

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

FACULTAD DE BIOLOGIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**METODOS ENZIMATICOS PARA LA DETERMINACION DE  
FOSFOLIPIDOS EN EL SURFACTANTE PULMONAR DE RATA.  
EFECTO DE LA HIPEROXIA SOBRE SU COMPOSICION LIPIDICA.**

José Antonio Encinar Hidalgo

1993

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

FACULTAD DE BIOLOGIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**METODOS ENZIMATICOS PARA LA DETERMINACION DE  
FOSFOLIPIDOS EN EL SURFACTANTE PULMONAR DE RATA.  
EFECTO DE LA HIPEROXIA SOBRE SU COMPOSICION LIPIDICA.**

Memoria presentada por José Antonio Encinar Hidalgo  
para optar al Grado de Salamanca.

1993

A mis padres.

"El laboratorio es una escuela del rigor, de la metodología científica, del contacto con el objeto de la investigación y con los objetos que su estudio exige. Nadie se convierte en investigador sin ese aprendizaje de la rutina, a menudo fastidiosa, a veces apasionante y pocas veces gratificante."

Jacques Testart

El embrión transparente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Prof. Dr. D. Marcial LLANILLO ORTEGA su dirección y disponibilidad a lo largo del desarrollo del trabajo, así como la labor de corrección de esta memoria. De igual modo a la Prof. Dra. D<sup>a</sup>. María Dolores LUDEÑA DE LA CRUZ por su labor de codirección, así como por su contribución en realizar el lavado broncoalveolar de los animales de experimentación; material que ha sido estudiado en este trabajo.

Al Prof. Dr. D. José Antonio CABEZAS FERNANDEZ DEL CAMPO por la acogida dispensada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

A la Dr. D<sup>a</sup>. Carmen GARCIA MATIAS, a D. Inocencio BURGOS GORJON y a D<sup>a</sup>. Margarita MORENO PEDRAZ por su contribución en realizar el lavado broncoalveolar.

Al Dr. D. Manuel URRUTIA, jefe del servicio de Urología del Hospital Clínico de Salamanca, por sus valiosos consejos sobre la metodología estadística más adecuada para analizar nuestros datos.

A D<sup>a</sup>. Elena DE LA CASA ESPERON y D<sup>a</sup>. Eva María MARTIN DE VALMASEDA por ayudarme a iniciar el trabajo de "cacharreo" en el laboratorio. A D. Amador FELIPE CONDE y a D. Juan Carlos AREVALO MARTIN por compartir su tiempo en trabajos comunes. Y a D<sup>a</sup>. Beatriz GAL IGLESIAS por su inestimable amistad.

Y a todos los demás miembros del Departamento con quienes he compartido numerosas horas de trabajo.

## **NOTA PRELIMINAR**

El presente estudio es continuación de una investigación iniciada hace varios años en nuestros laboratorios sobre la toxicidad pulmonar por elevadas concentraciones de oxígeno a presión atmosférica en el pulmón de rata. El trabajo se ha desarrollado, de manera conjunta, en los Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología y de Biología Celular y Patología de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Salamanca.

Esta investigación resulta de indudable interés, por la gran frecuencia con que se utiliza la oxigenoterapia en la clínica médica diaria, especialmente para tratar numerosos procesos cardiopulmonares y respiratorios de los adultos como el síndrome de distress respiratorio del adulto, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, insuficiencias respiratorias, etc. y también en niños recién nacidos, con patologías como la enfermedad de la "membrana hialina" o síndrome de distress respiratorio neonatal.

El trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, Ref. 93-0737.

MARCIAL LLANILLO ORTEGA Y MARIA DOLORES LUDEÑA DE LA CRUZ,  
PROFESORES TITULARES DE UNIVERSIDAD DE LOS DEPARTAMENTOS DE  
BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOLOGIA CELULAR Y PATOLOGIA,  
RESPECTIVAMENTE, DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICAN :

Que el trabajo titulado: "METODOS ENZIMATICOS PARA LA DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS EN EL SURFACTANTE PULMONAR DE RATA. EFECTO DE LA HIPEROXIA SOBRE LA COMPOSICION LIPIDICA." que para optar al GRADO DE SALAMANCA presenta D. José Antonio ENCINAR HIDALGO, ha sido realizado bajo nuestra dirección en los Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular (Unidad Biología) y Biología Celular y Patología (Facultad de Medicina) de la Universidad de Salamanca.

Considerando que dicho trabajo se encuentra concluido autorizamos su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Salamanca a 15 de Octubre de mil novecientos noventa y tres.

Fdo. Marcial Llanillo Ortega

Fdo. María Dolores Ludeña de la Cruz

## **ABREVIATURAS**

- AP. Ortofosforico-monoester fosfohidrolasa EC 3.1.3.1.= fosfatasa alcalina.
- CK. Colina fosfotransferasa, EC 2.7.1.32.= colina quinasa.
- CHEasa. Esterol-ester acilhidrolasa, EC 3.1.1.13. = colesterol esterasa.
- CHO.  $\Delta^5$ -colesterina-3 $\beta$ -ol= colesterol.
- CHOasa. Colesterol: oxígeno oxidorreductasa, EC 1.1.3.6.= colesterol oxidasa.
- DPPC. Dipalmitoilfosfatidilcolina.
- DPPG. Dipalmitoilfosfatidilglicerol.
- G. Glicerol.
- GK. ATP: glicerol 3-fosfotransferasa, EC 2.7.1.30.= glicerol quinasa.
- L. B. A. Lavado broncoalveolar.
- LDH. L-lactato:NAD<sup>+</sup> oxidorreductasa, EC 1.1.1.27.= lactato deshidrogenasa.
- p/p. peso/peso.
- p/v. peso/volumen.
- PC. Fosfatidilcolina.
- PE. Fosfatidiletanolamina.
- PEP. Fosfoenolpiruvato.
- PG. Fosfatidilglicerol.
- PI. Fosfatidilinositol.
- Pi. Fósforo.
- PiCh. Fosforilcolina.
- PK. Piruvato 2-O-fosfotransferasa, EC 2.7.1.40.= piruvato quinasa.
- PLasa C. Fosfatidilcolina colinafosfohidrolasa, EC 3.1.4.3.= fosfolipasa C.
- PLasa D. Fosfatidilcolina.fosfatidohidrolasa, EC 3.1.4.4.= fosfolipasa D.
- PLs. Fosfolípidos.
- Pox. NADH:hidrógeno-peróxido oxidorreductasa, EC 1.11.1.1.= peroxidasa.
- PS. Fosfatidilserina.
- RDS. Síndrome de dificultad respiratoria.
- SM. Esfingomielina.
- SMasa. Esfingomielina colinafosfohidrolasa, EC 3.1.4.12.= esfingomielinasa.
- TCL. Cromatografía en capa fina.
- v/v. volumen/volumen.
- SOD Superóxido dismutasa.

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	13
1.1. La ventilación pulmonar. ....	14
1.2. Unidad respiratoria. Algunos aspectos citológicos básicos. ..	14
1.3. Función del surfactante pulmonar. ....	16
1.4. Composición química del surfactante pulmonar. ....	18
1.5. Biosíntesis de los lípidos mayoritarios del surfactante. ....	22
1.6. Influencia de diversos factores en la producción de surfactante. ....	27
1.6.1. Efecto de algunas hormonas. ....	27
1.6.2. Efecto de otros agentes. ....	28
1.7. Evolución de la composición del surfactante pulmonar durante el desarrollo fetal y el periodo perinatal. ....	29
1.8. Algunos procesos causantes de cambios en el surfactante. ..	30
1.9. Influencia del oxígeno en el daño oxidativo. ....	32
1.9.1. Formación de radicales libres derivados de la molécula de oxígeno. Implicación de estos radicales en el daño oxidativo. ....	33
1.9.2. Mecanismos de protección frente a las reacciones provocadas por radicales libres. ....	37
1.9.2.1. Mediante sustancias antioxidantes. ....	37
1.9.2.2. Mediante reacciones de tipo enzimático. ....	39
1.9.3. Cambios morfológicos del pulmón asociados a situaciones experimentales de hiperoxia. ....	40
1.10. Objetivos. ....	44

	Pág.
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	47
2.1. Materiales y aparatos. ....	48
2.2. Reactivos. ....	48
2.3. Animales de experimentación. ....	48
2.4. Métodos. ....	50
2.4.1. Obtención del surfactante pulmonar. ....	50
2.4.2. Valoración de proteínas. ....	50
2.4.3. Valoración del colesterol. ....	50
2.4.4. Valoración del fósforo contenido en los lípidos totales. ....	51
2.4.5. Valoración de la fosfatidilcolina. ....	52
2.4.6. Valoración del fosfatidilglicerol. ....	53
2.4.7. Valoración de la esfingomielina. ....	54
2.4.8. Obtención de plaquetas. ....	55
2.4.9. Obtención de eritrocitos. ....	56
2.4.10. Extracción de lípidos totales de plaquetas. ....	56
2.4.11. Extracción de lípidos totales de eritrocitos. ....	56
2.4.12. Obtención de membranas de plaquetas enteras. ....	58
2.4.13. Obtención de membranas de eritrocitos. ....	58
2.4.14. Formación de liposomas. ....	58
2.5. Preparación de las muestras para el estudio de microscopia electrónica. ....	59
2.6. Tratamiento estadístico. ....	60
<b>3. RESULTADOS.</b>	61
3.1. Obtención de surfactante pulmonar. ....	62
3.2. Validez de los métodos enzimáticos para la cuantificación de algunas clases de fosfolípidos en materiales biológicos. ....	62

	Pág.
3.2.1. Valoración de la fosfatidilcolina. ....	62
3.2.1.1. En patrones de DPPC. ....	62
3.2.1.2. En lípidos procedentes de eritrocitos y plaquetas. ....	64
3.2.1.3. En membranas procedentes de eritrocitos y plaquetas. ....	64
3.2.2. Valoración de esfingomielina. ....	65
3.2.2.1. En patrones de esfingomielina. ....	65
3.2.2.2. En lípidos procedentes de eritrocitos y plaquetas. ....	66
3.2.2.3. En membranas procedentes de eritrocitos y plaquetas. ....	67
3.2.3. Valoración del fosfatidilglicerol. ....	68
3.2.3.1. En patrones de DPPG. ....	68
3.2.4. Valoración de colesterol. ....	70
3.3. Determinación de los principales fosfolípidos y del colesterol en el surfactante pulmonar procedente de ratas de diferentes edades. ....	70
3.3.1. Cuantificación del contenido en colesterol y fosfolípidos. ....	70
3.3.2. Estudio de la distribución porcentual de los principales fosfolípidos. ....	73
3.4. Efecto de la hiperoxia sobre la composición lipídica del surfactante pulmonar. ....	76
3.4.1. Estudio comparativo en ratas de la misma edad sometidas a condiciones de hiperoxia frente a ratas controles. ....	76
3.4.1.1. Estudio en animales de 2 días. ....	76
3.4.1.2. Estudio en animales de 7 días. ....	81
3.4.1.3. Estudio en animales adultos. ....	85
3.4.2. Estudio comparativo de la composición lipídica del surfactante pulmonar de ratas de diferentes edades sometidas a hiperoxia. ....	89

	Pág.
3.5. Estudio morfológico pulmonar. ....	94
3.5.1. Sobre ratas que han respirado aire atmosférico. ....	94
3.5.2. Sobre animales sometidos a hiperoxia normobárica.	98
<b>4. DISCUSION.</b>	<b>104</b>
4.1. Consideraciones acerca de la validez de los métodos enzimáticos propuestos para la cuantificación de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y esfingomielina en diferentes materiales biológicos. ....	105
4.2. Efecto de la edad sobre la composición lipídica del surfactante pulmonar de rata. ....	111
4.3. Efecto del tratamiento con hiperoxia normobárica sobre la composición lipídica del surfactante pulmonar de ratas de diferentes edades. Cambios morfológicos observados en los alveolos pulmonares. ....	114
<b>5. CONCLUSIONES.</b>	<b>120</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>122</b>
<b>7. APENDICE.</b>	<b>135</b>

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. LA VENTILACION PULMONAR.**

Se puede dividir el proceso de la respiración en tres etapas mecánicas principales, a saber, la ventilación pulmonar, que permite un flujo bidireccional de aire entre la atmósfera y los alveolos pulmonares, la difusión del O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> entre los alveolos y la sangre y el transporte de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en la sangre y en los líquidos corporales a todas las células del organismo, y viceversa (Guyton, 1988).

Los pulmones pueden contraerse y dilatarse gracias a dos tipos de movimientos, a saber, movimientos hacia arriba y hacia abajo del diafragma, que alargan y acortan la cavidad torácica, y movimientos por elevación y depresión de las costillas, de modo que se aumenta y disminuye el diámetro anteroposterior de la cavidad torácica (Guyton, 1988). Cuando la respiración es tranquila, y en individuos normales, los movimientos del diafragma son los responsables de su ejecución. En la inspiración tira de las superficies pulmonares hacia abajo, y en la espiración el retroceso elástico de los pulmones, de la pared del tórax y de las estructuras abdominales, por su simple relajación, hacen que los pulmones se contraigan. Durante la respiración intensa se requiere una velocidad de espiración que no puede ser producida por las fuerzas elásticas antedichas, y que requiere el concurso de los músculos abdominales, que fuerzan el contenido del abdomen hacia afuera contra el fondo del diafragma (Guyton, 1988).

Durante la inspiración, la presión intraalveolar disminuye ligeramente respecto a la atmosférica, y permite que el aire entre por las vías respiratorias. Al contrario, durante la espiración aumenta, y ello hace salir el aire al exterior (Guyton, 1988).

### **1.2. UNIDAD RESPIRATORIA. ALGUNOS ASPECTOS CITOLOGICOS BASICOS.**

Los pulmones son los órganos encargados de llevar a cabo la función respiratoria en los organismos. Están formados esencialmente por tejido respiratorio esponjoso, en el cual se producen los intercambios gaseosos entre la sangre y el aire, y un sistema ramificado de tubos aéreos denominados bronquiolos y bronquios, por los cuales "entra y sale" el aire de las bolsas aéreas del tejido respiratorio esponjoso. La unidad respiratoria incluye un bronquiolo respiratorio, conductos alveolares, atrios o vestíbulos, y sacos alveolares o alveolos (Guyton, 1988).

Los alveolos representan unos 250 millones en los dos pulmones de los seres humanos, con diámetro medio de 0,1 mm por alveolo. Están recubiertos de una capa continua de epitelio, suficientemente fina como para permitir el intercambio gaseoso. Los gases alveolares se hallan en estrecha proximidad con la sangre de los capilares, de forma tal, que el intercambio gaseoso entre el aire alveolar y la sangre pulmonar se produce a través de las membranas de todas las porciones terminales de los pulmones. Estas membranas en conjunto se denominan membranas respiratorias o membrana pulmonar. El análisis estructural de la membrana respiratoria muestra las siguientes capas: 1) Una capa monomolecular de sustancia tensioactiva, lipoproteína que se difunde sobre la superficie de líquido que reviste el alveolo, el surfactante pulmonar; 2) Una capa muy delgada de líquido que recubre el alveolo; 3) El epitelio alveolar formado de células epiteliales muy delgadas; 4) Un espacio intersticial entre el epitelio alveolar y la membrana capilar; 5) Una membrana basal capilar y 6) La membrana endotelial capilar. A pesar del número elevado de capas, el espesor global de la membrana respiratoria oscila entre 0,1-1  $\mu\text{m}$ .

El epitelio alveolar está compuesto de dos tipos de células, vinculadas por uniones herméticas, que recubren de forma continua el saco alveolar. Las más importantes son las planas y reciben el nombre de neumocitos de tipo I. Entre ellas se intercalan otras células secretoras de mayor tamaño, menos numerosas, conocidas como neumocitos de tipo II. Las células planas son las encargadas de permitir la difusión de gases a través de su citoplasma, en tanto que los neumocitos de tipo II tienen una función esencialmente secretora, por lo que su actividad metabólica es más intensa que en las células de tipo I. Cuando los neumocitos de tipo I son dañados por sustancias citotóxicas o por altas presiones de oxígeno, se forman nuevas células de tipo I a partir de los neumocitos de tipo II.

Los neumocitos tipo II constituyen entre el 10-15 % de las células pulmonares (Batenburg, 1984). Son células redondeadas y bastante grandes, ricas en retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y peroxisomas. Su citoplasma tiene un alto contenido en corpúsculos lamelares, que son un reservorio intracelular de surfactante. Estos orgánulos son estructuras hemiesféricas de material membranoso, dispuesto en torno a una matriz amorfa, situada en posición excéntrica. El material almacenado está formado casi exclusivamente por fosfolípidos cuya composición es semejante al surfactante pulmonar, y difiere de otras fracciones subcelulares en su composición. Diversos autores han estudiado la composición en fosfolípidos de

los cuerpos lamelares procedentes de diversas especies (Hallman y Gluck, 1975; Post et al, 1982; Magoon et al, 1983). En todos los casos se observa la predominancia de la fosfatidilcolina sobre el resto de los fosfolípidos, y un alto contenido de fosfatidilglicerol, que es considerado como marcador químico de esta fracción subcelular, si bien su porcentaje es algo inferior al que se encuentra en el surfactante pulmonar.

En los cuerpos lamelares se han detectado numerosas enzimas implicadas en el metabolismo del surfactante pulmonar, aunque tanto su actividad específica como total es muy baja. Por esta razón, se considera que la contribución de estos orgánulos al proceso de biosíntesis de los componentes del surfactante debe ser muy escasa (Hallman y Gluck, 1975).

Los cuerpos lamelares aparecen en el pulmón en las fases finales de la gestación, coincidiendo con el aumento en la síntesis de fosfolípidos. En la síntesis de estos lípidos participan el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, siendo los cuerpos lamelares el reservorio intracelular del surfactante donde se almacena este material hasta que es excretado al espacio alveolar extracelular (Haagsman y van Golde, 1991).

Otras células pulmonares, como las células de Clara, situadas al final de los bronquiolos terminales, o los macrófagos alveolares no están implicados en la síntesis del surfactante, sino en su degradación (Rashmi, 1978). Actualmente se piensa que los macrófagos alveolares provienen de los monocitos que llegan a la pared alveolar por la corriente sanguínea, salen del capilar y emigran a través del epitelio para llegar al interior de un alveolo. Son células bastante grandes y redondeadas, distintas a los neumocitos tipo II, que sobresalen de las paredes alveolares al interior del espacio alveolar. Estas células también se observan libres en dicho espacio. Se trata de unas células que eliminan partículas de polvo y otros residuos que penetran en los espacios alveolares. Se desplazan por las vías aéreas hasta llegar a los bronquiolos y después a los bronquios, donde son impulsados por los cilios. También pueden ser expulsados al exterior o deglutidos.

### **1.3. FUNCION DEL SURFACTANTE PULMONAR.**

La existencia del surfactante pulmonar fue sugerida en 1929 por von Neergard, aunque no se demostró su existencia hasta 30 años después por Pattle (1955). Avery y Mead (1959) ponen de manifiesto su importancia al demostrar que el síndrome de dificultad respiratoria (SDR) es causado por deficiencias en el mismo.

El surfactante pulmonar es un fluido que recubre la parte externa de las paredes alveolares pulmonares, abscribiéndose a la interfase aire-líquido de las mismas, y cuya característica más destacable es su elevada actividad como agente tensioactivo. Su principal función es disminuir la tensión superficial de los líquidos que recubren los alveolos pulmonares, y ello porque disminuye las fuerzas de atracción entre sus moléculas. En su ausencia, la tensión superficial es de unas 50 dinas/cm<sup>2</sup>, que se queda reducida en su presencia a valores entre 5-30 dinas/cm<sup>2</sup>, lo que hace la expansión pulmonar mucho más fácil (Guyton, 1988).

Dado que la presión intracelular (P) responde a la ley de Laplace, expresada como  $P=2T/R$ , donde T es la tensión superficial y R el radio alveolar, de ello se deduce que, la tensión superficial es inversamente proporcional al radio del alveolo y directamente proporcional a la presión del gas en la esfera, de tal modo que al disminuir el radio aumenta la tensión superficial, y los alveolos más pequeños serán los más proclives a colapsarse. Esto último es evitado por la presencia del surfactante que mantiene la tensión superficial por debajo de las 10 dinas/cm<sup>2</sup>, ya que se concentra de forma especial en la superficie de estos alveolos. En los alveolos grandes se disemina en una capa más delgada en la superficie del líquido alveolar.

Durante el periodo respiratorio, la diferencia de presiones intraalveolares entre los alveolos de distinto tamaño, determinaría también el colapso de los más pequeños. En este caso, el surfactante hace posible la existencia de presiones intraalveolares idénticas al disminuir más en los pequeños la tensión superficial, contribuyendo así al mantenimiento de la integridad estructural de los diferentes alveolos. Por otra parte, impide junto con la presión oncótica del plasma, la salida de líquido desde la circulación pulmonar a las cavidades alveolares. Por tanto, el surfactante es un agente antiatelectásico y antiedematoso (King, 1974; Casals, 1983; Roberston y van Golde, 1984).

El líquido surfactante interviene además en el transporte de sustancias extrañas desde los alveolos hasta los conductos aéreos ciliados, por lo que constituye una barrera de protección frente a agentes nocivos tales como sustancias químicas y bacterias. También está implicado en los procesos quimiotácticos, ya que los fosfolípidos del surfactante atraen a los macrófagos alveolares y les inducen a secretar una proteína que incrementa la monocitopoyesis durante la inflamación pulmonar (Leland, 1989).

#### **1.4. COMPOSICION QUIMICA DEL SURFACTANTE.**

La composición del surfactante pulmonar "in vivo" se desconoce. Sin embargo, se ha estudiado la composición de surfactantes pulmonares obtenidos mediante lavados broncoalveolares con soluciones salinas de NaCl y posterior purificación mediante diversos métodos: centrifugaciones diferenciales (Harwood et al, 1975; Adachi et al, 1989), centrifugaciones en gradientes de NaBr (King y Clements, 1972a) o de sacarosa.

En el pulmón fetal, el surfactante pulmonar está en comunicación directa con el líquido amniótico, siendo expulsado de los pulmones al mismo durante los movimientos respiratorios del feto. Por lo tanto, el líquido amniótico es una fuente adicional de surfactante, a partir del cual puede ser purificado por métodos apropiados. El análisis de la razón molar PC/SM en el líquido amniótico es usado como un test para conocer la maduración pulmonar del feto (Rooney, 1979).

El estudio de la composición química en surfactante procedente de lavado broncoalveolar realizado en diferentes especies (King y Clements, 1972b; Harwood et al, 1975), muestra un predominio de la porción lipídica (79-90 %) sobre la parte proteica (18-28 %), detectándose trazas de glúcidos. Dentro de los compuestos lipídicos, el 80-90 % corresponde a los fosfolípidos y el resto se reparte entre los lípidos neutros y cantidades trazas de glicolípidos (Rooney, 1984).

La composición en fosfolípidos del surfactante de diversas especies se recoge en la tabla inferior (datos tomados de Suckling y Harwood, 1986). La fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido más abundante, ya que representa el 78-91% de los fosfolípidos totales. El fosfatidilglicerol (PG) es el segundo fosfolípido más abundante (5-6 % del total), y es característico de este líquido biológico y de los cuerpos lamelares, donde llega a representar hasta un 13 % de los fosfolípidos, apareciendo también en otros tejidos animales, pero siempre en proporciones traza. Este fosfolípido aumenta la fluidez de las moléculas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), por lo que su presencia es crítica para la estabilidad alveolar (Sanders y Longmore, 1975). De hecho el PG se encuentra ausente en pulmones inmaduros. Hallman y Epstein (1980) y Bleasdale y Johnston (1982) hacen hincapié en la relación existente entre la razón fosfatidilglicerol/fosfatidilinositol en la maduración fetal del pulmón y ciertas enfermedades de carácter respiratorio. Cuando el pulmón fetal está maduro, la razón se incrementa, mientras que en estados de inmadurez

desciende. El resto de los fosfolípidos (fosfatidiletanolamina, esfingomiélinea, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y lisoderivados) están escasamente representados en este líquido biológico, aunque tanto la fosfatidiletanolamina como la esfingomiélinea, son fosfolípidos cuantitativamente importantes en el tejido pulmonar. Estudios recientes indican que el fosfatidilinositol puede reemplazar al fosfatidilglicerol sin afectar de modo importante a las propiedades fisiológicas y fisicoquímicas del surfactante (Haagsman y van Golde, 1991).

#### COMPOSICIÓN LIPÍDICA DEL SURFACTANTE PULMONAR DE DIFERENTES ESPECIES

(según Suckling y Harwood, 1986)

Lípidos (%)	Especie animal				
	Perro	Hombre	Cerdo	Rata	Conejo
Fosfolípidos	78	81	85	84	91
Lípidos neutros	22	18	15	16	9
<u>Fosfolípidos (%)</u>					
Fosfatidilcolina	78	81	85	84	91
Fosfatidiletanolamina	9	6	8	6	3
Esfingomiélinea	4	6	3	2	2
Fosfatidilglicerol	5	6	3	6	3
Fosfatidilserina (PS)	1			1	
Fosfatidilinositol (PI)	2			3	
PS + PI		5	4		5
Otros	5	10	3	Trazas	2

La fracción de lípidos neutros está constituida principalmente por colesterol, que es el más abundante (Haagsman y van Golde, 1991), junto con colesterol esterificado, que es un componente minoritario, ácidos grasos libres y acilglicéridos (King y Clements, 1972b; Harwood et al, 1975).

Harwood et al (1975) han encontrado diferencias significativas en la composición lipídica del surfactante pulmonar entre diferentes especies, aunque como ya se ha señalado, todos contienen elevadas cantidades de fosfatidilcolina, la cual es capaz de generar bajas tensiones superficiales. También existen diferencias interespecíficas en la proporción de fosfatidilcolina saturada (véase Tabla, datos tomados de Suckling y Harwood, 1986).

COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LA FOSFATIDILCOLINA  
PROCEDENTE DEL SURFACTANTE PULMONAR DE DIFERENTES  
ESPECIES. (según Suckling y Harwood, 1986)

Especie	ÁCIDO GRASO (%)						
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	Otros
Perro	5	67	4	7	10	1	6
Hombre	3	81	6	3	5	2	Trazas
Cerdo	5	73	6	3	10	1	2
Rata	2	80	1	2	6	6	3
Conejo	2	63	6	3	15	11	Trazas
Pavo	2	86	-	4	6	2	Trazas

El ácido palmítico es el ácido graso más abundante en la molécula de fosfatidilcolina por lo que la molécula de dipalmitoilfosfatidilcolina es el componente mayoritario del surfactante.

La formación rápida de la película superficial del surfactante sobre los alveolos requiere el concurso de proteínas específicas. La nomenclatura propuesta por Possmayer (1988) para la clasificación de las proteínas que forman parte del surfactante, es la aceptada actualmente, y estas se han separado convencionalmente en dos grupos dependiendo de su solubilidad. Las proteínas solubles en agua (SP-A y SP-D) se parecen a las proteínas del colágeno y pertenecen a las lectinas de tipo C. Las proteínas solubles en disolventes orgánicos (SP-B y SP-C) aportan características importantes a la funcionalidad del surfactante. Estas cuatro clases de proteínas se sintetizan en los neumocitos tipo II, colaborando también las células de Clara en la síntesis y liberación de las proteínas SP-A y SP-B (Hawgood y Schieffer, 1991).

La proteína SP-A está formada por 284 aminoácidos, para la que se han propuesto dos secuencias diferentes, que sólo difieren en 7 residuos (Hawgood y Schieffer, 1991). Es posible que ambas secuencias proteicas estén codificadas por dos genes distintos localizados en el brazo corto del cromosoma 10. En su secuencia podemos distinguir cuatro regiones. Una primera región N-terminal, donde se localiza el péptido señal, que es eliminado después de la secreción. Dicha región contiene un sitio potencial de N-glicosilación de la proteína, que ha sido hallado tanto en perro como en rata, sin embargo no se ha detectado en la especie humana ni en el conejo. La proteína presente en la especie humana contiene dos cisteínas, mientras que las proteínas procedentes de otras especies, sólo contienen un resto que permite el establecimiento de un puente

disulfuro con otra subunidad. Por tanto, la proteína madura se presenta en forma oligomérica. La segunda región se caracteriza por poseer 23 secuencias del tipo glicina-X-Y, donde X es cualquier aminoácido e Y hidroxiprolina, en 13 de las 23 posiciones. Esta homología sugiere que la región se pliega en triple hélice (Hawgood y Schieffer, 1991). Seis de los aminoácidos diferentes de las dos secuencias conocidas se encuentran en esta región. La tercera región consta de 24 aminoácidos, y en ella podría estar localizado el punto de unión con los fosfolípidos (Ross, 1986). La cuarta región, que incluye el extremo C-terminal, posee 124 aminoácidos.

En la proteína aislada a partir de células de tipo II cultivadas procedentes de rata, se ha detectado un oligosacárido sulfatado unido a una asparagina. Dicho oligosacárido presenta diferente movilidad electroforética, lo que implica variaciones en su carga que podrían ser debidas al número de ácidos siálicos existentes en su molécula. Dicho oligosacárido no ha podido ser detectado en sistemas "in vivo".

La estequiometría de los fosfolípidos unidos a la proteína SP-A en el surfactante aislado es aproximadamente de 30:1 (p/p), estando afectadas las funciones de dicho complejo macromolecular por la presencia de calcio a concentraciones entre  $10^{-6}$  y  $10^{-3}$  M. La principal función conocida de dicha proteína es permitir una rápida absorción de los fosfolípidos para formar la monocapa que rodea al líquido alveolar.

La proteína SP-D aunque es secretada por los neumocitos tipo II, aún resulta controvertida su asociación al surfactante pulmonar, ya que no se han descrito propiedades relacionadas directamente con él. En su forma monomérica tiene un tamaño de 43 kDa y, al igual que SP-A, pertenece a la familia de las lectinas de tipo C (Hawgood y Schieffer, 1991). El surfactante pulmonar desprovisto de esta proteína no experimenta cambios significativos en su tensión superficial con respecto a aquel que la contiene (Persson, 1990). Es posible que la proteína SP-D, al igual que otras lectinas de tipo C ricas en secuencias glicina-X-Y, desempeñe un papel como mediadora en la respuesta inmune (Thiel, 1989).

La proteína SP-B está codificada en la especie humana por un gen que se encuentra en el cromosoma 2 y que posee 11 exones. Se conocen dos secuencias de aminoácidos que únicamente difieren en un aminoácido, treonina por isoleucina. Se sintetiza como una preproteína de 381 aminoácidos, que después de procesada contiene 79 restos. Los aminoácidos 20-23 de su

secuencia probablemente sirven como péptido señal (Hawgood y Schieffer, 1991).

La proteína SP-C está codificada por un gen que en humanos se encuentra en el cromosoma 8. Se traduce en una preproteína de 193 aminoácidos, que después de su procesamiento da lugar a una forma activa de 35 kDa. La mayoría de sus aminoácidos son hidrofóbicos, aunque los 12 residuos del extremo N-terminal poseen restos hidrofílicos que contienen un par formado por lisina-arginina. Los 23 aminoácidos restantes son de naturaleza apolar. El dominio hidrofóbico podría interaccionar con las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos del surfactante y el par de residuos básicos con grupos cargados o iones.

Tanto la proteína SP-B como la proteína SP-C promueven la formación de la película superficial de fosfolípidos por disrupción de las membranas que forman los cuerpos lamelares, posiblemente por un mecanismo similar al implicado en la disrupción y fusión de membranas artificiales (Schurch y Goerke, 1976).

### **1.5. BIOSINTESIS DE LOS LIPIDOS MAYORITARIOS DEL SURFACTANTE.**

Los fosfolípidos son sintetizados en el retículo endoplásmico de los neumocitos de tipo II, de donde pasan al aparato de Golgi para ser incorporados posteriormente a los cuerpos lamelares en crecimiento que darán lugar finalmente a los cuerpos lamelares maduros. Aunque estos lugares son considerados como sitios de almacenamiento, no se descarta la posibilidad de que exista una síntesis, al menos parcial, de algunos fosfolípidos como la fosfatidilcolina (Spitzer et al, 1975) o el fosfatidilglicerol. El movimiento de los fosfolípidos dentro de las células alveolares de tipo II puede verse facilitado por proteínas transportadoras específicas para el fosfatidilglicerol y la fosfatidilcolina (Jobe et al, 1985).

Estudios llevados a cabo por Jobe et al (1985) en el pulmón de conejo han demostrado que los precursores radiactivos de los fosfolípidos muestran su máxima incorporación a los 30 min en el retículo endoplásmico, a las 2 horas en los cuerpos lamelares y a las 9 horas en el surfactante pulmonar.

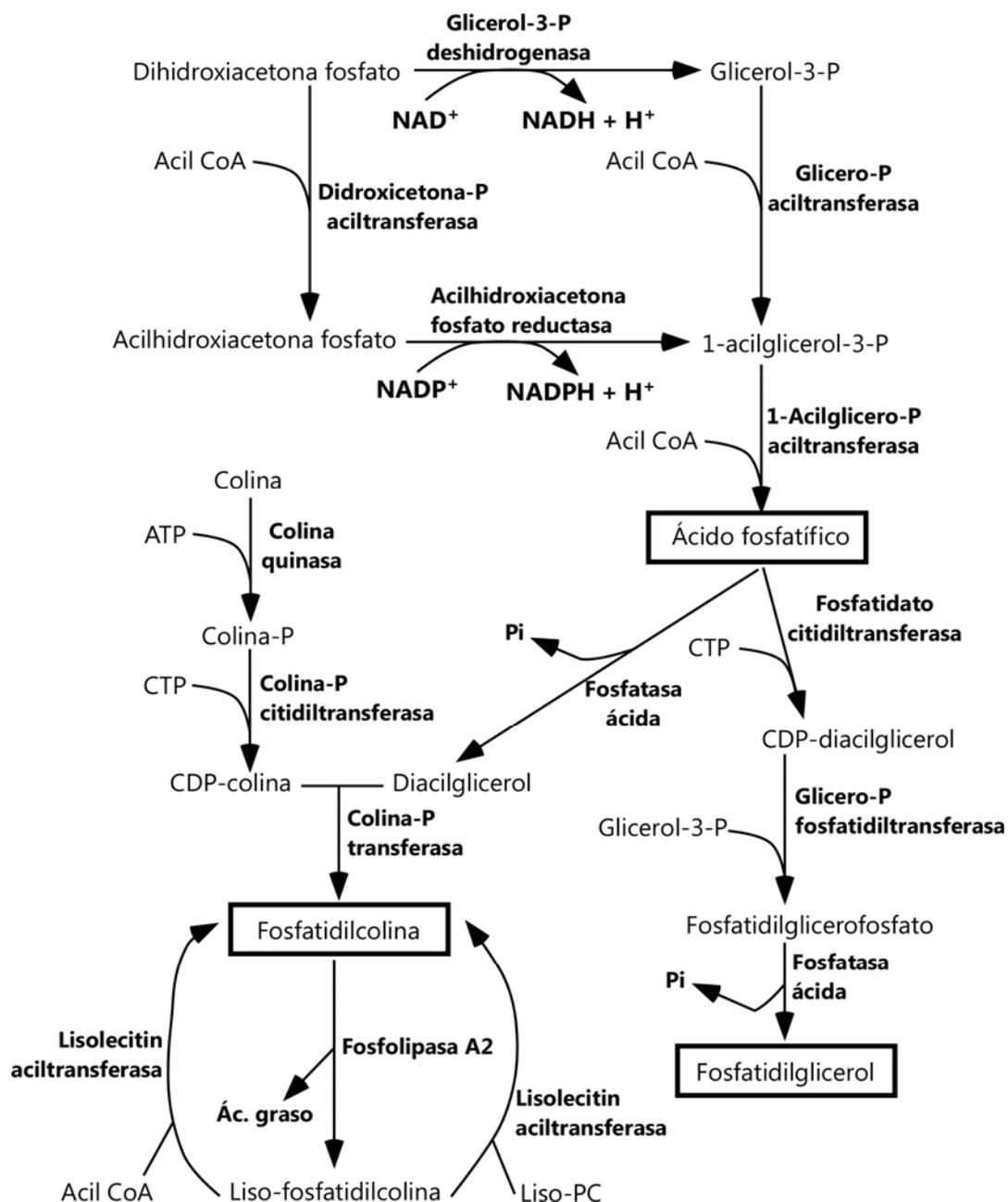
Para la biosíntesis de los fosfolípidos se requieren los siguientes sustratos: ácidos grasos, colina, inositol y glicerol a partir de los cuales se forma la columna vertebral de las moléculas fosfolipídicas. La glucosa es la principal

fuelle de formación de glicerol. Esta molécula es tomada directamente de la sangre en los pulmones adultos, mientras que en los fetos se obtiene por degradación del glucógeno (Tierney, 1974; Batenburg, 1984). Los ácidos grasos pueden ser de origen exógeno o endógeno. La principal fuente de ácidos grasos exógenos la constituyen los ácidos grasos libres en la sangre, y en menor proporción los triacilgliceroles contenidos en las lipoproteínas circulantes. El pulmón posee la capacidad de sintetizar activamente ácidos grasos a partir de acetato y malonil Co-A. El principal producto de la síntesis de "novo" es el palmitato (Batenburg, 1984). Actualmente se desconoce en qué medida contribuyen los ácidos grasos sintetizados de manera endógena a la síntesis de fosfolípidos del surfactante. El plasma sanguíneo parece ser la fuente de aprovisionamiento de colina (Batenburg, 1984). El inositol puede ser sintetizado a partir del plasma, o bien captado del medio extracelular con ayuda de una "bomba de Na<sup>+</sup>" específica, como se ha demostrado en el pulmón de conejos adultos y de fetos (Batenburg, 1984).

La síntesis de "novo" de fosfolípidos en el surfactante comienza con la formación del ácido fosfatídico a partir de ácidos grasos y un precursor de la molécula de glicerol (véase esquema de biosíntesis de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol).

### **Síntesis de ácido fosfatídico.**

El primer glicerofosfátido originado en la ruta de biosíntesis de los fosfolípidos del surfactante es el ácido fosfatídico. Este fosfolípido resulta de la acilación del 1-acilglicerol-3-P, el cual se ha formado a partir de dihidroxiacetona fosfato por dos mecanismos distintos: i) por reducción de la hidroxiacetona fosfato a glicerol-3-P y posterior acilación, o ii) por acilación de la molécula de hidroxiacetona fosfato y reducción posterior (véase esquema). Ambas rutas de síntesis parecen ser operativas en el pulmón (Rooney, 1984). Mason (1978) ha demostrado que la ruta de la acildihidroxiacetona fosfato es responsable de aproximadamente el 60 % de la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol en los neumocitos de tipo II aislados de pulmón de rata. También se ha observado que la dihidroxiacetona aciltransferasa y la glicerofosfato aciltransferasa son actividades asociadas a una misma enzima (Schlossman y Bell, 1977).



**ESQUEMA 1:** Rutas de biosíntesis de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol del surfactante pulmonar (según Rooney, 1984).

### **Síntesis de fosfatidilcolina.**

El ácido fosfatídico es defosforilado por la acción de la enzima ácido fosfatídico fosfatasa, rindiendo diacilglicerol que será utilizado para la síntesis de la fosfatidilcolina. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida por el pulmón, donde han sido identificadas cuatro formas moleculares (Batenburg, 1984). Actualmente se desconoce cuál de ellas está relacionada con la síntesis de fosfatidilcolina del surfactante. El diacilglicerol reacciona con la colina en su forma activa, como CDP-colina, para formar fosfatidilcolina. Esta reacción es catalizada por la fosfocolina transferasa (fosfocolina citidiltransferasa), que parece que tiene un importante papel en la regulación de la síntesis de fosfatidilcolina. Su actividad se encuentra incrementada al final de la gestación e inmediatamente después del nacimiento, que es cuando comienza la producción mayoritaria de surfactante (Rooney, 1984; Haagsman y van Golde, 1991). Esta enzima es estimulada por glucocorticoides y estrógenos.

Este fosfolípido también puede ser sintetizado a partir de CDP-etanolamina. En este caso, la molécula de S-adenosilmetionina actúa como donadora de grupos metilo, pero esta ruta tiene escasa importancia en la síntesis del surfactante pulmonar (Rooney, 1984).

Tanto en el pulmón como en otros órganos, la fosfatidilcolina sintetizada de "novo" está saturada en posición 1 e insaturada en posición 2. Inicialmente se pensó que la forma diesterificada no se sintetizaba de "novo", sino que resultaba de la modificación de la Liso-PC (Sarzal y van Golde, 1976), sin embargo, trabajos posteriores han puesto de manifiesto que sí hay síntesis de "novo" de las especies diesterificadas (Miller y Weinhold, 1987; van Heusden et al, 1987).

La modificación de la fosfatidilcolina diesterificada se lleva a cabo por desacilación y posterior reacilación de la Liso-PC. La desacilación está catalizada por la fosfolipasa A2, y la reacilación puede ocurrir por dos mecanismos: i) a partir de Acil CoA, catalizado por la lisolecitina aciltransferasa, o bien, ii) catalizado por lisolecitina: lisolecitina aciltransferasa, en la que dos moléculas de Liso-PC reaccionan para formar una molécula de fosfatidilcolina diesterificada y otra molécula de glicerofosfocolina. Al parecer, en las células de tipo II de rata, el primer mecanismo es cuantitativamente más importante.

### **Síntesis de fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol.**

El fosfatidilglicerol se sintetiza a partir de ácido fosfatídico en los microsomas. La fosfatidato citidiltransferasa cataliza la formación del CDP-diacilglicerol, que reacciona con el glicerol-3-P, para formar el fosfatidilglicerofosfato, que es rápidamente desfosforilado para formar fosfatidilglicerol. El CDP-diacilglicerol es también precursor de la síntesis de fosfatidilinositol. El aumento de fosfatidilglicerol va acompañado por un descenso en la concentración de fosfatidilinositol en el surfactante pulmonar (Hallman y Gluck, 1980).

Inicialmente se pensó que el surfactante se sintetizaba en los cuerpos lamelares, ya que dichos orgánulos contienen numerosas enzimas relacionadas con la biosíntesis de fosfolípidos (Rooney, 1984). Sin embargo, estudios autorradiográficos indican que la síntesis de "novo" de fosfatidilcolina ocurre en el retículo endoplásmico de las células de tipo II, siendo almacenada en los cuerpos lamelares, para ser posteriormente liberada en la superficie alveolar. El transporte del fosfolípido desde el retículo endoplásmico hasta los cuerpos lamelares está mediado por proteínas (van Golde, 1985). La conversión del CDP-diacilglicerol a fosfatidilinositol que es catalizada por la CDP-diacilglicerol: inositol transferasa, tiene lugar en el retículo endoplásmico (van Golde, 1985). Mientras que la transformación del CDP-diacilglicerol en fosfatidilglicerol ocurre tanto en las mitocondrias como en los microsomas (van Golde, 1985).

La biosíntesis del resto de los fosfolípidos minoritarios del surfactante (fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina) está poco estudiada. Por lo que respecta al colesterol del surfactante, tan solo el 1 % procede de la síntesis endógena y el resto es captado directamente de las lipoproteínas circulantes (HDL y LDL) (van Golde, 1985). De hecho, los niveles de estas lipoproteínas en la sangre regulan la síntesis endógena del colesterol en las células tipo II.

Estudios llevados a cabo por Tierney (1974) y Jobe et al (1985) han permitido conocer el tiempo de recambio de los principales fosfolípidos que forman parte del surfactante. El fosfatidilglicerol tiene una vida media de 10-14 horas. Este tiempo de recambio aumenta de forma progresiva en el caso de la fosfatidilcolina (16-17 h), el fosfatidilinositol (20-36 h) y el grupo de fosfatidiletanolamina + fosfatidilserina (57-88 h). Dichos tiempos de recambio se acortan en los fosfolípidos procedentes de los cuerpos lamelares. Dado que la síntesis de recambio y remplazamiento del fosfatidilglicerol y la fosfatidilcolina del surfactante en sus lugares de síntesis y en los cuerpos

lamelares son relativamente rápidos, la aparición de ciertas alteraciones patológicas puede tener graves repercusiones sobre el metabolismo del pulmón, lo que puede ocasionar cambios importantes en la composición química del surfactante (Morgan, 1971).

## **1.6. INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES EN LA PRODUCCION DE SURFACTANTE.**

### **1.6.1. Efecto de algunas hormonas.**

Diversas hormonas aceleran la maduración pulmonar y estimulan la biosíntesis de surfactante en el feto.

Numerosos trabajos publicados coinciden en que la administración de glucocorticoides supone una aceleración de la maduración morfológica y un incremento de la cantidad de fosfolípidos en L. B. A. No obstante, los datos recogidos son dispares en cuanto a los efectos que supone la administración de estas hormonas en la actividad de las diversas enzimas implicadas en la biosíntesis de los fosfolípidos. Estas diferencias que pueden ser explicadas por la diversidad en las condiciones experimentales planteadas, tales como, estudio en diferentes especies, administración de diferentes tipos de glucocorticoides y empleo de diferentes dosis, o variaciones en la edad de los animales de experimentación, etc. De forma general se observa, que las enzimas que incrementan su actividad durante el desarrollo normal, también la aumentan como consecuencia de la administración de estas hormonas. Los glucocorticoides endógenos son los implicados en el control fisiológico de la madurez pulmonar fetal (Rooney, 1984).

La administración de tiroxina a fetos de conejo acelera la maduración pulmonar desde el punto de vista morfológico e incrementa la cantidad de fosfolípidos en el L. B. A. (Rooney, 1984). Estos datos sugieren que las hormonas tiroideas juegan un papel importante en la maduración del pulmón fetal. En adultos, los datos son contradictorios. Redding et al (1972) encuentran que la administración de tiroxina a ratas adultas incrementa el contenido en surfactante en el L. B. A., y el número de cuerpos lamelares en las células tipo II; mientras que Mason et al (1972) no detectan tales efectos.

Por lo que a la administración de la hormona liberadora de tirotropina (THR) se refiere, los fetos de conejo tratados con dicha hormona también responden con un incremento de la cantidad de surfactante en el L.B.A., aunque este efecto no va acompañado de la utilización de colina para la síntesis de

fosfatidilcolina, lo que sugiere que su efecto consiste en estimular la secreción del surfactante (Rooney, 1979). Kumar y Hedge (1983) han observado un descenso en la concentración de fosfolípidos del surfactante en casos de hipotiroidismo y un aumento por hipertiroidismo.

El desarrollo bioquímico del pulmón fetal se ve también afectado por los andrógenos y estrógenos. Los estrógenos intervienen en la prevención del RDS (Rooney, 1984).

La administración de prolactina ovina a los fetos de conejo produce un incremento en la concentración de los fosfolípidos totales y de la fosfatidilcolina en el pulmón (Hamosh et al, 1978a), estimulándose también la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol en el caso de las células tumorales de tipo II que reciben dicha hormona (Porreco et al, 1980). Sin embargo otros autores encuentran resultados contrarios a los anteriormente expuestos ante la presencia de dicha hormona (Rooney, 1984).

La ACTH acelera la maduración pulmonar en los corderos, así como el factor de crecimiento epidérmico, que produce la maduración pulmonar en el feto de conejo (Rooney, 1984).

### **1.6.2. Efecto de otros agentes.**

La administración de aminofilina (un inhibidor de la fosfodiesterasa, que produce un aumento en los niveles endógenos de AMPc) a fetos de conejo, provoca un incremento en la cantidad de fosfolípidos en el L.B.A. y un aumento en la velocidad de incorporación de los precursores de esos fosfolípidos, disminuyendo el contenido de glucógeno (Rooney, 1984).

La administración intraperitoneal de AMPc a fetos de conejo produce el efecto indicado en el caso de la administración de aminofilina, aumento de la cantidad de fosfolípidos en el L.B.A.

Diversos trabajos han demostrado que los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos estimulan la síntesis de componentes lipídicos del surfactante, tanto en fetos como en adultos de diversas especies (Rooney, 1984). Esta acción podría ser debida al aumento de AMPc, que se produce a consecuencia de la presencia de estos agonistas.

Los agonistas colinérgicos también estimulan la producción de surfactante mediante una actuación indirecta, ya que su efecto está mediado por las catecolaminas, que son liberadas por la médula adrenal en respuesta a la

estimulación colinérgica, las cuales actúan directamente sobre el pulmón o las células de tipo II (Rooney, 1984).

Las prostaglandinas desempeñan un papel fisiológico en la producción del surfactante en el pulmón del neonato y en los animales adultos (Clements et al, 1981; Rooney, 1984).

La administración de heroína a fetos de conejo acelera su maduración pulmonar (Taeusch et al, 1973). De hecho, Glass (1971) encuentra que los hijos de madres adictas a la heroína no presentan el "síndrome de deficiencia respiratoria" del recién nacido. Sin embargo, la heroína no afecta a la velocidad de incorporación de colina para formar fosfatidilcolina en las células de tipo II procedentes de conejo, por lo que su acción debe de ser de naturaleza indirecta.

La colchicina y la vimblastina también inhiben la producción de fosfatidilcolina en el surfactante procedente de conejos recién nacidos, así como en hámster y ratas (células de tipo II) adultas (Rooney, 1984), lo que sugiere un posible papel de los microtúbulos en la producción del surfactante.

Así mismo, la utilización de anestésicos comunes a las concentraciones usualmente empleadas, también tiene pequeños efectos sobre la síntesis del surfactante (Pattle et al, 1972).

### **1.7. EVOLUCION DE LA COMPOSICION DEL SURFACTANTE PULMONAR DURANTE EL DESARROLLO FETAL Y EL PERIODO PERINATAL.**

Al final de la gestación es cuando tiene lugar un incremento importante de la biosíntesis de los componentes del surfactante en el pulmón fetal.

En el conejo, se produce un incremento desde el 29% al 79% en el porcentaje de fosfatidilcolina entre los días 27 al 31 de la gestación. A partir de este momento, el porcentaje de este fosfolípido se mantiene constante, en cifras similares a las detectadas en el adulto. El aumento en el contenido de fosfatidilcolina va asociado con un descenso en el porcentaje de esfingomielina, lo que se traduce en un incremento dramático de la razón molar PC/SM (Rooney, 1984).

En el líquido amniótico humano se observan cambios en el perfil de fosfatidilinositol durante la gestación. Hay un incremento de este fosfolípido después de la semana 30, para descender después de la semana 35, a partir de

la cual se observa un incremento en el contenido de fosfatidilglicerol, fosfolípido que está ausente o escasamente representado en el surfactante pulmonar de niños con SDR. En el tejido pulmonar también hay un aumento del contenido en fosfatidilcolina durante el desarrollo fetal, aunque este es cuantitativamente menor que el detectado en L.B.A.

El estudio de la composición del surfactante obtenido a partir de homogenados de tejido pulmonar, así como de lavados broncoalveolares procedentes de fetos de rata, revelan que el porcentaje de fosfatidilcolina aumenta progresivamente durante el periodo final de la gestación hasta alcanzar el máximo valor en el momento del nacimiento. Así el contenido de fosfatidilcolina se incrementa desde el 65% (20 días de gestación), pasando por el 71% (21 días), hasta alcanzar el 81% en el momento del nacimiento. El fosfatidilglicerol también experimenta un incremento durante este periodo, mientras que la esfingomielinina desciende considerablemente (Katyal et al, 1977).

### **1.8. ALGUNOS PROCESOS CAUSANTES DE CAMBIOS EN EL SURFACTANTE.**

Existen diversos procesos patológicos en los mecanismos ventilatorios, algunos de los cuales guardan relación con alteraciones del surfactante pulmonar. En la mayoría de estos casos se desconoce si las modificaciones cualitativas o cuantitativas del surfactante son fenómenos secundarios a otra patología, o si por el contrario, el cambio observado es la causa desencadenante de la alteración del proceso respiratorio.

Dentro de los estados fisiopatológicos pulmonares en los que se ha observado una alteración significativa del surfactante pulmonar se encuentran:

#### **1) El síndrome de dificultad respiratoria del recién nacido (SDR).**

Esta alteración representa la causa principal de mortalidad perinatal, especialmente en partos prematuros y en los nacimientos con cesárea realizados antes de las contracciones uterinas. Se considera que es debida a una deficiencia en dipalmitoilfosfatidilcolina, cuya síntesis aumenta en los últimos momentos de la gestación. Por tanto, si el nacimiento se produce durante este periodo crítico, se origina una deficiencia en la composición normal del surfactante, que desemboca en atelectasia y transudación de fluido, acompañada por hipoperfusión pulmonar. Este cuadro origina un estado

hipometabólico que desencadena anaerobiosis y acidosis, acelerándose de este modo el proceso patológico (Morgan, 1971).

## 2) El síndrome de dificultad respiratoria en el adulto.

Se produce como consecuencia de un daño en el tejido pulmonar, lo que provoca alteraciones del surfactante (Roberston y van Golde, 1984). Esta enfermedad puede ser inducida por multitud de factores, entre los que se incluyen la ingestión de agentes tóxicos y la aparición de infecciones virales y reacciones inmunopatológicas en las paredes alveolares.

Cuando se expone a los animales de laboratorio a altas concentraciones de oxígeno se provocan alteraciones importantes del surfactante, que probablemente son debidas a la oxidación de los lípidos insaturados y de las proteínas (Clark y Lambertsen, 1971). Además, el riesgo de daño en las células endoteliales y en los cuerpos lamelares de las células de tipo II aumenta considerablemente en tales circunstancias.

La inhalación de elevadas concentraciones de dióxido de carbono también tiene graves repercusiones, sobre todo en animales inferiores, en los cuales produce acidemia severa, atelectasia, edema pulmonar y desaparición de los cuerpos lamelares.

También se ha estudiado el efecto del humo del tabaco, habiéndose observado que provoca disminución de la tensión superficial, dando lugar a hiperinflación alveolar, probablemente debida a la inhibición de la actividad metabólica y fagocitaria de los macrófagos alveolares.

## 3) El edema pulmonar.

Esta patología provoca movilización de grandes cantidades del surfactante a partir de la monocapa que forma sobre la superficie alveolar, lo que contribuye a provocar dificultades respiratorias importantes (Morgan, 1971).

También se han descrito alteraciones del surfactante pulmonar en los procesos patológicos que a continuación se relacionan: hipovascularización fetal, oclusión de la arteria pulmonar, por hiperventilación artificial a presión elevada, en casos de peritonitis experimental, por administración de radiaciones ionizantes, en distintas obstrucciones de las vías aéreas del niño y del adulto y en casos de aspiración de sustancias extrapulmonares (vómitos, etc.).

### **1.9. INFLUENCIA DEL OXIGENO EN EL DAÑO.**

La mayor parte de los organismos existentes en nuestro planeta poseen un metabolismo aerobio. A pesar de ser necesaria la molécula de oxígeno para llevar a cabo dicho metabolismo, presenta un potencial tóxico importante, que se deja sentir con mayor intensidad en los pulmones, ya que son los órganos encargados de realizar el intercambio gaseoso en bastantes especies, como es el caso de los mamíferos. Por este motivo, los mamíferos recién nacidos desarrollan mecanismos tendentes a la defensa contra las especies reactivas del oxígeno a que se ve sometido el organismo al pasar de un ambiente de hipoxia uterina a un estado de normoxia.

En el hombre, diversos sistemas y órganos tales como el pulmón, sistema nervioso central, ojos, así como distintos tipos celulares, pueden verse perjudicados por altas concentraciones de oxígeno. El oxígeno hiperbárico produce alteraciones en el sistema nervioso central, que ocasionan convulsiones en el individuo (Jamieson y Cass, 1967).

Por lo que respecta al pulmón, la toxicidad del oxígeno a presión atmosférica viene influenciada por factores tales como el flujo sanguíneo que llega al tejido, su tasa de metabolismo, la susceptibilidad de los diferentes tipos de células que conforman este tejido, la concentración de oxígeno en el aire inspirado, la duración de la exposición, el grado de susceptibilidad por especie, sexo, edad, así como factores nutricionales, endocrinos y metabólicos. Los efectos tóxicos de las altas concentraciones de oxígeno sobre la función pulmonar son evidentes después de que transcurre un cierto periodo de tiempo, cuya duración es inversamente proporcional a la concentración de oxígeno inspirado (Clark y Lambertsen, 1971). En alturas elevadas, donde la presión atmosférica es elevada, las altas concentraciones de oxígeno son menos lesivas que las mismas concentraciones a presión normobárica (Dekene y Fanburg, 1982).

Los primates son más resistentes que las ratas a la hiperoxia (Parra, 1985). Se ha comprobado experimentalmente que las ratas y los ratones mueren a los 3 ó 4 días de vivir en atmósferas al 100% de oxígeno (Clark y Lambertsen, 1971; Mustafa y Tierney, 1978). Por lo que respecta al hombre se sabe que elevadas concentraciones de oxígeno, aún aplicadas durante breves periodos de tiempo producen lesiones, aunque estas son reversibles si la hiperoxia no se mantiene más de 24-48h (Dekene y Fanburg, 1982).

Las deficiencias nutricionales disminuyen la tolerancia a la hiperoxia. Dekene y Fanburg (1982) han comprobado que cuando se mantiene a ratas con una dieta hipoproteica durante 6 días, aumenta la susceptibilidad de estos animales a la hiperoxia, que puede remitir cuando se administra cisteína, cistina y metionina en la dieta. Resultados similares han sido obtenidos en ratas recién nacidas (Frank, 1981). Las deficiencias en vitaminas como  $\alpha$ -tocoferoles, ciertos metales como cobre y selenio y las dietas ricas en ácidos grasos saturados, aumentan la susceptibilidad al oxígeno.

La hiperoxia ocasiona alteraciones del metabolismo energético, con reducción del metabolismo oxidativo en los homogenados de pulmón. Su toxicidad radica en las lesiones provocadas por el oxígeno sobre la mitocondria, lo que ocasiona un descenso en la producción de ATP y una disminución en el consumo de oxígeno (Mustafa y Tierney, 1978).

### **1.9.1. Formación de radicales libres derivados de la molécula de oxígeno. Implicación de estos radicales en el daño oxidativo.**

Aunque el oxígeno es esencial para numerosas formas de vida, puede resultar letal para los organismos que carecen de los mecanismos bioquímicos tendientes a anular el efecto tóxico de los productos oxidantes derivados del mismo. Estos mecanismos resultan adecuados cuando el oxígeno se inhala a la presión parcial en que se encuentra en el aire, pero son inadecuados cuando la presión del oxígeno es de 3 a 5 veces mayor.

El oxígeno no es tóxico en la mayoría de los sistemas biológicos, ya que este se reduce en la mitocondria por captación de 4  $e^-$  en una reacción catalizada por la citocromo oxidasa, generando una molécula de agua. Este proceso forma parte de un conjunto de reacciones que llevan a cabo los organismos aerobios para la obtención de la energía que necesitan. Sin embargo, existen otras oxidaciones biológicas que se realizan con la transferencia de un número menor de electrones al oxígeno, lo que provoca una reducción parcial de esta molécula, dando lugar a productos altamente reactivos conocidos como radicales libres.

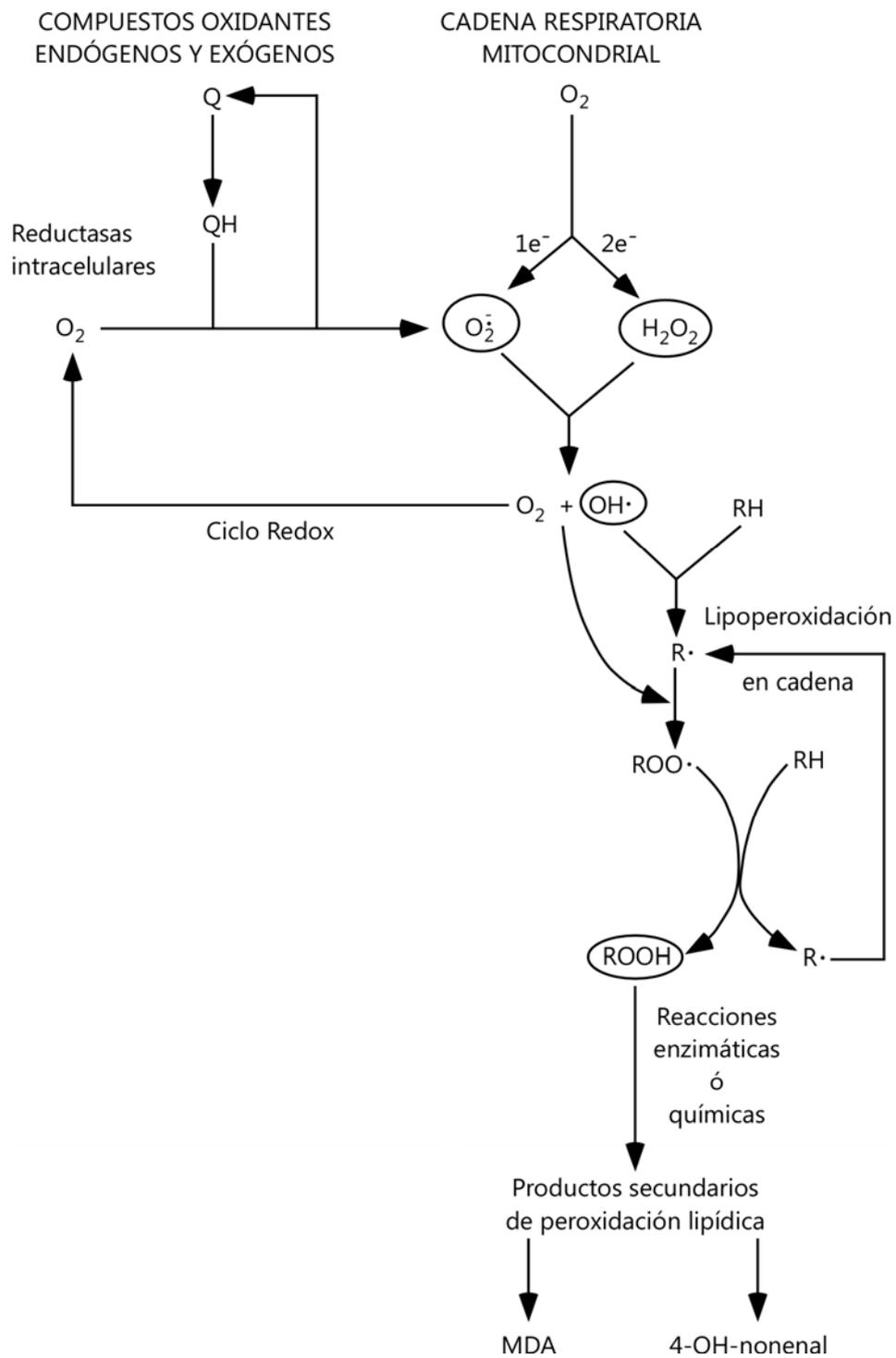
Los radicales libres son especies químicas (moléculas o átomos) que contienen electrones desapareados en su orbital más externo. Estos electrones desapareados confieren a la especie química una enorme reactividad que le conducirá a interactuar rápidamente con otras moléculas con las que entre en contacto. Un 5% del oxígeno que se consume en las etapas finales del

metabolismo oxidativo sigue la llamada vía univalente ( $O_2^{\cdot-}$ ), en lugar de la tetravalente clásica ( $H_2O$ ). Así pues, el metabolismo normal es una fuente de radicales libres, por esto, las células aerobias deben pagar un precio que es la toxicidad de las especies reactivas del oxígeno (ERO) formadas durante los procesos metabólicos. Estas especies reactivas de oxígeno comprenden a las siguientes moléculas: anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical perhidroxil ( $HOO\cdot$ ),  $H_2O_2$ , radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), radical alkoxy ( $RO\cdot$ ), radical peróxido ( $ROO\cdot$ ) y singlete de oxígeno ( $^1O_2$ ). Todos pertenecen al grupo de los radicales libres, con la excepción del peróxido de hidrógeno y del singlete de oxígeno.

Los efectos del anión superóxido sobre los sistemas biológicos son aún poco conocidos, y algunos de ellos se conocen por experimentos "in vitro" usando oxígeno y el sistema que genera el anión superóxido. Así, se sabe que altera la estructura del DNA, despolimeriza los polisacáridos, causa peroxidación lipídica y oxida a moléculas que portan grupos tiol y amino. Este anión procede de la transferencia de un solo electrón al oxígeno, lo que se conoce como reducción univalente del mismo. Este anión también puede ser formado a través de la reacción catalizada por la xantina oxidasa, enzima que convierte la xantina en ácido úrico. El anión superóxido es tóxico por sí mismo, y puede reaccionar con la molécula de  $H_2O_2$  para formar un nuevo radical libre mediante la reacción de Heber-Weiss, el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), que es aún más tóxico que el anterior:



El radical hidroxilo es el derivado de oxígeno de mayor toxicidad, ya que reacciona con ácidos grasos poliinsaturados (RH), eliminando un átomo de hidrógeno de la molécula del ácido graso para formar un ácido graso que tiene un electrón desapareado (radical libre de ácido graso,  $R\cdot$ ). Esta molécula sufre una serie de reordenaciones moleculares con formación de dienos conjugados, reaccionando rápidamente con el oxígeno molecular y formando los radicales peróxido correspondientes ( $ROO\cdot$ ). Los radicales peróxido pueden atacar los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados cercanos, formando hidroperóxidos lipídicos ( $ROOH$ ) y nuevos radicales libres de ácidos grasos ( $R\cdot$ ), lo que trae como consecuencia el establecimiento de peroxidaciones lipídicas en cadena. La formación de todos estos radicales libres derivados del oxígeno está recogida en el siguiente esquema:



**ESQUEMA 2:** Formación de radicales libres del oxígeno. Lipoperoxidación en cadena. (Tomado de Rodríguez-Martínez, 1992).

Las mitocondrias pulmonares contribuyen de forma especial a la formación de radicales libres derivados del oxígeno, cuya producción se ve incrementada en casos de hiperoxia (Freeman y Crapo, 1981). Los radicales libres también pueden proceder del metabolismo de los neutrófilos y macrófagos, que generan especies agresivas, fundamentalmente aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, con el fin de lesionar o destruir los elementos extraños al organismo. En condiciones normales, estas especies reactivas se generan en los lisosomas y no afectan a la célula ni a su entorno, pero en estados inflamatorios, las defensas antioxidantes que posee la célula pueden quedar desbordadas. Los radicales libres de origen externo pueden proceder de los humos del tabaco y de la contaminación atmosférica (óxidos de nitrógeno e hidrocarburos).

Los radicales libres y los productos derivados de la lipoperoxidación afectan a los componentes celulares en distinto grado. Cuando interaccionan con los lípidos de las membranas provocan un aumento en el orden y en la viscosidad de la bicapa lipídica, con cambios en la fase de transición de los lípidos, descensos en la resistencia eléctrica de la membrana, aumento del intercambio de fosfolípidos entre las monocapas a consecuencia de la desestabilización de la bicapa lipídica e incrementos en la permeabilidad de la membrana (Richter, 1987; Parinaldi et al, 1990). En las proteínas, los radicales libres producen fenómenos de entrecruzamiento mediante la participación de aldehídos bifuncionales, que conducen a una disminución en la movilidad de las proteínas de la membrana (Slater, 1984; Richter; 1987). También se desencadenan procesos de fragmentación de las moléculas proteicas a causa de los radicales libres, lo que las hace más susceptibles al ataque proteolítico (Wolff et al, 1986). La estructura de los ácidos grasos también puede ser dañada por los radicales libres o por los productos de la peroxidación. El malonildialdehído tiene propiedades carcinogénicas y mutagénicas, y ciertas proteínas alteradas por la peroxidación, pueden afectar al control de la expresión génica (Slater, 1984; Wolff et al, 1986).

A nivel celular, la peroxidación lipídica produce alteraciones estructurales en las membranas plasmáticas, reduce su fluidez, altera las propiedades antigénicas, varía el transporte, aumentando la permeabilidad de la membrana a ciertos iones como el  $\text{Ca}^{2+}$ , produce la inactivación de ciertos receptores (receptores para LDL en fibroblastos) y de enzimas particuladas. En las mitocondrias inhibe la respiración celular, y en los lisosomas produce la degradación de su membrana, liberándose su contenido enzimático, que puede

desencadenar la muerte celular (Tappel, 1973; Vladimirov et al, 1980; Slater, 1984; Gutteridge y Halliwell, 1990). Estas alteraciones pueden ser causa de procesos patológicos, tales como anemias hemolíticas, disfunciones reproductoras, atrofas musculares, aterosclerosis, artritis reumatoide, cáncer y daños pulmonares, entre otros (Grinna y Barber, 1973; McCay, 1980; Halliwell y Gutteridge, 1984).

### **1.9.2. Mecanismos de protección frente a las reacciones provocadas por radicales libres.**

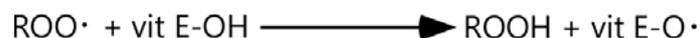
El estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio entre las especies químicas oxidantes y las antioxidantes, en favor de las primeras. Para mantener una homeóstasis es preciso regenerar la capacidad antioxidante de forma continua, y si esto no se consigue, surgen diversos trastornos fisiopatológicos tales como inflamación, envejecimiento y carcinogénesis, entre otros, como ya se indicó en el apartado anterior.

La desintoxicación de las ERO es un requisito indispensable para la vida aerobia, por ello se han desarrollado diversos mecanismos de defensa que proporcionan importantes sistemas de prevención y secuestro de radicales libres, así como de reparación de lesiones ocasionadas por ellos. Estos sistemas engloban los procesos no enzimáticos mediados por sustancias antioxidantes y los procesos enzimáticos.

#### **1.9.2.1. Mediante sustancias antioxidantes.**

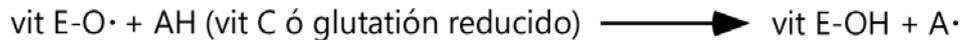
Diversas sustancias intracelulares de naturaleza lipofílica o hidrofílica (vitaminas E, C y glutatión reducido, entre otros) y la propia membrana plasmática, se encargan de proteger al organismo, captando los radicales libres que aparecen en su entorno.

La vitamina E (vit E-OH) impide la propagación de las reacciones de peroxidación mediante la cesión del grupo hidrofílico del tocoferol al radical peróxido (ROO·):



Por tanto, el tocoferol rompe la reacción en cadena de la peroxidación. Los hidroperóxidos formados (ROOH) se descomponen en sustancias no tóxicas por acción de la glutatión peroxidasa. Los radicales de la vitamina E (vit E-O·) son muy estables. No obstante, pueden ser convertidos en vitamina E por acción del

ascorbato a bajas concentraciones, con lo cual la vitamina C ejercerá una acción antioxidante:



Este dador de hidrógeno de tipo hidrosoluble (vit C o glutatión reducido), se eliminará de la membrana hacia el citoplasma celular. Los tioles pueden reaccionar con los radicales tocoferol para regenerar el tocoferol, y los propios tocoferoles pueden regenerar los radicales tiol. Sin duda, el glutatión es el el tiol más importante de la célula (Sies, 1992).

La vitamina C a bajas concentraciones puede actuar como antioxidante, como ya se ha indicado anteriormente, pero a altas concentraciones y en presencia de hierro, produce radicales libres (Clemens y Waller, 1987; Drevon, 1991; Gurr y Harwood, 1991). El ácido ascórbico parece ser que también puede ejercer un efecto antioxidante por descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en una reacción similar a la catalizada por la catalasa. Aunque dicha vitamina no es tan eficaz como la enzima, dado que su concentración plasmática es muy superior, su potencial antioxidante en el plasma puede ser muy importante.

Además de los mecanismos antes citados, las células y los tejidos pueden protegerse de la peroxidación mediante antioxidantes extracelulares, tales como los uratos, bloqueantes del singlete de oxígeno, y un grupo de proteínas plasmáticas (ceruloplasmina, albúmina, transferrina y haptoglobina) capaces de inmovilizar metales encargados de catalizar las reacciones de peroxidación lipídica u otras reacciones por radicales libres (Gutteridge y Halliwell, 1990). La mayor actividad antioxidante del plasma radica en la proteína encargada de la captación de Cu, la ceruloplasmina (Clements y Waller, 1987). También funcionan como antioxidantes circulantes la nicotinamida, el ADP y el coenzima Q. Los carotenoides, que se encuentran en una concentración más baja que los tocoferoles, gracias a su alta liposolubilidad pueden ejercer también un efecto protector en aquellos compartimentos hidrofóbicos no accesibles a los tocoferoles. Los flavonoides son sustancias antioxidantes de las plantas. Otras moléculas, tales como ciertos aditivos alimenticios (hidroxianisol butilado o el hidroxitolueno butilado), así como el dimetilsulfósido o la etildimetiltiourea tienen también actividad antioxidante.

### 1.9.2.2. Mediante reacciones de tipo enzimático.

Las células disponen de una barrera primaria de defensa antioxidante constituida por diversas enzimas (citocromo oxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) que actúan sobre los radicales libres generados en el citosol, evitando así la propagación de la peroxidación lipídica (Ahmed, 1987).

Se sabe que "in vivo", la SOD destruye rápidamente el anión superóxido, mediante la dismutación del mismo en peróxido de hidrógeno y oxígeno, con lo cual se corta la cascada de reacciones que dan lugar a la producción de radicales libres en los organismos:



En ausencia del anión superóxido no se forma el radical HO•, y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se genera tiene escasa toxicidad, y es descompuesto por la catalasa mediante la siguiente reacción:

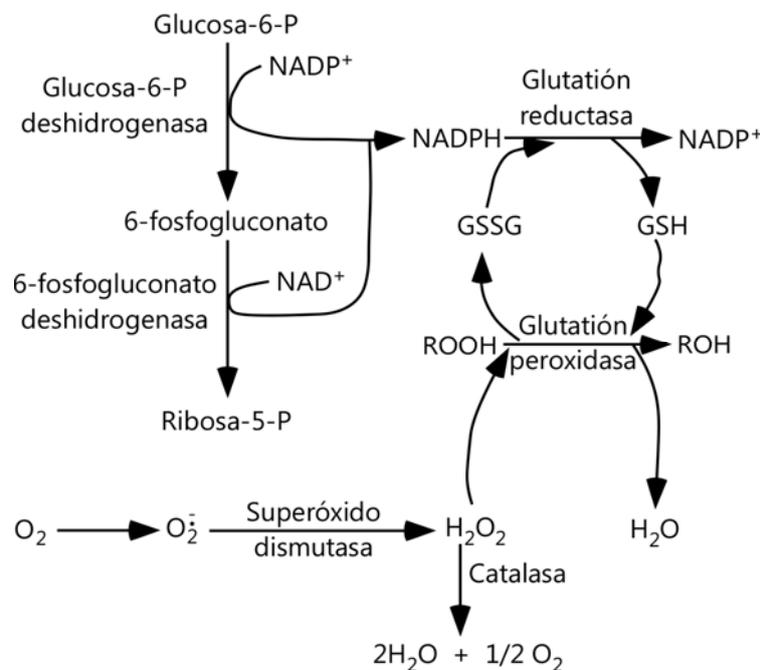


A pesar de la existencia de la barrera primaria y del control no enzimático que hay en los organismos, la presencia de mínimas cantidades de radicales en el medio, dada su gran reactividad, hace que sus efectos se propaguen con gran rapidez. Por ello las células están provistas de otros sistemas enzimáticos (Glucosa-6-P deshidrogenasa, 6-P-gluconato deshidrogenasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa) que son los encargados de catalizar un conjunto de reacciones destinadas a eliminar los productos de la peroxidación lipídica y los radicales libres que se generan (véase Esquema 3).

También la fosfolipasa A2 colabora en el proceso de reparación del daño oxidativo, hidrolizando preferentemente los ácidos grasos peroxidados que están esterificados en los fosfolípidos de las membranas. De esta forma, los ácidos grasos peroxidados en estado libre pueden ser degradados por la glutatión peroxidasa mediante la reacción antes señalada, y sustituidos por nuevos ácidos grasos que se incorporan a los lisofosfolípidos de la membrana mediante procesos de reacilación (Gurr y Harwood, 1991).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que tanto las células procarióticas como las eucarióticas responden al estrés oxidativo induciendo la formación de sistemas antioxidantes. Así, la actividad superóxido dismutásica se incrementa en los pulmones de rata después de ser expuestas a atmósferas con 85% de oxígeno en condiciones normobáricas. Igual ocurre con la enzima

Glucosa-6-P deshidrogenasa y otras enzimas relacionadas, lo que se conoce como fenómeno de adaptación. Estos incrementos en la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes también se detectan en ratas recién nacidas expuestas al 100% de oxígeno normobárico, sin embargo no se observan incrementos significativos en los adultos cuando se comparan con el grupo control (Mustafa y Tierney, 1978). También se sabe que bacterias como *E. coli* y *Salmonella typhimurium* son capaces de inducir la síntesis de, al menos, 30 proteínas en respuesta a la presencia de peróxido de hidrógeno, de modo que las células se hacen resistentes a dosis posteriores de este compuesto (Storz et al, 1990). *E. coli* también es capaz de responder a la acción de agentes productores del anión superóxido, induciendo la expresión de 40 proteínas aproximadamente. Se han identificado tres de ellas, que corresponden a la superóxido dismutasa, endonucleasa IV y glucosa-6-P deshidrogenasa (Greenberg et al, 1990).



**ESQUEMA 3:** Sistemas enzimáticos de desintoxicación oxidativa. (Según Rodríguez-Martínez, 1992).

### 1.9.3. Cambios morfológicos del pulmón asociados a situaciones experimentales de hiperoxia.

Smith (1989) fue el primero en hablar de los efectos nocivos de las altas concentraciones de oxígeno sobre la estructura y función pulmonar de animales de experimentación sometidos a ambientes normobáricos ó hiperbáricos. Sin embargo, en humanos no se relacionó la administración terapéutica de oxígeno con la aparición de lesiones en el parénquima pulmonar hasta 1958. Dichas

lesiones consistían inicialmente en congestión de los capilares alveolares, seguido de proliferación capilar y en algunos casos fibrosis intersticial (Pratt, 1958).

En 1967, Nash realiza una descripción de la evolución patológica de las lesiones pulmonares relacionadas con la concentración de oxígeno en el aire inspirado y la duración del tratamiento. Describe una primera fase exudativa aguda en la que aparece congestión, edema y hemorragia intraalveolar, edema perivascular y membrana hialina, y una segunda fase proliferativa subaguda o crónica, más tardía. Si la exposición continúa, aparecen cambios proliferativos como hiperplasia de las células de revestimiento alveolar, reabsorción progresiva del exudado con organización del mismo, depósito de fibrina y elastina en el espacio intersticial y por último fibrosis.

La administración a ratas de atmósferas con 90 % de oxígeno durante varios días, permite observar la evolución patológica de las lesiones pulmonares a lo largo del tiempo (Bowden et al, 1968). Los autores hacen una descripción detallada de los cambios observados durante dicho estudio, y concluyen que la única célula que responde a la hiperoxia es el granulocito, debido a su secuestro dentro de la luz vascular. No observan cambios en los granulocitos circulantes, ni en el número de macrófagos y células epitelio-alveolares. Tampoco detectan alteraciones estructurales en las células epiteliales de revestimiento del alveolo. Sólo el endotelio capilar muestra alteraciones estructurales evidentes, observándose edema pulmonar en el espacio periarterial, así como en el endotelio capilar. Los autores establecen una relación directa entre la severidad de las lesiones y el tiempo de exposición a las elevadas concentraciones de oxígeno.

Los estudios en ratas expuestas al 100 % de oxígeno a 0,92 atmósferas de presión, muestran lesiones pulmonares con un aumento en el número de células alveolares, sobre todo de neumocitos de tipo II y de macrófagos, además de un engrosamiento del endotelio capilar, ensanchamiento de septos y aumento del número de capilares septales, lo que produce una disminución de la superficie de intercambio gaseoso (Schaffner y Trachtenberr, 1967).

La administración de 100 % de oxígeno a presión atmosférica, produce una mortalidad en la rata cercana al 90 % después de 50-65 h de exposición (Rosenbaum et al, 1969). Por ello, los autores optan por someter a los animales a un periodo de adaptación (siete días en atmósfera con 85 % de oxígeno), para administrarles posteriormente oxígeno puro durante 6 días, consiguiéndose así

aumentar la supervivencia hasta el 85 %. Durante la adaptación previa, aparecen alteraciones ultraestructurales en las mitocondrias, así como en los ribosomas y en el retículo endoplásmico de los neumocitos de tipo II. En las mitocondrias se observan cambios en la organización y disposición de las crestas, con aumento de su número, haciéndose la matriz más densa y granular, y cambiando de forma alargada a muy irregular. Al pasar al 100 % de oxígeno, mantienen las transformaciones adquiridas y aparecen nuevos cambios de tipo degenerativo. A los 2-3 días de la exposición se observa una morfología similar a la del periodo de adaptación. Los cambios mitocondriales revierten cuando las ratas vuelven a respirar aire puro (Rosenbaum et al, 1969).

El oxígeno destruye los neumocitos de tipo I, mientras que los de tipo II proliferan, regenerando el revestimiento epitelial desnudo del pulmón de ratas sometidas a oxígeno puro normobárico (Weibel y Switzerland, 1971). Los estudios de estos autores muestran alteraciones morfológicas ultraestructurales a nivel de las células endoteliales capilares y de las células de revestimiento alveolar. Los animales se muestran asintomáticos hasta el tercer día del tratamiento, a partir del cual aparece cianosis, disnea y letargia, y un elevado número de ratas no sobrevive más de 72 h al tratamiento.

El estudio de los cuerpos lamelares de los neumocitos de tipo II en los animales tratados durante 48 h con oxígeno normobárico, no muestra diferencias en cuanto a su número respecto a los controles, aunque sí se observa una disminución significativa de su volumen, que los autores explican como una alteración selectiva de la permeabilidad de su membrana, con pérdida de agua. Asimismo, detectan una disminución en la síntesis de proteínas, que aumenta de nuevo a las 96 h, al igual que el tamaño de los cuerpos lamelares. Estos datos hacen pensar en la existencia de un mecanismo de adaptación a altas presiones de oxígeno (Masaro y Masaro, 1973).

Las lesiones inducidas por la hiperoxia se agrupan en dos fases, una primera fase exudativa o precoz, y una segunda fase proliferativa o tardía (Katzenstein et al, 1976). Las primeras lesiones alveolares aparecen a las primeras 19 h de exposición al 40 % de oxígeno, con presencia de tumefacción en los neumocitos de tipo I y en las células endoteliales. Estos cambios aumentan progresivamente y son máximos a los 6 días de tratamiento, momento en el que los neumocitos de tipo II son escasos. La membrana basal aparece desnuda y recubierta de restos granulofibrilares, presentándose edema septal debido a la pérdida de integridad del endotelio capilar, con trombos de fibrina en los epitelios alveolares. A partir del sexto día de exposición hay

hiperplasia de los neumocitos de tipo II, y a los 10 días, estos reemplazan casi totalmente a los neumocitos de tipo I.

El grado de lesión pulmonar que aparece en los animales tratados con altas concentraciones de oxígeno está directamente relacionado con el porcentaje de éste suministrado, y es independiente de la presión total aplicada (Shanklin, 1969).

Existen mecanismos de adaptación al estrés oxidativo en diversas especies animales, poniéndose especialmente de manifiesto este proceso en recién nacidos de mamíferos. Este mecanismo adaptativo reside en la estimulación de la actividad de los sistemas enzimáticos de carácter antioxidante, lo que está directamente relacionado con el aumento en el consumo de oxígeno. Dicho aumento se produce tanto a nivel pulmonar como sanguíneo (Hamosh et al, 1978b). El aumento del consumo de oxígeno debe producir un incremento de radicales libres en el medio, lo que ocasionará una estimulación de los sistemas enzimáticos antioxidantes, preparando así al feto para la nueva forma de vida. Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de oxígeno también produce alteraciones pulmonares importantes en los recién nacidos. Bonikos et al (1975) han seguido la evolución de las lesiones pulmonares en ratas recién nacidas sometidas a atmósferas con 100 % de oxígeno durante 7 días de tratamiento. Describen una segunda fase, entre los días 3-4, que se caracteriza por la proliferación de neumocitos de tipo II y alteraciones mitocondriales en ellos. Hay una tercera fase que se caracteriza por la proliferación fibroblástica, con depósitos de colágeno y nuevo aumento de los neumocitos de tipo II que reemplazan a los de tipo I.

### 1.10. OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO.

En apartados anteriores hemos visto la importancia del surfactante pulmonar en relación con una serie de trastornos patológicos, que se producen generalmente por alteraciones en su composición química, sobre todo por modificaciones en la proporción de determinados fosfolípidos responsables más directamente del mantenimiento de la tensión superficial, dentro de los valores establecidos (véase apartados 1.7. y 1.8.). Por tanto, la cuantificación de estos fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y esfingomielina) mediante métodos rápidos, reproducibles y que requieran pequeñas cantidades de muestra, debe resultar sumamente útil para averiguar la madurez pulmonar del recién nacido (índice fosfatidilcolina/esfingomielina), así como para detectar algunas patologías pulmonares presentes en los individuos, lo que resulta de indudable interés clínico. Hasta el momento, la cuantificación de estos fosfolípidos en el líquido amniótico, los surfactantes pulmonares, tejido pulmonar y otros materiales biológicos se ha venido haciendo por los métodos tradicionales, que consisten en la extracción de los lípidos, separación de las diferentes clases de fosfolípidos mediante cromatografía en capa fina y cuantificación posterior de los mismos mediante valoración del fósforo lipídico de cada uno de los fosfolípidos separados (Harwood et al, 1975; Kulovich et al, 1979; Freer y Statland, 1981; Greene et al, 1987; Adachi et al, 1989; Oulton et al, 1993). Sin embargo, esta metodología resulta de difícil aplicación a las biopsias pulmonares y a los líquidos de lavado broncoalveolares, dada la gran cantidad de material que se necesita para llevar a cabo el estudio.

Por otra parte, se ha comprobado experimentalmente que los animales de laboratorio expuestos a altas concentraciones de oxígeno sufren alteraciones en la composición química de sus surfactantes (Clark y Lanbertsen, 1971), que probablemente son debidas a una oxidación de los lípidos insaturados y de las proteínas. De hecho, se ha comprobado que la vida en hiperoxia normobárica modifica la actividad de las enzimas relacionadas con la biosíntesis de los fosfolípidos del surfactante pulmonar (Merrill et al, 1984), a lo que podría en parte deberse las alteraciones encontradas en él. También se han descrito modificaciones a nivel celular por consecuencia del tratamiento con hiperoxia normobárica (véase apartado 1.9.3.). Estudios recientes desde el punto de vista morfológico, empleándose distintas condiciones de hiperoxia, han sido realizados por el grupo de investigación que dirige la Dra. Ludeña. Estas investigaciones han constituido un punto de partida para plantear el estudio de la composición química del surfactante en ratas neonatas sometidas a distintas

condiciones de hiperoxia, con el fin de intentar averiguar si existe una correlación entre las modificaciones celulares encontradas y las posibles alteraciones en la composición química del surfactante. Esta investigación resulta de indudable interés, por la gran frecuencia con que se utiliza la oxigenoterapia en la clínica médica diaria, especialmente para tratar numerosos procesos cardiopulmonares y respiratorios de los adultos como el síndrome de distress respiratorio del adulto, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, insuficiencias respiratorias, etc. y también en niños recién nacidos, con patologías como la enfermedad de la "membrana hialina" o síndrome de distress respiratorio neonatal.

A la vista de lo anteriormente expuesto, el objeto de nuestro trabajo se centra en los siguientes puntos: i) Encontrar un método rápido, reproducible y de alta sensibilidad, que requiera bajas cantidades de muestra para valorar la composición fosfolipídica del surfactante pulmonar; ii) Estudiar el efecto de la hiperoxia normobárica sobre la composición lipídica del surfactante, y averiguar si los cambios que se producen están relacionados con la edad del animal y/o por el tiempo de tratamiento.

A la vista de los objetivos que se pretenden alcanzar, el trabajo de investigación se ha planteado en los siguientes términos:

1) Poner a punto métodos enzimáticos destinados a valorar los fosfolípidos del surfactante pulmonar con significación clínica, como son la fosfatidilcolina, el fosfatidilglicerol y la esfingomielina, cuantificándose también el contenido en colesterol, con el fin de valorarlos en distintas situaciones experimentales y aplicarlos en un futuro a análisis de tipo clínico.

2) Aplicación de los métodos anteriormente indicados a la cuantificación de los fosfolípidos de interés clínico en el surfactante pulmonar procedente del lavado broncoalveolar (LBA) de animales de experimentación con distintas edades (grupos 1, 2, 3 y 4), aprovechándose los valores obtenidos para realizar un estudio comparativo de la composición química del surfactante a lo largo del desarrollo, en especial durante el periodo perinatal.

3) Análisis del efecto de la hiperoxia normobárica sobre la composición fosfolipídica del surfactante pulmonar de los animales tratados, mediante la aplicación de métodos enzimáticos. El trabajo ha sido programado de modo que permita el estudio de los efectos del tiempo de exposición a la hiperoxia, así como valorar el grado de influencia que tiene la hiperoxia sobre los individuos de diferentes edades. Este estudio es analizado en paralelo con los

resultados obtenidos en el análisis morfológico de los pulmones procedentes de los animales tratados. Para llevarlo a cabo hemos utilizado ratas albinas recién nacidas (grupos 5 y 6) a las que se ha aplicado diferentes tiempos de tratamiento. En el caso de los animales adultos (90-120 días) no han podido utilizarse tratamientos superiores a 72 h de exposición a atmósferas con 100 % de oxígeno, ya que la mortalidad de los animales alcanza cifras superiores al 90 %, como se ha descrito en la bibliografía (Mustafa y Tierney, 1978).

La extracción del lavado broncoalveolar en los diferentes grupos de experimentación, la aplicación del tratamiento de hiperoxia y los estudios morfológicos fueron realizados en el Departamento de Biología Celular y Patología de la Facultad de Medicina de Salamanca, bajo la dirección de la Dra. Ludeña. El resto de los estudios experimentales se han llevado a cabo íntegramente por el autor de esta Memoria, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la unidad de Biología, bajo la dirección del Dr. Llanillo.

Los resultados, junto con la metodología empleada y la discusión de los mismos, constituyen el objeto de la presente Memoria.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. MATERIALES Y APARATOS.

Aparato de ultrasonidos "Branson B-30". Balanzas granataria y analítica. Baños termostáticos. Centrífugas refrigeradas ("IEC B/20" y "MSE Chilspin"). Congeladores de -20°C y -70°C. Espectrofotómetros "Spectronic 700" y "LKB Novaspec II". Termoblock "Liebisch". Homogeneizador tipo "Potter". Ultracentrífuga "IEC B/60". Jaula transparente de metacrilato, con un mezclador de fases incorporado (Quantiflex air-oxygen-mixer, Cyprane), con un medidor digital de la concentración de oxígeno (Oxygen monitor bio-electronics, Roche), un manómetro y una válvula para controlar la presión en el interior de la jaula. Liofilizador "Flexi-dry". pH-metro "Radiometer". Microscopio Electrónico de Transmisión "Philips". Material de uso frecuente en el laboratorio, como agitadores, estufas, etc.

## 2.2. REACTIVOS.

Todos los productos usados en este trabajo fueron de calidad analítica: colesterol, seroalbúmina bovina, Tris, 4-aminoantipirina, NADH, 3,4 diclorofenol, colato sódico, dipalmitoilfosfatidilcolina, polioxietilen-9-lauril eter, ATP, fosfoenolpiruvato, fosforilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol, esfingomieline, peroxidasa, colina quinasa, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, fosfolipasa C, fosfolipasa D que procedían de "Sigma Chemical Co. (USA)". Fosfatasa alcalina, glicerol quinasa, esfingomielinasa, colesterol esterasa, colesterol oxidasa fueron adquiridas en "Boehringer Mannheim "(Alemania). El resto de los productos fueron suministrados por "Probus" y "Panreac" (España).

## 2.3. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

La experimentación se ha llevado a cabo en ratas albinas Wistar, suministradas por el animalario de la Facultad de Medicina de Salamanca, distribuidas en los siguientes grupos:

GRUPO 1: RECIEN NACIDOS (5-6 HORAS). Incluye animales que han vivido respirando aire atmosférico durante 5-6 horas, y que tenían un peso medio de 5,9 g  $\pm$  0,6. El número de animales utilizados fue de 20, distribuidos en 5 grupos de 4 animales cada uno tomados al azar.

GRUPO 2: ANIMALES DE DOS DIAS (2 días). Agrupa 28 animales de 48 horas de vida y con un peso medio de 8,3 g  $\pm$  0,7 que vivieron en ambiente atmosférico. Fueron distribuidos en 7 grupos (4 individuos tomados al azar en cada grupo).

GRUPO 3: ANIMALES DE SIETE DIAS (7 días). Corresponde a 28 animales que han vivido respirando aire atmosférico durante 7 días, y que tenían un peso medio de 19,5 g  $\pm$  0,7.

GRUPO 4: ADULTOS (90-120 días). Este grupo estaba constituido por 7 ratas hembras con un peso comprendido entre 150-200 g, que habían respirado aire atmosférico durante sus 90-120 días de vida.

Los grupos de animales que se citan a continuación, lo mismo que las madres que los alimentaron, vivieron en una atmósfera de oxígeno (95- 99.5%) desde su nacimiento, lo que se conoce como estado de hiperoxia normobárica.

GRUPO 5: ANIMALES DE DOS DIAS EN HIPEROXIA (2 días vs hiperoxia). Agrupa a 20 animales recién nacidos con 48 horas de vida en hiperoxia, con un peso medio 7,6 g  $\pm$  0,6, distribuidos en 5 grupos al azar.

GRUPO 6: ANIMALES DE SIETE DIAS EN HIPEROXIA (7 días vs hiperoxia). Corresponde a 20 animales recién nacidos que vivieron 7 días en hiperoxia, cuyo peso fue de 9,9 g  $\pm$  1,3 y que fueron reunidos en 4 grupos al azar. Los animales fueron alimentados por madres diferentes cada 24 horas, dado que los adultos tienen un índice de mortalidad próximo al 90% cuando se les somete a hiperoxia durante 2 días (Mustafa & Tierney, 1978).

GRUPO 7: ADULTOS EN HIPEROXIA (90-120 días vs hiperoxia). Este grupo estaba formado por 7 ratas hembras de 90-120 días de edad, que presentaban un peso medio entre 150-200 g y que vivieron durante las 48 horas previas a su sacrificio respirando en una atmósfera rica en oxígeno (95-99.5 %).

Los animales adultos fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar (58.7% de glúcidos más 4.3% de celulosa, 17% de proteínas, 3% de lípidos, 5% de sales minerales y 12% de agua) y con libre acceso al agua de bebida. La temperatura de estabulación de los animales osciló entre 20 y 25 °C, con una humedad entre 45 y 65%.

Los animales de los grupos anteriormente citados fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentotal sódico, posteriormente sacrificados y sometidos a un lavado broncoalveolar (LBA) con 20 ml de NaCl 0,9%, cada uno de los individuos de los grupos 4 y 7, recogiendo prácticamente el volumen inyectado en cada caso. En los restantes grupos se inyectaron 2 ml de NaCl 0,9% por individuo, recogiendo volúmenes algo inferiores a los introducidos en cada caso.

Cada una de las muestras utilizadas para la obtención del surfactante pulmonar corresponde al líquido de lavado broncoalveolar de un grupo de animales constituido por 4 individuos tomados al azar en el caso de los grupos 1, 2, 3, 5 y 6, mientras que en los animales adultos (grupos 4 y 7), cada muestra del líquido de lavado broncoalveolar se corresponde con lo obtenido para cada uno de los individuos que conforman el grupo.

## 2.4. METODOS.

### 2.4.1. Obtención del surfactante pulmonar.

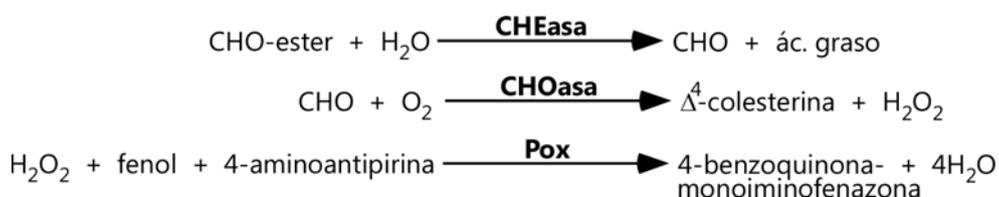
El surfactante pulmonar se obtuvo a partir del líquido de lavado broncoalveolar, previa eliminación del botón celular por centrifugación a 300xg, durante 20 min (Harwood et al, 1975). El sobrenadante obtenido, que contiene el surfactante pulmonar, se dializó frente a 200 V de agua destilada durante 48 h a 4°C, con 3 cambios durante el periodo de diálisis. Las muestras procedentes de animales adultos fueron liofilizadas después del proceso de dializado, y posteriormente resuspendidas en 1,5-2 ml de agua destilada.

### 2.4.2. Valoración de proteínas.

La concentración de proteínas se valoró por el método de Bradford (1976), utilizándose seroalbúmina bovina como patrón. Las muestras fueron diluidas con NaOH 0,5 N antes de cada determinación.

### 2.4.3. Valoración del colesterol.

El colesterol total (libre más esterificado) se valoró espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 500 nm de la 4-benzoquinona-monoiminofenazona, producida en el transcurso de tres reacciones acopladas, que son catalizadas por las enzimas colesterol esterasa (CHEasa), colesterol oxidasa (CHOasa) y la peroxidasa (Pox), tal como describen Siedel et al., (1981).



Los ensayos se realizaron en las siguientes condiciones:

Pipetear sucesivamente en la cubeta de reacción:		Concentración en la mezcla de ensayo:
Muestra problema o solución estándar	10-20 $\mu$ l	Colesterol total hasta 100 mg/ml
Solución reactiva	1 ml	Tris 100 mM MgSO <sub>4</sub> 50 mM 4-Aminoantipiridina 1mM Fenol 6 mM 3,4 Diclorofenol 4 mM Colato sódico 10 mM Polioxietilen 9 lauril éter 3 g/l CHEasa 800 U/l CHOasa 500 U/l Peroxidasa 400 U/l
Mezclar vigorosamente e incubar durante 5 min a 37 °C. Incubar a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 1 h y medir la absorbancia a 500 nm frente al blanco correspondiente.		

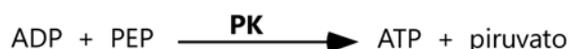
#### 2.4.4. Valoración del fósforo contenido en los lípidos totales.

El contenido de fosfolípidos fue calculado multiplicando la cantidad de fósforo (Pi) por el factor 25 (1  $\mu$ g de fósforo lipídico procede de 25  $\mu$ g de fosfolípidos) tal como indican Barber & Jamieson (1970).

El fósforo presente en las muestras de surfactante pulmonar (alícuotas de 25-50  $\mu$ l de muestra) se valoró espectrofotométricamente por el método de Rouser et al. (1970), previa hidrólisis de las muestras secas con 0,15 ml de HClO<sub>4</sub> al 60% a 180°C durante 45 min. El fósforo liberado en el proceso de hidrólisis se cuantificó mediante una reacción colorimétrica que se produce al añadir 0,7 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 0,1 ml de molibdato amónico al 2,5% y 0,1 ml de ácido ascórbico al 10%, manteniendo la mezcla durante 5 min en el baño maría. La coloración azul que aparece se mide a 797 nm. Como patrón se empleó una disolución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (4,39 g/l) diluida al 1% y al 0,1%, respectivamente.

### 2.4.5. Valoración de la fosfatidilcolina.

La fosfatidilcolina se valoró espectrofotométricamente midiendo el descenso de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH en la etapa final de cinco reacciones acopladas, catalizadas por las enzimas fosfolipasa C, fosfatasa alcalina, colina quinasa, piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa, tal como describen Schiefer & Beutler (1981):



Los ensayos se realizaron según se indica a continuación:

Pipetear sucesivamente en el tubo de ensayo		Concentración en la mezcla de incubación	
Buffer borato sódico, MgSO <sub>4</sub> , pH=8	0,5 ml	Borato	141 mM
PLasa C/AP	0,025 ml	MgSO <sub>4</sub>	5 mM
Muestra problema	0,1-0,2 ml	Triton X-100	5,8 g/l
Mezclar e incubar durante 20 min a 37 °C, mantener los tubos con la mezcla de reacción durante 10 min a 90-100 °C, dejar enfriar a temperatura ambiente, y añadir a continuación los siguientes reactivos:		PLasa C	9,8 U/ml
		AP	4,3 U/ml
NADP/ATP/PEP/Glucosa	0,05 ml	NADH: 223 μM; ATP: 892 μM; PEP: 1,87 mM;	
PK/LDH	0,010 ml	Glucosa: 2,5 mM; PK: 2,67 U/l; LDH: 2,67 U/l	
Mezclar y centrifugar a 700 g durante 10 min; tomar el sobrenadante y a continuación pipetear:			
Sobrenadante	0,75 ml		
Leer absorbancia (A <sub>1</sub> ) y añadir a continuación:			
CK	17,6 μl	CK	65 U/l
Mezclar e incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Leer blanco y problemas a 340 nm (A <sub>2</sub> ) frente a aire.			

Los cálculos efectuados para determinar la concentración vienen dados por la siguiente expresión:

$$(A_1 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco}} / \varepsilon = \mu\text{moles de PC en volumen de muestra}$$

Donde :

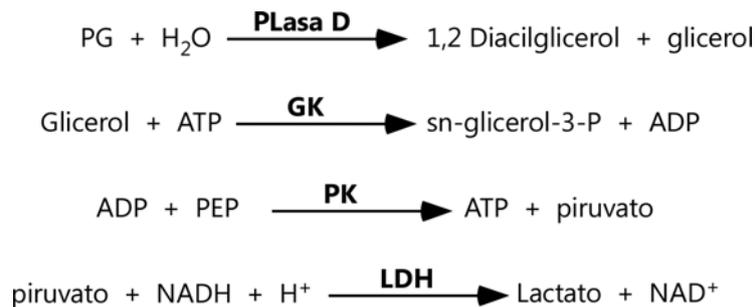
A1 : absorbancia a 340 nm a tiempo inicial.

A2 : absorbancia a 340 nm después de transcurridas las reacciones.

$\varepsilon$  :  $6,22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.4.6. Valoración del fosfatidilglicerol.

El fosfatidilglicerol se determinó espectrofotométricamente midiendo el descenso de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH en el transcurso de cuatro reacciones acopladas, catalizadas por las enzimas fosfolipasa D, glicerol quinasa, piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa; tal como describen Schiefer & Beutler (1984):



Las determinaciones se llevaron a cabo de la siguiente forma:

Pipetear sucesivamente en el tubo de ensayo		Concentración en la mezcla de incubación	
Buffer borato sódico, MgSO <sub>4</sub> , pH=8	0,5 ml	Borato	141 mM
		MgSO <sub>4</sub>	5 mM
		Triton X-100	5,8 g/l
NADP/PEP /ATP	0,05 ml	NADH	229 μM
		ATP	917 μM
		PEP	1,9 mM
Muestra problema	0,2-0,4 ml		
PK/LDH	0,010 ml	PK	2,8 U/ml
		LDH	2,8 U/ml
GK	0,005 ml	GK	0,39 U/ml
Mezclar y leer la abs. (A <sub>1</sub> ) a 340 nm frente a aire.			

Tomar 0,75 ml de cada tubo y añadir 11 $\mu$ l de fosfolipasa D	PLasa D      3,4 U/ml
Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 40 min. Leer el blanco y las muestras problema a 340 nm ( $A_2$ ) frente a aire.	

Los cálculos que se realizaron para determinar la concentración de fosfatidilglicerol, vienen dados por la siguiente expresión:

$$(A_1 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco}} / \varepsilon = \mu\text{moles de PG en volumen de muestra}$$

Donde :

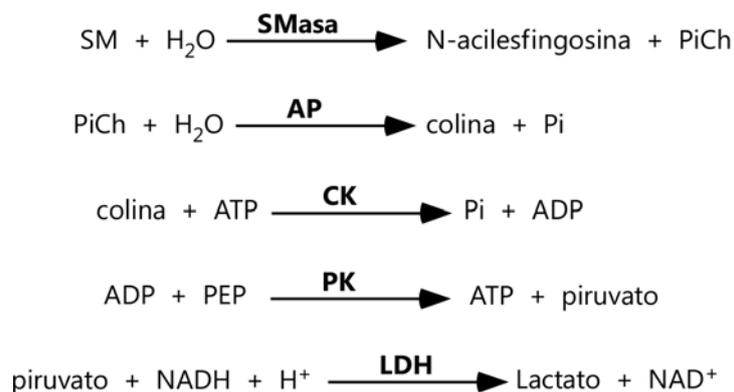
$A_1$  : absorbancia a 340 nm a tiempo inicial.

$A_2$  : absorbancia a 340 nm después de transcurridas las reacciones.

$\varepsilon$  :  $6,22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.4.7. Valoración de la esfingomielina.

El contenido en esfingomielina en las muestras se valoró espectrofotométricamente midiéndose el descenso de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH en cinco reacciones acopladas, catalizadas por las enzimas esfingomielinasa, fosfatasa alcalina, colina quinasa, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, mediante las siguientes reacciones:



Los ensayos se realizaron tal como se especifica a continuación:

Pipetear sucesivamente en el tubo de ensayo		Concentración en la mezcla de incubación	
Buffer borato sódico, MgSO <sub>4</sub> , pH=8	0,5 ml	Borato	141 mM
SMasa/AP	0,025 ml	MgSO <sub>4</sub>	5 mM
Muestra problema	0,1-0,2 ml	Triton X-100	5,8 g/l
Mezclar e incubar durante 20 min a 37 °C, mantener los tubos con la mezcla de reacción durante 10 min a 90-100 °C, dejar enfriar a temperatura ambiente, y añadir a continuación los siguientes reactivos:		SMasa	9,8 U/ml
		AP	4,3 U/ml
NADP/ATP/PEP/Glucosa	0,05 ml	NADH: 223 μM; ATP: 892 μM; PEP: 1,87 mM; Glucosa: 2,5 mM; PK: 2,67 U/l; LDH: 2,67 U/l	
PK/LDH	0,010 ml		
Mezclar y centrifugar a 700 g durante 10 min; tomar el sobrenadante y a continuación pipetear:			
Sobrenadante	0,75 ml	CK 65 U/l	
Leer absorbancia (A <sub>1</sub> ) y añadir a continuación:			
CK	17,6 μl		
Mezclar e incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Leer blanco y problemas a 340 nm (A <sub>2</sub> ) frente a aire.			

Los cálculos que es necesario efectuar para determinar la concentración de esfingomielina, vienen dados por la expresión siguiente:

$$(A_1 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco}} / \varepsilon = \mu\text{moles de SM en volumen de muestra}$$

Donde :

A<sub>1</sub> : absorbancia a 340 nm a tiempo inicial.

A<sub>2</sub> : absorbancia a 340 nm después de transcurridas las reacciones.

$\varepsilon$  :  $6,22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.4.8. Obtención de plaquetas.

La técnica de separación se basa en el empleo de centrifugaciones diferenciales, realizadas a temperatura ambiente. Se trata de una modificación del método de Barber y Jamieson (1970).

Se recogió sangre de oveja (*Ovis aries L. var. doméstica*) donada por el Matadero Municipal de Salamanca, sobre anticoagulante ACD (75 mM citrato sódico, 40 mM ácido cítrico y 125 mM glucosa) (80 ml anticoagulante/450 ml de sangre). A continuación la sangre se centrifugó a 300xg durante 15 min, obteniéndose de este modo un plasma rico en plaquetas, que es de nuevo centrifugado a 1500xg durante 4 min en un rotor oscilante, repitiéndose el proceso 1 ó 2 veces más. El plasma rico en plaquetas, que está exento prácticamente de leucocitos (<0,005 %) y eritrocitos (<0,05 %) se centrifuga a 3000xg durante 30 min para sedimentar las plaquetas. El sedimento de plaquetas se suspende en una solución A (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, glucosa 5,5 mM, pH=7,4): 9 ml/450 ml de sangre, y se centrifuga a 3000xg durante 30 min para lavar las plaquetas. Así se obtiene un sedimento de plaquetas puras.

#### **2.4.9. Obtención de eritrocitos.**

La sangre recogida en las condiciones indicadas en el apartado 2.4.8., se centrifuga a 300xg durante 15 min. Obtenemos de este modo un sedimento de eritrocitos separado del plasma rico en plaquetas. El sedimento de eritrocitos se lava con NaCl al 0,9 %.

#### **2.4.10. Extracción de lípidos totales de plaquetas.**

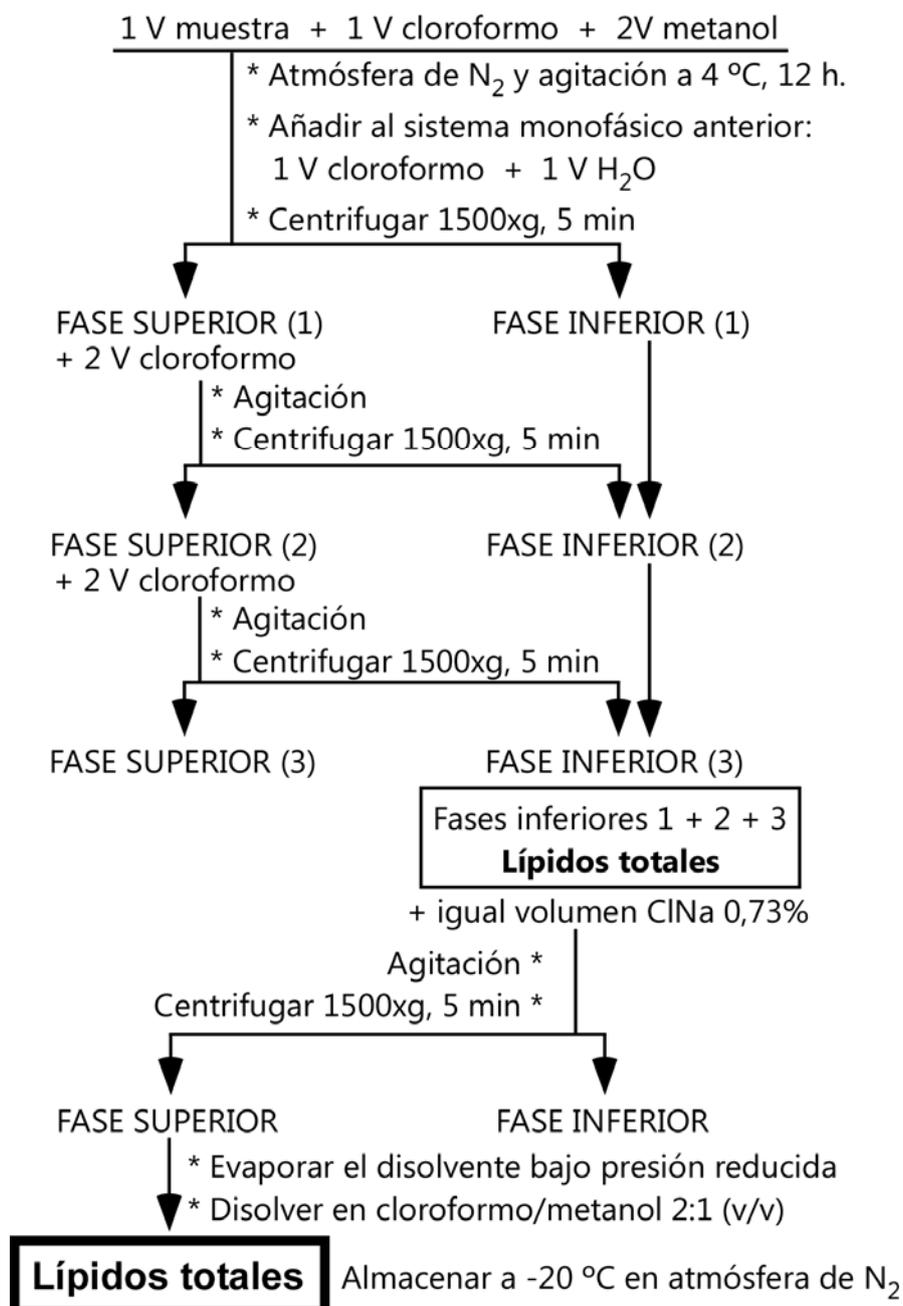
Los lípidos fueron extraídos según el método de Bligh & Dyer (1959), al que se han aplicado las modificaciones siguientes:

Las fases clorofórmicas obtenidas mediante el citado método, que contienen los fosfolípidos y lípidos neutros, fueron lavadas con una disolución de NaCl al 0,73 % para eliminar las sustancias solubles en soluciones salinas diluidas, y que han podido ser arrastradas en el proceso de extracción. A continuación se llevó a sequedad bajo presión reducida determinándose el contenido total de lípidos por gravimetría. El extracto lipídico se disolvió en una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v) a una concentración de 25 mg lípidos/ml, almacenándose a -20 °C en una atmósfera de N<sub>2</sub> hasta que fueron utilizados (véase Esquema 1 en la pág. siguiente).

#### **2.4.11. Extracción de lípidos totales de eritrocitos.**

Los eritrocitos obtenidos según se describe en el apartado 2.4.9. se compactan por centrifugación en un rotor angular a 2300xg durante 10 min, extrayéndose los lípidos tal como describen Rose y Oklander (1965). A 4 ml de eritrocitos compactados se le añaden 1,6 ml de EDTA 0.5 M en NaCl 0,9 %, pH=

7,4 y 30 ml de isopropanol. Se agita la mezcla de forma intermitente durante 1 hora en atmósfera de N<sub>2</sub> y a temperatura ambiente. Seguidamente se añaden 20 ml de cloroformo y de igual modo se agita durante 1 hora. La mezcla se centrifuga a 600xg durante 5 min en un rotor oscilante, para separar la fase orgánica del sedimento. El sobrenadante (fase orgánica) se lleva a sequedad bajo presión reducida determinándose el contenido de lípidos por gravimetría en el extracto seco y disolviéndolos en una mezcla de cloroformo:metanol (2:1,v/v) a una concentración de 25 mg lípidos/ml, que se almacenan a -20 °C en atmósfera de N<sub>2</sub> hasta que son utilizados.



**Esquema 1.** Extracción de lípidos de plaquetas

#### **2.4.12. Obtención de membranas de plaquetas enteras.**

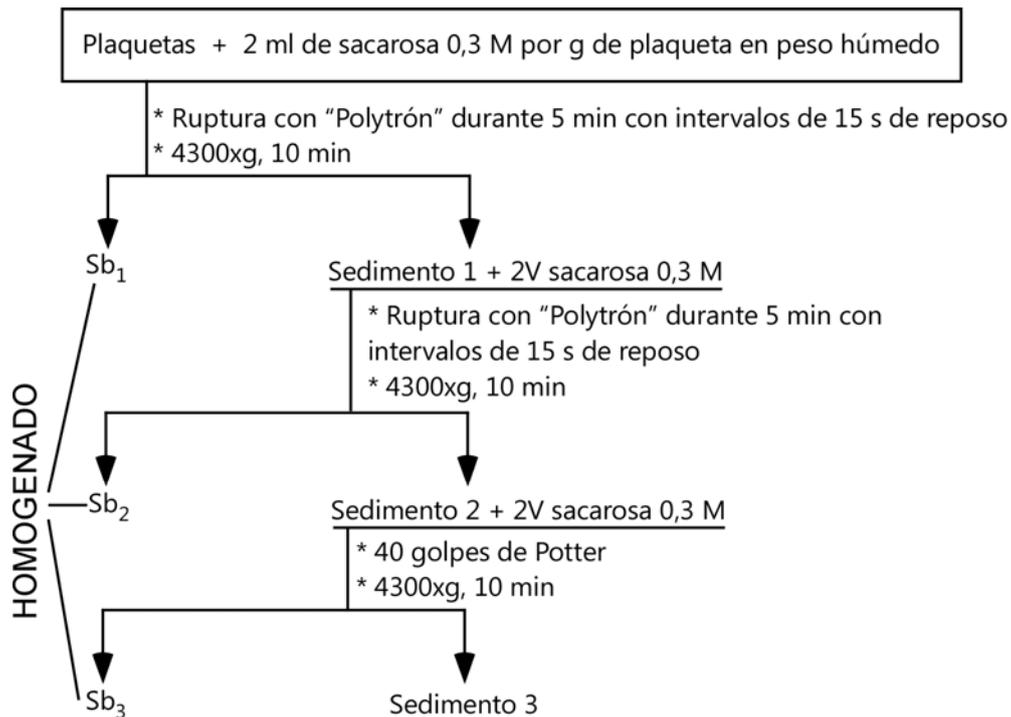
Tres gramos de plaquetas obtenidas según se describe en el apartado 2.4.8., se suspenden en 6 ml de sacarosa 0,3 M (2 ml/g en peso húmedo). Se homogeneizaron con "Polytrón" a la máxima velocidad tal como se indica en el Esquema 2. El homogenado obtenido se centrifuga a 2600xg durante 10 min para sedimentar las células no rotas. El sobrenadante se centrifuga a 100.000xg durante 1 h, obteniéndose un sedimento de membranas crudas. Dichas membranas se lavan con NaCl al 0,9 % y se resuspenden en 2 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

#### **2.4.13. Obtención de membranas de eritrocitos.**

Cuatro ml de eritrocitos compactados se lisan en presencia de 20 V de una disolución de fosfato sódico 5 mM, pH= 7,5, a 0-4°C durante 5 min. Se centrifugan a 100.000xg durante 1h, y el sedimento de membranas eritrocitarias que se obtiene se resuspende en fosfato sódico 5 mM, pH= 7,5, centrifugándose de nuevo a 100000xg durante 1h., con el fin de lavar las membranas de eritrocitos, que finalmente se resuspenden en 6 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

#### **2.4.14. Formación de liposomas.**

Los extractos de lípidos totales de plaquetas y eritrocitos obtenidos según se indica en los apartados 2.4.10. y 2.4.11., respectivamente; se llevan a sequedad total bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, eliminándose las trazas de disolventes al vacío durante 30 min. A continuación se añade disolución amortiguadora borato 0,29 M, que contiene MgSO<sub>4</sub> 11 mM, 1,2 % de Triton X-100, pH= 8,0, para obtener una concentración de fósforo lipídico en la mezcla de 5 mg/ml en el caso de los lípidos procedentes de eritrocitos y de 2 mg/ml en el caso de los lípidos procedentes de plaquetas. La mezcla se resuspendió por agitación, obteniéndose una emulsión que se sometió a 10 "pulsos" de ultrasonidos a la máxima intensidad de 30 s de duración cada uno, manteniéndose 30 s de descanso entre "pulso" y "pulso". De esta forma se obtuvieron vesículas unilamelares que se centrifugaron a 4.000xg durante 45 min, para eliminar metales pesados procedentes de la punta del sonicador, y se mantuvieron en atmósfera de N<sub>2</sub> a 4°C hasta su utilización.



**Esquema 2.** Homogeneización de plaquetas y separación de la fracción cruda de membrana.

## 2.5. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Las muestras se tomaron de ambos pulmones y de todos los lóbulos pulmonares, fijándolas en glutaraldehído al 2% y utilizándose como disolvente buffer fosfato 0,125 M, pH=7,0. Además se añadió 1-3 nM de CaCl para estabilizar los fosfolípidos. La adición del calcio se efectuó goteando lentamente con agitación continua y manteniendo el buffer a 0-4 °C para evitar precipitados. Una vez fijadas las muestras durante 2 h, se lavaron en el mismo buffer utilizado para diluir el glutaraldehído y se osmificaron en tetróxido de osmio al 2% recientemente disuelto en el buffer. Finalizada la osmificación (90 min, 4°C), se lavaron en buffer durante 10-15 min, y se introdujeron en acetato de uranilo al 0.5% a 0°C por espacio de 1 h en oscuridad. Después de un nuevo lavado con el buffer, se procedió a su inclusión en araldita, utilizando para la deshidratación acetonas de concentraciones crecientes. De todos los bloques se realizaron cortes de 1-2  $\mu\text{m}$  mediante un piramitotomo LKB, tiñiéndolos posteriormente con azul de toluidina. Mediante estos cortes panorámicos y utilizando oculares con cuadrícula, se seleccionaron las áreas más interesantes, tallándose en el bloque para realizar cortes ultrafinos con un ultramicrotomo LKB III. Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para así poder ser estudiados en un microscopio electrónico de transmisión.

## **2.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.**

Para determinar si existen diferencias significativas entre los distintos parámetros estudiados se ha utilizado el análisis de la varianza o ANOVA. Este tipo de análisis nos permite controlar la igualdad entre las medias de más de dos poblaciones utilizando muestras independientes. La variabilidad existente dentro de cada parámetro estudiado en cada grupo de edad o en cada grupo de edad-tratamiento ha de ser menor que la variabilidad existente entre los parámetros estudiados en los distintos grupos de edad o grupos de edad-tratamiento, para que las diferencias sean detectables. Se ha utilizado el programa informático SPSS 4.0 para realizar los análisis. El ANOVA es robusto respecto a la hipótesis de normalidad de las variables, no así respecto a la hipótesis de homoscedasticidad. Por ello, se han realizado tests de Shapiro y Lilliefors para normalidad y el test de Levene para homoscedasticidad. Cuando este último era significativo para un parámetro estudiado se transformaban los datos aplicando una función determinada, frecuentemente raíz cuadrada, logaritmo natural, etc., para que así la variable se ajustara a la hipótesis de homoscedasticidad (Galindo, 1984).

Cuando el ANOVA indica que existen diferencias entre las medias de los distintos grupos se realizan pruebas comparativas entre todos los grupos posibles con el fin de identificar aquellos que difieren entre sí. La comparación entre cada par de grupos se realizó aplicando el test de Scheffé. Se consideran resultados del test significativos aquellos pares de valores entre los que se encuentran diferencias con significación estadística del 99 % ( $p < 0,01$ ).

En el estudio para el tratamiento con hiperoxia normobárica, se ha aplicado un ANOVA con dos factores de variación (Edad y medio de vida). Cuando el análisis indica que existen diferencias entre las medias de los distintos grupos comparados, se aplica el test de Scheffé para detectar dichas diferencias. Los resultados se consideran estadísticamente significativos en aquellos pares de valores con significación estadística de 99% ( $p < 0,01$ ).

### **3. RESULTADOS.**

### **3.1. OBTENCIÓN DE SURFACTANTE PULMONAR.**

Los intentos de purificación del surfactante pulmonar contenido en el LBA, según indican Harwood et al (1975) aportaron escaso material, y el análisis de la fosfatidilcolina revelaba que el porcentaje de este fosfolípido en el material purificado no se correspondía con el indicado en la bibliografía para ratas adultas. Posteriormente intentamos purificar el surfactante siguiendo el procedimiento de Adachi et al (1989), y aunque nuestros análisis revelaban que la razón fosfolípido/proteína era similar a la publicada por estos autores, de nuevo, el análisis de fosfatidilcolina mostraba que el porcentaje de este fosfolípido era inferior al publicado por diferentes autores. Así pues, decidimos trabajar con el surfactante pulmonar contenido en el líquido de L. B. A. obtenido según se indica en el apartado 2.4.1., cuyos análisis mostraban una distribución porcentual de los fosfolípidos estudiados similar a la indicada en la bibliografía.

### **3.2. VALIDEZ DE LOS MÉTODOS ENZIMÁTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ALGUNAS CLASES DE FOSFOLÍPIDOS EN MATERIALES BIOLÓGICOS.**

#### **3.2.1. Valoración de la fosfatidilcolina.**

La utilización del método enzimático de Schiefer & Beutler (1981), tal como se describe en el apartado 2.4.5., permitió cuantificar de forma correcta el contenido de fosfatidilcolina en diversos materiales biológicos, tal como se deduce de los resultados que se exponen a continuación.

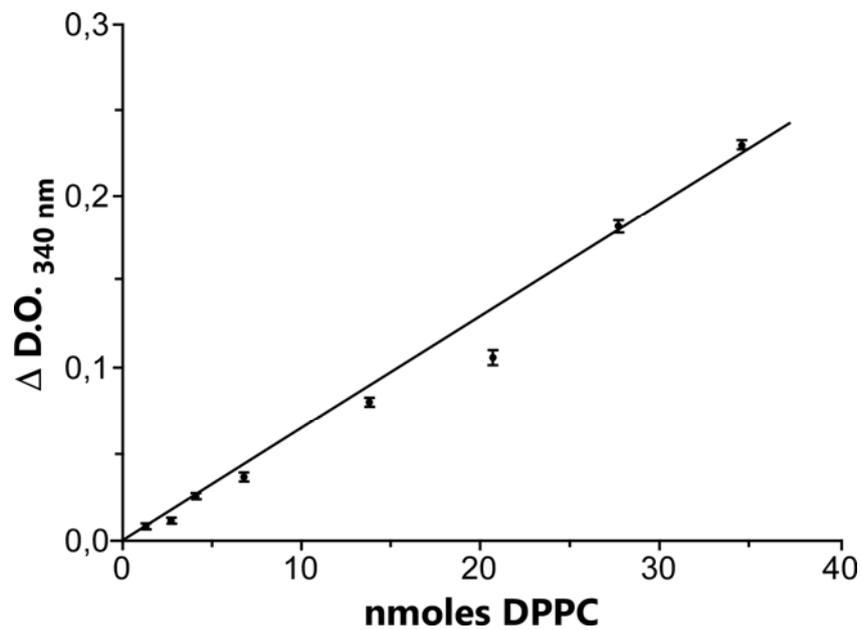
##### **3.2.1.1. En patrones de DPPC.**

En la Fig. 1 se representa la recta patrón de DPPC obtenida según el método de Schiefer & Beutler (1981) a partir de concentraciones crecientes de una disolución de DPPC 0,1 mM en buffer borato sódico 0,29M, que contiene MgSO<sub>4</sub> 11mM y 1,2% de Tritón X-100 (p/v) pH=8. Se observa una relación lineal entre la disminución de la absorbancia a 340 nm y el aumento de la concentración de DPPC comprendida entre 1,4 y 34,6 nmoles en la mezcla de reacción. Resultados similares se obtienen para disoluciones patrones de fosforilcolina (véase Fig. 2). En ambos casos, los valores muestran una relación lineal entre la concentración del sustrato de partida, DPPC y fosforilcolina, y el descenso de la absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH en el transcurso del proceso de valoración. Las funciones que definen las rectas de regresión en las Fig. 1 y Fig. 2 corresponden a las expresiones matemáticas (1) y (2), respectivamente:

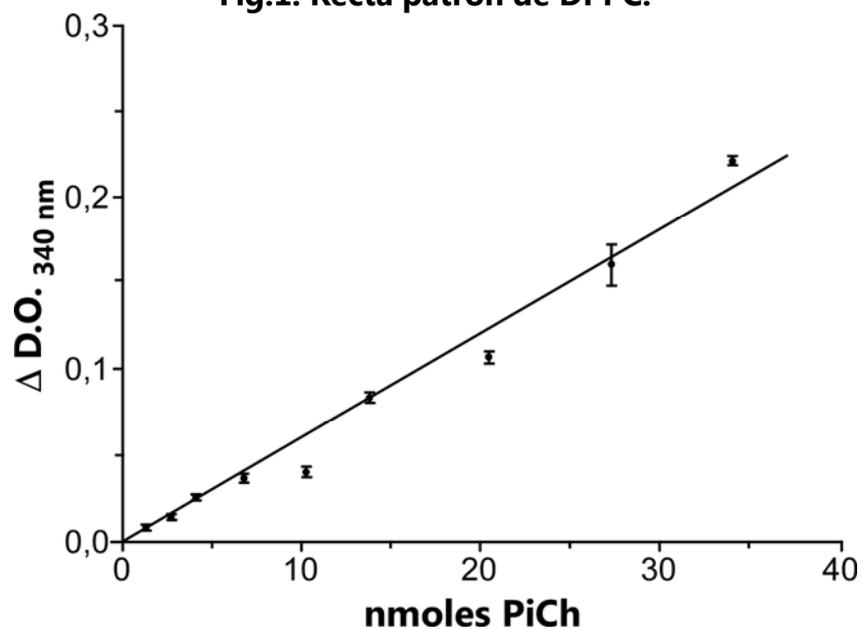
$$y = 0.006x - 0.007 \quad R^2 = 0.981 \quad (1)$$

$$y = 0.007x - 0.008 \quad R^2 = 0.983 \quad (2)$$

De la práctica igualdad entre ambas funciones se deduce que la fosfolipasa C hidroliza toda la DPPC presente en el medio de reacción, liberando, por tanto, el 100 % de la fosforilcolina. Así, el método enzimático permite cuantificar el 100 % de la PC presente en las muestras entre concentraciones de 1,4 y 34,6 nmoles en la mezcla de reacción, y por cada 18,7 nmoles de PC presentes en la mezcla se oxidan 18,7 nmoles de NADH, lo que origina un descenso en la absorbancia a 340 nm de 0,1 unidad.



**Fig. 1: Recta patrón de DPPC.**



**Fig. 2. Recta patrón de fosforilcolina.**

### 3.2.1.2. En lípidos procedentes de eritrocitos y plaquetas.

Los resultados de cuantificación de la fosfatidilcolina en los liposomas formados a partir de los extractos lipídicos procedentes de eritrocitos y plaquetas ovinas mediante el método enzimático, se encuentran recogidos en la Tabla I. El contenido en dicho fosfolípido es aproximadamente del 2 % en eritrocitos, y del 32 % en plaquetas con respecto a los fosfolípidos totales, siendo coincidentes estos valores con los aportados por la bibliografía.

**Tabla I.** VALORACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA POR DISTINTOS MÉTODOS EN LÍPIDOS EXTRAÍDOS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.

<b>Distribución porcentual de PC</b>		
Procedencia de la PC	Según método enzimático	Según bibliografía
Lípidos de eritrocitos	1,6 ± 0,45 n=4	1,2 n=5 <b>(1)</b>
Lípidos de plaquetas	31,9 ± 0,0 n=4	29,8 ± 1,3 n=5 <b>(2)</b>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los porcentajes de PC respecto al total de fosfolípidos en n experimentos.

(1) MARIN et al. Biochimie (1990) **72**: 745-750

(2) SANCHEZ-YAGÜE & LLANILLO. Biochim. Biophys. Acta. (1986) **856**: 193-201.

### 3.2.1.3. En membranas procedentes de eritrocitos y plaquetas.

La fosfatidilcolina se valoró directamente en membranas de eritrocitos y plaquetas ovinas mediante el método enzimático descrito en el apartado 2.4.5. obteniéndose los resultados que figuran en la Tabla II. Estos valores son coincidentes con los encontrados en lípidos procedentes de las citadas células sanguíneas (véase Tabla I), lo que demuestra que el método de valoración enzimático es directamente aplicable a membranas intactas, sin necesidad de realizar extracciones previas de lípidos.

**Tabla II.** VALORACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA POR DISTINTOS MÉTODOS EN MEMBRANAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.

<b>Distribución porcentual de PC</b>		
Procedencia de la PC	Según método enzimático	Según bibliografía
Membranas de eritrocitos	2,0 ± 0,5 n=4	1,2 n=5 <b>(1)</b>
Membranas de plaquetas	33,9 ± 0,3 n=4	29,8 ± 1,3 n=5 <b>(2)</b>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los porcentajes de PC respecto al total de fosfolípidos en n experimentos.

(1) MARIN et al. Biochimie (1990) **72**: 745-750

(2) SANCHEZ-YAGÜE & LLANILLO. Biochim. Biophys. Acta. (1986) **856**: 193-201.

Las determinaciones de fosfatidilcolina en eritrocitos y plaquetas por el método enzimático aportan resultados coincidentes con los obtenidos mediante otros métodos descritos en la bibliografía (véase Tablas I y II), lo que demuestra que dicho método de valoración es totalmente válido, dada la reproductibilidad de los resultados obtenidos mediante el mismo. Además es rápido de efectuar y requiere el empleo de muy pequeñas cantidades de muestra.

### **3.2.2. Valoración de la esfingomielina.**

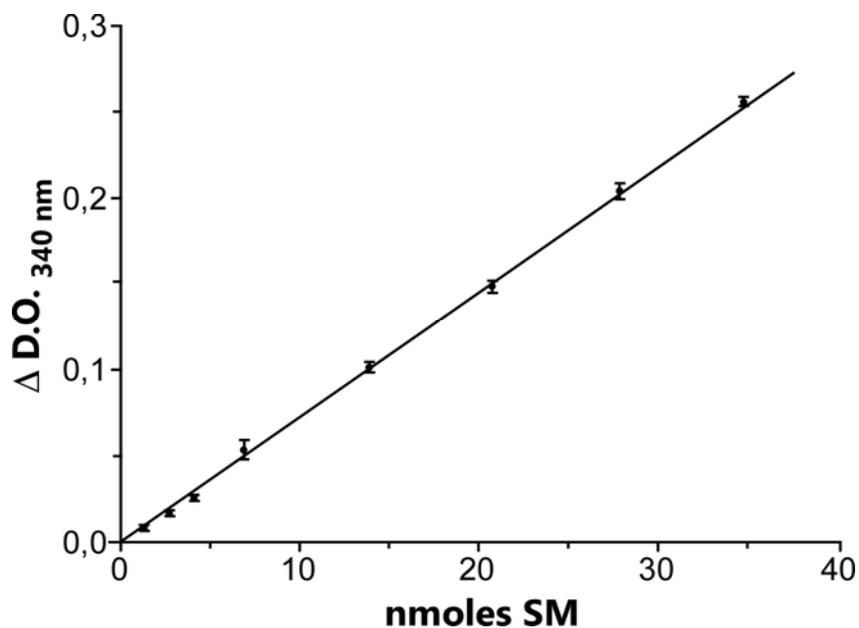
La utilización del método enzimático basado en el de Schiefer & Beutler (1981) con las modificaciones que se describen en el apartado 2.4.7., ha permitido una correcta valoración de la esfingomielina en los materiales biológicos que a continuación se indican:

#### **3.2.2.1. En patrones de esfingomielina.**

En la Fig. 3 se representa la recta patrón obtenida a partir de concentraciones crecientes de una disolución de esfingomielina 0,1 mM en buffer borato sódico 0,29 M, MgSO<sub>4</sub> 11mM y 1,2% de Tritón X-100 (p/v), pH=8,0, valoradas por el método enzimático anteriormente indicado. Se observa relación lineal entre la disminución de la absorbancia a 340 nm y el aumento de las concentraciones de esfingomielina comprendidas entre 1,4 y

34,6 nmoles en la mezcla de reacción. La función que define la recta de regresión es la siguiente:

$$y = 0.007x - 0.001 \quad R^2 = 0.999$$



**Fig.3: Recta patrón de esfingomielina.**

Este método de valoración permite cuantificar el 100 % de la esfingomielina presente en las muestras entre 1,4 y 34,6 nmoles en la mezcla de reacción, y por cada 17,8 nmoles de SM presentes en la mezcla se oxidan 17,8 nmoles de NADH, lo que origina un descenso en la absorbancia a 340 nm de 0,1 unidad.

### 3.2.2.2. En lípidos procedentes de eritrocitos y plaquetas.

La Tabla III muestra los porcentajes de esfingomielina presentes en lípidos de eritrocitos y plaquetas. Los porcentajes obtenidos en liposomas formados a partir de lípidos extraídos de estas células sanguíneas valorados por el método enzimático descrito en el apartado 2.4.7., son coincidentes con los descritos en la bibliografía. La esfingomielina presente en los eritrocitos oscila alrededor del 45 %, mientras que en plaquetas es bastante inferior, aproximadamente 16 % del total de fosfolípidos presentes.

**Tabla III.** VALORACIÓN DE ESFINGOMIELINA POR DISTINTOS MÉTODOS EN LÍPIDOS EXTRAÍDOS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.

<b>Distribución porcentual de SM</b>		
Procedencia de la SM	Según método enzimático	Según bibliografía
Lípidos de eritrocitos	45,5 ± 0,7 n=4	47,3 ± 2,4 n=5 <b>(1)</b>
Lípidos de plaquetas	16,7 ± 3,2 n=4	17,6 ± 1,9 n=5 <b>(2)</b>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los porcentajes de SM respecto al total de fosfolípidos en n experimentos.

(1) MARIN et al. Biochimie (1990) **72**: 745-750

(2) SANCHEZ-YAGÜE & LLANILLO. Biochim. Biophys. Acta. (1986) **856**: 193-201.

### 3.2.2.3. En membranas procedentes de eritrocitos y plaquetas.

El método enzimático anteriormente citado permite valorar de forma directa el contenido de esfingomielina en las muestras biológicas. Los resultados obtenidos en las membranas de eritrocitos y plaquetas se recogen en la Tabla IV, y son coincidentes con los obtenidos en lípidos procedentes de estas células sanguíneas (véase Tabla III).

**Tabla IV.** VALORACIÓN DE ESFINGOMIELINA EN MEMBRANAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS MEDIANTE DISTINTOS MÉTODOS.

<b>Distribución porcentual de SM</b>		
Procedencia de la SM	Según método enzimático	Según bibliografía
Membranas de eritrocitos	43,0 ± 2,0 n=4	47,3 ± 2,4 n=5 <b>(1)</b>
Membranas de plaquetas	23,6 ± 0,9 n=4	17,6 ± 1,9 n=5 <b>(2)</b>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los porcentajes de SM respecto al total de fosfolípidos en n experimentos.

(1) MARIN et al. Biochimie (1990) **72**: 745-750

(2) SANCHEZ-YAGÜE & LLANILLO. Biochim. Biophys. Acta. (1986) **856**: 193-201.

Las determinaciones de esfingomielina en muestras de eritrocitos y plaquetas por el método enzimático aportan resultados coincidentes con los obtenidos mediante otros métodos descritos en la bibliografía (véase Tablas III y IV) lo que demuestra que dicho método de determinación es totalmente válido, dada la reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante el mismo. Además es rápido de efectuar y requiere el empleo de muy pequeñas cantidades de muestra.

### **3.2.3. Valoración del fosfatidilglicerol.**

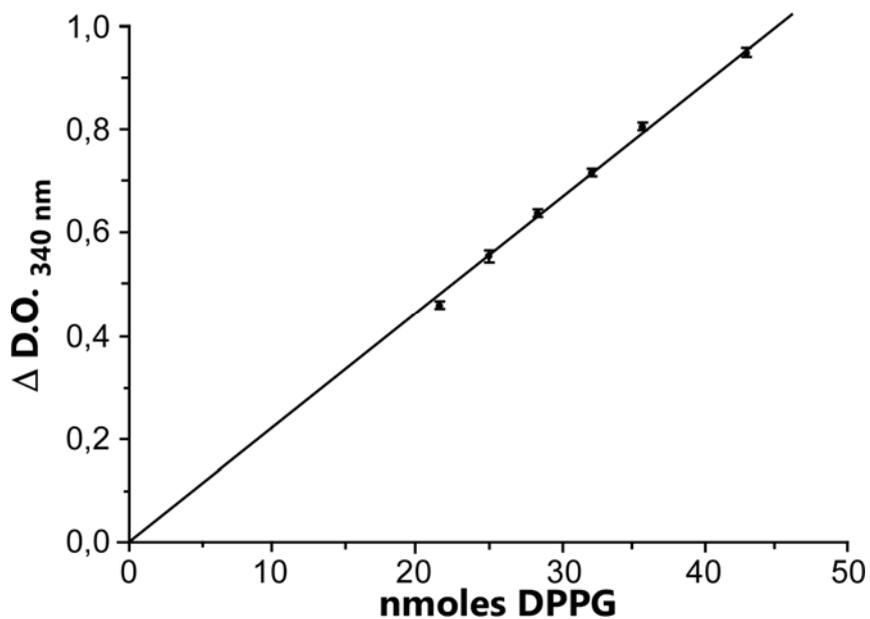
El empleo del método enzimático de Schiefer & Beutler (1984) para valorar el fosfatidilglicerol en el líquido amniótico, es también aplicable a la valoración de este fosfolípido en los materiales biológicos que a continuación se indican.

#### **3.2.3.1. En patrones de DPPG.**

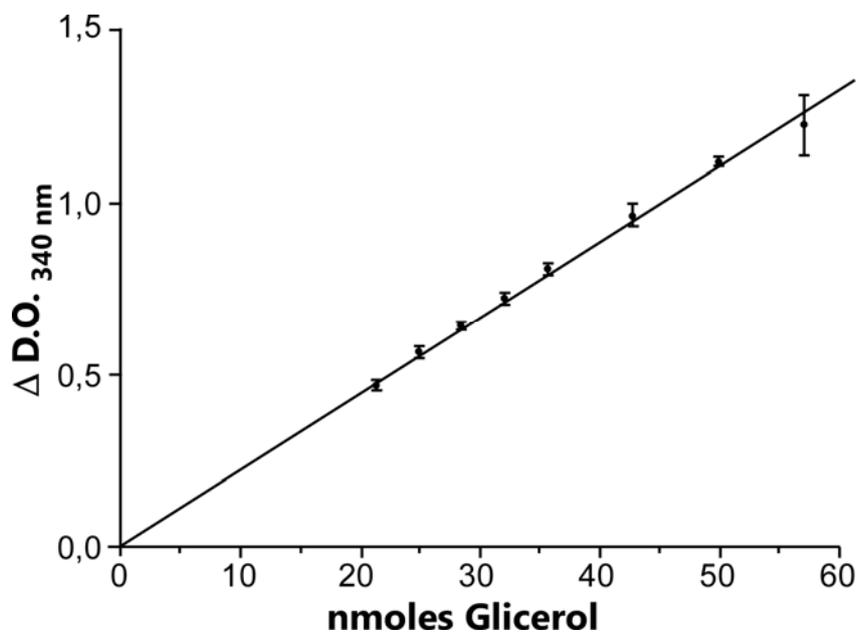
Las representaciones de concentraciones crecientes de DPPG (Fig. 4) o glicerol (Fig. 5) frente a los descensos en la absorbancia a 340 nm siguen relaciones directamente proporcionales a concentraciones comprendidas entre 21,4 y 42,8 nmoles, cuyas rectas de regresión vienen definidas por la función (3) para la Fig. 4 y por la función (4) para la Fig. 5.

$$y = 0.023x - 0.025 \quad R^2 = 0.998 \quad (3)$$

$$y = 0.021x + 0.029 \quad R^2 = 0.995 \quad (4)$$



**Fig.4: Recta patrón de DPPG.**



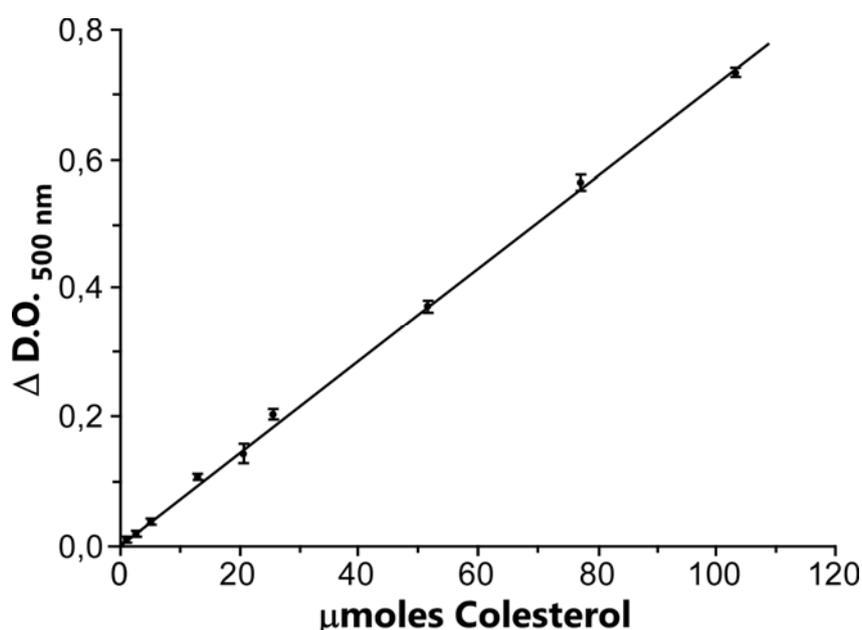
**Fig.5 Recta patrón de glicerol.**

En este caso, también el método enzimático permite cuantificar el 100 % del sustrato presente en las muestras, cuando se trabaja a concentraciones comprendidas entre 21,4 y 42,8 nmoles en la mezcla de reacción, originándose un descenso de 0,5 unidades en la absorbancia a 340 nm cuando existen 22,8 nmoles de sustrato (DPPG o glicerol).

### 3.2.4. Valoración de colesterol.

En la Fig. 6 se representa la recta patrón de colesterol obtenida según el método de Siedel et al (1981), a partir de concentraciones crecientes de una disolución de colesterol 2,58 mM. Como puede verse, existe una relación directamente proporcional entre los incrementos de la absorbancia a 500 nm y las concentraciones de colesterol comprendidas entre 1,3 y 103,2  $\mu$ moles. La función que define la recta de regresión es:

$$y = 0.007x + 0.0062 \quad R^2 = 0.999$$



**Fig. 6. Recta patrón de colesterol.**

### 3.3. DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES FOSFOLÍPIDOS Y DEL COLESTEROL EN EL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS DE DIFERENTES EDADES.

Las cantidades de proteínas, colesterol y fosfolípidos en el surfactante pulmonar de rata fueron determinadas tal como se indica en los apartados 2.4.2., 2.4.3. y 2.4.4., respectivamente.

#### **3.3.1. Cuantificación del contenido en colesterol y fosfolípidos.**

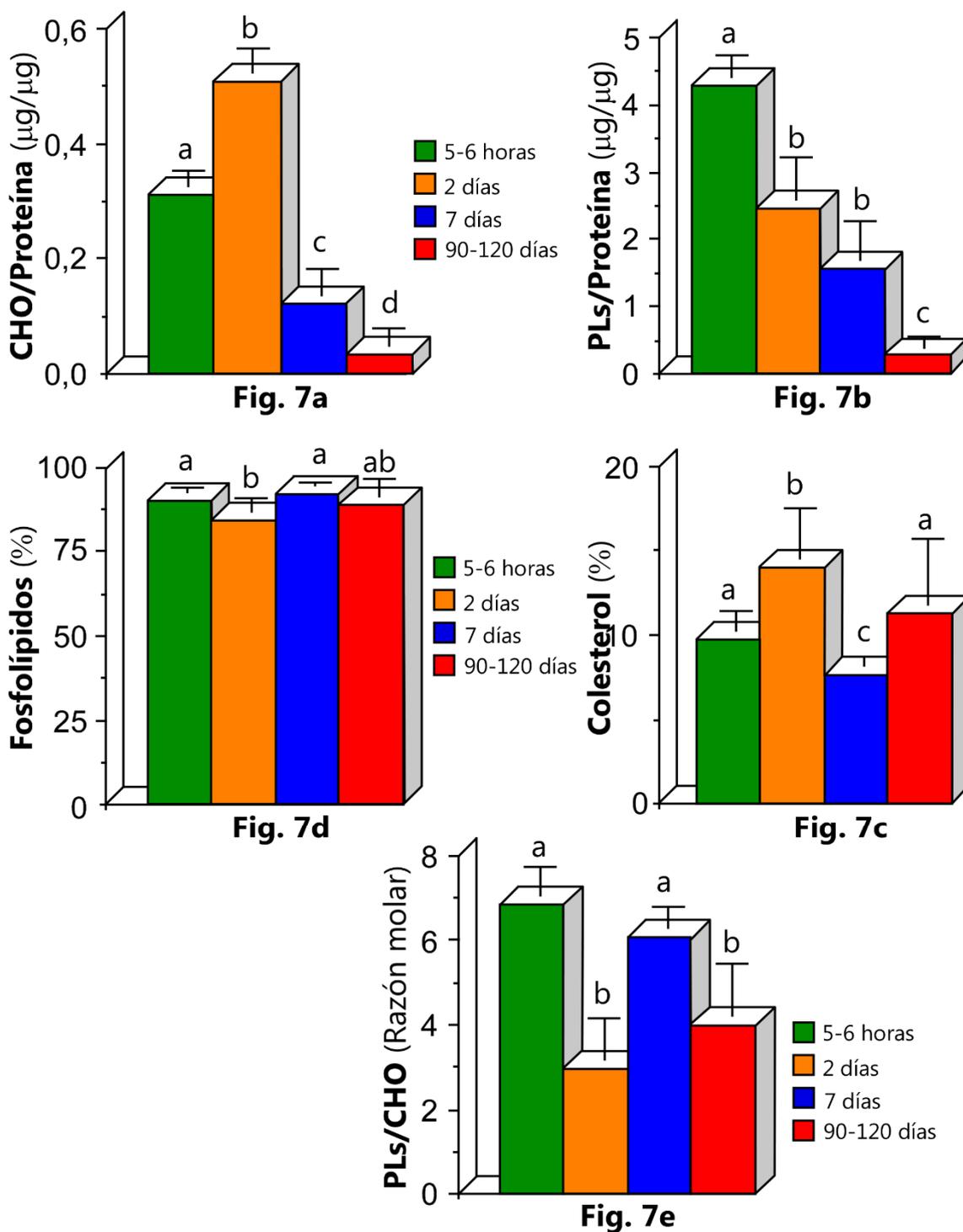
Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V, y aparecen representados gráficamente en la Fig. 7. Los lípidos mayoritarios del surfactante pulmonar son el colesterol (11-8 %) y los fosfolípidos (92-85 %), los cuales experimentan cambios estadísticamente significativos en función de la edad del animal (véase Figs. 7c y 7d). Las razones colesterol/proteína y

fosfolípidos/proteína descienden, excepto la razón colesterol/proteína en animales de 2 días, a medida que aumenta la edad del animal, debido a un incremento del contenido en proteínas del surfactante con el aumento de la edad (véase Figs. 7a y 7b). Sin embargo, la razón molar colesterol/fosfolípidos no sigue una pauta general de comportamiento, ya que desciende hasta la mitad en animales de 2 días con respecto al valor registrado en recién nacidos, para volver a alcanzar los niveles hallados en recién nacidos a los 7 días de vida, descendiendo nuevamente en los animales adultos hasta un valor de 4,0 (véase Fig. 7e).

**TABLA V.** CONTENIDO EN FOSFOLÍPIDOS TOTALES Y COLESTEROL DEL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS DE DIFERENTES EDADES.

Composición	GRUPOS DE EDAD			
	5-6 horas (n=5)	2 días (n=7)	7 días (n=7)	90-120 días (n=7)
CHO/Proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	$0,31 \pm 0,03^a$	$0,5 \pm 0,04^b$	$0,12 \pm 0,04^c$	$0,034 \pm 0,003^d$
PLs/Proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	$4,3 \pm 0,3^a$	$2,5 \pm 0,6^b$	$1,5 \pm 0,6^b$	$0,3 \pm 0,2^c$
Fosfolípidos (%)	$90,3 \pm 1,1^a$	$84,7 \pm 3,3^b$	$92,2 \pm 0,6^a$	$89,3 \pm 4,6^{ab}$
Colesterol (%)	$9,7 \pm 1,1^a$	$14,1 \pm 3,0^b$	$7,6 \pm 0,6^c$	$11,3 \pm 3,9^a$
Fosfolípidos / colesterol (Razón molar)	$6,8 \pm 0,7^a$	$3,0 \pm 1,0^b$	$6,1 \pm 0,5^a$	$4,0 \pm 1,3^b$

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  S. D. de los datos obtenidos en n experimentos. La distribución porcentual se ha calculado considerando el 100% a la suma de fosfolípidos más colesterol. Por filas, los datos con superíndices sin ninguna letra coincidente (a, b, c, d):  $p < 0,01$ .



**Fig. 7.** Estudio comparativo del contenido en fosfolípidos y colesterol del surfactante pulmonar de ratas de diferentes edades. La distribución porcentual se ha calculado considerando el 100 % a la suma de fosfolípidos más colesterol. Las barras de cada diagrama sin letra coincidente (a, b, c, d) corresponden a valores con significación estadística:  $p < 0,01$ .

### 3.3.2. Estudio de la distribución porcentual de los principales fosfolípidos.

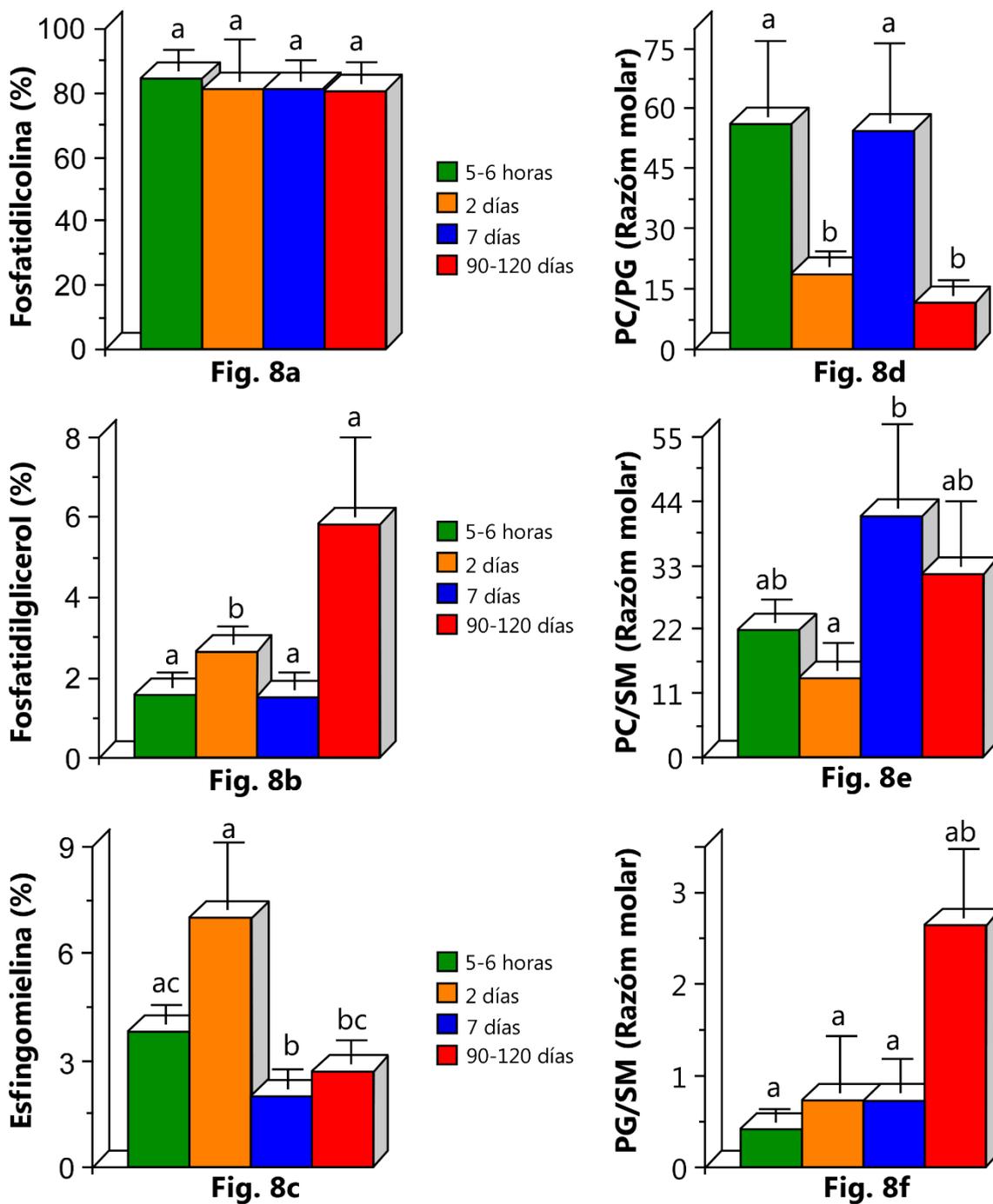
Las valoraciones de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y esfingomiélin se llevaron a cabo según se especifica en los apartados 2.4.5., 2.4.6. y 2.4.7., respectivamente.

La distribución porcentual de los principales fosfolípidos del surfactante pulmonar de ratas de diferentes edades se refleja en la Tabla VI, cuyos resultados se expresan gráficamente en la Fig. 8. El porcentaje de fosfatidilcolina es aproximadamente del 80 % respecto al total de fosfolípidos, sin que se observen variaciones estadísticamente significativas con la edad (véase Fig. 8a). El porcentaje de fosfatidilglicerol aumenta significativamente con la edad adulta (6 %) con respecto a los recién nacidos (véase Fig. 8b). Sin embargo, el porcentaje de esfingomiélin desciende con la edad, llegando a ser aproximadamente del 2 % en el adulto (véase Fig. 8c). La razón molar PC/PG desciende de forma significativa en los animales adultos, alcanzando valores 5 veces inferiores a los detectados en los recién nacidos (véase Fig. 8d). Las razones molares PC/SM se mantienen sin variaciones estadísticamente significativas a lo largo de la edad, excepto en los animales de 2 días, donde se aprecia un descenso de 3 veces con respecto a los valores encontrados en los animales de 7 días (véase Fig. 8e). La razón molar PG/SM en el surfactante pulmonar de ratas adultas experimenta un aumento al menos de 3 veces con respecto a los animales del resto de las edades. De ello se deduce, que si bien los porcentajes de fosfatidilcolina y esfingomiélin se mantienen bastante constantes a lo largo de la edad, sin embargo, el fosfatidilglicerol aumenta significativamente con respecto a la esfingomiélin y desciende con respecto a la fosfatidilcolina en el estado adulto, cuando se comparan dichas razones con las que aparecen en los recién nacidos.

**Tabla VI.** CUANTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES FOSFOLÍPIDOS DEL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS DE DIFERENTES EDADES.

Distribución (%)	GRUPOS DE EDAD			
	5-6 horas (n=5)	2 días (n=7)	7 días (n=7)	90-120 días (n=7)
Fosfatidilcolina	84,6 ± 6,1 <sup>a</sup>	81,5 ± 12,5 <sup>a</sup>	81,4 ± 6,4 <sup>a</sup>	80,5 ± 6,5 <sup>a</sup>
Fosfatidilglicerol	1,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,8 ± 1,9 <sup>b</sup>
Esfingomielina	3,8 ± 0,5 <sup>ac</sup>	7,0 ± 1,9 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,6 <sup>bc</sup>
<u>Razón molar</u>				
PC/PG	56,0 ± 18,8 <sup>a</sup>	17,6 ± 3,4 <sup>b</sup>	54,5 ± 19,6 <sup>a</sup>	11,4 ± 3,7 <sup>b</sup>
PC/SM	21,7 ± 4,0 <sup>ab</sup>	19,6 ± 4,5 <sup>a</sup>	41,4 ± 14,4 <sup>b</sup>	31,3 ± 11,0 <sup>ab</sup>
PG/SM	0,41 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,7 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los datos obtenidos en n experimentos. Por filas, los datos con superíndices sin ninguna letra coincidente (a, b, c): p<0,01.



**Fig. 8.** Estudio comparativo de la composición en fosfolípidos mayoritarios del surfactante pulmonar procedente de ratas de diferentes edades. Las barras de cada diagrama sin ninguna letra coincidente (a, b, c) corresponden a valores con significación estadística:  $p < 0,01$ .

### **3.4. Efecto de la hiperoxia sobre la composición lipídica del surfactante pulmonar.**

#### **3.4.1. Estudio comparativo en ratas de la misma edad sometidas a condiciones de hiperoxia frente a ratas controles.**

Las cantidades de proteínas, colesterol y fosfolípidos en el surfactante pulmonar de rata fueron determinadas tal como se indica en los apartados 2.4.2., 2.4.3. y 2.4.4., respectivamente. Las valoraciones de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y esfingomieline se llevaron a cabo según se especifica en los apartados 2.4.5., 2.4.6. y 2.4.7., respectivamente.

##### **3.4.1.1. Estudio en animales de 2 días.**

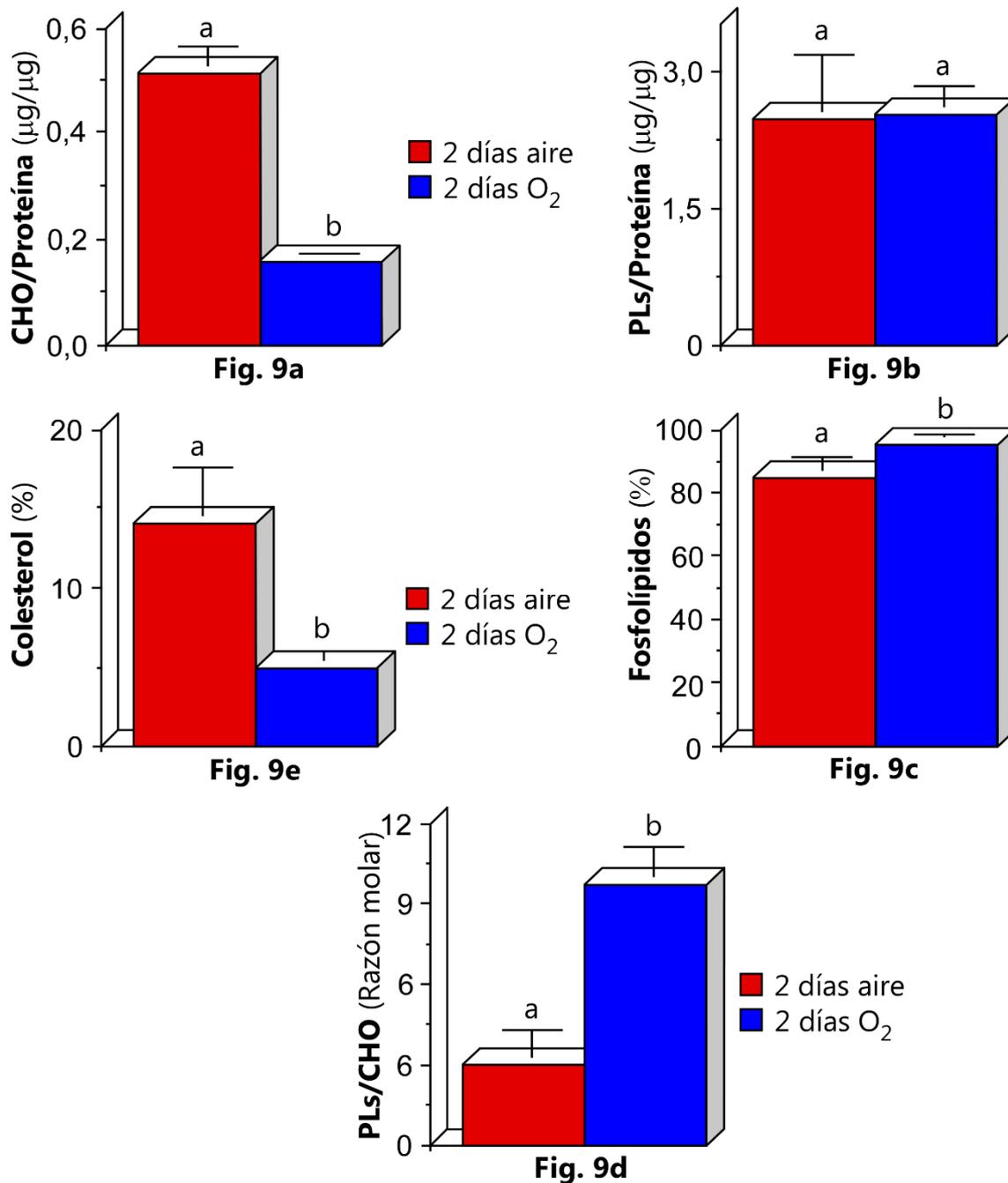
Los datos obtenidos en el estudio de la composición lipídica del surfactante pulmonar de ratas de 2 días tratadas con hiperoxia aparecen en la Tabla VII, representándose gráficamente en la Fig. 9. Solamente la relación fosfolípido/proteína no varía por el efecto del tratamiento, el resto de los parámetros analizados cambian de forma significativa, con descensos tanto en el porcentaje de colesterol como en la razón colesterol/proteína, con aumento en el porcentaje de fosfolípidos. La razón molar fosfolípidos/colesterol aumenta 3,2 veces por efecto del tratamiento.

La composición en fosfolípidos mayoritarios se muestra en la Tabla VIII. Estos datos se expresan gráficamente en la Fig. 10. No se observan diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de fosfatidilcolina (Fig. 10a) y de fosfatidilglicerol (Fig. 10b). Sin embargo, el porcentaje de esfingomieline desciende 4 veces por efecto del tratamiento con respecto a los controles (Fig. 10c). La razón molar PC/PG no muestra variaciones significativas (Fig. 10d), mientras que las razones molares PC/SM y PG/SM aumentan 3 y 7 veces respectivamente por efecto del tratamiento, a consecuencia de los cambios que experimenta el surfactante en el contenido de SM (Fig. 10e y 10f).

**Tabla VII.** CONTENIDO EN FOSFOLÍPIDOS TOTALES Y COLESTEROL DEL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS DE 2 DÍAS TRATADAS CON HIPEROXIA.

<b>Composición</b>	<b>CONTROLES (n=7)</b>	<b>HIPEROXIA (n=5)</b>
CHO/Proteína (µg/µg)	0,50 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>b</sup>
PLs/Proteína (µg/µg)	2,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
Fosfolípidos (%)	84,7 ± 3,3 <sup>a</sup>	95,0 ± 0,8 <sup>b</sup>
Colesterol (%)	14,1 ± 3,0 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,6 <sup>b</sup>
Fosfolípidos/colesterol (Razón molar)	3,1 ± 1,0 <sup>a</sup>	9,7 ± 1,1 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S. D. de los datos obtenidos en n experimentos. La distribución porcentual se ha calculado considerando el 100% a la suma de fosfolípidos más colesterol. Por filas, los datos con superíndices sin ninguna letra coincidente (a, b): p<0,01.

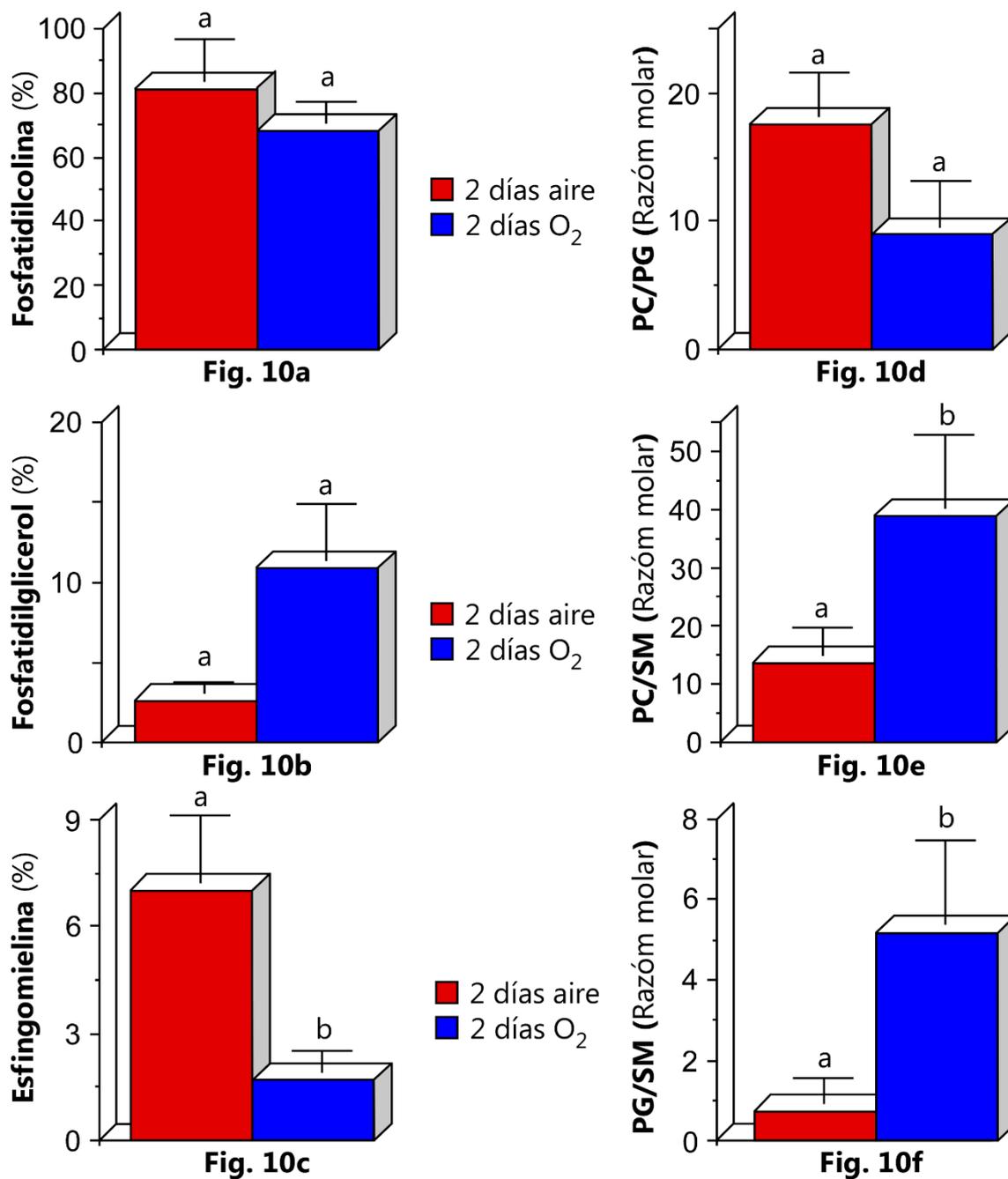


**Fig. 9.** Efecto de la hiperoxia sobre el contenido en fosfolípidos y colesterol del surfactante pulmonar de ratas de 2 días. La distribución porcentual se ha calculado considerando el 100 % a la suma de fosfolípidos más colesterol. Los diagramas de barras sin ninguna letra coincidente (a, b) corresponden a valores con significación estadística:  $p < 0,01$ .

**Tabla VIII.** COMPOSICIÓN EN FOSFOLÍPIDOS MAYORITARIOS DEL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS DE 2 DÍAS EN HIPEROXIA.

<b>Distribución (%)</b>	<b>CONTROLES (n=7)</b>	<b>HIPEROXIA (n=5)</b>
Fosfatidilcolina	81,5 ± 12,5 <sup>a</sup>	68,3 ± 6,4 <sup>a</sup>
Fosfatidilglicerol	2,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	10,9 ± 3,5 <sup>a</sup>
Esfingomielina	7,0 ± 1,9 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,6 <sup>b</sup>
<u>Razón molar</u>		
PC/PG	17,6 ± 3,4 <sup>a</sup>	8,8 ± 3,6 <sup>a</sup>
PC/SM	19,6 ± 4,5 <sup>a</sup>	38,8 ± 12,6 <sup>b</sup>
PG/SM	0,72 ± 0,61 <sup>a</sup>	5,2 ± 2,1 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los datos obtenidos en n experimentos. Por filas, los datos con superíndices sin ninguna letra coincidente (a, b): p<0,01.



**Fig. 10.** Composición en fosfolípidos mayoritarios del surfactante pulmonar procedente de ratas de 2 días tratadas con hiperoxia. Los diagramas de barras sin ninguna letra coincidente (a, b) corresponden a valores con significación estadística:  $p < 0,01$ .

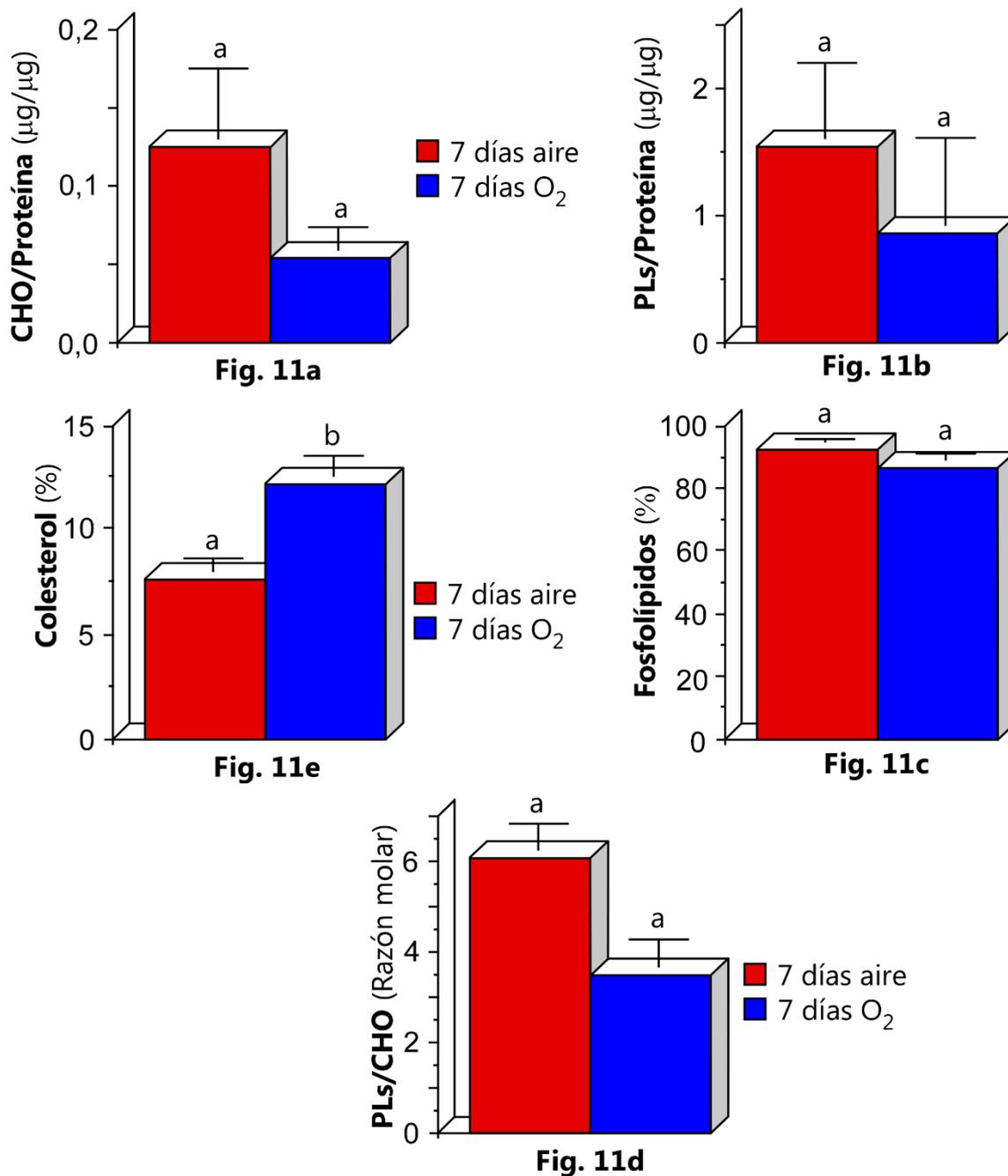
### 3.4.1.2. Estudio en animales de 7 días.

La Tabla IX muestra el contenido en fosfolípidos totales y en colesterol del surfactante pulmonar de ratas de 7 días tratadas con hiperoxia. Estos datos se representan de forma gráfica en la Fig. 11. De todos los parámetros analizados sólo el porcentaje de colesterol muestra cambios estadísticamente significativos durante el tratamiento, con un aumento de su distribución porcentual (1.6 veces) con respecto a los lípidos totales en el grupo tratado. La composición en fosfolípidos mayoritarios (Tabla X y Fig. 12) no muestra diferencias estadísticamente significativas en el grupo de animales tratados con respecto a los controles en lo que se refiere a los porcentajes de fosfatidilcolina (Fig. 12a) y fosfatidilglicerol (Fig. 12b), lo mismo que sucede en los animales de 2 días. Sin embargo, los cambios observados en el patrón de esfingomielina, muestran un comportamiento distinto en este caso con respecto a los animales más jóvenes, ya que aquí se observa un incremento de 4 veces en el porcentaje de dicho fosfolípido en las ratas tratadas (Fig. 12c). Respecto a las razones molares, sólo la razón PC/SM experimenta variaciones estadísticamente significativas, disminuyendo 4,5 veces en el grupo de ratas tratadas con hiperoxia (ver Fig. 12e).

**Tabla IX.** CONTENIDO EN FOSFOLÍPIDOS TOTALES Y COLESTEROL DEL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS DE 7 DÍAS TRATADAS CON HIPEROXIA.

<b>Composición</b>	<b>CONTROLES (n=7)</b>	<b>HIPEROXIA (n=4)</b>
CHO/Proteína (µg/µg)	0,12 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,053 ± 0,02 <sup>a</sup>
PLs/Proteína (µg/µg)	1,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,7 <sup>a</sup>
Fosfolípidos (%)	92,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	86,7 ± 1,7 <sup>a</sup>
Colesterol (%)	7,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	12,1 ± 1,0 <sup>b</sup>
Fosfolípidos/colesterol (Razón molar)	6,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,6 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los datos obtenidos en n experimentos. La distribución porcentual se ha calculado considerando el 100 % a la suma de fosfolípidos más colesterol. Por filas, los datos con superíndices sin ninguna letra coincidente (a, b): p<0,01.

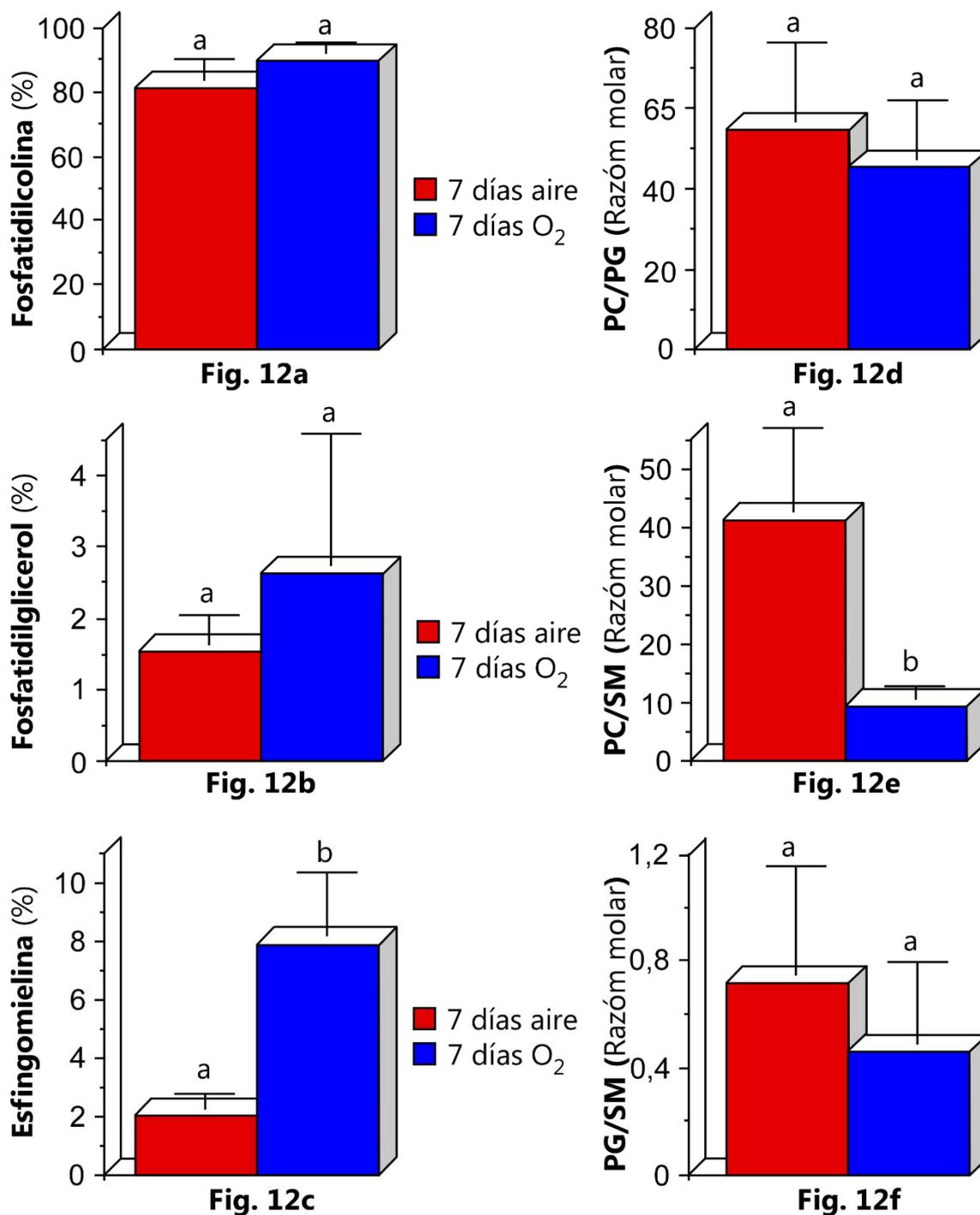


**Fig. 11:** Efecto de la hiperoxia sobre el contenido en fosfolípidos y colesterol del surfactante pulmonar de ratas de 7 días. La distribución porcentual se ha calculado considerando el 100 % a la suma de fosfolípidos más colesterol. Los diagramas de barras sin ninguna letra coincidente (a, b) corresponden a valores con significación estadística:  $p < 0,01$ .

**Tabla X:** COMPOSICIÓN EN FOSFOLÍPIDOS MAYORITARIOS DEL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS DE 7 DÍAS TRATADAS CON HIPEROXIA.

<b>Distribución (%)</b>	<b>CONTROLES (n=7)</b>	<b>HIPEROXIA (n=4)</b>
Fosfatidilcolina	81,4 ± 6,9 <sup>a</sup>	90,0 ± 2,2 <sup>a</sup>
Fosfatidilglicerol	1,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,6 ± 1,8 <sup>a</sup>
Esfingomielina	2,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	8,0 ± 2,1 <sup>b</sup>
<u>Razón molar</u>		
PC/PG	54,5 ± 19,6 <sup>a</sup>	45,4 ± 14,5 <sup>a</sup>
PC/SM	41,4 ± 14,4 <sup>a</sup>	9,2 ± 2,2 <sup>b</sup>
PG/SM	0,72 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,3 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los datos obtenidos en n experimentos. Por filas, los datos con superíndices sin ninguna letra coincidente (a, b): p<0,01.



**Fig. 12.** Composición en fosfolípidos mayoritarios del surfactante pulmonar procedente de ratas de 7 días tratadas con hiperoxia. Los diagramas de barras sin ninguna letra coincidente (a, b) corresponden a valores con significación estadística:  $p < 0,01$ .

### 3.4.1.3. Estudio en animales adultos.

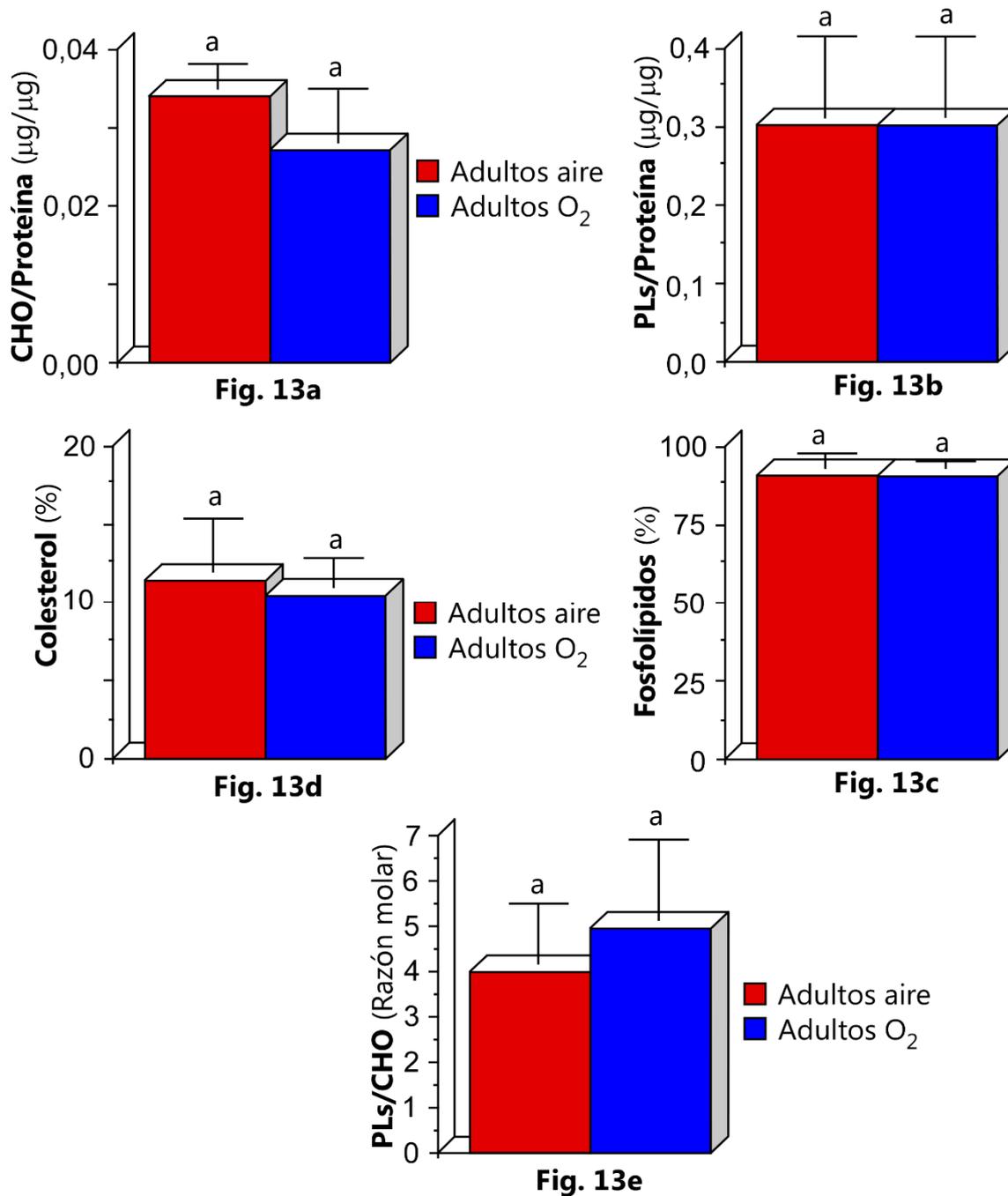
El contenido en fosfolípidos totales y en colesterol del surfactante pulmonar de ratas adultas (90-120 días) no muestra variaciones estadísticamente significativas con respecto a los controles (véase Tabla XI y Fig. 13).

El estudio de la composición en fosfolípidos mayoritarios muestra solamente cambios en el contenido en fosfatidilglicerol, que desciende 4 veces en los animales tratados con respecto a los controles (véase Tabla XII y Fig. 14), lo que ocasiona un aumento en la relación molar PC/PG de 6,5 veces (Fig. 14d) y un descenso en la relación molar PG/SM de 6,5 veces (Fig. 14f).

**Tabla XI:** CONTENIDO EN FOSFOLÍPIDOS TOTALES Y COLESTEROL DEL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS ADULTAS TRATADAS CON HIPEROXIA.

<b>Composición</b>	<b>CONTROLES (n=7)</b>	<b>HIPEROXIA (n=7)</b>
CHO/Proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	$0,034 \pm 0,003^a$	$0,027 \pm 0,007^a$
PLs/Proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	$0,3 \pm 0,1^a$	$0,3 \pm 0,1^a$
Fosfolípidos (%)	$86,3 \pm 4,6^a$	$89,5 \pm 1,8^a$
Colesterol (%)	$11,3 \pm 3,4^a$	$10,4 \pm 1,8^a$
Fosfolípidos/colesterol (Razón molar)	$4,0 \pm 1,3^a$	$5,0 \pm 1,8^a$

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  S.D. de los datos obtenidos en n experimentos. La distribución porcentual se ha calculado considerando el 100% de la suma de los fosfolípidos más colesterol. Por filas, los datos con superíndices sin ninguna letra coincidente (a, b):  $p < 0,01$ .

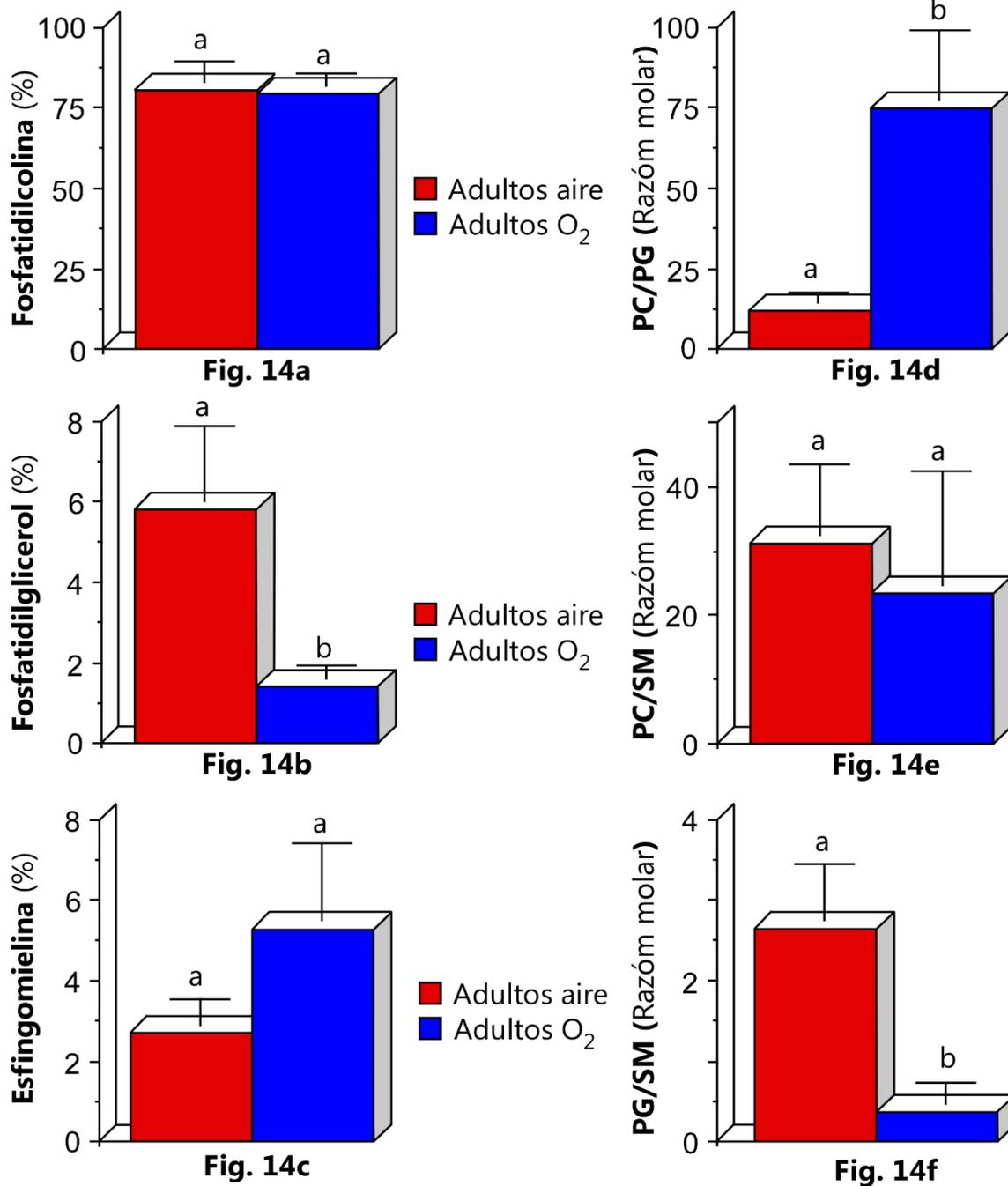


**Fig. 13.** Efecto de la hiperoxia sobre el contenido en fosfolípidos y colesterol del surfactante pulmonar de ratas adultas tratadas con hiperoxia. La distribución porcentual se ha calculado considerando el 100 % a la suma de fosfolípidos más colesterol. Los diagramas de barras sin ninguna letra coincidente (a, b) corresponden a valores con significación estadística:  $p < 0,01$ .

**Tabla XII.** COMPOSICIÓN EN FOSFOLÍPIDOS MAYORITARIOS DEL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS ADULTAS TRATADAS CON HIPEROXIA.

<b>Distribución (%)</b>	<b>CONTROLES (n=7)</b>	<b>HIPEROXIA (n=7)</b>
Fosfatidilcolina	80,5 ± 6,5 <sup>a</sup>	79,1 ± 3,9 <sup>a</sup>
Fosfatidilglicerol	5,5 ± 1,9 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>
Esfingomielina	2,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	5,3 ± 1,9 <sup>a</sup>
<u>Razón molar</u>		
PC/PG	11,4 ± 3,7 <sup>a</sup>	74,4 ± 22,3 <sup>b</sup>
PC/SM	31,3 ± 11,0 <sup>a</sup>	23,4 ± 17,7 <sup>a</sup>
PG/SM	2,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,2 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los datos obtenidos en n experimentos. Por filas, los datos con superíndices sin ninguna letra coincidente (a, b): p<0,01.



**Fig. 14:** Estudio comparativo de la composición en fosfolípidos mayoritarios de los surfactantes pulmonares procedentes de ratas adultas tratadas con hiperoxia y ratas controles. Los diagramas de barras sin ninguna letra coincidente (a, b) corresponden a valores con significación estadística:  $p < 0,01$ .

### **3.4.2. Estudio comparativo de la composición lipídica del surfactante pulmonar de ratas de diferentes edades sometidas a hiperoxia.**

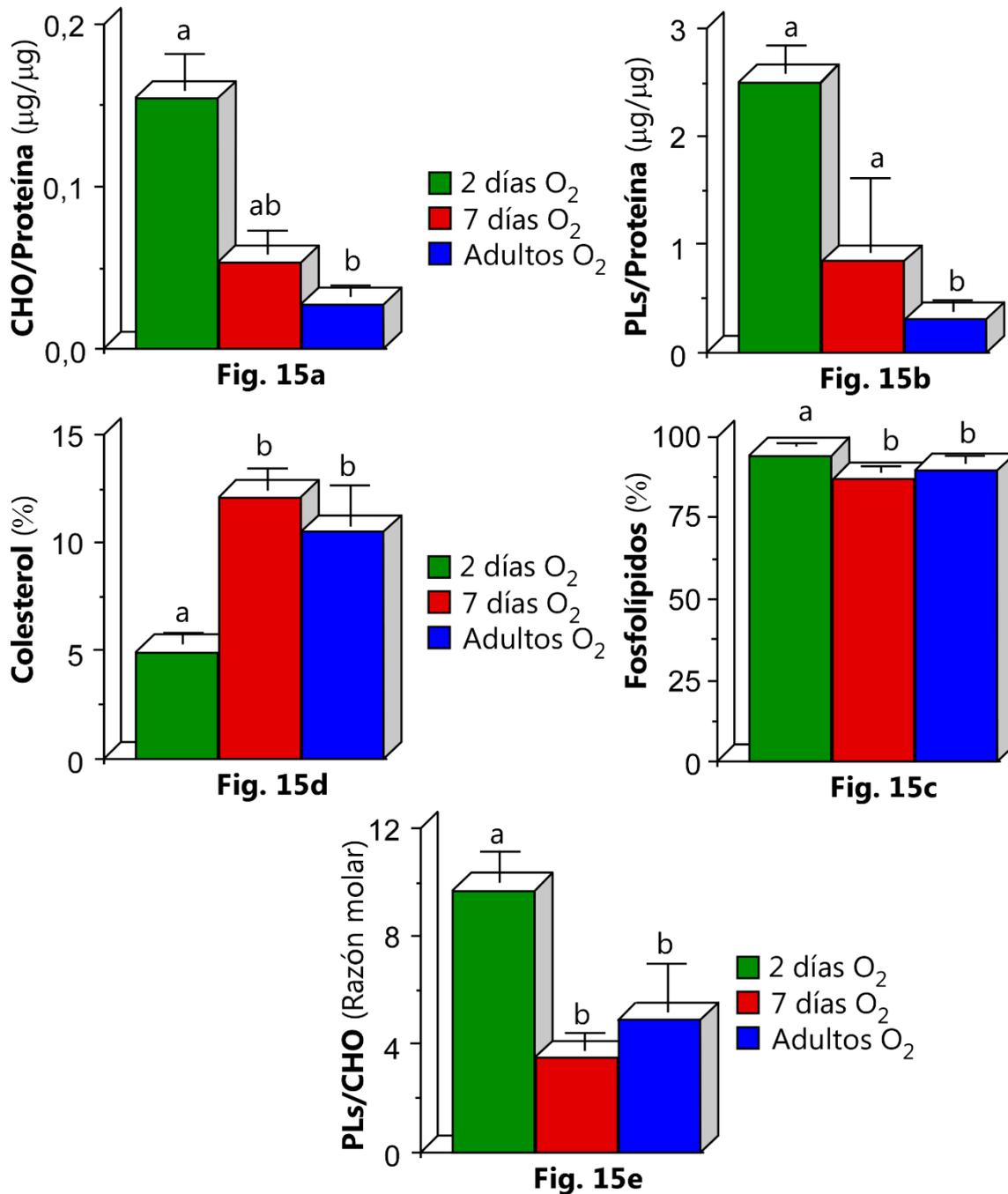
El tratamiento de las ratas de diferentes edades con altas concentraciones de oxígeno (95-99 %) provoca cambios estadísticamente significativos en la composición lipídica del surfactante pulmonar. Los descensos en las razones molares colesterol/proteína y fosfolípidos/proteína, a medida que aumenta la edad del animal, se producen como consecuencia del aumento del contenido en proteínas totales en el primer caso, y por descenso de los fosfolípidos y aumento de las proteínas en el segundo. Estas alteraciones son imputables a la edad como ya se ha señalado en el apartado 3.3.1., pero no se excluye un efecto asociado del propio tratamiento. La razón molar fosfolípido/colesterol disminuye a medida que se incrementa la edad de los animales tratados (véase Tabla XIII y Fig. 15).

La composición en fosfolípidos mayoritarios muestra los siguientes cambios durante el tratamiento. Un descenso en el contenido en fosfatidilglicerol y un aumento en el contenido en esfingomielina a medida que aumenta la edad del animal, sin que se observen cambios en los porcentajes de fosfatidilcolina (véase Tabla XIV y Fig. 16). Las razones molares entre los distintos fosfolípidos reflejan, lógicamente, las pautas marcadas por el contenido en los fosfolípidos respectivos (véase Tabla XIV y Figs. 16d, 16e y 16f).

**Tabla XIII.** CONTENIDO EN FOSFOLÍPIDOS TOTALES Y COLESTEROL DEL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS DE DIFERENTES EDADES TRATADAS CON HIPEROXIA.

Composición	GRUPOS DE EDAD		
	2 días (n=5)	7 días (n=4)	90-120 días (n=7)
CHO/Proteína (µg/µg)	0,15 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,053 ± 0,2 <sup>ab</sup>	0,027 ± 0,01 <sup>b</sup>
PLs/Proteína (µg/µg)	2,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,7 <sup>ab</sup>	0,32 ± 0,1 <sup>b</sup>
Fosfolípidos (%)	94,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	86,7 ± 1,7 <sup>b</sup>	89,5 ± 1,8 <sup>b</sup>
Colesterol (%)	4,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	12,1 ± 1,0 <sup>b</sup>	10,4 ± 1,8 <sup>b</sup>
PG/SM	9,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	5,0 ± 1,8 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los datos obtenidos en n experimentos. La distribución porcentual se ha calculado considerando el 100% a la suma de fosfolípidos más colesterol. Por filas, los datos con superíndices sin ninguna letra coincidente (a, b): p<0,01.

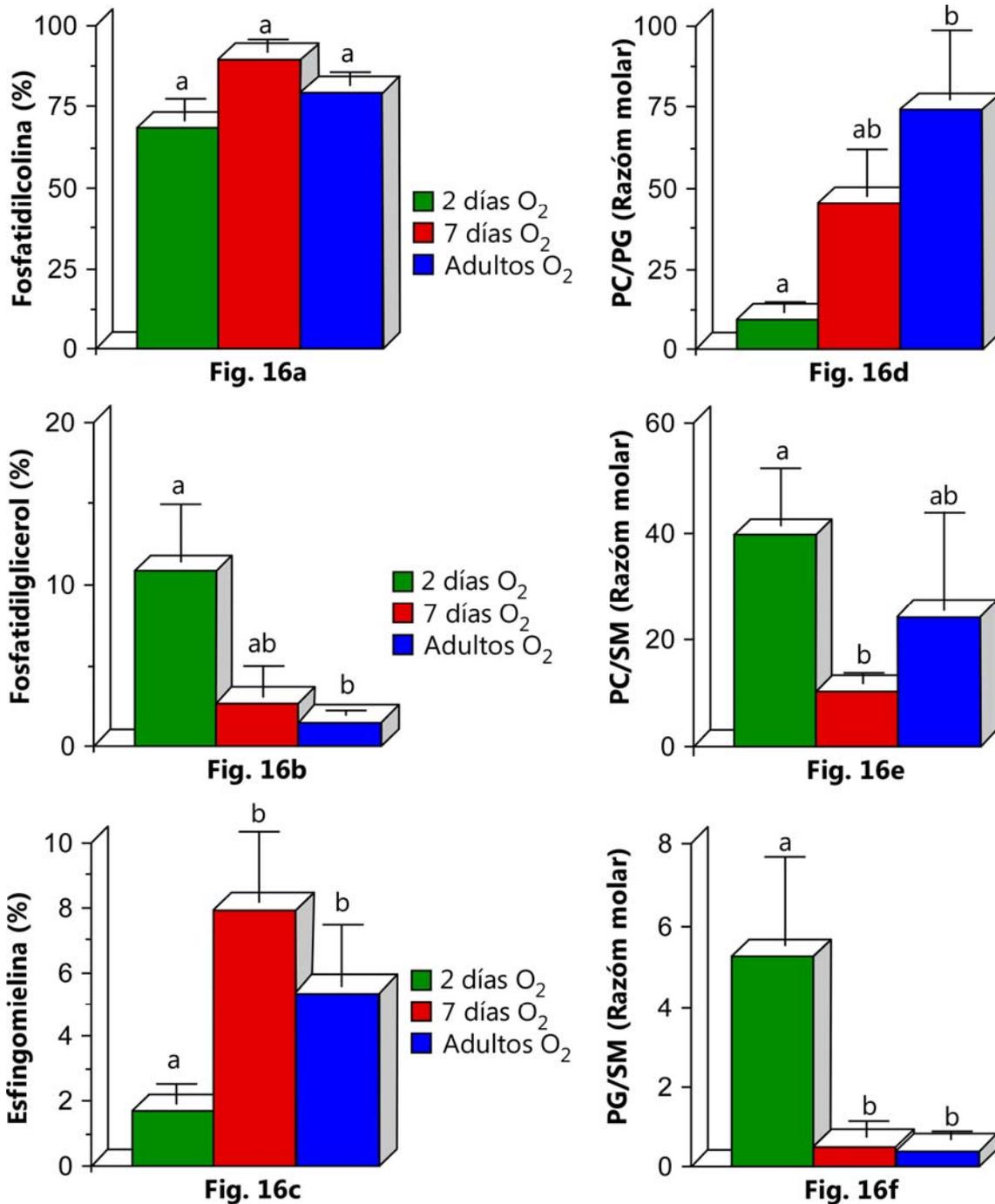


**Fig. 15. Estudio comparativo de la composición de fosfolípidos y colesterol del surfactante pulmonar de ratas de diferentes edades tratadas con hiperoxia.** La distribución porcentual se ha calculado considerando el 100 % a la suma de fosfolípidos más colesterol. Los diagramas de barras sin ninguna letra coincidente (a, b) corresponden a valores con significación estadística:  $p < 0,01$ .

**Tabla XIV.** COMPOSICIÓN EN FOSFOLÍPIDOS MAYORITARIOS DEL SURFACTANTE PULMONAR PROCEDENTE DE RATAS DE DIFERENTES EDADES TRATADAS CON HIPEROXIA.

Distribución (%)	GRUPOS DE EDAD		
	2 días (n=5)	7 días (n=4)	90-120 días (n=7)
Fosfatidilcolina	68,3 ± 6,4 <sup>a</sup>	89,9 ± 2,2 <sup>a</sup>	79,1 ± 3,9 <sup>a</sup>
Fosfatidilglicerol	10,9 ± 3,5 <sup>a</sup>	2,6 ± 1,8 <sup>ab</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>
Esfingomielina	1,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	7,9 ± 2,1 <sup>b</sup>	5,3 ± 1,9 <sup>b</sup>
Razón molar			
PC/PG	8,8 ± 3,6 <sup>a</sup>	45,4 ± 14,5 <sup>ab</sup>	74,4 ± 22,3 <sup>b</sup>
PC/SM	38,8 ± 12,6 <sup>a</sup>	9,2 ± 2,2 <sup>b</sup>	23,4 ± 17,7 <sup>ab</sup>
PG/SM	5,2 ± 2,1 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,2 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como la media aritmética ± S.D. de los datos obtenidos en n experimentos. Por filas, los datos con superíndices sin ninguna letra coincidente (a, b): p<0,01.



**Fig. 16.** Estudio comparativo de la composición en fosfolípidos mayoritarios del surfactante pulmonar procedente de ratas de diferentes edades tratadas con hiperoxia. Los diagramas de barras sin ninguna letra coincidente (a, b, c) corresponden a valores con significación estadística:  $p < 0,01$ .

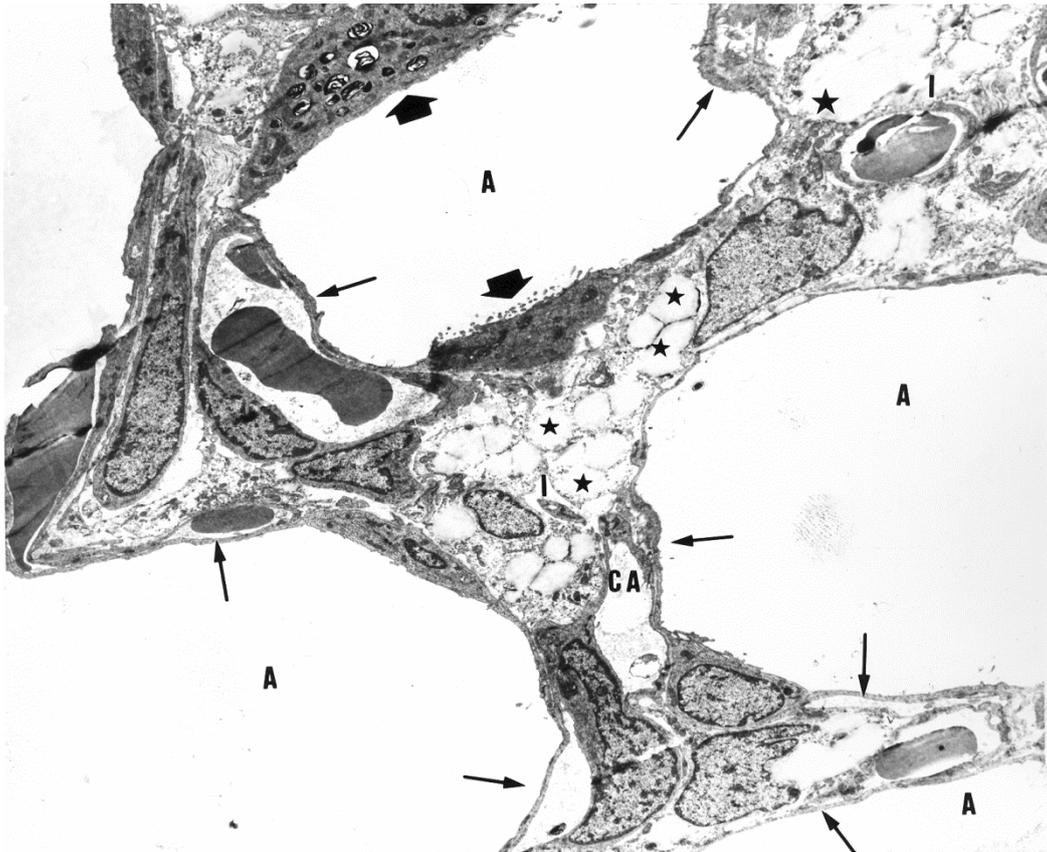
### **3.5. ESTUDIO MORFOLÓGICO PULMONAR.**

#### **3.5.1. Sobre ratas que han respirando aire atmosférico.**

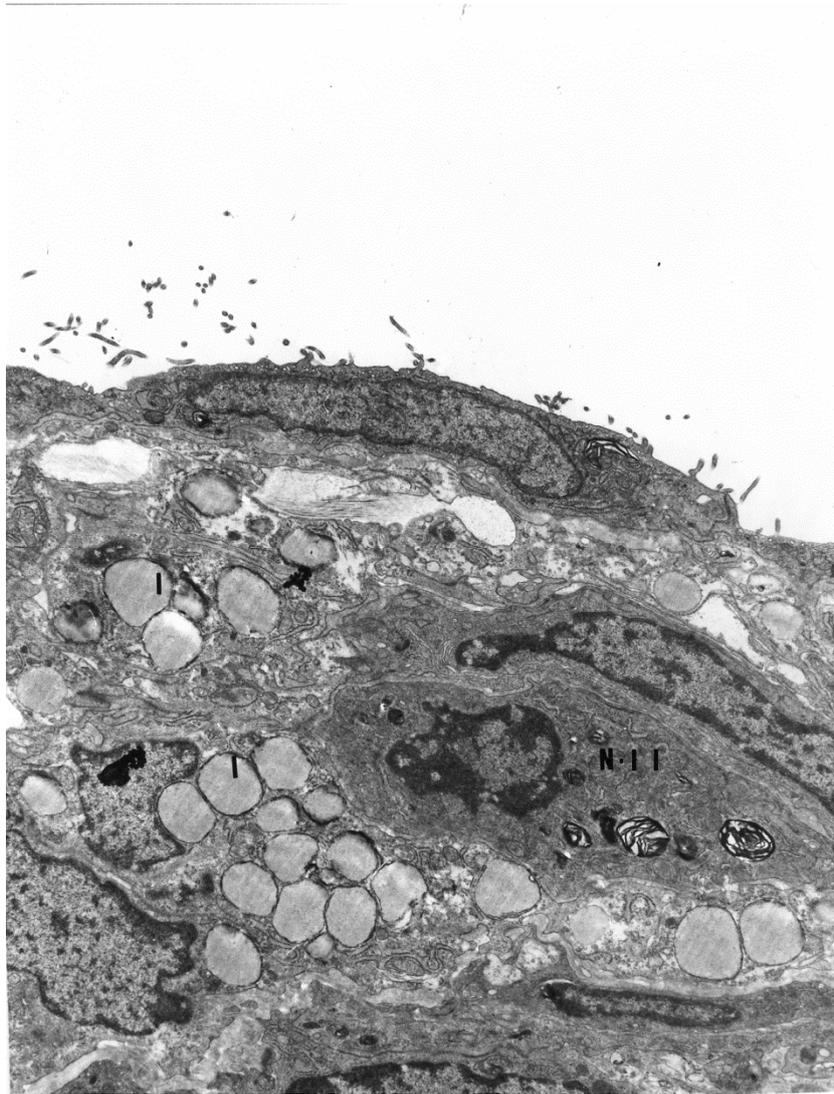
GRUPO 1° (Recién nacidos): Ultraestructuralmente, los pulmones de los animales de este grupo presentan unos espacios alveolares bien conformados, sin contenido evidente en su interior, y revestidos por los neumocitos tipos I y II (Foto 1). En todos los animales, los neumocitos tipo I están constituidos por un citoplasma fino que tapiza la mayor parte del citoplasma alveolar (Foto 1, ↑). Entre ellos observamos a los Neumocitos tipo II (N-II) (Foto 1, ▲) como células globulosas y con abundante citoplasma y cuerpos lamelares (Foto 1, ▲). La mayoría de los capilares alveolares (CA) se localizan en las inmediaciones de los espacios alveolares en íntima relación con los N-I. A nivel intersticial es frecuente observar abundantes células intersticiales (Foto 1, ▬) cargadas de grasa (Foto 1, A).

GRUPO 2°: La estructura alveolar del pulmón de rata de dos días respirando aire atmosférico no presenta muchos cambios respecto al grupo anterior. Hemos de remarcar, por la importancia que tiene en la presente Memoria, la ultraestructura de los N-II en los pulmones de este grupo. En todos los animales, estas células muestran un citoplasma abundante en el que predominan las mitocondrias, así como un retículo endoplásmico rugoso bastante desarrollado y cuerpos lamelares (Foto 2, N-II).

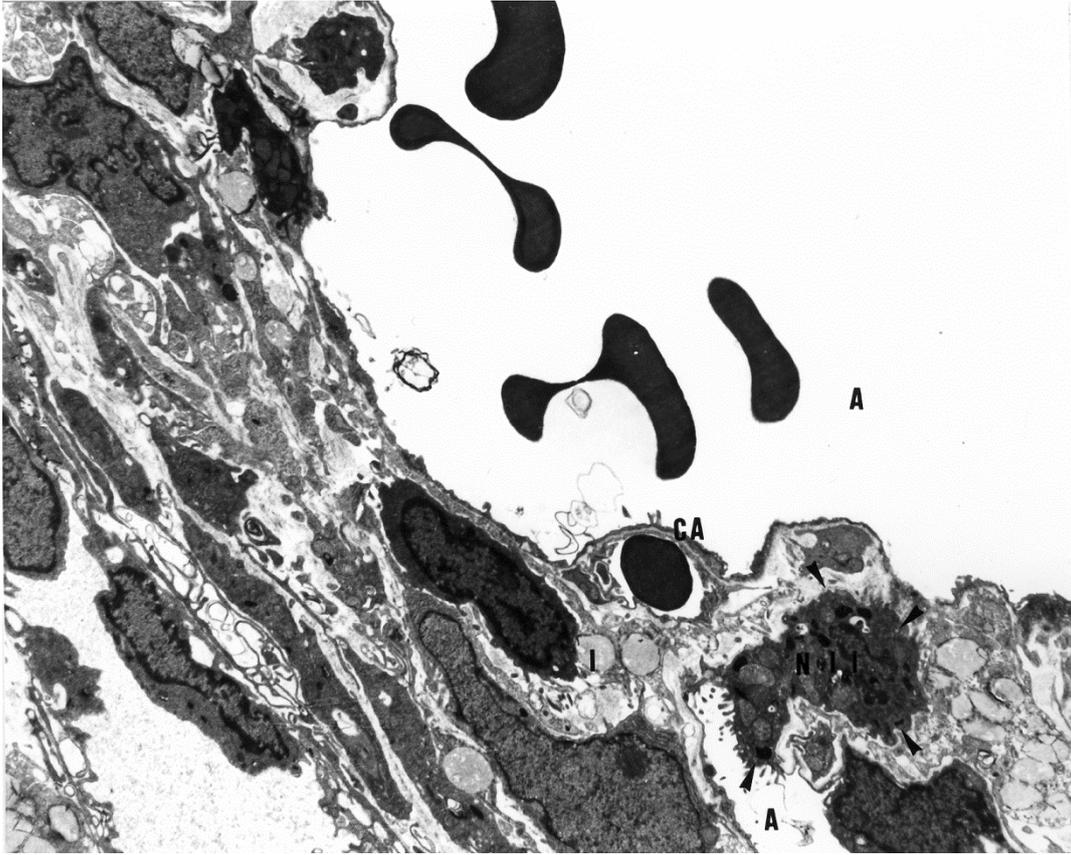
GRUPO 3°: Ultraestructuralmente, los pulmones de los animales de siete días que han respirado aire atmosférico presentan gran cantidad de espacio alveolar, con capilares subyacentes (Foto 3, CA), siendo la barrera alveolo-capilar muy extensa. Los N-II (Foto 3, N-II) no presentan muchas diferencias respecto al grupo anterior. Los orgánulos predominantes suelen ser mitocondrias y cuerpos lamelares, que en algunas células son muy abundantes y electrodensas (Foto 3, ▲). A nivel intersticial se observan menos células lipídicas cargadas de lípidos (Foto 3).



**FOTO 1: Microscopia Electrónica de Transmisión de parénquima pulmonar distal de recién nacido (5 ó 6 horas), en la que podemos observar espacios alveolares (A) tapizados por N-I (↑) y N-II (▲). CA: Capilares alveolares. I: células intersticiales lipídicas con abundantes vacuolas de grasa (★). 3.350x.**

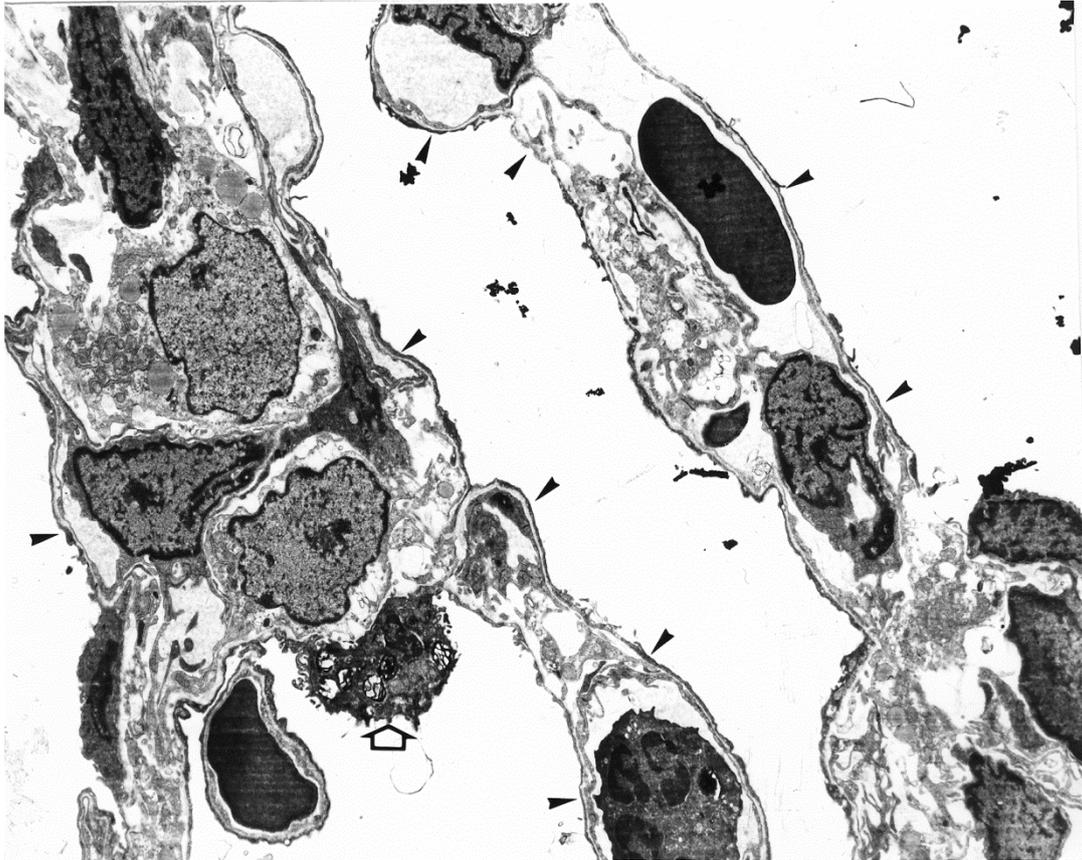


**FOTO 2: Microscopia Electrónica de Transmisión de parénquima pulmonar de animales de 2 días respirando aire atmosférico, en la que se aprecian N-II y algunos cuerpos lamelares. I: células intersticiales con vacuolas de grasa. 21.900x.**



**FOTO 3: Microscopia Electrónica de Transmisión de pulmón de rata de 7 días respirando aire atmosférico**, en la que se observan varios espacios alveolares tapizados de N-I y N-II, con abundantes cuerpos lamelares electrodensos. Nótese la abundancia de capilares alveolares (CA) y la escasez de células intersticiales lipídicas (I). **21.900x**.

GRUPO 4°: Los animales adultos presentan los pulmones completamente desarrollados, con una mayor superficie alveolar y una barrera muy extensa. En la superficie de revestimiento alveolar predominan especialmente los N-I (Foto 4, ▲), observando ocasionalmente intercalados N-II (Foto 4, ◀). Estos suelen presentar abundantes cuerpos lamelares de distinto tamaño y con distinta forma, variando, así mismo, su densidad electrónica.



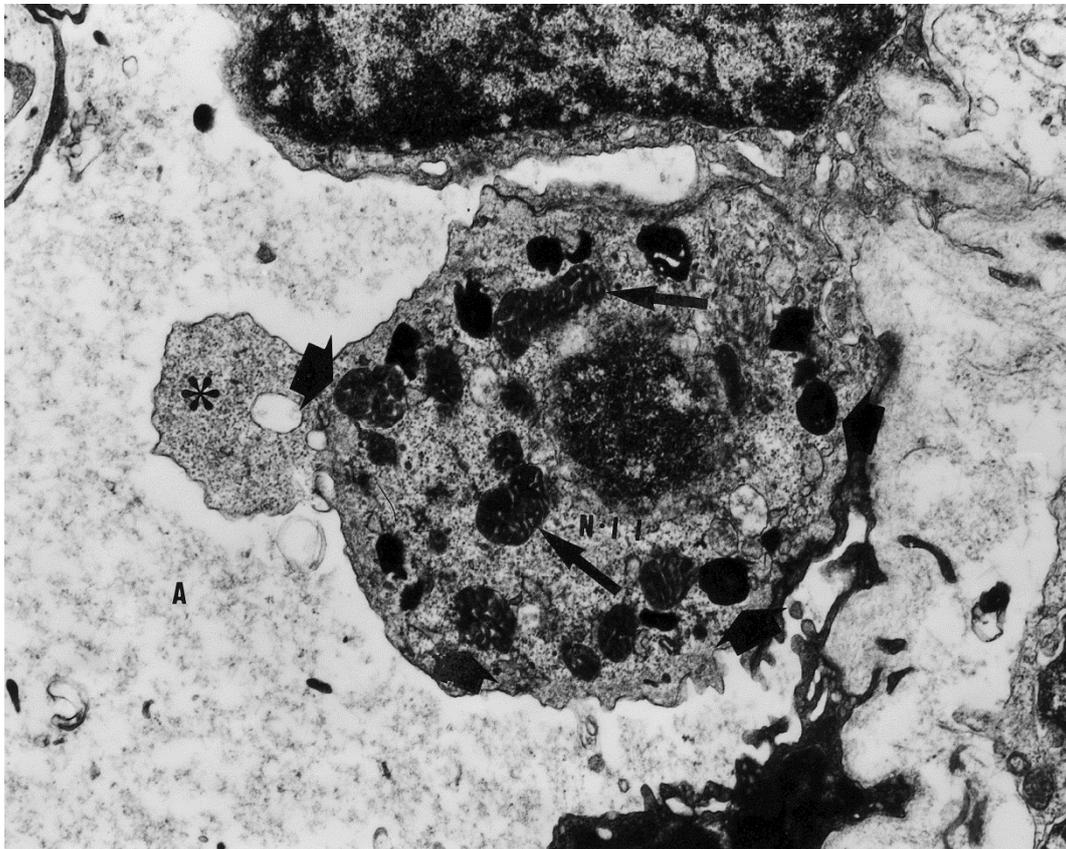
**FOTO 4: Imagen ultraestructural de parénquima pulmonar distal de rata adulta viviendo en aire atmosférico.** Nótese la presencia de gran cantidad de N-I (▲) y algún N-II (◀). Se aprecian abundantes capilares alveolares conformando la barrera alveolo-capilar. **4.875x.**

### 3.5.2. Sobre animales sometidos a hiperoxia normobárica.

GRUPO 5°: Los animales de 2 días que han respirado altas concentraciones de  $O_2$  presentan cambios morfológicos en varias estructuras de los distintos componentes alveolares. Centremos el estudio en las modificaciones observadas en los N-II. Estos presentan pequeñas excrescencias de su citoplasma hacia la luz alveolar (Foto 5, ✱), en la que se aprecia claramente un material finamente granular de densidad electrónica media que corresponde a líquido de edema. Las mitocondrias presentan variaciones en la forma e inversión de la imagen (mitocondrias contraídas) (Foto 5, ▲). Presentan también cuerpos lamelares, en número variable y con distinta ultraestructura incluso dentro de una misma célula (Foto 5, †). En este grupo podemos observar algunos N-II en mitosis (Foto 6, N-II), sobre todo en aquellos casos en los que los N-I presentan necrosis celular.

GRUPO 6°: Los animales de 7 días que han vivido en hiperoxia presentan cambios morfológicos en los N-II semejantes a los descritos en los animales de 2 días, siendo los cambios mitocondriales los más llamativos (Foto 7, ▲). En este grupo, los N-II suelen tener abundantes cuerpos lamelares en distintos estadios de producción (Foto 7, ✱).

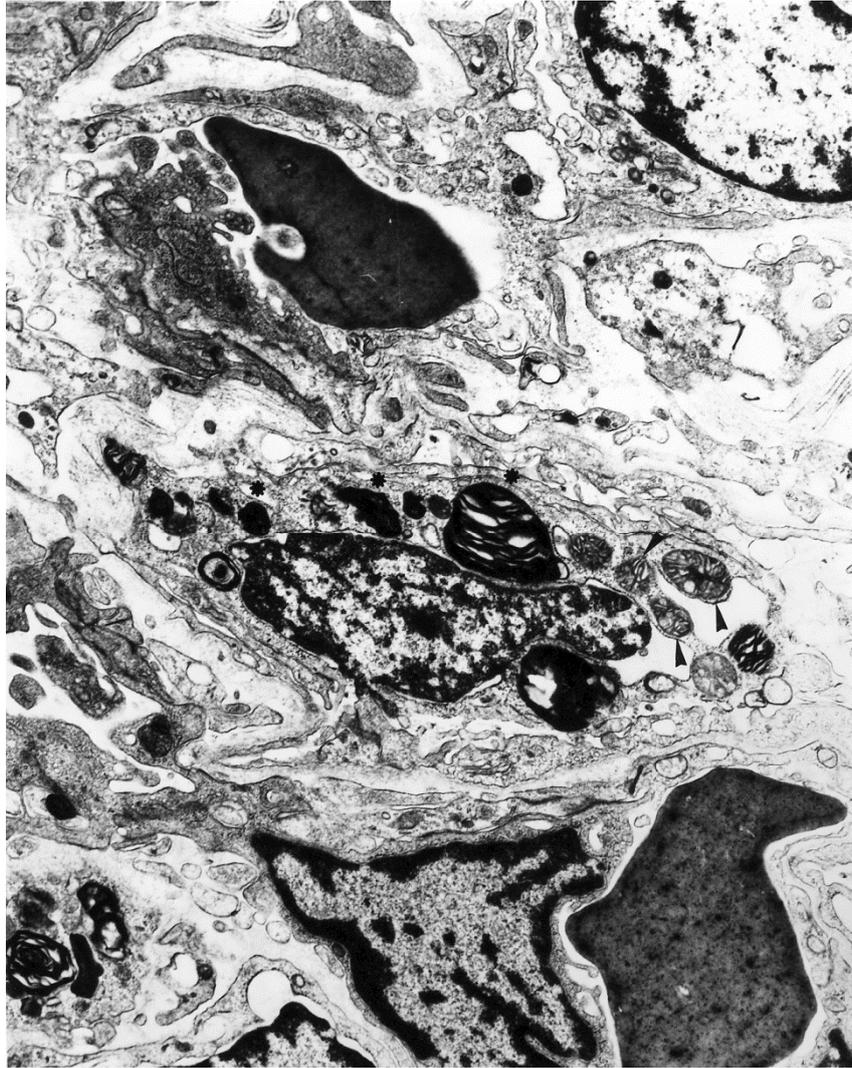
GRUPO 7°: Los animales adultos sometidos a hiperoxia durante dos días, presentan sus N-II con abundante citoplasma (Foto 8, N-II), en el que es frecuente observar un sistema vacuolar (SVC) bastante desarrollado (Foto 8, ▲). Los cambios mitocondriales suelen ser muy semejantes a los de otros grupos, predominando los cambios en la forma y en la densidad electrónica de su matriz con inversión de la imagen (Foto 9, ★). Ocasionalmente pueden verse mitocondrias en íntima relación con cuerpos lamelares (Foto 10, ★).



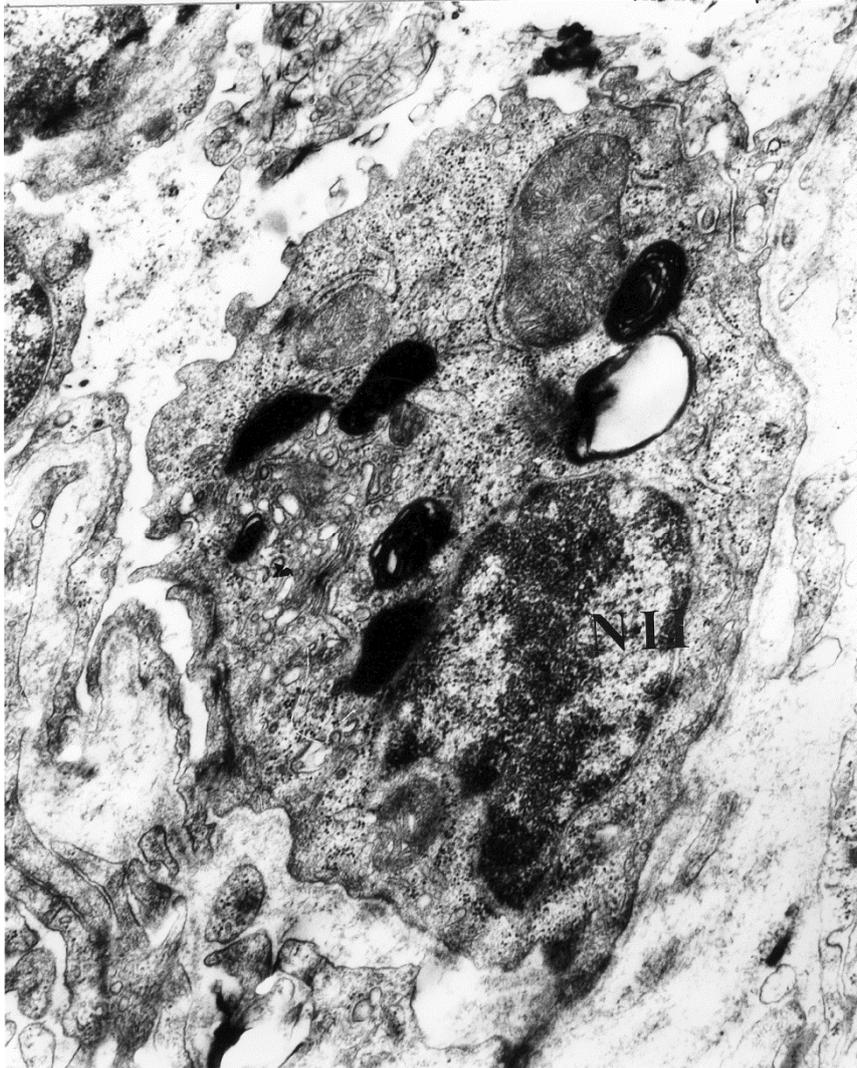
**FOTO 5: Detalle ultraestructural de un alveolo pulmonar (A) de animales de 2 días en hiperoxia**, en el que se aprecia edema. N-II: Neumocito Tipo II con excrecencia citoplásmica (✱), alteraciones mitocondriales (↑) y cuerpos lamelares (▲). **21.900x.**



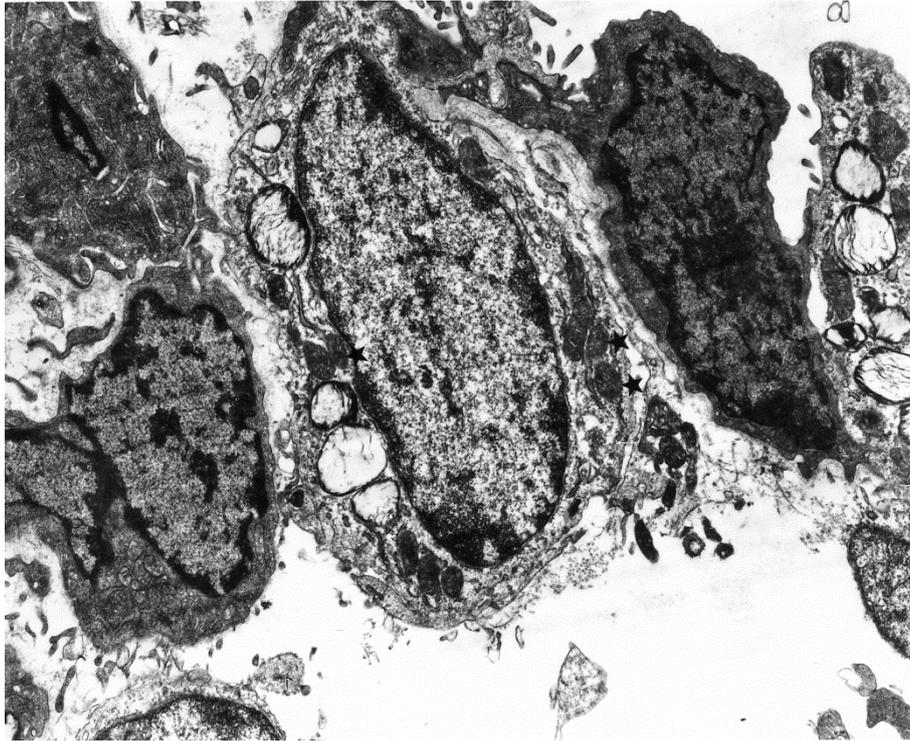
**FOTO 6:** Imagen ultraestructural del pulmón procedente de animales de 2 días en hiperoxia, en la que se puede observar N-II en mitosis. **21.900x.**



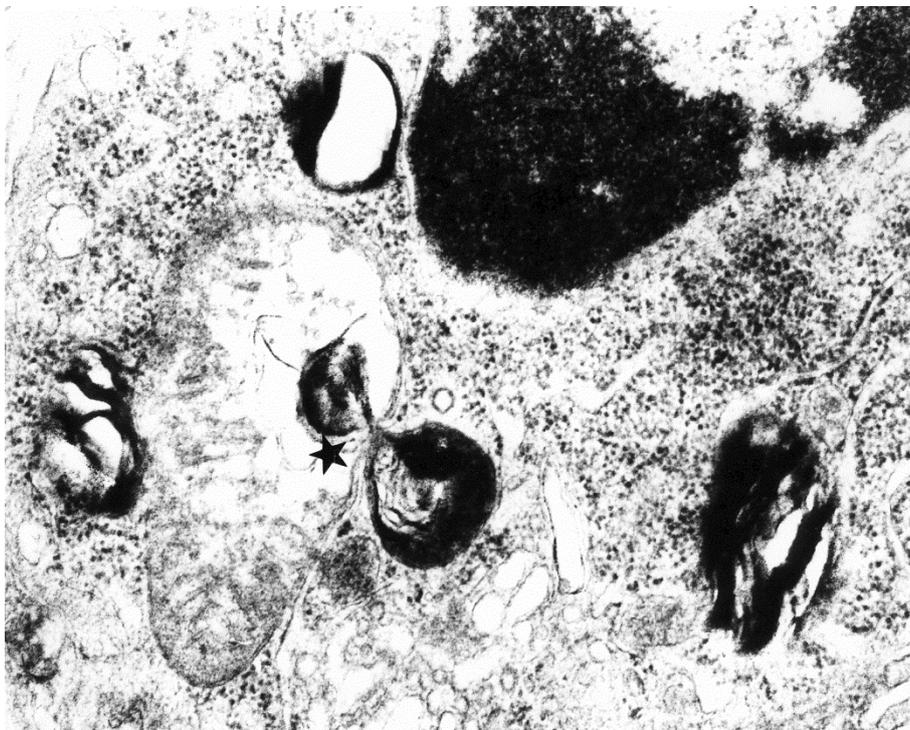
**FOTO 7: Microscopia Electrónica de Transmisión de parénquima pulmonar procedente de animales de 7 días sometidos a hiperoxia, en la que vemos un N-II con alteraciones mitocondriales (▲) y cuerpos lamelares en distintas fases de producción (\*). 21.900x.**



**FOTO 8:** Detalle con Microscopia Electrónica de Transmisión de un N-II procedente de pulmón de rata adulta sometida a hiperoxia. Nótese la presencia de un sistema vacuolar muy desarrollado. **69.500x.**



**FOTO 9: Microscopia Electrónica de Transmisión de alveolo pulmonar de rata adulta**, en la que se ve un N-II con mitocondrias contraídas (★). 21.900x.



**FOTO 10: Detalle ultraestructural de un N-II procedente de rata adulta en hiperoxia**, en el que se observa una mitocondria en íntima relación con un cuerpo lamelar. 69.500x.

#### **4. DISCUSIÓN.**

El surfactante pulmonar es una lipoproteína compleja sintetizada en los neumocitos tipo II, que se almacena en los cuerpos lamelares de estas células a la espera de ser secretada hacia el fluido extracelular para recubrir la superficie de los alveolos pulmonares. Su principal función es prevenir el colapso alveolar, al disminuir la tensión superficial de la interfase alveolar aire-líquido (Wright y Dobbs, 1991). Se presenta bajo diferentes formas físicas en el medio extracelular, como mielina tubular, como mielina común y en monocapas en la interfase aire-líquido (Baritussio et al, 1984). En su composición se han descrito proteínas: SP-B y SP-C (liposolubles) y SP-A y SP-D (hidrosolubles), que en el surfactante pulmonar purificado representan el 10 % del peso seco de la molécula (Possmayer, 1984). El 90 % restante corresponde a la porción lipídica constituida en un 90 % por fosfolípidos y el resto por lípidos neutros, siendo el colesterol el componente mayoritario de este último grupo de lípidos. Un 80 % de los fosfolípidos es dipalmitoilfosfatidilcolina, seguido en orden de importancia cuantitativamente por el fosfatidilglicerol (10 %). Ambos fosfolípidos son los responsables en gran parte de las propiedades físicas del surfactante. Otro componente cuantitativamente poco importante que se halla presente en este fluido biológico es la esfingomielina, cuyo contenido va disminuyendo al ser sustituido por la fosfatidilcolina durante la maduración pulmonar. Por este motivo, la medida de la razón PC/SM en el surfactante aislado del líquido amniótico, o la medida de dicha razón directamente en el propio líquido amniótico es indicativo de la madurez pulmonar fetal (Rooney, 1984). Otros fosfolípidos, como fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina y otras clases de lípidos aparecen en cantidades muy minoritarias, por lo que se consideran trazas (Harwood et al, 1975; King, 1984).

#### **4.1. CONSIDERACIONES ACERCA DE LA VALIDEZ DE LOS METODOS ENZIMATICOS PROPUESTOS PARA LA CUANTIFICACION DE FOSFATIDILCOLINA, FOSFATIDILGLICEROL Y ESFINGOMIELINA EN DIFERENTES MATERIALES BIOLOGICOS.**

En revisiones bibliográficas realizadas recientemente, no hemos encontrado descrito ningún método rápido, reproducible y que requiera pequeñas cantidades de muestra para ser aplicado a la valoración de los fosfolípidos de interés clínico (PC, PG y SM) en el surfactante pulmonar. Como ya se ha señalado en el apartado 1.10. de esta Memoria, los métodos existentes para valorar los citados lípidos son los aplicados tradicionalmente en la separación y cuantificación de estas sustancias, en los que nunca se consigue la extracción del total del contenido lipídico, y requieren para ello cantidades

importantes de muestra (25  $\mu\text{g}$  de fósforo lipídico/muestra) y bastante tiempo para su determinación. Actualmente se vienen aplicando técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) a la separación de los fosfolípidos del surfactante pulmonar y su cuantificación (Bonanno et al, 1992). Sin embargo, este método aporta unos resultados de cuantificación que no coinciden con los publicados en la bibliografía. También se han usado medidas biofísicas del surfactante para determinar la madurez pulmonar, tales como la tensión superficial, estabilidad de la espuma y polarización de fluorescencia (Freer y Statland, 1981; Francoual et al, 1991). La aplicación de estos métodos requiere el uso de aparatos especializados de alto coste.

Estos hechos nos han movido a buscar métodos que requieran escaso aparataje, que sean rápidos, sensibles y que permitan valorar la composición lipídica del surfactante pulmonar con pequeñas cantidades de muestra. Para lograr dicho objetivo, inmediatamente se pensó en el uso de técnicas enzimáticas que se aplican a la cuantificación de PC en el líquido amniótico. Nos basamos en ellas y también en otras similares para poner a punto la determinación de PC y otros fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar. El único inconveniente de estos métodos enzimáticos es la necesidad de disponer de reactivos específicos de alto coste, como son diferentes clases de enzimas.

La valoración de PC se llevó a cabo siguiendo básicamente la técnica enzimática descrita por Schiefer & Beutler (1981) para determinar este fosfolípido en líquido amniótico. Técnicas similares de determinación de este fosfolípido por métodos enzimáticos han sido aplicadas con anterioridad por Anaokar et al (1978) y Michal y Beutler (1979).

La valoración se basa en el empleo de fosfolipasa C para liberar la fosforilcolina, cuya concentración es medida por el descenso de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH en presencia de la fosforilcolina a través de varias reacciones enzimáticas acopladas (véase apartado 2.4.5.). La concentración del citado alcohol es directamente proporcional a la cantidad de fosfatidilcolina existente en el medio, liberándose 1 mol de fosforilcolina en presencia de fosfolipasa C por cada mol de fosfatidilcolina presente. El método permite cuantificar el 100 % de la fosfatidilcolina presente en una muestra entre concentraciones de 1,4 y 34,6 nmoles en la mezcla de reacción, sin extracción previa de la misma de la muestra (véase apartado 3.2.1.).

La puesta a punto del citado método se ha llevado a cabo utilizando diversos materiales biológicos: patrones de DPPC y fosforilcolina (véase apartado 3.2.1.1.), lípidos procedentes de eritrocitos y plaquetas (apartado 3.2.1.2.), así como membranas de eritrocitos y plaquetas (apartado 3.2.1.3.). La valoración de la PC en membranas intactas o en lípidos procedentes de estas membranas por el método enzimático, aporta valores similares a los descritos en la bibliografía, los cuales han sido obtenidos mediante los métodos clásicos de extracción de lípidos, separación de las diferentes clases de fosfolípidos mediante TLC y cuantificación del fósforo lipídico. Así, la fosfatidilcolina detectada en la membrana del eritrocito por el método enzimático representa entre 1,6% (valorado en lípidos procedentes de membranas eritrocitarias) y 2 % (valor detectado directamente en la membrana eritrocitaria) del total de los fosfolípidos, lo que es prácticamente coincidente con el 1,2 % encontrado por Marín et al (1990) en este mismo material, utilizando el método clásico de determinación de este fosfolípido. En la membrana de las plaquetas, la fosfatidilcolina valorada enzimáticamente en extractos lipídicos procedentes de dichas membranas, representa el 31,9 % del total de fosfolípidos, mientras que si la valoración se realiza directamente en muestras de membrana, este valor alcanza la cifra de 33,9 %. Ambos valores son prácticamente coincidentes con el 29,8 % de fosfatidilcolina aportado por Sánchez-Yagüe y Llanillo (1986) para este mismo material, utilizando en este último caso el método clásico de determinación. Cuando se valora la fosfatidilcolina en el surfactante pulmonar de rata adulta por el método enzimático, se obtiene un valor del 80 % respecto al total de fosfolípidos, dato que es similar al descrito por diversos autores (Harwood et al, 1975; Katyal et al, 1977; Adachi et al, 1989). De todo esto se deduce que el método enzimático de valoración de la fosfatidilcolina aplicado, es válido para llevar a cabo dicha determinación, ya que es un método totalmente reproducible, que aporta valores coincidentes con otros métodos clásicos totalmente contrastados. Además es 22 veces más sensible que el método clásico de determinación, ya que requiere solamente 1.4 nmoles de fosfatidilcolina frente a los 32 nmoles de fosfolípido necesarios para realizar la determinación cuando se aplica la reacción colorimétrica de Rouser. Además, el método enzimático requiere hasta 4 veces menos tiempo para la valoración que en el caso del método clásico y es aplicable directamente a membranas y líquidos biológicos, lo que evita la extracción de lípidos mediante mezclas de cloroformo/metanol, en la que difícilmente se consigue la extracción del 100 % de lípidos presentes en la muestra, por lo que el resultado obtenido con el

método enzimático será siempre más fiable que el que se consigue mediante los métodos clásicos de valoración.

La cuantificación de la esfingomielina se intentó llevar a cabo por el método de Assmann y Schriewer (1981). Este método está basado en la extracción previa del fosfolípido en mezclas de cloroformo/metanol (1:1, v/v) y posterior valoración del mismo en el extracto disuelto en soluciones amortiguadoras de barbital, mediante el empleo de mezclas de enzimas. La reproducción del citado método no dio los resultados apetecidos, por lo que se intentó la puesta a punto de un método enzimático de valoración, basado en el empleo de la esfingomielinasa que utilizan Assmann y Schriewer (1981), en un medio de borato sódico en lugar del barbital, con el fin de liberar la fosforilcolina, valorándose el fosforilalcohol mediante el sistema de reacciones acopladas descrito para determinar este mismo alcohol fosforilado en la valoración de la fosfatidilcolina (véase apartado 2.4.5.). Como sucede en el caso de la determinación de la fosfatidilcolina, la concentración de fosforilcolina es directamente proporcional a la cantidad de esfingomielina existente en el medio, liberándose 1 mol del fosforilalcohol en presencia de la esfingomielinasa por cada mol de esfingomielina presente. El método permite cuantificar el 100 % de la esfingomielina existente en una muestra entre concentraciones 1,4 y 34,6 nmoles en la mezcla de reacción, sin extracción previa del lípido (véase apartado 3.2.2.). La puesta a punto del método se ha efectuado empleando materiales biológicos similares o idénticos (lípidos y membranas procedentes de eritrocitos y plaquetas) a los usados para contrastar el método enzimático de determinación de la fosfatidilcolina.

La determinación de la esfingomielina en membranas intactas o en lípidos procedentes de estas membranas por el método enzimático puesto a punto por nosotros, aporta valores similares a los descritos en la bibliografía aplicando los métodos clásicos de determinación ya señalados. Así, la esfingomielina detectada en la membrana del eritrocito por el método enzimático representa entre el 43 % (valoración directa en la membrana) y el 45 % (valorada en los lípidos procedentes de la membrana eritrocitaria) del total de los fosfolípidos, lo que resulta prácticamente coincidente con el 47,3 % encontrado por Marín et al (1990) en este último material, utilizando las técnicas de extracción y separación previas a la cuantificación del mismo. En la membrana de las plaquetas, la esfingomielina valorada enzimáticamente en los extractos lipídicos procedentes de dichas membranas representa el 16,7 % del total de fosfolípidos, valor muy próximo al publicado por Sánchez-Yagüe y

Llanillo (1986) para este mismo material (17,6 %), y algo inferior al 23,6 % encontrado cuando se utiliza directamente la membrana plaquetaria. La valoración de la esfingomielina en el surfactante pulmonar de rata adulta por el método enzimático ya citado, aporta un 3% respecto al total de fosfolípidos, cifra que es similar a la indicada por diversos autores para este mismo material (Harwood et al, 1975; Katyal et al, 1977; Adachi et al, 1989). Por tanto, el método enzimático de valoración de la esfingomielina descrito en la presente Memoria, queda perfectamente contrastado con los métodos clásicos de valoración. Dada la coincidencia de los valores obtenidos por los diversos métodos, se puede concluir que el sistema de valoración enzimático aplicado para cuantificar la esfingomielina en diversas muestras biológicas es totalmente reproducible, con la ventaja de ser 22 veces más sensible que el método clásico de determinación. Además este método enzimático supone un ahorro de tiempo en la valoración del fosfolípido, invirtiéndose aproximadamente el mismo tiempo que en el caso de la PC. Es un método aplicable directamente a membranas y líquidos biológicos, lo que evita la extracción del fosfolípido, por lo que los resultados obtenidos mediante el mismo serán siempre más fiables que los conseguidos mediante los métodos clásicos de valoración.

Finalmente, la puesta a punto de un método para la determinación de fosfatidilglicerol mediante sistemas enzimáticos se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Schiefer y Beutler (1984) para el líquido amniótico, basado en el empleo de fosfolipasa D para liberar el glicerol. La concentración de este alcohol es determinada por descenso de la absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH en presencia del citado alcohol, a través de reacciones enzimáticas acopladas (véase apartado 2.4.6.). La concentración de glicerol es directamente proporcional a la cantidad de fosfatidilglicerol existente en el medio, liberándose 1 mol de glicerol en presencia de fosfolipasa D por cada mol de fosfatidilglicerol presente. El método permite cuantificar el 100 % del fosfatidilglicerol, sin necesidad de ser extraído previamente de la muestra, cuando se trabaja a concentraciones comprendidas entre 21,4 y 42,8 nmoles en la mezcla de reacción (véase apartado 3.2.3.). Este método enzimático ha sido puesto a punto utilizando patrones de DPPG y glicerol, pero no ha podido ser contrastado con los métodos clásicos de valoración de este fosfolípido cuando se emplean los materiales utilizados en el caso de la fosfatidilcolina y esfingomielina, dada la escasa presencia de dicho fosfolípido en estas muestras (0,7 % en eritrocitos según Marín et al, 1990; no detectado en plaquetas según Sánchez-Yagüe y Llanillo, 1986). No resulta extraña la imposibilidad de su cuantificación por el método enzimático en las muestras

indicadas, si se toma en consideración que son necesarios al menos 21,4 nmoles para lograr su detección, cifra que es muy superior a la que se necesita en el caso de la SM y de la PC. Sin embargo, la aplicación del método enzimático para la valoración del fosfatidilglicerol en muestras de surfactante pulmonar de rata adulta permite obtener resultados coincidentes con los aportados por diversos autores (Harwood et al, 1975; Katyal et al, 1977; Adachi et al, 1989), con valores de aproximadamente el 6 % con respecto a los fosfolípidos totales. Por tanto, el método enzimático aplicado es reproducible, y aunque menos sensible que en los casos anteriores, sigue siendo 1,5 veces más efectivo que el método clásico de determinación, ya que requiere 21,4 nmoles frente a los 32 nmoles de fosfolípidos necesarios para realizar la determinación cuando se aplica la reacción colorimétrica de Rouser. El método enzimático de determinación de fosfatidilglicerol descrito en esta Memoria, es directamente aplicable a muestras biológicas, sin necesidad de que sea extraído previamente, por lo que también el tiempo empleado para su determinación es mucho menor que en el caso del método clásico y además los resultados obtenidos serán siempre más fiables que los que se consigan mediante los métodos clásicos de valoración.

Los métodos enzimáticos aquí descritos nos han permitido determinar el contenido en fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y esfingomiélinina en cada una de las muestras de L.B.A. procedentes de 7 grupos de ratas, como veremos posteriormente, procesándose una media de 10 muestras por día, sin necesidad de más infraestructura que un espectrofotómetro (visible-UV) y un baño termostático. Otra de las ventajas de esta metodología, reside en que se necesita disponer de mínimas cantidades de muestra, lo que es imprescindible para estudiar la composición lipídica en los grupos de ratas neonatas, de 2 y 7 días de vida, dado que en estos casos se dispone de pequeñísimas cantidades de muestra, que a su vez proceden de la reunión de los lavados broncoalveolares de cuatro individuos. El estudio de la composición lipídica mediante los métodos clásicos de determinación, habría resultado sumamente lento y prácticamente imposible de llevarse a cabo en esta clase de muestras, dada la necesidad de disponer de cantidades de material superiores a las obtenidas a partir de los lavados broncoalveolares.

Este apartado se concluye destacando la puesta a punto de tres métodos enzimáticos para la valoración de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y esfingomiélinina, tanto en el surfactante pulmonar de rata como en otros materiales biológicos (membranas y liposomas), sin que haya necesidad de una extracción previa de los mismos, lo que hace que estos métodos sean más

rápidos y fiables que los utilizados habitualmente en la determinación de estos fosfolípidos, a lo que se debe añadir la necesidad de menor cantidad de muestra dada su mayor sensibilidad.

#### **4.2. EFECTO DE LA EDAD SOBRE LA COMPOSICION LIPIDICA DEL SURFACTANTE PULMONAR DE RATA.**

El estudio de la composición lipídica del surfactante pulmonar de rata se pretendió llevar a cabo sobre el surfactante pulmonar purificado. Sin embargo, el intento de purificación del surfactante contenido en el L.B.A. siguiendo la metodología descrita por Harwood et al (1975), aportó escaso material, y el análisis de la fosfatidilcolina reveló que el porcentaje de este fosfolípido en el material purificado no se correspondía con el indicado en la bibliografía para las ratas adultas. Esta metodología aplica centrifugaciones a bajo número de g, por lo que el precipitado obtenido carece prácticamente de material surfactante. Posteriormente se intentó purificar el surfactante siguiendo el procedimiento de Adachi et al (1989), y aunque nuestros análisis revelaban que la razón fosfolípido/proteína era similar a la publicada por estos autores, de nuevo, el análisis de la fosfatidilcolina mostraba que el porcentaje de este fosfolípido era inferior al publicado por diferentes autores para esta especie animal. No es de extrañar tal resultado, ya que mediante el citado método se consigue la separación de diferentes subclases de surfactante, con lo cual, los análisis aportados sobre estas subclases nunca pueden ser comparados con el material sin fraccionar. A partir del lavado broncoalveolar se ha logrado la separación de diferentes clases de surfactante mediante centrifugaciones diferenciales en distintas especies animales. Así, Oulton et al (1993) separan tres poblaciones de surfactante, que denominan P10, P60 y P100, a partir de ratón, y observan diferencias significativas en la razón fosfolípido/proteína entre las distintas subfracciones, con aumento del contenido en fosfatidilcolina y descenso en fosfatidilglicerol y esfingomielina en la fracción P100 respecto al resto de las fracciones analizadas. Estos datos precedentes nos indican que los procesos de purificación, que producen aumentos significativos en la relación fosfolípido/proteína, ocasionan la separación de distintas poblaciones de surfactante, cuyos datos de composición nunca pueden ser comparados con los que se obtengan de surfactantes no fraccionados.

Los motivos anteriormente expuestos nos han impulsado a realizar el estudio directamente sobre el surfactante pulmonar contenido en el líquido de L.B.A., en el que se ha eliminado previamente el botón celular y se ha realizado

una diálisis del mismo, aplicándose en él los tres métodos enzimáticos descritos en la Memoria, con el fin de cuantificar los fosfolípidos de interés clínico.

Nuestros estudios indican que el líquido procedente del lavado broncoalveolar de rata adulta presenta una relación fosfolípido/proteína de 0.3, valor que es inferior al encontrado en ratón (1.108) (Oulton et al, 1993) lo que podría ser debido a una contaminación del líquido de lavado broncoalveolar al que suelen acompañar proteínas de procedencia plasmática, principalmente albúmina, seguido en orden de importancia cuantitativa por Inmunoglobulina G y  $\gamma$ -1-globulina (Bignon et al, 1976; Hawgood y Schiffer, 1991), lo que produciría un descenso en la citada razón. Sin embargo, la baja pureza del surfactante pulmonar de rata adulta aquí estudiado, en nada modifica la composición lipídica, como se deduce del análisis de su patrón de fosfolípidos, que muestra un 80 % de fosfatidilcolina, 6 % de fosfatidilglicerol y 3 % de esfingomiélin. Estos valores son similares a los encontrados por otros autores en este mismo material (Harwood et al, 1975; Hallman y Gluck, 1975; Katyal et al, 1977; Adachi et al, 1989).

El estudio lo hemos centrado solamente en el análisis de la porción lipídica, sin abordar el estudio de la porción proteica de la lipoproteína del surfactante. Dado que la composición lipídica no se ve afectada por la presencia de proteínas que acompañan a la lipoproteína del surfactante, hemos prescindido de purificarla, habiéndose realizado los estudios directamente sobre el líquido de lavado broncoalveolar, eliminadas las células y dializado, con el consiguiente ahorro de tiempo en los análisis de las preparaciones.

Nuestros resultados indican que el surfactante pulmonar de rata adulta presenta una relación fosfolípido/proteína de aproximadamente 0,3, con un contenido en fosfolípidos del 89 % y un 11% de colesterol. El lípido mayoritario es la fosfatidilcolina (80 %). El fosfatidilglicerol representa el 6 % del total de fosfolípidos, y el 2 % corresponde a la esfingomiélin. La composición lipídica descrita es muy similar a la encontrada en preparaciones de surfactante pulmonar procedente de rata y otras especies (Harwood et al, 1975; Rooney, 1979; Sanders, 1982; Harwood y Richards, 1985). El lípido más representado en este líquido biológico es la fosfatidilcolina, presente en su mayor parte como DPPC, con cantidades relativamente elevadas de fosfatidilglicerol. Ambos fosfolípidos son los responsables principales de las funciones propias del surfactante. El fosfatidilglicerol facilita la ruptura de los cuerpos lamelares, aumentando a su vez la fluidez de la DPPC (Sanders, 1982), ayudando a la producción de una monocapa superficial activa con propiedades similares a la

estructura en fase hexagonal-II. El resto de los componentes, tales como fosfatidilinositol, proteínas específicas y las bajas cantidades de colesterol y triacilgliceroles también parece que contribuyen a la funcionalidad total del surfactante (Harwood y Richards, 1985; Keough, 1985). El fosfatidilinositol puede sustituir al fosfatidilglicerol sin que se observen pérdidas de las características funciones del surfactante (Benson et al, 1983). Así sucede en algunas especies como el conejo, donde el fosfatidilglicerol está presente solamente en cantidades traza en el surfactante del recién nacido, mientras que el fosfatidilinositol se encuentra ampliamente representado (Benson et al, 1983).

El estudio de la composición lipídica en los surfactantes procedentes de ratas de diferentes edades, muestra cambios significativos a lo largo del desarrollo. Las razones fosfolípido/proteína y colesterol/proteína descienden a medida que aumenta la edad del animal, lo que implica un aumento en la porción proteica en las muestras analizadas, que podría ser debido a un aumento de las apoproteínas del surfactante y/o de las proteínas acompañantes durante la extracción. El porcentaje de fosfatidilcolina en el surfactante no experimenta cambios estadísticamente significativos durante el desarrollo, manteniéndose entre valores del 85 % (neonatos) al 81% (adultos). Sin embargo, el porcentaje de fosfatidilglicerol aumenta significativamente con la edad, mientras que el de esfingomielina desciende. Estos cambios hacen que varíen las diferentes razones molares de fosfolípidos. Así, la razón molar fosfatidilcolina/fosfatidilglicerol desciende 4.9 veces en adultos con respecto a los recién nacidos, mientras que aumentan las razones molares fosfatidilcolina/esfingomielina y fosfatidilglicerol/esfingomielina 1.4 y 6.4 veces, respectivamente.

La línea evolutiva del patrón de fosfolípidos del surfactante marcada durante el periodo de la gestación es semejante a la descrita anteriormente, aunque durante la gestación, los cambios inciden en la misma línea pero de forma mucho más acusada. Los porcentajes de esfingomielina y fosfatidilserina disminuyen conforme avanza la gestación, desde un 40 % hasta cantidades traza, siendo sustituida la esfingomielina por la fosfatidilcolina, aumentando esta última desde un 20 % hasta un 80 % al final del periodo (Benson et al, 1983). El fosfatidilinositol suele aumentar, mientras que la fosfatidilserina disminuye, haciendo su aparición el fosfatidilglicerol en cantidades trazas después del nacimiento en los cuerpos lamelares con cantidades iniciales de alrededor del 1 % (Benson et al, 1983). Transformaciones idénticas a las

anteriormente indicadas se han descrito en fetos de conejo (Hallman y Gluck, 1980), rata (Katyal et al, 1977) y humanos (Benson et al, 1983).

Los cambios señalados deben ser interpretados a la luz de las modificaciones que sufren las enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos del surfactante a través del desarrollo. Así, la fosfolina citidiltransferasa, que cataliza la activación de la colina a CDP-colina, metabolito intermediario de la síntesis de fosfatidilcolina, es activada por los fosfolípidos ácidos en el siguiente orden: fosfatidilglicerol > fosfatidilinositol > fosfatidilserina (Rooney, 1984). Por tanto, la aparición del fosfatidilinositol, y posteriormente de fosfatidilglicerol, estimulará la síntesis de fosfatidilcolina, viéndose favorecido su incremento porcentual a lo largo del periodo fetal, hasta alcanzar valores máximos en los últimos momentos de la gestación, cuando hace su aparición el fosfatidilglicerol y tiene máxima presencia el fosfatidilinositol. También se ha observado una correlación positiva entre el incremento porcentual de fosfatidilcolina y el aumento de la actividad fosfatásica ácida durante el desarrollo fetal (Benson et al, 1983). Esta enzima está presente en los cuerpos lamelares y desempeña un papel regulador fundamental en el proceso de biosíntesis de la fosfatidilcolina y el fosfatidilglicerol.

#### **4.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON HIPEROXIA NORMOBARICA SOBRE LA COMPOSICION LIPIDICA DEL SURFACTANTE PULMONAR DE RATAS DE DIFERENTES EDADES. CAMBIOS MORFOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS ALVEOLOS PULMONARES.**

La sensibilidad del pulmón frente a los radicales libres viene condicionada por sus características funcionales como órgano de intercambio. El oxígeno a altas concentraciones produce especies muy reactivas que pueden oxidar los componentes tisulares, afectando a las células epiteliales, al intersticio y a las células endoteliales de los capilares pulmonares.

Las especies químicas del oxígeno portadoras de uno o más electrones no apareados suelen considerarse moléculas tóxicas, tal es el caso del anión superóxido, un radical libre que resulta tóxico por sí mismo y que tiene capacidad de reaccionar con el  $H_2O_2$  generando radicales hidroxilo ( $HO\cdot$ ), considerados aún más tóxicos. El principal mecanismo de defensa es la superoxido dismutasa, que cataliza la dismutación del anión superóxido a  $H_2O_2$  evitando la formación del radical hidroxilo (Mustafa y Tierney, 1978; Sánchez-Agudo, 1992).

La exposición a ambientes de hiperoxia conlleva efectos tóxicos debidos a la presencia de radicales libres, cuya severidad depende fundamentalmente de la concentración del gas en el aire inhalado, el volumen de gas inhalado y el tiempo de exposición (Jamieson et al, 1986), sin olvidar la influencia de la especie animal, la edad, el peso corporal y el estado nutricional (Mustafa y Tierney, 1978). En mamíferos, la inspiración de oxígeno a presiones parciales por encima de los 500 torr deja al pulmón dañado, con la formación de edema, producción de depósitos de fibrina, atelectasis, congestión, inflamación, hialinización y engrosamiento de las arteriolas, hipertrofia de las células alveolares e hiperplasia.

La formación del edema (fase exudativa) se debe al incremento de la permeabilidad de las células del endotelio capilar, causado por la presencia de radicales libres derivados del oxígeno, cuando estos se forman a una velocidad que desborda a la capacidad antioxidante celular (Freeman y Crapo, 1981; Dekene y Fanburg, 1982). Estas especies reactivas actúan sobre los fosfolípidos de las membranas produciendo su peroxidación, con la consiguiente alteración de la capacidad de la célula para mantener el equilibrio iónico bajo el estrés oxidativo (Jamieson et al, 1986). La fase exudativa se inicia entre el segundo y tercer día, desarrollándose el edema a nivel intersticial y alveolar, seguido de formación de membranas hialinas y destrucción de las células epiteliales de tipo I y endoteliales de los capilares. Las células de tipo I son las más sensibles a la toxicidad por oxígeno, y son rápidamente reemplazadas por las de tipo II, que se transforman después en tipo I jóvenes. El estadio proliferativo se superpone con el anterior y se inicia uno o dos días más tarde con hiperplasia de células alveolares de tipo II y células intersticiales. Si prosigue la exposición aparece la fibrosis (Sánchez-Agudo, 1992). La fase proliferativa está en estrecha relación con el despliegue de la defensa antioxidante, y de la efectividad de esta depende que podamos hablar de adaptación (tolerancia) o de muerte de los individuos expuestos a la hiperoxia. La superóxido dismutasa, enzima crucial en la defensa antioxidante, incrementa su actividad en los pulmones de rata después de que estos sean expuestos a concentraciones subletales de oxígeno (Jamieson y al, 1986; Crystal y Ramón, 1992), así como el contenido en proteínas mitocondriales y de retículo endoplásmico (Freeman y Crapo, 1981).

Las alteraciones funcionales anteriormente descritas son concordantes con las observaciones morfológicas en las que se aprecia vacuolización de las mitocondrias del pulmón de rata tras 8 h de exposición a 1 atm. de oxígeno, inicialmente en las células epiteliales, pero a los 2-3 días también en las

endoteliales. Se han encontrado modificaciones en las mitocondrias de los neumocitos tipo II que podrían ser compatibles con una adaptación a la toxicidad por oxígeno cuando se somete al animal a concentraciones subletales de oxígeno, por lo que se sugiere que los cambios morfológicos podrían ser debidos a cambios metabólicos bifásicos: una disminución inicial del metabolismo, seguida de un aumento, que se relaciona con la proliferación de neumocitos tipo II, células con alta tasa metabólica (Mustafa y Tierney, 1978; Rooney, 1984).

Las mitocondrias son los orgánulos donde el consumo de oxígeno es mayor, y probablemente por contener gran número de enzimas con grupos sulfidrilo y sus membranas con abundantes ácidos grasos insaturados, resultan más vulnerables al ataque por radicales libres. El daño mitocondrial provoca descensos en la producción de ATP y en el consumo de oxígeno, así como una destrucción de los nucleótidos de adenina reducidos, fuente importante de poder reductor, eliminándose de este modo uno de los sistemas antioxidantes celulares de que dispone la célula (Mustafa y Tierney, 1978). Experimentalmente se ha comprobado que las ratas expuestas a un 100 % de oxígeno durante varios días aumentan el consumo de glucosa, produciendo un marcado incremento de lactato por vía glucolítica, con el fin de contrarrestar la bajada en aporte energético producido por la vía aeróbica, a consecuencia de un posible deterioro de la estructura mitocondrial (Mustafa y Tierney, 1978).

El estudio ultraestructural de los alveolos pulmonares en ratas de diferentes edades nos ha permitido observar algunos cambios morfológicos indicativos de la maduración pulmonar. Los capilares alveolares se hacen más evidentes y se acercan en mayor número a los neumocitos tipo I según aumenta la edad de los animales. Esto supone un incremento de la superficie de intercambio gaseoso, y se considera como "marcador morfológico" del desarrollo y maduración pulmonar, junto con la desaparición de células intersticiales lipídicas a medida que aumenta la edad. Estas células parece que están en íntima relación con los neumocitos tipo II, encargándose de aportar los lípidos de reserva en los primeros días de vida (Maksvytis, 1981).

En los grupos de animales tratados con hiperoxia, las alteraciones mitocondriales son comunes y similares en todos ellos. Existen, a nuestro entender, dos cambios sustancialmente diferentes, como son la contracción mitocondrial y las variaciones en la forma. Esta contracción mitocondrial es indicativa de una mayor producción de ATP (Trump, 1971), y aparece en todos aquellos casos en los que la célula necesita una mayor producción de energía,

como sucede en los estados de hiperoxia. La necesidad de un mayor aporte energético en tales estados de hiperoxia viene ocasionado por el deterioro que sufre la membrana plasmática, debido a los procesos peroxidativos producidos por los radicales libres procedentes de las altas concentraciones de oxígeno, lo que ocasiona una ruptura del equilibrio iónico, y por tanto, alteración de la hemostasis celular. Para restablecer la hemostasis, la bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  necesita realizar un mayor trabajo, y así, consumir mayor cantidad de ATP, lo que justificaría la contracción mitocondrial observada en todos los alveolos pulmonares procedentes de las ratas tratadas con hiperoxia. Los cambios en la forma de las mitocondrias, observados en todos los grupos sometidos a hiperoxia, pueden corresponderse con adaptaciones o modificaciones en su función.

Como dato diferencial entre los animales jóvenes y adultos sometidos a hiperoxia, debemos comentar el incremento del sistema vacuolar en los adultos, observado en este estudio, que es coincidente con lo que describen Cotran et al (1990).

Por lo que respecta a la composición lipídica del surfactante pulmonar de rata, nuestros estudios demuestran que ésta sufre cambios durante el tratamiento con hiperoxia, los cuales varían en función de la edad del animal. El contenido en fosfolípidos totales se incrementa solamente en los animales de 2 días, mientras que disminuye el porcentaje de colesterol, que aumenta en los animales de 7 días. El incremento en el contenido de fosfolípidos totales se justificaría por un aumento de la actividad glicerol-3-fosfato aciltransferásica, como ha sido demostrado por Merrill et al (1984) en el pulmón de ratas tolerantes a la hiperoxia. Las razones fosfolípidos/proteína y colesterol/proteína se mantienen estables en todos los grupos de edad, excepto en los animales de 7 días, donde se observa una disminución de estos valores, lo que es imputable a un ascenso en el contenido de proteínas como ya ha sido puesto de manifiesto en los estados de tolerancia de la rata a la hiperoxia (Freeman y Crapo, 1981). Sin embargo, esta síntesis proteica se encuentra sumamente disminuida a altas concentraciones de oxígeno, cuando el animal no se ha adaptado previamente a un ambiente hiperóxico (Masaro y Masaro, 1973).

El patrón de fosfolípidos del surfactante pulmonar también varía en función de los diferentes grupos de edad sometidos a hiperoxia. De los fosfolípidos analizados en este estudio, solamente el porcentaje de FOSFATIDILCOLINA se mantiene invariable en los diferentes grupos. Un comportamiento similar se ha puesto de manifiesto por Abe y Tierney (1976),

quienes encuentran cambios muy pequeños en el contenido de dipalmitoilfosfatidilcolina en el surfactante pulmonar de ratas después de tres días de exposición al 100 % de oxígeno. La estabilidad del porcentaje de fosfatidilcolina en el surfactante pulmonar durante el tratamiento con hiperoxia hace pensar en un posible mantenimiento de las propiedades fisicoquímicas y funcionales del mismo. De hecho, Brousolle et al (1978) han observado que la calidad del surfactante se mantiene dentro de la normalidad en ratas adaptadas a la hiperoxia, mientras que se aprecia un incremento en la actividad de la superoxido dismutasa Cu-Mn dependiente, lo que hace a las ratas adaptadas más tolerantes a posteriores tratamientos con hiperoxia normobárica (Jamieson et al, 1986).

Analizando los datos obtenidos en nuestros experimentos respecto al porcentaje de FOSFATIDILGLICEROL, observamos que este fosfolípido se mantiene constante en los animales de 2 y 7 días sometidos a hiperoxia, en cambio sufre un descenso de 4 veces con respecto a los controles en los animales adultos, que es estadísticamente significativo. Este descenso en el contenido de fosfatidilglicerol debe repercutir de forma importante sobre la capacidad funcional del surfactante pulmonar, a la vista de las capacidades fisicoquímicas y funcionales que aporta dicho fosfolípido, pudiendo contribuir esta disminución a la aparición de patologías respiratorias de carácter letal. Dado que dicho fosfolípido se sintetiza parcialmente en la mitocondria, las alteraciones funcionales que se producen en dicho orgánulo ante altas concentraciones de oxígeno (Mustafa y Tierney, 1978), podrían ocasionar el descenso observado.

Por lo que respecta al porcentaje de ESFINGOMIELINA, este se ve modificado durante el tratamiento con hiperoxia. Se aprecia un descenso de 4 veces en dicho porcentaje en los animales de 2 días tratados con respecto a los controles. Este descenso también ha sido puesto de manifiesto por Merrill y cols. (1984) en los cuerpos lamelares de ratas adultas adaptadas a condiciones de hiperoxia, a pesar de que la enzima serin palmitiltransferasa mantiene constante su actividad durante el tratamiento. El descenso observado podría venir impuesto por una disminución en la disponibilidad del sustrato acil Co A por parte de la enzima, dado que este es también usado por la glicerol-fosfato aciltransferasa, que es 7 veces más activa que la serin palmitiltransferasa (Merrill et al, 1984). El aumento en el contenido en esfingomielina (4 veces con respecto a los controles) detectado en los animales sometidos a hiperoxia durante 7 días, podría ser justificado por un incremento de la actividad serin palmitiltransferasa,

como se ha puesto de manifiesto en casos de regeneración hepática, donde se observa un comportamiento paralelo entre el aumento de la actividad y el incremento de la esfingomielina (Coleman y Hayness, 1983).

Cuando los animales de diferentes edades se someten a dos días de hiperoxia, se observa que tanto la razón fosfolípidos/proteína como la razón colesterol/proteína descienden significativamente a medida que aumenta la edad, lo que parece venir impuesto por un aumento en la síntesis de proteínas producido por efecto de la edad, aunque no se excluye un efecto asociado de la hiperoxia. El contenido en fosfolípidos desciende, mientras que aumenta el colesterol, de forma tal que la relación fosfolípidos/colesterol desciende al aumentar la edad. Por lo que respecta a la composición en fosfolípidos, el porcentaje de esfingomielina aumenta, mientras que disminuye el de fosfatidilglicerol, manteniéndose constante el de fosfatidilcolina a lo largo del desarrollo. Con los datos existentes no podemos realizar una interpretación clara de los cambios anteriormente descritos, ya que se carece de información sobre el comportamiento de las enzimas implicadas en la síntesis de estos lípidos en animales de diferentes edades sometidos a hiperoxia.

Nuestros resultados indican que además de la proliferación celular causada por la hiperoxia, junto con una vacuolización de los neumocitos de tipo II en el adulto, también se observan cambios en la composición lipídica del surfactante pulmonar ante situaciones de hiperoxia, poniéndose de manifiesto el mantenimiento del contenido de fosfatidilcolina en todos los grupos estudiados, y el descenso del fosfatidilglicerol en los animales adultos. Además, estos datos sugieren una mayor susceptibilidad de los animales adultos a las situaciones de hiperoxia, como de hecho ha sido demostrado experimentalmente por Mustafa y Tierney (1978). A todo esto hay que añadir una posible acción peroxidativa de la atmósfera hiperóxica sobre los ácidos grasos de los lípidos del pulmón y del propio surfactante, como ya se ha descrito en otros casos (Menzel, 1970), lo que contribuirá también al deterioro de las características funcionales del surfactante natural.

## **5. CONCLUSIONES.**

- 1) Los tres métodos enzimáticos puestos a punto para determinar fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y esfingomielina, permiten cuantificar de forma rápida, precisa y sensible la concentración de los citados fosfolípidos en diversos materiales biológicos (membranas, liposomas y surfactante pulmonar), sin necesidad de una extracción previa del lípido, siendo entre 1,5 y 22 veces más sensibles que los métodos clásicos de determinación habitualmente empleados.
- 2) El porcentaje de fosfatidilcolina (81-85 %) del surfactante pulmonar de rata no experimenta variaciones estadísticamente significativas ni con la edad del individuo, ni durante el tratamiento con hiperoxia normobárica.
- 3) El surfactante pulmonar de rata muestra cambios estadísticamente significativos en su composición lipídica durante el desarrollo del animal, observándose descensos en las razones fosfolípido/proteína y colesterol/proteína, y en el porcentaje de esfingomielina, que alcanza valores del 2 % en los adultos, mientras que el fosfatidilglicerol aumenta hasta el 6 % al final del desarrollo.
- 4) El estudio ultraestructural de los neumocitos tipo II de ratas de diferentes edades sometidas a hiperoxia normobárica (95-99 % de oxígeno), muestra alteraciones mitocondriales con contracciones y variaciones en su forma, en todos los grupos de edad, observándose un incremento del sistema vacuolar en los animales adultos.
- 5) La composición lipídica del surfactante pulmonar de rata se ve modificada en función de la edad del animal durante el tratamiento con hiperoxia normobárica. En los adultos el tratamiento produce un descenso en el porcentaje de fosfatidilglicerol de 4 veces con respecto a los controles, mientras que en los animales jóvenes, es la esfingomielina el único fosfolípido de los analizados, que se ve cuantitativamente modificado 4 veces respecto a los controles, descendiendo en los animales de 2 días y aumentando en los de 7 días.

## **6. BIBLIOGRAFIA.**

- ABE, M. & TIERNEY, D. F.(1976). Lipid metabolism of rat lung during recovery from lung injury. *Fed. Proc.* 35: 479-482.
- ADACHI, H.; HAYASHI, H; DEMPO, K. & AKINO, T. (1989). Characterization of phospholipids accumulated in pulmonary surfactant compartments of rats intratracheally exposed to silica. *Biochem. J.* 262: 781-786.
- AHMED, N. (1987). NADH-dependent and dependent lipid peroxidation. *Biochem. Educ.* 15: 58-62.
- ANAOKAR, S.; GARRY, P. J. & STANDERFER, J. C. (1978). Enzymic assay for lecithin in amniotic fluid. *Clin. Chem.* 25: 103-107.
- ASSMANN, G. & SCHRIEWER, H. (1981). "Sphingomyelin". En: "Methods of Enzymatic Analysis. Metabolites 3: Lipids, aminoacids and related compounds". (H. U. Bermeyer, ed.),.vol . 8, 3rd Ed., pp. 105-111.
- AVERY, M. E. & MEAD, J. (1959). Surface properties in relation to atelectasis and hialine membrane disease. *Am. J. Dis. Child.* 97: 513-523.
- BARBER, A. J. & JAMIESON, G. A. (1970). Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* 275: 6357-6365.
- BARITUSSIO, A.; BELLINA, L.; CARRARO, R.; ROSSI, A.; ENZI, G. MAGOON, M. W. & MUSSINI, I. (1984). Heterogeneity of alveolar surfactant in the rabbit: composition, morphology and labelling of subfractions isolated by centrifugation of lung lavage. *Eur. J. Clin. Invest.* 14: 24-29.
- BATENBURG, J. J. (1984). "Biosynthesis and secretion of pulmonary surfactant". En: "Pulmonary surfactant". (Roberston, R.; van Golde, L. M. G. & Batenburg, J. J. Ed.). Elseviers Science Publishers, Amsterdan. pp 237-270.
- BENSON, B. J.; KITTERMAN, J. A.; CLEMENTS, J. A.; MESCHER, E. J. & TOOLEY, W. H. (1983). Changes in phospholipids composition of lung surfactant during development in the fetal lamb. *Biochim. Biophys. Acta.* 753: 83-88.
- BIGNON, J.; JAURAND, M. C.; PINCHON, M. C.; SAPIN, C. & WARNET, J. M. (1976). Immunoelectron microscopic and immunochemical demonstrations of serum protein in the alveolar lining material of the rat lung. *Am. Rev. Res. Dis.* 113: 109-120.

- BLEASDALE, J. E. & JOHNSTON, J. M. (1982). "Phosphatidic acid production and utilization". En: "Lung Development: Biological and Clinical Perspectives". vol. 1. (Ed. Farrell, P. M.). Academic Press, New York. pp 259-249.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- BONANNO, L. M.; DENIZOT, B. A.; TCHORELOFF, P. C.; PUISIEUX, F. & CARDOT, P.J. (1992). Determination of phospholipids from pulmonary surfactant using an on-line coupled-phase high-performance liquid chromatography system. *Anal. Chem.* 64: 371-379.
- BONIKOS, D. S.; BENSCH, K. G.; LUDWIN, S. K. & NORTHWAY, W. H. (1975). Oxygen toxicity in the newborn: the effects of prolonged 100% O<sub>2</sub> exposure on the lungs of newborn mice. *Lab. Invest.* 32(5): 619-622.
- BOWDEN, D. H.; ADANSON, I. Y. R. & WYATT, J. P. (1968). Reaction of the lung cells to a high concentration of oxygen. *Arch. Path.* 86: 671-679.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BROUSSOLE, B.; BURNET, H.; BARET, A.; FOLIGUET, B.; MICHEL, P. & MARCHAL, L. (1978). Adaptation to pulmonary chronic hyperoxia in rats: Demonstration by a study of pulmonary surfactant, tissue superoxide dismutase and histology. Ed. Ph. H. Quanjer, J. G. Widdicombe. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* pp 133-135.
- CASALS, C. (1983). "Metabolismo del surfactante pulmonar durante el desarrollo fetal". En: "Actualidades en el laboratorio médico". Ed. Biolecta. Madrid. pp 33-45.
- CLARK, J. M. & LAMBERTSEN, C. J. (1971). Pulmonary oxygen toxicity: A review. *Pharmacol. Rev.* 23: 37-42.
- CLEMENTS, J. A.; OYARZUN, M. J. & BARITUSSIO, A. (1981). Secretion and clearance of lung surfactant: a brief review. *Prog. Resp. Res.* 15: 20-26.
- CLEMENTS, M. R. & WALLER, H. D. (1987). Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids.* 45: 251-268.

- COLEMAN, R. A. & HAYNES, E. B. (1983). Selective changes in microsomal enzymes of triacylglycerol and phosphatidylcholine synthesis in fetal and postnatal rat liver. *J. Biol. Chem.* 258: 450-456.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V. & ROBBINS, S. L. (1990). "Lesión y adaptación celular". En: "Patología estructural y funcional ROBBINS". McGRAW-HILL. Interamericana. pp 234-242.
- CRYSTAL, R. J. & RAMON, J. R. (1992). GSH SYSTEM; Glutation: eje de la defensa antioxidante. Excerpta Medica (An Elsevier Company). Amsterdam. Países Bajos.
- DEKENE, S. M. & FANBURG, B. L. (1982). Protein and increased oxygen toxicity in rats. *Fed. Proc.* 40: 427.
- DREVON, C. A. (1991). Absorption, transport and metabolism of vitamin E. *Free Rad. Res. Comms.* 14: 229-246.
- FRANCOUAL, J.; BENATTAR, C.; VIAL, M.; PATIERNIK, E.; LELUG, R. & LINDERBAUN, A. (1991). Determination rapide du surfactant pulmonaire dans le liquide amniotique par polarisation de fluorescence (FLM test Abbott). *J. Gynecol. Biol. Reprod.* 20: 425-428.
- FRANK, L. (1981). Undernutrition in newborn rats compromises their tolerance to prolonged hyperoxia. *Am. Rev. Res. Dis.* 123: 156-160.
- FREEMAN, B. A. & CRAPO, J. A. (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J. Biol. Chem.* 256: 10986-10992.
- FREER, D. E. & STATLAND, B. E. (1981). Measurement of amniotic fluid surfactant. *Clin. Chem.* 27/10: 1629-1641.
- GALINDO VILLARDON, M. P. (1984). Exposición intuitiva de métodos estadísticos. Universidad de Salamanca.
- GLASS, L. (1971). Absence of respiratory distress syndrome in premature infants of heroin-addicted mothers. *Lancet* ii. 685-686.
- GREENBERG, J. T.; MONACH, P.; CHOU, J. H.; JOSEPHY, P. D. & DEMBLE, B. (1990). Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6181-6185.

- GREENE, F. M.; FENCL, M. M. & TULCINSKY, D. (1987). Biochemical aspects of pregnancy. En: Fundamentals of Clinical Chemistry. (Tietz, N. W. Ed.) Saunders. 3rd Edition. pp 906-927.
- GRINNA, L. S. & BARBER, A. A. (1973). Lipid peroxidation in livers and kidneys from young and old rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55: 773-779.
- GURR, M. I. & HARWOOD, J. L. (1991). *Lipid Biochemistry. An introduction.* 4th Ed., Chapman & Hall, London.
- GUTTERIDGE, J. M. C. & HALLIWELL, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15-April, 129-135.
- GUYTON, A. C. (1988). *Tratado de fisiología médica.* McGraw-Hill. Interamericana.
- HAAGSMAN, H. P. & van GOLDE, L. M. G. (1991). Synthesis and assembly of lung surfactant. *Ann. Rev. Physiol.* 53: 441-464.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.
- HALLMAN, M. & EPSTEIN, B. L. (1980). Role of myo-inositol in the synthesis of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol in the lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 1151-1159.
- HALLMAN, M. & GLUCK, L. (1975). Phosphatidylglycerol in lung surfactant II. Subcellular distribution and mechanism of biosynthesis in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 409: 172-191.
- HALLMAN, M. & GLUCK, L. (1980). Formation of acidic phospholipids in rabbit lung during perinatal development. *Pediatr. Res.* 14: 1250-1259.
- HAMOSH, M.; SCHECKTER, Y. & HAMOSH, P. (1978a) Metabolic activity of developing rat lung. *Fed. Proc.* 37: 808.
- HAMOSH, M.; SIMON, M. R.; HAMOSH, P. (1978b) Metabolic activity of developing rabbit lung. *Fed. Proc.* 37: 808.
- HARWOOD, J. L. & RICHARDS, R. J. (1985). Pulmonary surfactant: its isolation, characterization and function. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 1079-1086.

- HARWOOD, J. L.; DESAI, R.; HEXT, P.; TETLEY, T.; RICHARDS, R. (1975). Characterization of pulmonary surfactant from ox, rabbit, rat and sheep. *Biochem. J.* 151: 707-714.
- HAWGOOD, S. & SHIFFER, K. (1991). Structures and properties of the surfactant-associated proteins. *Ann. Rev. Physiol.* 53: 375-394.
- JAMIESON, D. & CASS, N. (1967). CNS and pulmonary damage in anesthetized rats exposed to hyperbaric oxygen. *J. Appl. Physiol.* 23: 235-421.
- JAMIESON, D.; CHANCE, B.; CADENAS, E. & BOVERIS, A. (1986). The relation of free radical production to hyperoxia. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 703-719.
- JOBE, A.; IKEGAMI, M.; SARTON-MILLER, I.; JONES, S. & YU, G. (1985). Characterization of phospholipids and localization of some phospholipid synthetic and subcellular marker enzymes in subcellular fractions from rabbit lung. *Biochim. Biophys. Acta.* 666: 47-57.
- KATYAL, S. L.; ESTES, D. L. W. & LOMBARDI, B. (1977). Method for the isolation of surfactant from homogenates and lavages of lung of adult, newborn, and fetal rats. *Lab. Invest.* 36: 558-592.
- KATZENSTEIN, A.; BLOOR, C. M. & LEIBOW, A. A. (1976). Diffuse alveolar damage: the role of oxygen, shock and related factors. *Am. J. Pathol.* 85: 210-214.
- KEOUGH, K. M. W. (1985). Physicochemical properties of surfactant lipids. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 1081-1084.
- KING, R. J. & CLEMENTS, J. A. (1972a). Surface active materials from dog lung. I. Method of isolation. *Am. J. Physiology.* 223: 707-714.
- KING, R. J. & CLEMENTS, J. A. (1972b). Surface active materials from dog lung. II. Composition and physiological correlations. *Am. J. Physiology.* 223: 715-726.
- KING, R. J. (1974). The surfactant system of the lung. *Fed. Proc.* 33: 2238-2247.
- KING, R. J. (1984). "Isolation and chemical composition of pulmonary surfactant". En: "Pulmonary surfactant". (Roberston, R.; van Golde, L. M. G. & Batenburg, J. J. Ed.). Elseviers Science Publishers, Amsterdam. pp 1-16.
- KULOVICH, M. V.; HALLMAN, M. B. & GLUCK, L. (1979). The lung profile. I. Normal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135: 57-63.

- KUMAR, R. & HEDGE, K. S. (1983). Influence of thyroid hormone on the phospholipid composition of lung tissue and surfactants of rats. *Indian. J. Physiol. Pharmacol.* 27: 203-208.
- LELAND G. DOBBS, M. D. (1989). Pulmonary surfactant. *Ann. Rev. Med.* 40: 431-46.
- MAGOON, M. W.; WRIGHT, J. R.; BARITUSSIO, A.; WILLIAMS, M. C.; GOERKE, J. D; BENSON, B. J.; HAMILTON, R. L. & CLEMENTS, J. A. (1983). Subfraction of lung surfactant. Implications for metabolism and surface activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 750: 18-31.
- MAKSVYTIS, H. J. (1981). Isolation and characterization of the developing rat lung. *Lab. Invest.* 45(3): 248.
- MARIN, M. S.; CEBEZAS, J. A.; SANCHEZ-YAGÜE, J. & LLANILLO, M. (1990). Changes in the phospholipid and fatty acid composition in normal erythrocytes from sheep of different ages. Aminophospholipid organization in the membrane bilayer. *Biochimie.* 72: 745-750.
- MASARO, D. & MASARO, D. (1973). Adaptation to hyperoxia. Influence of protein synthesis by lung and on granular pneumocyte ultrastructure. *J. Clin. Invest.* 705-711.
- MASON, R. J. (1978). Importance of the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway in the synthesis of phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine in alveolar type II cells. *J. Biol. Chem.* 182: 3367-3370.
- MASON, R. J., MANGANIELLO, E. & VAUGHAN, M. (1972). Effects of thyroxine on the disaturated lecithin content of the lung. *Am. Rev. Resp. Dis.* 106: 767-768.
- McCAY, P. B.(1980). Physiological significance of lipid peroxidation. *Fec. Proc.* 40: 173-182.
- MENZEL, D. B. (1970). Toxicity of ozone, oxygen and radiation. *Annu. Res. Pharmacol.* 10: 379-393.
- MERRILL, A. H.; WANG, E.; STEVENS, J. & BRUMLEY, G. W. (1984). Activities of the initial enzymes of glycerolipid and sphingolipid synthesis in lung microsomes from rats exposed to air or 85% oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119: 995-1000.

- MICHAL, G. & BEUTLER, H. O. (1979). Enzymatic determination of lecithin in amniotic fluid. *Clin. Chem.* 25: 1138-1141.
- MILLER, J. C. & WEINHOLD, P. A. (1987). Cholinephosphotransferase in rat lung. The in vivo synthesis of DPPC from dipalmitoylglycerol. *J. Biol. Chem.* 256: 12662-12665.
- MORGAN, M. D. T. E. (1971). Pulmonary surfactant. *N. Engl. J. Med.* 284: 1185-1193.
- MUSTAFA, M. G. & TIERNEY, D. F. (1978). Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide toxicity. *Am. Rev. Resp. Dis.* 118: 1061-1090.
- NASH, G. (1967). Pulmonary lesions associated with oxygen therapy and artificial ventilation. *N. Engl. J. Med.* 276: 368.
- OULTON, M.; MacDONALD, J.; JANIGAN, D. T. & FAULKNER, G. T. (1993). Mouse alveolar surfactant: characterization of subtypes prepared by differential centrifugation. *Lipids* 28: 715-720.
- PARINALDI, N. L.; WEIS, B. K.; NATARAJAN, V. & SCHMID, H. H. O. (1990). Peroxidative modification of phospholipids in myocardial membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 280: 45-52.
- PARRA PEREZ, M. C. (1985). Estudio experimental de las lesiones pulmonares inducidas por altas concentraciones de oxígeno. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.
- PATTLE, R. E. (1955). Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature.* 175: 1125-1126.
- PATTLE, R. E.; SCHOCK, C. & BATTENSBY, J. (1972). Some effects of anesthetics on lung surfactant. *Brit. J. Anaesth.* 44: 1119-1127.
- PERSSON, A. (1990). Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein. *J. Biol. Chem.* 265: 55755-60.
- PORRECO, R. P.; MERRITT, T. A. & GLUCK, L. (1980). Effect of prolactin on phospholipid biosynthesis by alveolar cell carcinoma (A549) in monolayer tissue culture. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 136: 1071-1074.
- POSSMAYER, F. (1984). "Biochemistry of pulmonary surfactant during fetal development and in the perinatal period". En: "Pulmonary surfactant".

(Roberston, R.; van Golde, L. M. G. & Batenburg, J. J. Ed.). Elseviers Science Publishers, Amsterdam. pp 295-356.

- POSSMAYER, F. (1988). A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am. Rev. Resp. Dis.* (1988). 138: 990-998.
- POST, M.; BATENBURG, J. J.; SCHUURMANS, E. A. J. M.; LAROS, C. D. & VAN GOLDE, L. M. G. (1982). Lamellar bodies isolated from human lung tissue. *Exp. Lung Res.* 3: 17-28.
- PRATT, P. C. (1958). Pulmonary capillary proliferation induced by oxygen inhibition. *Am. J. Pathol.* 34:1033.
- RASHMI, D. (1978). Studies on the fat of pulmonary surfactant in lung. *Biocem. J.* 176: 455-462.
- REDDING, R. A.; DOUGLAS, W. H. J. & STEIN, M. (1972). Thyroid hormone influence upon lung surfactant metabolism. *Science.* 175: 994-996.
- RICHTER, C. (1987). Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids* 44: 175-189.
- ROBERSTON, B. & VAN GOLDE, L. M. G. (1984). "Posscript: Surfactant research; current concepts and perspectives for the future". En: "Pulmonary surfactant". (Roberston, R.; van Golde, L. M. G. & Batenburg, J. J. Ed.). Elseviers Science Publishers, Amsterdam. pp 549-564.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, M. A. (1992). Comportamiento de los sistemas enzimáticos antioxidantes frente a la producción de radicales libres durante el envejecimiento humano, y su relación con el síndrome del aceite tóxico como modelo de stress oxidativo. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.
- ROONEY, S. A. (1979). Biosynthesis of lung surfactant during fetal and early postnatal development. *Trends in Biochem. Sci.(TIBS).* 189-191.
- ROONEY, S. A. (1984). Lung surfactant. *Environmen Health Perspectives.* 55: 205-226.
- ROSE, H. G. & OKLANDER. M. (1965). Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J. Lip. Res.* 6: 428-431.

- ROSENBAUM, R. M.; WITTNER, M. & LENGGER, M. (1969). Mitochondrial and other ultrastructural changes in great alveolar cells of oxygen-adapted and poisoned rats. *Lab. Invest.* 20: 516-520.
- ROSS, G. F. (1986). Phospholipid binding and biophysical activity of pulmonary surfactant-associated protein (SAP)-35 and its non-collagenous COOH-terminal domains. *J. Biol. Chem.* 261: 14283-91.
- ROUSER, A. J.; FLEISCHER, S. & YAMAMOTO, A. (1970). Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5: 494-496.
- SANCHEZ-AGUDO, L. (1992). Radicales libres y enfermedades respiratorias. En: *GSH System. Glutation: eje de la defensa antioxidante.* pp 182-200. Excerpta Médica.
- SANCHEZ-YAGÜE, J. & LLANILLO, M. (1986). Lipid composition of subcellular particles from sheep platelets. Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in plasma membranes and platelet liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 856: 193-201.
- SANDERS, R. L. & LONGMORE, W. J. (1975). Phosphatidylglycerol in rat lung. II. Comparison of occurrence, composition and metabolism in surfactant and residual lung fractions. *Biochemistry.* 14: 835-840.
- SANDERS, R. L. (1982). In *Lung Development: Biological and Clinical Perspectives.* (Farrell, P. M. ed.) Vol. 1. *Biochemistry and Physiology.* pp 211-219. Academic Press, New York.
- SARZALA, M. G. & VAN GOLDE, L. M. G. (1976). Selective utilization of endogenous unsaturated phosphatidylcholines and diacylglycerols by cholinephosphotransferase of mouse lung microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 441: 423-432.
- SCHAFFNER, F. & TRACHTENBER, E. (1967). Structure of rats lung after protracted oxygen breathing. *Arch. Path.* 83: 99-104.
- SCHIEFER, S. & BEUTLER, H.-O. (1981). "Phosphatidylcholine". En: "*Methods of Enzymatic Analysis. Metabolites 3: Lipids, aminoacids and related compounds.*" (H. U. Bermeyer, ed.), vol. 8, 3rd Ed., pp. 87-104.

- SCHIEFER, S. & BEUTLER, H.-O. (1984). "Phosphatidylglycerol". En: "Methods of Enzymatic Analysis. Metabolites 3: Lipids, aminoacids and related compounds". (H. U. Bermeyer, ed.), vol . 8, 3rd Ed., pp. 117-125.
- SCHLOSSMAN, D. M. & BELL, R. M. (1977). Microsomal sn-glycerol-3-P and dihidroxyacetone phosphate acyltransferase activities from liver and other tissues. Evidence for a syngle enzyme catalyzing both reactions. Arch. Biochem. Biophys. 182: 732-742.
- SCHURCH, S. & GOERKE, J. D. (1976). Direct determination of surface tension in the lung. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 4689-4702.
- SHANKLIN, D. R. (1969). On the pulmonary toxicity of oxygen. I. Relationship of oxygen content to effect of oxygen on the lung. Lab. Invest. 21: 439-442.
- SIEDEL, J.; ROLLINGER, W.; RÖSCHLAU, P. & ZIEGENHORN, J. (1981). "Cholesterol". En: "Methods of Enzymatic Analysis. Metabolites 3: Lipids, aminoacids and related compounds". (H. U. Bermeyer, ed.), vol . 8, 3rd Ed., pp. 139-148.
- SIES, H. (1992). El estrés oxidativo: de la investigación básica a la aplicación clínica. En: GSH System. Glutation: eje de la defensa antioxidante. pp 48-64. Excerpta Médica.
- SLATER, T. F. (1984). Free radical mechanisms in tissue injury. Biochem, J. 222: 1-15.
- SMITH, J. L. (1989). The pathological effects due to increased of oxygen tension in the air breathed. J. Physiol. 24: 19-23.
- SPITZER, H. L.; RICE, J. M.; MAC DONALD, P. C. & JOHNSON, J. M. (1975). Phospholipid biosynthesis in lung lamellar bodies. Biochim. Biophys. Res. Commun. 66: 17-23.
- STORZ, G.; TARTAGLIA, L. A. & AMES, B. N. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. Science 248: 189-194.
- SUCKLING, K. E. & HARWOOD, J. L. (1986). Lung Surfactant. Biochem. Soc. Trans. 16: 1079-1096.

- TAEUSCH, H. W.; CARSON, S. H.; WANG, N. S. & AVERY, M. E. (1973). Heroin induction of lung maturation and growth retardation in fetal rabbit. *J. Pediatr.* 82: 869-875.
- TAPPEL, A. L. (1973). Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* 32: 1870-1874.
- THIEL, S. (1989). Structures and functions associated with the group of mammalian lectins containing collage-like sequences. *FEBS Lett.* 250: 78-84.
- TIERNEY, F. (1974). Lung metabolism and biochemistry. *Ann. Rev. Physiol.* 36: 209-231.
- TRUMP, B. F. (1971). "The role of energy metabolism, ion o water shifts in the pathogenesis of cell injury". En: "Cell Membranes, Biological and Pathological aspects". Willians and Wilkins, Baltimore.
- VAN HEUSDEN, G. P. H.; RUESTOW, B. & VAN DER MAST, M. A. (1987). Utilization of desaturated and unsaturated phosphatidylcholine and diacylglycerols by cholinephosphotransferase in rat lung microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 711: 361-368.
- van GOLDE, L. M. G. (1985). Synthesis of surfactant lipids in the adult lung. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 765-774.
- VLADIMIROV, Y. A.; OLENEV, V. I. SUSLOVA, T. B. & CHEREMISINA, Z. P. (1980). Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Rew.* 17: 174-249.
- von NEERGARD, K. (1929). Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in der Alveolen. *Z. Gesante. Exp. Med.* 66: 373-394.
- WEIBEL, E. R. & SWITZERLAND, B. (1971). Oxygen effect to lung cells. *Arch. Intern. Med.* (1971). 128: 54-62.
- WOLFF, S. P.; GAMER, A. & DEAN, R. T. (1986). Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends Biochem. Sci.* 11, January, 27-31.
- WRIGHT, J. R. & DOBBS, L. G. (1991). Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Ann. Rev. Physiol.* 53: 395-414.

"El método científico no da certeza, sino probabilidad, aunque, eso sí, alta probabilidad."

H. Poincaré

## **A PROPÓSITO DEL MÉTODO CIENTÍFICO**

(Recordando las palabras de mi Profesor y amigo Baltasar Sánchez)

Método es una palabra de origen griego, que quiere decir por medio de qué camino se llega a un fin perseguido, a una meta. Por consiguiente se trata de un medio y nunca de un fin.

Es posible llegar a un mismo resultado científico por varios caminos.

La Ciencia tiene como meta el saber de la verdad. Solamente desde Descartes se puso a sí misma un fin alternativo: el dominio y explotación de la Naturaleza.

Los métodos científicos son caminos que pretenden llegar a la verificación universal. Esta verificación es un intento de dar con unos valores de verdad cuya vigencia sea para siempre, de carácter universal y general y con validez para todo tiempo y espacio.

Fue, en esta suposición de hallazgo inmutable y de creer que se había dado con un modo aséptico de confirmación de los modelos racionales previos, lo que llevó a la comunidad científica del siglo XIX y parte del siglo XX, a afirmar la neutralidad del método científico, y por ende, de la Ciencia misma. Suponía la escisión total del observador de la observación.

Hoy se entiende por método científico los procedimientos de observación y razonamiento; dicho de otro modo, que la verificación se basa en dos tipos de conocimientos, a saber, conocimientos directos o inmediatos (observación de los hechos de experiencia) y conocimientos indirectos o mediatos, es decir, los razonamientos, bien sean deductivos o reductivos (inductivos).

La observación consiste en introducir sobre el hecho experimentable controles, registros y aislamientos artificiales, catalogada la información se formulan las reglas de un comportamiento cuyas constantes se ignoran. Los controles seguidos son continuos o discontinuos en el tiempo. Los registros suelen consistir en la elaboración de unas tablas de valores, que muestren la correspondencia entre las distintas variables que se estudian, y al mismo tiempo, la constancia o no entre ellas.

Los aislamientos artificiales, o en condiciones ideales, suelen ser idóneos para los fenómenos físicos, pero muy dudosos en los biológicos. Así Niels Böhr afirmaba que en muchas ocasiones para estudiar la vida había que matarla previamente, con lo que lo estudiado ya sólo era físico o químico, y la espontaneidad o principio de operación propia, tan exclusivos del ser vivo, quedan anulados.

Los razonamientos son reconstrucciones racionales de unas experiencias de investigación o de una intuición y en muchos casos se basan en una complección de ciertos aspectos o datos que faltan. En los razonamientos deductivos se va de lo más a lo menos general e incluso al caso concreto, es el caso de las demostraciones matemáticas. Así pues, demostrar es valerse de razonamientos deductivos.

En el razonamiento inductivo se da el paso contrario. Por una acumulación de experiencias concretas concordantes, de premisas particulares se infiere un enunciado o ley general. Es el llamado salto inductivo. Este es el razonamiento típico de las Ciencias Naturales.

El lógico polaco Lukasiewicz sostiene que cualquier razonamiento, sea deductivo o inductivo, tiene dos premisas, donde la primera es de tipo condicional (o reductible a condicional) y ha de adoptar la forma genérica de: "Si P entonces Q". Lo que caracteriza a la deducción es que la segunda premisa puede ser isomorfa del antecedente, por lo que la conclusión (consecuente) es la consecuencia derivada o deducida que necesariamente se obtiene. En la reducción la segunda premisa es isomorfa del consecuente y lo que se extrae o concluye es el antecedente, que es una generalización del consecuente. De este tipo son la mayoría de los razonamientos en Ciencias experimentales. De los casos particulares (experiencias de laboratorio) se va a leyes generales.

En la deducción, si las dos premisas son verdaderas, la conclusión es necesariamente verdadera; mientras en la inducción de dos premisas verdaderas se puede extraer una conclusión falsa. No se dispone de la necesidad lógica de la deducción. Por esto el método científico no estará nunca bien justificado.

El primero en atacar la inducción como método poco fiable fue David Hume en su crítica al principio de causalidad, pues en la experiencia no se da necesidad en el paso de un hecho a otro. La inducción encuentra su "aparente solidez" en un acostumbamiento de esperar la conexión de un hecho (causa) con otro que le sigue (efecto). Por tanto, la demostración inductiva no es posible. Esto, además, nos dice que toda teoría científica nunca está cerrada, sino que es remodelable, discutida y reinsertable en otra de mayor alcance explicativo. De aquí que se recurra a la probabilidad y a la confirmación. Por este recurso, para hacer firme una reducción ha de valerse de otras reducciones sucesivas o progresivas y de la experiencia para aproximarse fiablemente a un valor lógico de verdad.

Para Henri Poincaré, el método científico no da certeza, sino probabilidad, aunque, eso sí, alta probabilidad. De este modo el método inductivo gira en torno a la predicción desde la probabilidad. A mayor probabilidad, predicción más posible y segura.

El método inductivo concluye en la enunciación de una ley científica, que toma la forma de proposiciones o enunciados. Estas proposiciones son verificables, es decir, son transmisibles para otros hombres, o lo que es lo mismo, que las pruebas empíricas pueden ser repetidas.

La observación como tal es un hecho psicológico; está sometida a las limitaciones de los procesos psíquicos. Esto pone en cuestión la suposición de "neutralidad científica". Fue Werner Heisenberg quien en su "Principio de indeterminación cuántica" formuló desde los nuevos hallazgos de la Física cuántica el fin de la neutralidad científica al afirmar que: "El método ya no puede separarse de su objeto" o "En nuestros experimentos, tarde o temprano nos encontramos a nosotros mismos". Ya la Escolástica decía: "Todo conocimiento se obtiene *per modum cognoscentis*, es decir, según las facultades cognitivas del estudioso.

Diversas son las variables que influyen en la observación científica:

- Los motivos de la persona que investiga, así no tendrá un mismo signo el mismo grado de significación para un creyente que para un ateo. Fritz Schumacher afirma que: "El nivel de significación al que el observador o investigador trata de adaptarse, es elegido, no por su inteligencia, sino por su fe."

- Las actitudes, pasivas o activas, de resistencia; que se basan en orientaciones o "coloración" de la percepción y en las respuestas que le siguen frente a ciertos objetos y valores. Hoy se sabe que las actitudes de cada persona son muy resistentes al cambio, de ahí su incidencia en el hecho de la observación.

- La propia personalidad e historia individual del investigador.

- Influencias y condiciones culturales y sociales: mentalidad predominante en cada época, prejuicios, grandes paradigmas en vigor, valores en boga, condicionamientos políticos, etc.

- La preparación científica, cultural y filosófica; unida a la capacidad y penetración intelectuales del investigador.

Si consideramos a la Ciencia como sistema de enunciados y no de conceptos, como más aceptación tiene hoy día, surge del carácter de la ciencia experimental, esencialmente intuitiva, la problemática de la verificación de sus enunciados.

Las proposiciones o enunciados son verificables, es decir, transmisibles, o lo que es lo mismo, son repetibles. Este hecho de poder replicar o repetir investigaciones es en lo que se basa la actual exigencia científica; que ha de ajustarse a: 1° verificabilidad-falsabilidad, 2° carácter metódico de las prácticas, 3° objetividad y 4° actitud crítica.

Según Karl Popper: " Es fácil obtener confirmaciones o verificaciones prácticamente para cualquier teoría, si lo que buscamos son sólo confirmaciones". Y es que el criterio de verificación empírica muestra una insuficiencia tal que siempre se puede "encontrar" hechos que parecen confirmar una afirmación. Y en los casos que de entrada la observación no confirme basta una reinterpretación a posteriori para que se vaya más allá de las evidencias primeras.

Por esta razón Karl Popper propuso el criterio de falsabilidad o de refutabilidad, una teoría científica permite la deducción de consecuencias observables que presentan un riesgo. El investigador enuncia por adelantado cuáles son los hechos que pueden confirmar su hipótesis. En las "pseudociencias" los enunciados están siempre confirmados. No se pueden someter a ninguna prueba, son irrefutables. Una ciencia es más plausible cuanto más fácilmente salva las pruebas de falsación o contrastación.

Wilhelm Dilthey distinguió entre Ciencias del Espíritu y Ciencias de la Naturaleza, en las primeras el elemento de trabajo sería lo histórico y en las segundas la constancia de las leyes naturales, que se ratifican en el tiempo por su repetibilidad sistemática.

Teniendo en cuenta esta distinción podemos fijarnos en otro dualismo basado en la instrucción y en la descripción, que corre paralelo a la de Dilthey. Esto nos lleva a la división en Ciencias Descriptivas, Ciencias Instructivas y Ciencias de carácter mixto, que reúnen instrucción y descripción.

Una descripción fiel obedece a la pregunta: ¿Qué es lo que realmente encuentro? Lo ideal de toda descripción es no dejar nada relevante fuera.

Una instrucción eficaz obedece, en cambio, a la pregunta: ¿Qué debo hacer para obtener un resultado seguro? La instrucción es más fecunda cuanto

más rigurosamente se excluya lo innecesario y lo subjetivo. Las instrucciones, para que sean eficaces, deben ser precisas, claras y que no lleven a la duda o discusión (esto llevó a muchos a llamar impropriamente a estas Ciencias "de exactas" por su cuantificación inherente).

La primera conclusión es que ninguno de estos tres tipos de Ciencias se basan en meras acumulaciones de hechos tal y como la Naturaleza los muestra. En cualquiera de ellas, los hechos son "purificados" e "idealizados" en la formación de conceptos y modelos teóricos.

La afirmación de que la Ciencia prueba, y que, por tanto, la verdad de ese conocimiento es inquebrantable hay que ponerla en cuestión. Una receta o cualquier tipo de instrucción es fácil de probar, con tal de que del resultado apetecido, en caso contrario, es rechazada (pragmatismo).

Debido al "éxito" de la Física, a finales del siglo XIX, las demás Ciencias quisieron hacer suyo el método de esta, modelo de Ciencias instructivas. Pero cuando los requisitos metodológicos de las Ciencias Instructivas son tomados por las Ciencias Descriptivas resulta que son incompatibles con una descripción auténtica.

Bajo este punto de vista, se considera que una afirmación es falsa, no porque parezca incompatible con la experiencia, sino porque no sirve de guía en la investigación; a la inversa, se considera que una teoría es verdadera, por improbable que sea en su conjunto, simplemente porque posee un "valor heurístico superior". Por esta razón Karl Stern llega a decir que: "Los métodos se convierten en mentalidades". Esto nos lleva a una conclusión importante: "que cuanto más comprensible sea una teoría, mayor es la fe que se necesita para aceptarla"; cumpliéndose aquí la genial enunciación de la complementariedad entre fe y razón, propuesta por San Agustín.

Por esta razón, la crisis surge en las Ciencias Descriptivas, donde dependiendo del criterio de los científicos, unos ven inteligencia o significado en lo que describen y otros no ven más que azar y necesidad; y es que no pueden observar más que lo que captan con los sentidos, pero nunca: significado y propósito, inteligencia o causalidad, libertad o necesidad. Sólo se encuentra signos y para interpretarlos hay que elegir un nivel de significación, lo que es ya un acto de fe.