

14/8.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



**CONTENIDO Y SINTESIS DE COLAGENA DE PULMON
NORMAL DE RATA Y DESPUÉS DE LA INTOXICA-
CION AGUDA CON PARAQUAT - OXIGENO.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:

CARLOS RAMOS ABRAHAM

MEXICO, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Págs.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	22
MATERIALES	24
METODOS	25
RESULTADOS	38
DISCUSION	67
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFIA	79

I N T R O D U C C I O N

COMPOSICION DE LOS TEJIDOS CONJUNTIVOS.

Los tejidos conjuntivos proporcionan la matriz de soporte para cada órgano del cuerpo y están constituidos por una población particular de células rodeadas de fibras y sustancia basal amorfa. Las células se derivan del mesénquima y su función fundamental es sintetizar y secretar las proteínas fibrosas y los proteoglicanos (proteínas unidas covalentemente a polisacáridos). Las células son específicas para cada tejido y además responsables de la síntesis y secreción de las proteínas de estos tejidos. Entre ellas podemos mencionar: los condroblastos, osteoblastos, odontoblastos, fibroblastos y células reticulares. Las fibras las constituyen las proteínas colágena y elastina, las cuales se rodean de proteoglicanos, que constituyen la sustancia basal amorfa.

La colágena es la proteína estructural más abundante de los tejidos conjuntivos de: piel, hueso, tendón, etc. y por lo tanto del cuerpo. Representa alrededor del 30% de las proteínas corporales en peso seco y en algunos tejidos llega a constituir más del 50%

molécula (considerando 1000 residuos de aminoácidos por cadena α), siendo su presencia crucial para la formación de la triple hélice, ya que su radical R es un átomo de hidrógeno. Además, la triple hélice es estabilizada por los residuos de hidroxiprolina, que son alrededor del 10% de los residuos y se localizan preferencialmente en la posición Y. La prolina constituye aproximadamente otro 10% de los residuos totales y se encuentra en la posición X, siendo la suma de ambos iminoácidos entre el 20 y 25% de los residuos totales de aminoácidos en las cadenas α . También puede existir la hidroxilisina en la posición Y, la cual se glicosila en ciertas regiones de la cadena. En otros casos mediante reacciones específicas de deaminación oxidativa, da origen a uniones covalentes entre las moléculas de colágena por medio de reacciones de condensación aldólica.

En cada giro de la α hélice están comprendidos tres residuos de aminoácidos (5, 6), lo que permite a la 4-hidroxiprolina (derivado de prolina) formar puentes de hidrógenos con el agua lo que facilita la estabilización de la triple hélice a la temperatura corporal (1, 2).

BIOSINTESIS DE LA COLAGENA.

La complejidad de la unidad funcional en una matriz de tejido conjuntivo explica la dificultad que existe para entender la biogénesis de los elementos estructurales que constituyen dichos tejidos, debido principalmente a que cada una de sus macromoléculas es en sí el producto de una serie de reacciones biosintéticas. Las características de un tejido conjuntivo en particular, están determinadas no solamente por la naturaleza de sus componentes macromoleculares, sino también por la distribución relativa de ellos en la unidad funcional. También es necesario considerar como un factor importante, la forma en que las macromoléculas se organizan y se orientan físicamente dentro de la matriz. Estas observaciones explican la importancia del estudio de la biosíntesis de colágena y sus mecanismos regulatorios, ya que como se mencionó anteriormente esta proteína es el componente más abundante de los tejidos conjuntivos.

La colágena es una de las proteínas que sufren un mayor número de modificaciones postraduccionales. La síntesis de colágena se puede dividir en dos estadios: a) eventos intracelulares requeridos para ensamblar y secretar las moléculas de procolágena y b) eventos extracelulares.

lulares que convierten a la molécula de procolágena en colágena y la incorporan en una fibrilla por medio de uniones covalentes. La molécula de colágena es sintetizada inicialmente como un precursor llamado procolágena, formada por asociaciones de tres cadenas pro- α . Una vez que los ARN's mensajeros de procolágena se transcriben (Fig. 1.a.), son transportados al citoplasma y posteriormente se integran a los polisomas que se unen a las membranas del retículo endoplásmico rugoso (RER) (7) (Fig. 1.b.), cada cadena pro- α se sintetiza independientemente y contiene una región colagénica (Gli-X-Y)₃₃₄ así como extensiones peptídicas en las regiones amino y carboxilo terminales. Cada molécula de pro- α tiene un peso molecular aproximado de 150,000 daltones correspondiendo 20,000 daltones a la extensión amino terminal y 30,000 daltones a la del carboxilo terminal (Fig. 1.c.). Estudios recientes han demostrado la presencia de 100 residuos de aminoácidos adicionales en la región del amino terminal, los cuales contienen una secuencia de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos hidrofóbicos, la cual dirige el movimiento de la cadena nascente de pro- α a través del retículo endoplásmico rugoso (8, 9). Este segmento es separado por una endopeptidasa específica. Una vez que empieza a pasar la cadena pro- α a las cisternas del RER se inician -

las modificaciones postraduccionales que se describen a continuación: primero se hidroxilan ciertos residuos de prolina y lisina (Fig. 1.d.), posteriormente se glicosilan algunos residuos de hidroxilisina en la región colágena, a los que se le adiciona galactosa y después glucosa formando glucosilgalactosil hidroxilisil, posteriormente se glicosilan el péptido carboxilo terminal (Fig. 1.e.) y se forman puentes disulfuro inter o intracadena entre las tres regiones carboxilo terminales y exclusivamente intracadena en las regiones amino terminales (Fig. 1.f.). Por ensamble específico de tres cadenas pro- α se forma la triple hélice de procolágena, que pesa aproximadamente 450,000 daltones (Fig. 1.g.). Esta molécula pasa al aparato de Golgi en donde se empaqueta en las vesículas secretoras y finalmente se exporta de la célula (Fig. 1.h.). En el ámbito extracelular la molécula de procolágena se transforma en colágena por la pérdida de ciertas regiones carboxilo y amino terminales mediante enzimas específicas (Fig. 1.i.). Las moléculas de colágena resultantes quedan con un peso molecular aproximado de 300,000 daltones. Estas se unen covalentemente entre sí formando fibras específicas para cada tipo de colágena durante la fibrilogenesis. Con este fin la enzima lisil oxidasa cataliza una desaminación oxidativa de grupos ϵ -amino de ciertos resi-

duos de lisina o hidroxilisina, produciendo aldehídos reactivos que por condensación aldólica forman dos tipos de unión covalente: intramolecular e intermolecular. Además existe otro tipo de enlace intermolecular cuando se forma una base de Schiff por reacción entre un aldehído de una cadena y un grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de otra cadena adyacente (Fig. 1.j.).

FUNCIONES DE LA COLAGENA.

Entre las diferentes funciones adscritas a la colágena podemos mencionar las siguientes:

A. Estructura o de soporte:

- a) La principal función es proporcionar la fuerza de tensión para mantener los tejidos como una unidad funcional, lo cual es dado por: uniones covalentes inter o intramoleculares, fuerzas de fricción entre fibrillas y la interacción física y/o química de colágena con otros componentes tisulares.
- b) Las fibrillas y fibras se organizan de tal forma que permiten a los tejidos un cierto grado de extensibilidad.

- c) Limita el movimiento de otros componentes -
tisulares (10).
- d) En el hueso forma un sustrato adecuado para
el depósito de cristales de hidroxapatita,
durante el desarrollo y regeneración del te
jido óseo (11).

B. Funciones específicas:

- e) El papel que desempeña en la diferenciación
celular de los tejidos. Por ejemplo, el de
sarrollo de la columna vertebral es inicia
do por colágena tipo II y proteoglicanos -
que son sintetizados por la notocorda (12).
- f) Promueve la diferenciación condrogénica y -
de mioblastos en el músculo en desarrollo -
(12, 13).
- g) Interviene en una gran variedad de procesos
patológicos tales como la regeneración y re
paración del hígado y del pulmón en el esta
do fibrótico (14, 15).

- h) Su papel en el desarrollo embrionario del pulmón (31).
- i) Las fibras de colágena son el sitio de adhesión para las plaquetas (16).
- j) La colágena promueve el proceso de coagulación, mediante la activación del factor de Hageman (factor XII) (22).
- k) La colágena soluble es un factor quimiotáctico fuerte para los neutrófilos (17).

Las observaciones anteriores demuestran la importancia de la colágena en la fisiología y anatomía normal de los tejidos, así como su implicación en la fisiopatología de éstos, de la que un aspecto importante es el relacionado con la fibrosis pulmonar difusa.

ORGANIZACION HISTOLOGICA DEL PULMON.

Los pulmones son órganos que están situados a cada lado de la cavidad torácica, la cual ocupan casi por completo. Están separados uno de otro por el corazón y -

órganos del mediastino (tráquea, esófago y vasos sanguíneos de grueso calibre). Son órganos blandos, esponjosos, flexibles, distensibles y comprensibles, tienen forma de cono irregular, con un vértice superior que llega a la primer costilla y una base que se apoya en el diafragma. El pulmón derecho es mayor que el izquierdo y está dividido por dos cisuras en tres lóbulos desiguales, mientras que el izquierdo sólo tiene dos lóbulos. Morfológicamente el pulmón puede ser dividido en zonas parenquimatosas (alveolos, conductos alveolares y capilares sanguíneos) y zonas no parenquimatosas (árbol bronquial, vasos sanguíneos, tejido peribronquial, perivascular y pleura que envuelve al pulmón). En la figura 7 se muestra el patrón histológico del pulmón de la rata normal. Se ha calculado que las superficies alveolares tienen una extensión de aproximadamente 70 m² en el humano adulto. La principal función del pulmón es la de permitir la difusión de oxígeno del medio externo a la sangre, y de bióxido de carbono en sentido inverso.

Se han identificado aproximadamente 40 tipos celulares distintos (18, 19) y un tejido conjuntivo complejo, las principales células del parénquima pulmonar son los neumocitos tipo I y tipo II, las células endoteliales

y mesenquimatosas (fibroblastos y macrófagos), observándose otros tipos celulares en zonas no parenquimatosas.

El tejido conjuntivo está construido por colágena de los tipos I y III en el parénquima, así como en zonas no parenquimatosas, y colágena tipo IV en las membranas basales. Los proteoglicanos se arreglan alrededor de la colágena formando capas delgadas y la elastina se une específicamente a la colágena (10). Es importante hacer notar que los elementos mencionados varían en sus proporciones relativas y en su arreglo espacial, que permite la realización de la actividad mecánica del pulmón durante la inspiración y la espiración. En estos mecanismos respiratorios la elastina contribuye a la extensibilidad del tejido y los surfactantes alveolares facilitan la difusión de gases a través del epitelio alveolar, mientras que la colágena limita la distensibilidad del tejido.

FIBROSIS PULMONAR DIFUSA.

La fibrosis pulmonar es una enfermedad crónica progresiva y habitualmente mortal en un plazo relativamente corto en animales y en el hombre (20). En 1933 Hamman y Rich (21) describieron los rasgos clínicos y morfológicos de cuatro pacientes con fibrosis pulmonar difusa de

causa desconocida y que fallecieron en menos de un año después de la aparición de los síntomas respiratorios. Desde entonces se han reportado un número cada vez mayor de pacientes con este padecimiento. Aún cuando el número de agentes conocidos que son capaces de provocar este padecimiento ya sea por inhalación o sistémicamente aumenta progresiva y dramáticamente (19) (Tabla 2). De los casos reportados en la literatura, en un 30% se desconoce la causa (fibrosis pulmonar idiopática).

Independientemente de su etiología, la fibrosis pulmonar difusa se caracteriza por inflamación crónica de las porciones distales del parénquima pulmonar y desarreglo difuso y complejo de la colágena intersticial, con destrucción progresiva de la arquitectura alveolar hasta que los pulmones no pueden desarrollar adecuadamente su función y el paciente muere (19,23-25).

Los principales hallazgos morfológicos descritos en la fibrosis pulmonar consisten en: inflamación intersticial heterogénea, presencia de macrófagos, fibroblastos y neumocitos tipo II en los espacios alveolares y un aumento irregular del tejido fibroso, principalmente colágena, como se demuestra por tinciones espe

ciales (tricrómica de Gomori y Mallory-Hanzer) (23). Este depósito anormal de tejido conjuntivo distorsiona la arquitectura alveolar del pulmón, comprometiendo su función de intercambio gaseoso. Desde el punto de vista bioquímico la fibrosis pulmonar se caracteriza por un aumento en el contenido total de colágena (23-25), dado por un incremento de colágena tipo I, lo que hace que el tejido sea menos distensible y acepte menor volumen de gases.

FIBROSIS PULMONAR EXPERIMENTAL CON PARAQUAT Y OXIGENO.

Un buen modelo de fibrosis pulmonar es aquel que reproduzca los hallazgos morfológicos y bioquímicos mencionados anteriormente. A pesar de que han sido diseñados numerosos modelos en animales sometidos a diferentes agresores (Tabla 2) con el fin de producir fibrosis pulmonar experimental, ninguno de ellos ha demostrado ser satisfactorio en cuanto a su sencillez, reproducibilidad y semejanza con la fibrosis pulmonar humana. El paraquat y el oxígeno se han utilizado como agresores para producir un modelo de fibrosis pulmonar y son útiles desde el punto de vista de conocer los mecanismos iniciales que desencadenan la enfermedad. El paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-diclorobipiridilium) es un her-

bicida de amplio uso en el área de la agricultura y su ingestión accidental ha provocado numerosos muertes, generalmente por daño pulmonar agudo o bien por fibrosis pulmonar (26-30). El paraquat es absorbido selectivamente por el pulmón y esta absorción depende de energía metabólica. Se ha observado que las células epiteliales, neumocitos tipo I y tipo II lo absorben inicialmente. El pulmón de rata y el del humano acumulan paraquat en un mismo rango de concentración (31-33). El tiempo medio de eliminación de este herbicida administrado por vía intravenenosa es de 20 horas (34,35). La acumulación selectiva y el daño pulmonar han sido verificados en diferentes experimentos y utilizando vías distintas de administración (26-35). Los estudios indican que la dosis más utilizada es de 24-25 mg/Kg de peso (LD_{50}).

Los cambios pulmonares patológicos inducidos por paraquat son más bien agudos y consisten principalmente en: edema, hemorragia alveolar, infiltración celular inflamatoria (que causa obliteración de los alveolos), congestión capilar, atelectasia y una tasa alta de mortalidad debido a insuficiencia respiratoria (36). Además, se producen alteraciones en diferentes vías metabólicas como son: una mayor incorporación de H^3 -timidina

en el ADN (37-38), la estimulación de la vfa colateral - de las pentosas fosfatadas con oxidación de NADPH (39,40), un incremento de biosíntesis de colágena (15,20), y se observa un aumento de la actividad de transglutaminasas que correlacionan con una actividad aumentada de hidroxilasa de prolina (38) y un incremento del contenido de colágena (15,20).

La toxicidad del paraquat, tanto en plantas como en animales se ha asociado con la habilidad de este compuesto para aceptar electrones de moléculas como flavoproteínas y clorofila, con la formación de radicales libres y la transferencia de estos electrones al oxígeno molecular, produciendo un radical superóxido O_2^- (35,39-40). Este radical produce además de otras reacciones: una peroxidación de lípidos, oxidación de enzimas (alterando vías metabólicas normales) y una unión covalente anormal de proteínas membranales (41,42).

Por otro lado, el radical superóxido desempeña un papel importante en el mecanismo de la toxicidad producida por oxígeno, la cual eventualmente puede producir fibrosis pulmonar. Los hallazgos patológicos en animales de laboratorio y en humanos sometidos a concentraciones

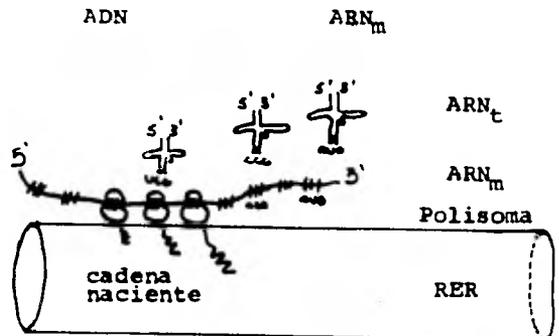
nes de aproximadamente 80% de saturación de oxígeno son variables e inespecíficos, consistiendo principalmente - en: atelectasia, edema, hemorragia alveolar, inflamación y depósito de fibrina (43,44). Por lo anterior se infiere que la lesión pulmonar producida por paraquat sigue - el mismo mecanismo que la intoxicación producida por oxígeno. Esto significa que el oxígeno acelera y agrava - los cambios pulmonares inducidos por el paraquat y plantea problemas de tratamiento en pacientes intoxicados - con paraquat (44).

FIGURA 1

Síntesis, procesamiento, secreción, depósito y estabilización de la colágena.

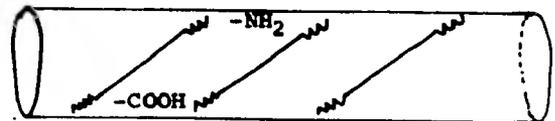
EVENTOS INTRACELULARES.

- a) Transcripción de cada tipo de ARN mensajero de las cadenas de pro- α .



- b) Traducción de los ARNm.

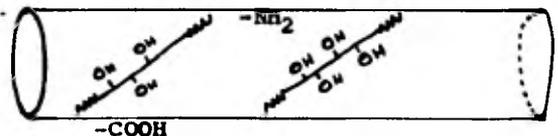
- c) Termina traducción y paso a través de las membranas del RER.



- d) Hidroxilación de prolina y lisina en la cadena.

Requiere:

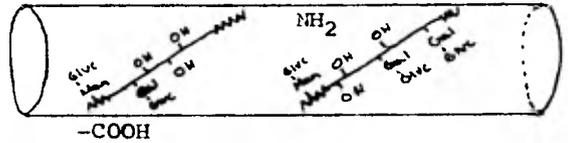
hidroxilasas de prolina y -
lisina, α -cetoglutarato, Fe²⁺
ascorbato y O₂.



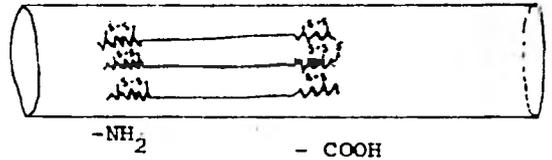
- e) Glicosilación de la cadena pro- α

Requiere:

galactosil y glucosil transferasas, Mg^{2+} , azúcares-UDP, residuos de hidroxilisina - Glicosilación del carboxilo terminal.



- f) Formación de puentes disulfuro.



- g) Formación de la triple hélice.

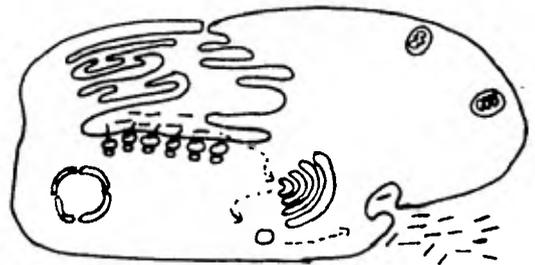
Requiere: ATP



NH_2

- COOH

- h) Secreción de la procolágena - Requiere: ATP y sistema de microtúbulos



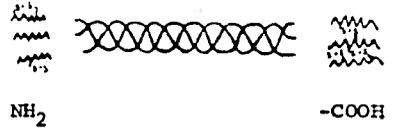
Moléculas de Procolágena.

EVENTOS EXTRACELULARES

- i) Transformación de procolágena en colágena.

Requiere:

peptidasa de amino terminal y peptidasa de carboxilo terminal.



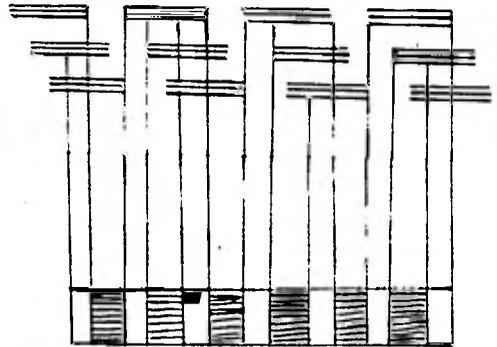
- j) Fibrilogénesis, formación de enlaces covalentes entre las moléculas de colágena.

Requiere:

lisil oxidasa

Cu²⁺

O₂



Fibra de Colágena.


Molécula
de
Colágena.

TABLA 1

TIPOS DE COLAGENA EN MAMIFEROS, CARACTERISTICAS Y DISTRIBUCION.

TIPO	CADENAS POLIPEPTIDICAS	PM APARENTE (daltones)	FORMULA MOLECULAR	CARACTERISTICAS	DISTRIBUCION EN TEJIDOS
I	$\alpha 1(I)$	95,000	$[\alpha 1(I)]_2^{\alpha 2}$	Baja en hidroxilisina e hidroxilisina glicosilada.	Todos los tejidos con <u>juntivos.</u>
	$\alpha 2$	95,000			
I trif- mero	$\alpha 1(I)$	95,000	$[\alpha 1(I)]_3$	Similar a tipo I.	Tendón, den- tina, piel, tumores....
II	$\alpha 1(II)$	95,000	$[\alpha 1(II)]_3$	Relativamente alta en hidroxilisina e hidroxilisina glicosilada.	Cartilago, membranas de Bowman.
III	$\alpha 1(III)$	95,000	$[\alpha 1(III)]_3$	Alta en hidroxiprolina y baja en hidroxilisina, con uniones disulfuro intercadena.	Parénquima pulmonar, útero, músculo cardiaco, hígado. piel.
IV	$\alpha 1(IV)$	140,000	$[\text{pro-}\alpha 1(IV)]_3$	Alta en hidroxilisina glicosilada, con regiones globulares. Con tiene 3-hidroxiprolina.	Membranas basales, alveolos pulmonares.
V	αA	104,000	$[\alpha A]_3$ $[\alpha B]_3$ $\alpha A \alpha B$	Similar a tipo IV.	Membranas basales, pulmón, placenta.
	αB	99,000			

TABLA 2

ETIOLOGIA DE LA FIBROSIS PULMONAR DIFUSA

1. De causa desconocida.
Fibrosis pulmonar idiopática.
2. De causa conocida.
 - a) Inhalación de polvos inorgánicos: sílice, asbesto, etc.
 - b) Inhalación de polvos orgánicos:
Proteínas aviarias (palomas, patos, gallinas, etc.)
Microorganismos (Termoactinomyces vulgaris, Termoactinomyces sacharii, Microspolispora faenii, etc.)
 - c) Drogas.
Antineoplásicas: busulfán, bleomicina, ciclofosfamida, metotrexate, etc.
Antibióticos: nitrofurantofinas, sulfonamidas.
difenilhidantofinas, propranolol, hexametonio.
 - d) Gases, humos, vapores y aerosoles.
Gases: oxígeno, dióxido de azufre.
Humos: óxido de zinc, cobre, cadmio, fierro y magnesio.
Vapores: mercurio, diisocianato de tolueno.
Aerosoles: grasas, piretro.
 - e) Radiaciones: rayos X.
 - f) Herbicidas: paraquat.
 - g) Asociada a enfermedades colágeno-vasculares:
Lupus eritematoso sistémico.
Artritis reumatoide.
Esclerosis sistemática progresiva.
Dermatomiositis.

O B J E T I V O S

Diversos estudios han demostrado que la intoxicación pulmonar producida por varios agentes (Tabla 2) - puede conducir al desarrollo de la fibrosis pulmonar difusa (19). Se ha postulado que en la inducción de fibrosis pulmonar por paraquat y/o oxígeno ocurren dos -- eventos: una fase inflamatoria edematosa aguda y una fase reparativa caracterizada por hiper celularidad con depósito excesivo de colágena (37). En varios estudios en los que se reportan cuadros de intoxicación aguda no se observó un aumento en el contenido de colágena y estos - casos se consideran como una fibrosis pulmonar, en la - que ocurre un desarreglo espacial de la colágena y no un incremento en su contenido (36-40).

En el presente trabajo estudiaremos el efecto de la intoxicación pulmonar aguda producida por administración simultánea de paraquat y oxígeno. Se evaluarán diferentes parámetros: fisiológicos, bioquímicos y morfológicos de este modelo experimental y se compararán - con el pulmón de ratas normales.

Se determinará el contenido de proteínas totales, proteínas colagénicas y celularidad (contenido de ADN) con el objeto de conocer si su distribución es homogénea en los distintos lóbulos del pulmón de ratas normales, así como en ratas intoxicadas.

Se evaluarán las capacidades biosintéticas de los tejidos pulmonares en cuanto a proteínas totales y colagénicas en los distintos lóbulos de pulmones de ratas intoxicadas y normales. Lo anterior con el objeto de conocer si antes de que se detecten cambios en el contenido de colágena depositada es posible observar un aumento en su biosíntesis.

También se determinarán las alteraciones morfológicas en la fase aguda de la intoxicación con el objeto de establecer una posible correlación con las alteraciones bioquímicas. La evaluación de los parámetros antes citados es importante, ya que esto nos permitirá entender los mecanismos que intervienen en el desarrollo y establecimiento de la fibrosis pulmonar, utilizando la intoxicación con paraquat y oxígeno como un modelo experimental.

M A T E R I A L E S

Las ratas utilizadas en este trabajo fueron de la cepa Sprague-Dawley, de 7 a 9 semanas de edad y con un peso de 150-220 gr.

El paraquat (1, 1'-dimetil-4,4'-diclorobipiridilium) fue obtenido de Sigma Chemical Corp; el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) de Gibco Laboratories, la estreptomycin y penicilina G sódica - cristalizada de laboratorios Lakeside; el fumarato de β -amino propionitrilo, la L-prolina y la L-hidroxiprolina de Sigma Chemical Corp; el ácido ascórbico de Fisher Scientific Co; la L- 2,3,4,5-³H -Prolina (actividad específica: 139.1 Ci/mmol), fue obtenida de New England Nuclear Corp; los filtros de fibra de vidrio a34AW de Whatman Inc; la cloramina-T, 4-dimetilaminobenzaldehido reactivo de difenilamina, la ninhidrina y la pepsina cristalizada (100 mu/mg) fueron de Merck. Los líquidos de centelleo utilizados fueron: líquido de centelleo de Bray (45) y líquido de centelleo tolueno-PPO. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

M E T O D O S

A 16 ratas se les administró por vía intraperitoneal 5 mg de paraquat/Kg de peso e inmediatamente después fueron introducidas a una cámara que contenía oxígeno normobárico a 72% de saturación. Los animales permanecieron durante cinco días en esta atmósfera y se sacaron únicamente para pesarlas. Al quinto día se les administró una dosis igual de paraquat y se colocaron nuevamente en la cámara con oxígeno durante 24 horas más hasta completar seis días. Después de este periodo, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones.

El grupo control consistió de 16 ratas a las que se les administró solución fisiológica estéril y se mantuvieron a concentración ambiental de oxígeno (21%) durante seis días. Después del sexto día los animales fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones.

OBTENCION DE LOS PULMONES.

Las ratas se anestesiaron con éter para luego hacer un corte longitudinal de la cavidad torácica, que

dejó al descubierto los pulmones. Estos se extrajeron y lavaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (pH 7.4), se separaron los cinco lóbulos de los pulmones y se colocaron en medio de cultivo DMEM. Los lóbulos se fragmentaron con el objeto de tener una muestra representativa de los tejidos para el análisis bioquímico e histológico.

ANALISIS BIOQUIMICO.

OBTENCION DE PESO SECO Y DETERMINACION DE PROLINA E HIDROXIPROLINA EN HIDROLIZADOS ACIDOS DE TEJIDOS PULMONARES.

La cuantificación de prolina e hidroxiprolina se realizó utilizando el método de Rojkind y González (46). La hidroxiprolina se determinó también por el método de Woessner (47).

Se tomaron porciones de aproximadamente 50 mg de tejido, se secaron con papel filtro estéril y se llevaron a peso constante (peso seco). Con este objeto las muestras de los tejidos fueron deshidratadas por incubación a 100°C en una estufa (Thelco) hasta obtener un peso constante. Posteriormente el tejido se hidrolizó con

HCl 6 N dentro de una ampolleta de vidrio sellada al vacío, que se incubó a 100°C durante 20 horas. Después de la incubación el hidrolizado se filtró y se evaporó a se quedad. Finalmente la muestra se resuspendió en 5 ml de agua, se tomaron alícuotas de 0.1 y 0.2 ml y cada alícuota se llevó a un volumen de 2 ml con agua destilada y se le adicionó 1.0 ml de solución de cloramina T (0.704 g de cloramina T, 10 ml de agua destilada, 15 ml de solución amortiguadora de citratos; pH con el fin de oxidar los iminoácidos. Las muestras se agitaron y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Para terminar la reacción se adicionaron 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2 M y posteriormente se agregó 1 ml de NaOH 1 N y 2 g de NaCl y se agitó. La prolina se extrajo por agita ción durante 30 segundos con 3 ml de tolueno y se recupe ró la fase orgánica que contenía la prolina.

Para la extracción de la hidroxiprolina las muestras se calentaron a ebullición durante 30 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se adicionaron 3 ml de tolueno, se agitaron fuertemente durante 30 segundos y se recuperó la fase orgánica que contenía la hidroxiprolina (46).

DETERMINACION COLORIMETRICA DE PROLINA.

A 1 ml de la fase orgánica extraída se le adicionaron 2 ml de agua destilada, 3 ml de ácido acético y 3 ml de solución de ninhidrina (1.25 g de ninhidrina, 30 ml de ácido acético y 20 ml de ácido fosfórico 6 M), los tubos se taparon y se calentaron a ebullición en baño maría durante 60 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se les adicionaron 5 ml de tolueno. Las muestras se agitaron en un vórtex (Curtin Scientific) durante 2 minutos y la capa de tolueno se separó y se determinó su absorbancia a 515 nanómetros (nm) en un fotocolorímetro (Spectronic Co. Bausch-Lomb).

DETERMINACION COLORIMETRICA DE HIDROXIPROLINA.

A 1 ml de tolueno de la segunda extracción se le adicionaron 4 ml de reactivo de Ehrlich (5 g de para-dimetilaminobenzaldehído, 90 ml de etanol absoluto y 10 ml de HCl concentrado) y se agitó inmediata y vigorosamente. Las muestras se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se determinó su absorbancia a 560 nm.

CALCULOS PARA PROLINA.

U.O. X 3 ÷ 0.36 = μ M X 115 = μ g 1000 X $\frac{25}{50}$ ÷ gth = mg Pro/gth
 X % = mg Pro/gts.

U.O. = Unidades ópticas de absorbancia por ml de tolueno.

X 3 Porque la prolina se extrajo en 3 ml de tolueno -
 y sólo se utilizó 1 ml para las determinaciones.

0.36 Porque se elaboró una curva patrón utilizando con
 centraciones de 0.1-0.7 μ M de prolina y se obtuvo
 la ecuación:

$$\mu\text{M} = \frac{\text{U.O.}}{0.36}$$

115 = Peso molecular de la prolina.

1000 Para convertir μ g a mg de prolina.

X 25 y/6 50 Para conocer los mg de prolina en 5 ml depen
 diendo de la alícuota utilizada.

gth = Gramos de tejido húmedo utilizados.

% = Porcentaje de peso seco, es la pérdida de agua de
 los tejidos expresada como porcentaje, la cual se
 determinó y encontró que fue 21.94% para los pulmo
 nes de ratas normales y 16.0% para los pulmones -
 de ratas intoxicadas.

CALCULOS PARA HIDROXIPROLINA.

$$U.O. \times 3 \div 16.7 = \mu M \times 131 = \mu g \times \frac{25}{50} \quad 1000 \times E \div gth = mg$$

$$OH-Pro/gth \times \% = mg \quad OH-Pro/gts \times 7.42 = mg \text{ colágena/gts.}$$

U.O. = Unidades ópticas de absorbancia por 1 ml de tolueno.

X 3 Porque la hidroxiprolina se extrajo en 3 ml de tolueno y sólo se utilizó 1 ml para las determinaciones.

16.7 = Coeficiente de extinción molar para la hidroxiprolina determinado a 560 nm.

131 = Peso molecular de la hidroxiprolina.

X 25 y/6 50 para conocer los μg en 5 ml.

1000 Para convertir μg a mg.

E = Eficiencia de recuperación de una solución patrón de la hidroxiprolina y se obtiene del siguiente modo:

$$\frac{\mu g \text{ recuperados}}{\mu g \text{ alicuotados}} = \% \text{ de recuperación}$$

$$\frac{100}{\% \text{ de recuperación}} = E$$

% = Porcentaje de peso seco, es la pérdida de agua de los tejidos expresada como porcentaje, la cual se determinó y encontró que fue 21.94% para los pulmones de ratas normales y 16.0% para los pulmones de ratas intoxicadas.

7.42 = Factor de conversión de hidroxiprolina a colágena, asumiendo que la hidroxiprolina constituye el 14% de los residuos de aminoácidos de la molécula y se obtiene de la siguiente forma:

$$\begin{array}{l} 1 - 14\% \\ x - 100\% \end{array} \quad x = \frac{100}{14} = 7.42$$

BIOSINTESIS DE PROTEINAS.

La biosíntesis de proteínas se realizó para cada lóbulo pulmonar por duplicado, y se determinó mediante una cinética de incorporación de ^3H -Prolina, según el método para cultivo de órganos (48), incubando los tejidos por 2,4 y 6 horas. Porciones de tejido de aproximadamente 50 mg, se secaron con papel filtro estéril para eliminar el exceso de medio de cultivo, el tejido se colocó en un frasco de vidrio de 20 ml que contenía 4 ml de medio de cultivo DMEM y se fragmentaron lo más posible. Se le adicionaron a cada frasco de vidrio 20 μCi de ^3H -[2,3,4,5]-L-Prolina y 50 mg de β -aminopropionitrilo por ensayo y con el fin de evitar la formación de enlaces covalentes intra e intermoleculares de colágena durante la biosíntesis, también se agregaron 50 mg de ácido ascórbico que es un cofactor de la hidroxilasa de prolina, además de 100 unidades de penicilina y 100 μg de

estreptomycin con el fin de evitar la contaminación por bacterias. Los frascos se taparon flojamente y se colocaron en un agitador (WEDCO, Silver Spring Maryland U.S.A.) que se ajustó a una velocidad de 100 rpm. Las muestras se colocaron dentro de un incubador (WEDCO mod. -- 2-17 M de Silver Spring Maryland U.S.A.) con una atmósfera de aire-CO₂ (95% - 5%) y se incubaron a 37°C por 2,4 y 6 horas. La reacción se terminó por enfriamiento de las muestras en hielo.

A cada frasco de vidrio se le adicionaron 2 ml de ácido acético 1.5 N (Concentración final 0.5 N) y las muestras se homogeneizaron utilizando un polytron (BRINKMANN Instruments Inc. Westbury N.Y.). De este homogenado se tomaron alícuotas apropiadas para determinar la incorporación del isótopo a proteínas totales, para medir el porcentaje de incorporación del isótopo en colágena y también se tomaron alícuotas para la cuantificación de ADN.

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES MARCADAS CON ³H-PROLINA.

La cuantificación del isótopo incorporado en proteínas totales, se determinó por la cantidad de radiactividad susceptible a la precipitación con ácido tricloro-

roacético (TCA). Una alícuota de 0.2 ml de cada muestra se llevó a 1 ml con agua destilada, se le adicionaron - 0.5 ml de solución decolorante (25 ml de NaOH 10 M, 15 ml de H₂O₂ 30%, 250 mg de L-prolina y se aforó a 250 ml con agua destilada) y 1 ml de TCA al 25%. Las muestras se incubaron a 4°C durante 30 minutos y se filtraron por vacío a través de filtros de fibra de vidrio. Los filtros se colocaron en frascos de plástico y se les adicionaron 10 ml de líquido de centelleo de Bray. La radiactividad se determinó utilizando un espectrofotómetro de centelleo líquido (Packard). Todas las determinaciones se hicieron por duplicado).

CALCULOS.

$$(\text{cpm}/0.02 \text{ ml}) \times 30 = \text{cpm}/6 \text{ ml} \times E = (\text{dpm}/6 \text{ ml}) \div \text{gth} = \text{dpm}/\text{gth}.$$

cpm = Cuentas por minuto.

X 30 Para conocer las cpm en 6 ml.

E = Eficiencia del espectrofotómetro del centelleo líquido. Se obtuvo usando una solución estándar del tritio (³H), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{cpm}}{\text{dpm del estándar}} = x \quad ; \text{ después: } \frac{100}{x} = E$$

con el estándar que se utilizó en estos experimentos

$$E = 15.05\%.$$

dpm = Desintegraciones por minuto.

gth = Gramos de tejido húmero utilizados en la biosíntesis.

La biosíntesis se expresa como dpm incorporadas/gth.

DETERMINACION DE LA COLAGENA RADIATIVA.

Esta determinación se realizó por el método de digestión con pepsina ya que la colágena no es susceptible a degradación por esta enzima. A una alícuota del homogenado que estaba en ácido acético 0.5N se le adicionó pepsina a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó a 4°C durante 72 horas. Posteriormente las muestras se homogeneizaron brevemente con el polytron y se determinó el porcentaje de colágena por precipitación con TCA como se describió anteriormente. Los cálculos fueron los mismos que para proteínas totales.

DETERMINACION DE ADN.

La determinación de ADN se realizó según el método de difenilamina de Burton (49). Se tomó una alícuota de 0.4 ml de cada una de las muestras sometidas a digestión con pepsina y se le adicionó 0.1 ml de ácido perclórico 2.5 N. El ADN se hidrolizó por incubación a 60°C durante 90 minutos y la reacción de la desoxiribosa

con difenilamida se desarrolló por adición de 1 ml de -- reactivo de difenilamina que se preparó del siguiente modo:

Reactivo A:

1.5 g de difenilamina.

100 ml de ácido acético.

1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Reactivo B:

16 mg/ml de acetaldehído en agua.

Se hizo una solución que contenía 20 ml del reactivo A + 0.1 ml del reactivo B.

Las muestras se incubaron en baño maría a 30°C durante 16-20 horas y posteriormente se determinó la absorbancia a 600 nm. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

CALCULOS.

Se elaboró una curva patrón de absorbancia contra μg de ADN de esperma de salmón, utilizando concentraciones de 10-100 μg se obtuvo una línea recta con una pendiente $m = 0.01847$.

Utilizando la ecuación:

$$y = m x + b \quad ; \quad b = 0$$

$$U.O. = 0.01847 \text{ (}\mu\text{g ADN)}$$

Despejando $\mu\text{g DNA}$:

$$\mu\text{g ADN} = \frac{U.O.}{0.01847}$$

$$U.O. \quad 0.01847 \times 15 = \mu\text{g}/6 \text{ ml} \times 1000 = \text{mg ADN}/6 \text{ ml} \quad -$$

$$\text{gth} = \text{mg ADN} / \text{gth.} \quad (\text{mg DNA/GTH}) \quad \%$$

gth = Gramos de tejido húmedo utilizados para la biosin_tesis.

% Porcentaje de peso seco, para conocer los mg de ADN por gramo de tejido seco, considerando 21.94% para los pulmones normales y 16.0% para los pulmones de ratas intoxicadas.

ANALISIS MORFOLOGICO:

Para este estudio se tomaron fragmentos de cada uno de los lóbulos de pulmones tanto de ratas intoxicadas como de ratas normales. Los tejidos se fijaron en solución de formaldehído al 5% amortiguada con fosfatos (pH 7.4) y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes semifinos (6 μm) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) de acuerdo con las técnicas convencionales.

ANALISIS ESTADISTICO.

La comparación de los resultados obtenidos en los distintos parámetros evaluados en las ratas intoxicadas y normales se realizó por análisis estadístico, utilizando la prueba de t de Student y con una significancia de $p < 0.005$.

R E S U L T A D O S

1. FISIOLÓGICOS.

Las ratas del grupo experimental (sometidas a paraquat-oxígeno) presentaron signos fisiológicos de insuficiencia respiratoria, caracterizados por bradipnea y tiros intercostales desde las 12 horas posteriores a la administración de la primera dosis. Estos síntomas se fueron haciendo cada vez más graves y entre las 24 y 48 horas se observó en algunas ratas aleteo nasal y cianosis, conjuntamente con una depresión intensa en el 90% de las ratas, que se alternaba con excitación sicomotriz frente a los estímulos físicos. Se observó un 50% de mortalidad alrededor de las 48 horas y las ratas que sobrevivieron mostraron cierta estabilización de los signos respiratorios, junto con una notoria disminución en la ingestión de alimentos. Lo anterior dió como resultado una disminución en el peso corporal que osciló entre 20 y 60 g cuando se comparó con el peso de las ratas del grupo control. Las ratas que sobrevivieron después de seis días de tratamiento se encontraban en su mayoría en un estado preagónico al momento de ser sacrificadas (datos que concuerdan con el trabajo de Montaña, R.M.) (51).

Las ratas del grupo control no mostraron ninguna de las manifestaciones clínicas descritas para las ratas del grupo experimental.

2. BIOQUIMICOS.

A. CONTENIDO DE COLAGENA, PROTEINAS TOTALES Y ADN.

En contenido promedio de colágena referido a gramo de tejido seco en los distintos lóbulos del pulmón de ratas normales fue de $\bar{X} = 65.05 \pm 1.13$ mg/gts y en los lóbulos de pulmones de ratas intoxicadas con paraquat oxígeno fue de $\bar{X} = 62.9 \pm 7.85$ mg/gts, aún cuando la desviación estándar fue mayor en las ratas intoxicadas no se encontró una diferencia significativa en estos valores. La relación de proteínas totales (índice dado por contenido de prolina) contra colágena (índice dado por contenido de hidroxiprolina), expresado como mg de prolina/mg de hidroxiprolina, en los lóbulos de pulmones de ratas del grupo control fue de 3:1 mientras que en los del grupo experimental fue de 30:1, lo anterior puede interpretarse como un incremento de 10 veces en el contenido de proteínas totales respecto a la concentración de colágena. Existe también la posibilidad de que la hidroxilación de prolina haya sido baja en las ratas intoxicadas. La observación de este contenido aumentado en proteínas totales se corroboró posteriormente con los hallazgos histológicos.

Cuando se evaluó el contenido de colágena por gramo de tejido húmedo si se encontraron diferencias, ya que el valor obtenido para el grupo control fue de $\bar{X} = 10.98 \pm 0.45$ mg/gth. (tabla I) y el del grupo experimental fue de $\bar{X} = 7.72 \pm 0.436$ mg/gth. (tabla II). Esta diferencia se debe a que los porcentajes de peso seco fueron de 21.94% en las ratas normales y 16.0% en las ratas intoxicadas.

El contenido de ADN (índice de celularidad) en los lóbulos de los pulmones de ratas del grupo control fue de $\bar{X} = 5.28 \pm 0.433$ mg/gth (tabla I) y de $\bar{X} = 4.676 \pm 0.632$ mg/gth para los lóbulos de ratas del grupo experimental (tabla II). No se encontró una diferencia significativa al comparar estos valores.

Cuando se compararon los valores obtenidos para colágena y ADN (mg de colágena/mg de ADN) por gramo de tejido húmedo, se obtuvo en el caso del grupo control un valor de $\bar{X} = 2.096 \pm 0.141$ (tabla I), mientras que para el grupo experimental el valor fue de $\bar{X} = 1.68 \pm 0.249$ (tabla II). La comparación de estos valores indicó una disminución del 20% en la relación colágena/DNA para los lóbulos del grupo experimental respecto al grupo control.

B. BIOSINTESIS DE COLAGENA Y PROTEINAS TOTALES.

La biosíntesis de proteínas se realizó utilizando el método para cultivo de órganos (48) y la capacidad biosintética de los tejidos, se evaluó por incorporación de ^3H -Prolina en proteínas totales determinada por precipitación con TCA al 8%. Alternativamente se determinó también la incorporación de ^3H -prolina y ^3H -hidroxiprolina (prolina hidroxilada postraduccionalmente) (ver figura 1). Las tablas III y IV muestran los datos de la incorporación expresados como dpm ^3H -prolina por gramo de tejido húmedo.

Es importante hacer notar que para todos los resultados obtenidos en los distintos parámetros evaluados y que se presentan en las tablas III y IV, se encontraron diferencias significativas en los distintos lóbulos de los pulmones de ratas intoxicadas con paraquat-oxígeno cuando se compararon con los resultados obtenidos utilizando lóbulos de pulmones de ratas normales.

La radiactividad incorporada en proteínas totales se encontró aumentada un 112% en las ratas del grupo experimental respecto a las del grupo control. Cuando alícuotas de homogenados de los tejidos se sometieron

a digestión con pepsina para determinar la radiactividad incorporada en colágena, se encontró un aumento de 276% en los pulmones de las ratas del grupo experimental comparadas con el grupo control. El porcentaje de incorporación del isótopo en colágena (relación de la incorporación en colágena/incorporación en proteínas totales) se encontró aumentado un 76% en los lóbulos de pulmones de ratas intoxicadas.

Cuando la incorporación de radiactividad en proteínas totales se refirió al contenido de ADN (índice de celularidad) en las muestras utilizadas para la biosíntesis, se encontró un aumento de 149% en ratas del grupo experimental respecto al control. Para el caso de la incorporación de radiactividad en colágena referida al contenido de ADN, se encontró un aumento de 352% en las ratas del grupo experimental respecto al control. Lo anterior indica que el valor de la incorporación de radiactividad en colágena por unidad de ADN fue mayor que cuando se expresó como radiactividad resistente a digestión con pepsina o como porcentaje de incorporación del isótopo en colágena con respecto a las proteínas totales.

La cinética de incorporación de ^3H -Prolina en ambos grupos, control y experimental se muestra en las figuras 1 y 4 respectivamente. En la figura 1 se muestra la incorporación de radiactividad para cada lóbulo de los pulmones de ratas normales incubados por 2, 4 y 6 horas. Se observó que la incorporación del isótopo fue lineal para cada uno de los lóbulos. Además los lóbulos derechos fueron más activos en la incorporación de ^3H -Prolina que los lóbulos izquierdos. La incorporación de radiactividad en colágena para los mismos lóbulos fue también lineal con respecto al tiempo (figura 2) y la capacidad biosintética del pulmón derecho fue mayor que la del izquierdo.

Es importante hacer notar que el porcentaje de incorporación del isótopo en colágena (figura 3) que se obtuvo a las 2 horas fue muy disperso con variaciones de 12 hasta 25% y que esta diferencia fue disminuyendo hasta estabilizarse alrededor de 12.56% (tabla III) después de 6 horas de incubación. Este comportamiento fue semejante para todos los lóbulos analizados.

En los lóbulos de los pulmones de ratas intoxicadas con paraquat-oxígeno, se observó también que la in-

corporación del isótopo fue lineal en el caso de proteínas totales (figura 4), aún cuando los valores de esta incorporación son mayores que los obtenidos para los pulmones de las ratas normales. Cuando se determinó la incorporación de radiactividad en colágena (figura 5) se observó también linealidad, aunque los lóbulos derechos no fueron más activos que los lóbulos izquierdos como sucedió con el grupo control (figura 2). Los porcentajes de incorporación del isótopo en colágena fueron mayores que los del grupo control (figura 6), con variaciones de 25 a 57% a las 2 horas tendiendo a estabilizarse alrededor de 22.19% a las 6 horas de incubación (tabla IV). Es importante hacer notar que este valor de 22.19% corresponde al doble del valor obtenido para el grupo control (12.56%).

C. MORFOLOGICOS.

La figura 7 muestra la imagen histológica del parénquima pulmonar de la rata normal en la que se observa el espesor homogéneo de los tabiques alveolares, así como la presencia de los conductos respiratorios terminales, de donde se derivan los sacos alveolares.

En las figuras 8-11 se muestran las imágenes histológicas de las distintas alteraciones producidas por la administración de paraquat-oxígeno en el parénquima pulmonar de ratas del grupo experimental. Estas alteraciones incluyeron: engrosamiento de los tabiques alveolares por edema y/o infiltración celular inflamatoria en casi la totalidad del parénquima, descamación celular, hemorragia intraalveolar, dilatación de los espacios aéreos, que pueden presentarse en forma quística o en forma sacular en los alveolos distales y hemorragia capilar. Los resultados histológicos nos sugieren que la intoxicación producida por paraquat-oxígeno no fue homogénea, ya que se conservaron algunos alveolos subpleurales. Cuando se utilizó la tinción tricrómica de Masson (específica para colágena) no se encontró un aumento en el contenido de colágena, esta observación no guarda correlación con los resultados obtenidos durante la biosíntesis de colágena, la cual se encontró aumentada. Lo anterior indica que en los estadios agudos de la intoxicación es posible observar un aumento en la síntesis de colágena sin que esto se refleje necesariamente en un aumento en su contenido.

TABLA I

CONTENIDO EN COLAGENA Y ADN TOTAL EN LOS DISTINTOS
LOBULOS DEL PULMON DE RATA NORMAL¹

Lóbulo Pulmonar	mg Colágena/g tejido húmedo	mg ADN/g tejido húmedo	Colágena/ADN
DERECHO			
Superior	11.31	5.53	2.04
Medio	10.23	5.26	1.94
Inferior	11.29	5.89	2.02
IZQUIERDO			
Superior	10.97	5.16	2.12
Inferior	10.78	4.57	2.36
	$\bar{X} = 10.98 \pm 0.45$	$\bar{X} = 5.28 \pm 0.433$	$\bar{X} = 2.096 \pm 0.141$

¹Los valores representan el promedio de por lo menos dos experimentos, con 5-6 ratas utilizadas en cada experimento.

TABLA II

CONTENIDO DE COLAGENA Y ADN TOTAL EN LOS DISTINTOS LOBULOS DEL PULMON
DE LA RATA DESFUES DE LA INTOXICACION AGUDA CON PARAQUAT-OXIGENO

Lóbulo Pulmonar	mg Colágena/g tejido húmedo	mg ADN/g tejido húmedo	Colágena/ADN
DERECHO			
Superior	8.04	5.53	1.45
Medio	8.59	4.65	1.85
Inferior	6.95	5.21	1.33
IZQUIERDO			
Superior	7.46	4.20	1.78
Inferior	7.55	3.79	1.99
	$\bar{X} = 7.72 \pm 0.436$	$\bar{X} = 4.676 \pm 0.632$	$\bar{X} = 1.68 \pm 0.249$

¹ Los valores representan el promedio de por lo menos dos experimentos, con 5-6 ratas utilizadas en cada experimento.

TABLA III

BIOSINTESIS DE COLAGENA Y PROTEINAS TOTALES EN EL PULMON DE LA RATA NORMAL¹

Lóbulo Pulmonar	Radiactividad en prot. totales ² (dpm x 10 ⁶ /g.t.h.)	Radiactividad resistente a pepsina (dpm x 10 ⁶ /g.t.h.)	Incorporación en colágena (%)	dpm x 10 ⁶ prot. tot/mg AIN	dpm x 10 ⁶ colágena/mg AIN
DERECHO					
Superior	49.26	6.75	13.69	9.53	1.30
Medio	56.85	7.39	12.99	10.06	1.17
Inferior	56.00	6.14	10.96	8.59	0.94
IZQUIERDO					
Superior	37.88	4.31	11.37	7.81	0.88
Inferior	40.14	5.54	13.80	8.33	1.14
	$\bar{X} = 48.02 \pm 7.85$	$\bar{X} = 6.026 \pm 1.056$	$\bar{X} = 12.56 \pm 1.18$	$\bar{X} = 8.864 \pm 0.835$	$\bar{X} = 1.086 \pm 0.5$

¹ Los valores representan el promedio de por lo menos dos experimentos, con 5-6 ratas utilizadas en cada experimento.

² Los tejidos se incubaron por seis horas, utilizando el método de cultivo de órganos. Posteriormente se homogeneizaron y la radiactividad se determinó por precipitación con TCA como se describió en la sección de Métodos.

TABLA IV

BIOSINTESIS DE COLAGENA Y PROTEINAS TOTALES EN LOS LOBULOS DEL PULMON DE LA RATA
DESPUES DE LA INTOXICACION AGUDA CON PARAQUAT-OXIGENO¹

Lóbulo Pulmonar	Radiactividad en prot. totales ² (dpm x 10 ⁶ /g.t.h.)	Radiactividad resistente a pepsina (dpm x 10 ⁶ /g.t.h.)	Incorporación en colágena (%)	dpm x 10 ⁶ prot. tot/ mg DNA	dpm x 10 ⁶ colágena/mg DNA
DERECHO					
Superior	115.00	22.77	19.80	20.83	4.12
Medio	82.24	18.66	22.69	17.72	4.02
Inferior	114.29	28.17	24.64	21.93	5.41
IZQUIERDO					
Superior	90.93	19.96	21.95	21.65	4.75
Inferior	108.56	23.73	21.86	28.64	6.26
	$\bar{X} = 102.2 \pm 13.23$	$\bar{X} = 22.66 \pm 3.31$	$\bar{X} = 22.19 \pm 1.56$	$\bar{X} = 22.15 \pm 3.57$	$\bar{X} = 4.91 \pm 0.830$

¹ Los valores representan el promedio de por lo menos dos experimentos, con 5-6 ratas utilizadas en cada experimento.

² Los tejidos se incubaron por seis horas, utilizando el método de cultivo de órganos. Posteriormente se homogeneizaron y la radiactividad se determinó por precipitación con TCA, como se describió en la sección de Métodos.

FIGURA 1:**BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES EN LOS DISTINTOS LOBULOS DE PULMONES DE RATAS NORMALES.**

Los valores representan el promedio de por lo menos dos experimentos, con 5-6 ratas utilizadas en cada experimento. Los tejidos se incubaron por 2,4 y 6 horas, utilizando el método de cultivo de órganos, la incorporación de radiactividad se determinó por precipitación con ácido tricloroacético, como se describió en la sección - de Métodos.

Equivalentes (Figura 1-6)

SD Lóbulo superior derecho.

MD Lóbulo medio derecho.

ID Lóbulo inferior derecho.

SI Lóbulo superior izquierdo.

II Lóbulo inferior izquierdo

^3H -PROLINA INCORPORADA (dpm x 10^{-6} /g de tejido)

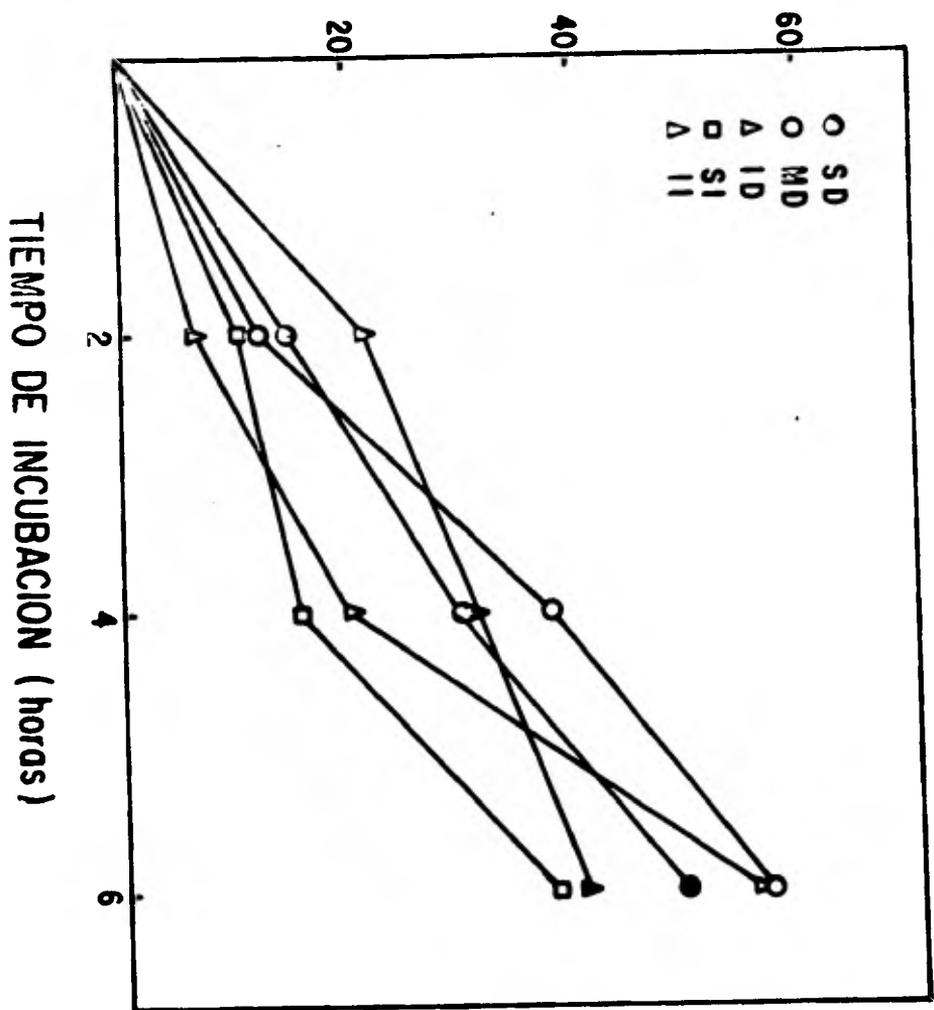


FIGURA 2:

BIOSINTESIS DE PROTEINAS RESISTENTES A DIGESTION CON PEPSINA (COLAGENA), EN LOS DISTINTOS LOBULOS DE PULMONES DE RATAS NORMALES.

Los valores representan el promedio de por lo menos dos experimentos, con 5-6 ratas utilizadas en cada experimento. Los tejidos se incubaron por 2,4 y 6 horas, utilizando el método de cultivo de órganos. Posteriormente las muestras se incubaron con pepsina (1 mg/ml) durante 72 horas a 4°C y la radiactividad se determinó por precipitación con ácido tricloroacético, como se describió en la sección de Métodos.

^3H -PROLINA INCORPORADA (dpm x 10^{-6} /g de tejido)

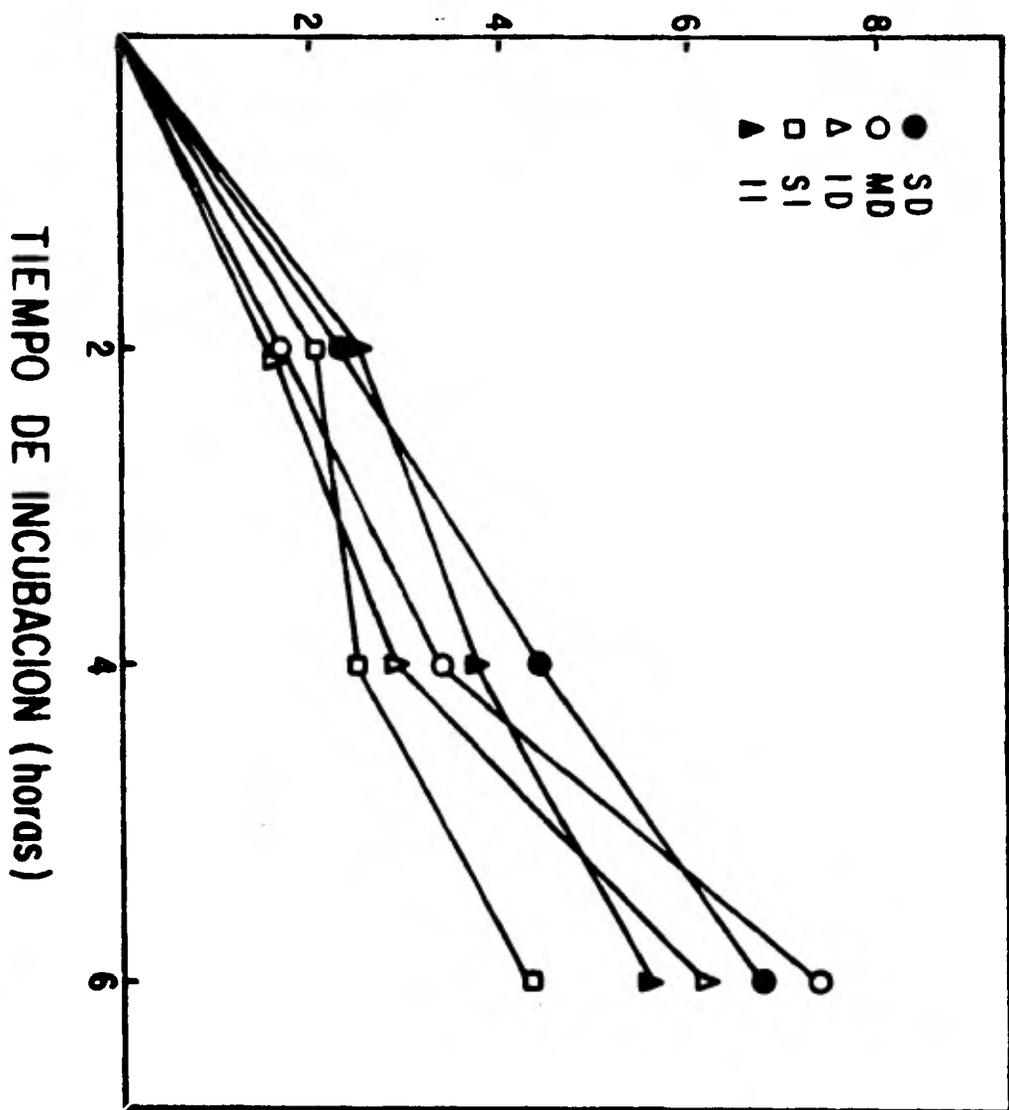


FIGURA 3:

**RELACION COLAGENA/PROTEINAS TOTALES EN LOS DISTINTOS
LOBULOS DE PULMONES DE RATAS NORMALES.**

Cada punto representa el porcentaje de colágena sintetizada para cada tiempo de incubación, los valores fueron obtenidos de los tiempos de incubación correspondientes, que se muestran en las figuras 1 y 2.

PORCENTAJE DE COLAGENA SINTETIZADA
(% / g de tejido)

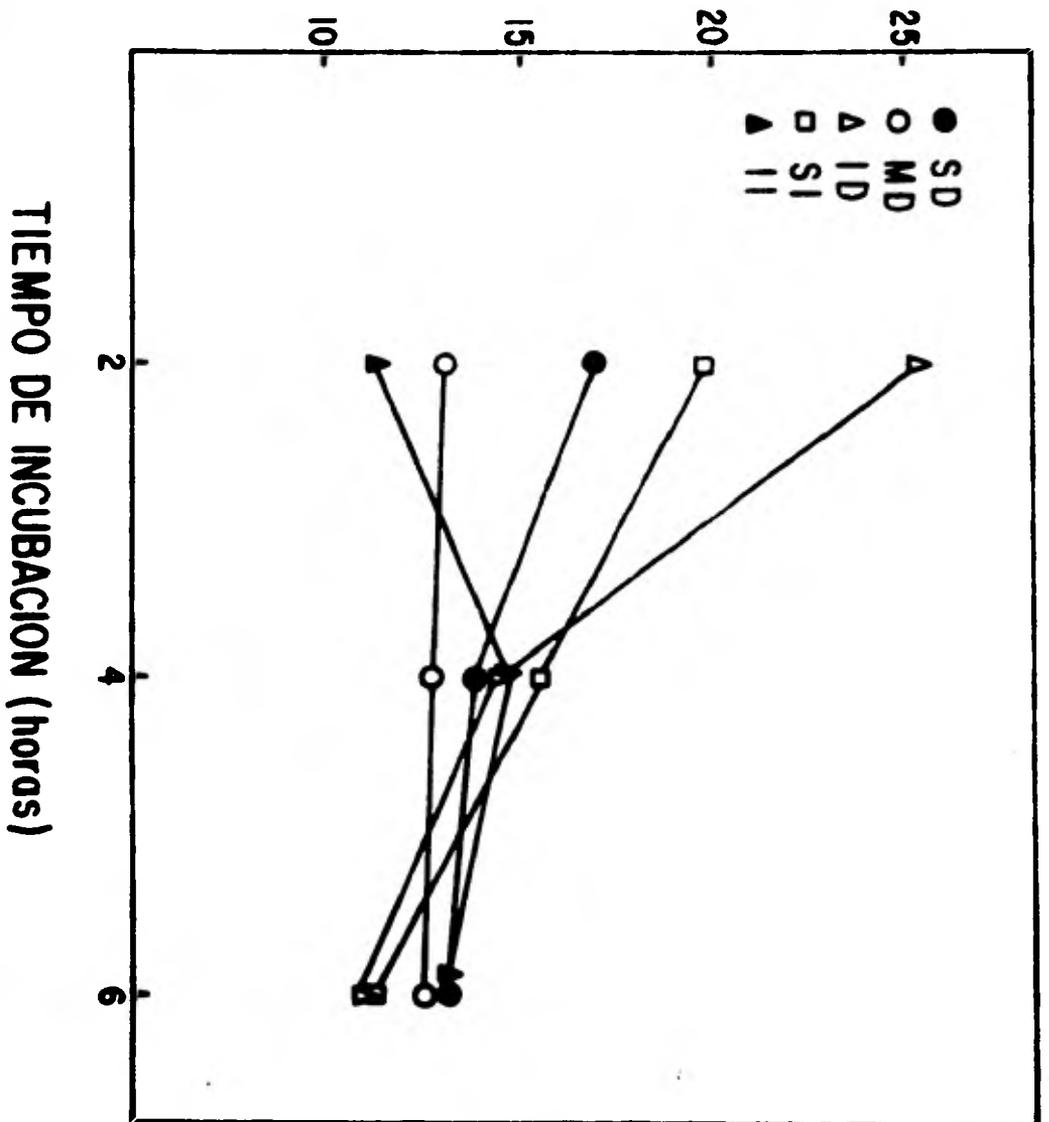


FIGURA 4:

BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES EN LOS DISTINTOS LOBULOS DE PULMONES DE RATAS INTOXICADAS CON PARAQUAT-OXIGENO.

Los valores representan el promedio de por lo menos dos experimentos, con 5-6 ratas utilizadas con cada experimento. Los tejidos se incubaron por 2,4 y 6 horas utilizando el método de cultivo de órganos, la radiactividad se determinó por precipitación con ácido tricloroacético, como se describió en la sección de Métodos.

^3H -PROLINA INCORPORADA (dpm $\times 10^{-6}$ /g de tejido)

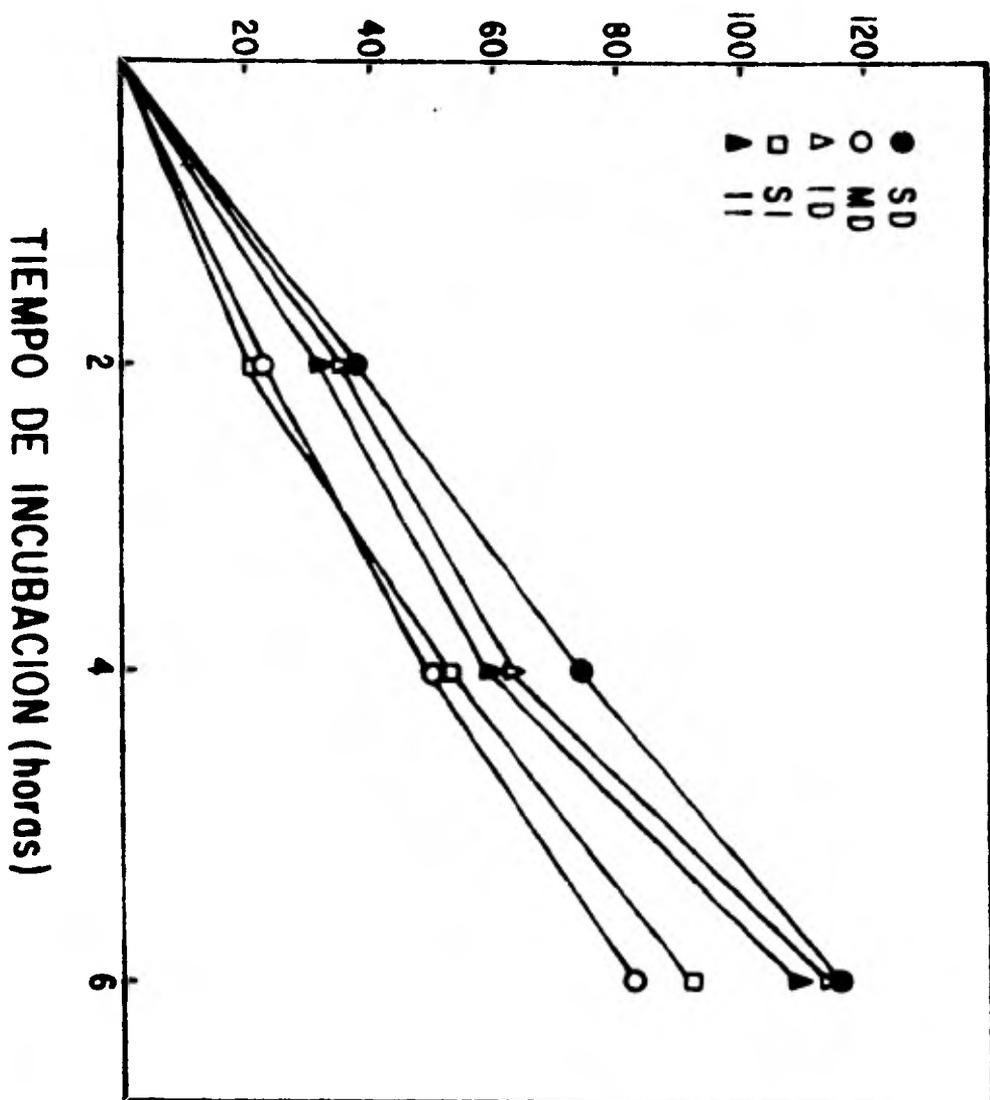


FIGURA 5:

BIOSINTESIS DE PROTEINAS RESISTENTES A DIGESTION CON PEPSINA (COLAGENA), EN LOS DISTINTOS LOBULOS DE PULMONES DE RATAS INTOXICADAS CON PARAQUAT-OXIGENO.

Los valores representan el promedio de por lo menos dos experimentos, con 5-6 ratas utilizadas en cada experimento. Los tejidos se incubaron por 2,4 y 6 horas utilizando el método de cultivo de órgano. Posteriormente las muestras se incubaron con pepsina (1 mg/ml) durante 72 horas a 4°C y la radiactividad se determinó por precipitación con ácido tricloroacético, como se describió en la sección de Métodos.

^3H -PROLINA INCORPORADA (dpm x 10^{-6} /g de tejido)

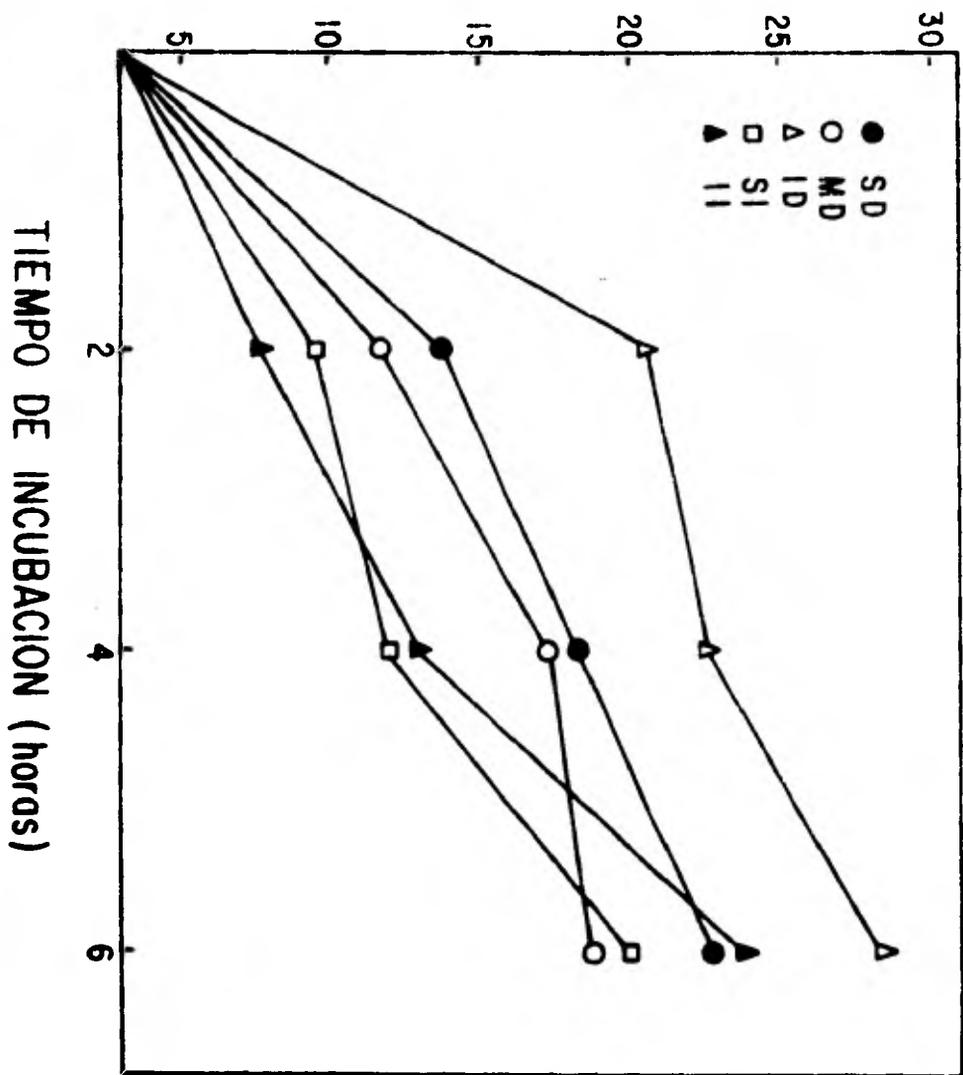
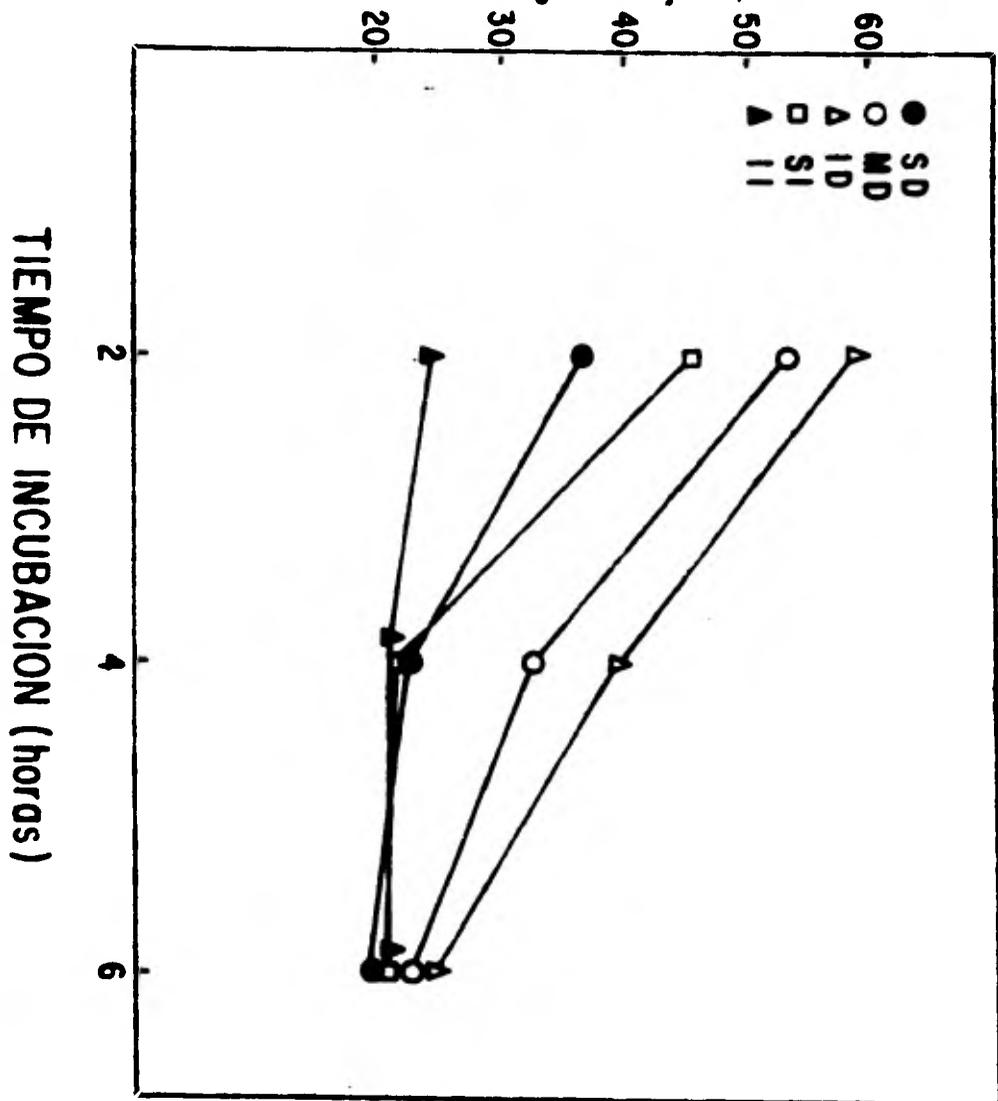


FIGURA 6:

RELACION COLAGENA/PROTEINAS TOTALES EN LOS DISTINTOS LO-
BULOS DE PULMONES DE RATAS INTOXICADAS CON PARAQUAT-OXIGEN
NO.

Cada punto representa el porcentaje de coláge-
na sistetizada para cada tiempo de incubación, los valo-
res fueron obtenidos de los tiempos de incubación corrés-
pondientes que se muestran en las figuras 4 y 5.

PORCENTAJE DE COLAGENA SINTETIZADA
(% / g de tejido)



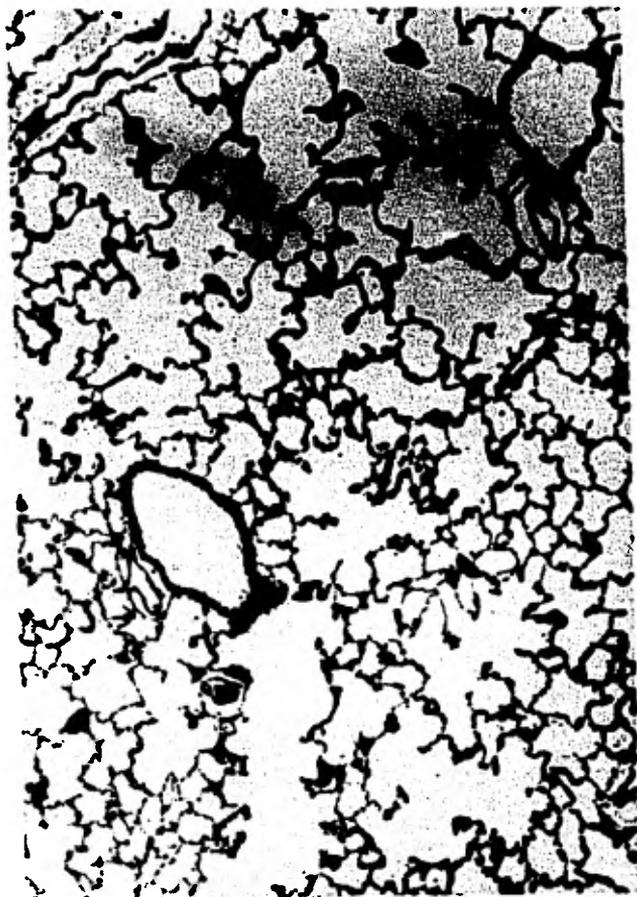


FIGURA 7:

MICROFOTOGRAFIA DEL PARENQUIMA PULMONAR DE RATA
NORMAL.

Obsérvese el espesor homogéneo de los tabiques alveolares y la presencia de los conductos respiratorios terminales, de donde derivan los sacos alveolares. Hematoxilina y eosina (HE), 130 X.



FIGURA 8:

MICROFOTOGRAFIA A PEQUEÑO AUMENTO DEL PARENQUIMA PULMONAR DE RATA INTOXICADA CON PARAQUAT-OXIGENO. Se observa conservación de unos cuantos alveolos subpleurales, engrosamiento de los tabiques alveolares por edema e infiltrado inflamatorio en el resto del parénquima y dilatación de espacios -- aéreos terminales en forma quística. Las tinciones para fibras conjuntivas (colágena) no mostron aumento con respecto al pulmón normal. HE, 130 X.



FIGURA 9:

MICROFOTOGRAFIA A MAYOR AUMENTO DE LA FIGURA 8.

Se muestra un detalle del parénquima pulmonar subpleural con engrosamiento de tabiques alveolares, descamación e infiltración celular inflamatoria.

HE, 280 X.



FIGURA 10:

MICROFOTOGRAFIA A PEQUEÑO AUMENTO DEL PARENQUIMA PULMONAR DE RATA INTOXICADA CON PARAQUAT-OXIGENO. Se observa gran dilatación sacular de espacios aéreos distales, algunos con hemorragia reciente. Los alveolos intermedios aparecen colapsados. HE, 130 X.



FIGURA 11:

MICROFOTOGRAFIA DEL PARENQUIMA PULMONAR DE RATA INTOXICADA CON PARAQUAT-OXIGENO.

Se observa edema, descamación celular y hemorragia intraalveolar. Los tabiques alveolares aparecen engrosados en la mitad inferior de la microfotografía, donde también hay infiltrado inflamatorio. HE, 280 X.

D I S C U S I O N

En este estudio de intoxicación pulmonar aguda producida por paraquat y oxígeno simultáneos se encontró una mortalidad de 50% a los dos días de administrada la primera dosis, lo anterior es un índice primario de daño pulmonar, ya que se ha demostrado que entre los dos y cuatro días de administrada una dosis letal media de paraquat (25 mg/Kg de peso) o la quinta parte de ésta con oxígeno, se produce edema e inflamación (15, 20, 37, 42-44), que probablemente es la causa de las muertes observadas y de los demás signos fisiológicos descritos.

Un índice de la producción de edema e inflamación es la disminución de 25% en el contenido de colágeno/gramo de tejido húmedo en las ratas intoxicadas respecto a las normales, y el observar que este contenido permanece constante en ambos grupos cuando se comparó por gramo de tejido seco.

Se ha postulado que en la inducción de la fibrosis pulmonar por paraquat y oxígeno existen dos etapas: una fase de inflamación edematosa aguda seguida de

una fase reparativa hipercelular con depósito excesivo de colágena (37). Los resultados obtenidos demostraron que en la administración aguda de paraquat y oxígeno existe un predominio de la primera fase, como se ilustró en las microfotografías de los pulmones intoxicados (figuras 7-11).

Sin embargo, los resultados bioquímicos no se correlacionaron con la primera fase, sino que son semejantes a la segunda fase postulada. Lo anterior tomando en cuenta que la síntesis de colágena estuvo aumentada, aún cuando no se observó aumento de su contenido en el tejido. Este aumento en síntesis de colágena pudo ser parte del proceso inflamatorio, o explicarse si se considera que la degradación de la colágena fue comparable a su síntesis sin llegar a una acumulación excesiva de colágena, o quizás a ambos factores que podrían ser etapas del desarrollo prefibrótico.

La intoxicación con paraquat y oxígeno produjo un aumento de 112% en la síntesis de proteínas totales en los pulmones de ratas intoxicadas respecto a la de los pulmones normales (tablas 3 y 4 columna 1), que se correlacionó con un aumento celular (inflamación) (figuras 7-

11), así como un incremento del 50% en el contenido de - DNA/gramo de tejido seco en las ratas intoxicadas comparadas con las normales. Se observó un aumento del 276% en la síntesis de colágena en las ratas intoxicadas respecto a las ratas normales (tablas 3 y 4 columna 2), y el porcentaje de incorporación del isótopo en colágena respecto a proteínas totales se encontró aumentado un 76% en las ratas intoxicadas (figura 3 y 4 columna 3).

Cuando la biosíntesis de proteínas se refirió a la celularidad de los tejidos (contenido de ADN), se encontró un aumento de 149% para las proteínas totales en los pulmones de las ratas intoxicadas respecto a las normales (tablas 3 y 4 columna 4), y para colágena se observó un aumento de 352% en los pulmones de las ratas intoxicadas comparadas con las normales. Lo anterior demuestra que en los pulmones intoxicados con paraquat y oxígeno - ocurre una síntesis más activa para colágena que para proteínas totales, como se demuestra por los datos de la biosíntesis referidos a la celularidad del tejido, ya que indica la actividad por célula y no por gramo de tejido húmedo ni como porcentaje de incorporación del isótopo en colágena. Este aumento significativo en la síntesis de colágena no se relaciona con un incremento en el depósito de colágena intersticial, ya que los valores obtenidos pa

ra el contenido de colágena en los pulmones de las ratas intoxicadas fueron comparables a los de las ratas normales.

La cantidad de colágena en cualquier tejido está determinada por la suma de dos procesos metabólicos: su velocidad de síntesis y su velocidad de degradación. Existen diversos factores que durante los estados patológicos pueden inducir un aumento o un decremento en el contenido de colágena del tejido. Ahora bien, cuando la velocidad de síntesis esté aumentada y la velocidad de degradación disminuída se observará un aumento neto en el contenido de colágena y en el caso de que se aumente la velocidad de degradación paralelamente con una disminución de la velocidad de síntesis habrá una disminución del contenido de colágena en el tejido.

En este estudio se observó un incremento en la síntesis de colágena, sin que esto se reflejara en un aumento de su contenido en el pulmón de las ratas intoxicadas, que incluso fue menor cuando se expresó por gramo de tejido húmedo (tablas 1 y 2 columna 1). Esta observación sugiere que en la intoxicación aguda con paraquat-oxígeno la degradación de la colágena o la inducción de actividad

de colagenasa fue tal que no permitió un depósito excesivo de colágena. Desconocemos los mecanismos que están involucrados en la degradación de la colágena sintetizada en exceso y de mantener el contenido de colágena en los niveles normales.

Por otro lado, aún cuando no se conocen los mecanismos que inducen una síntesis excesiva de colágena, se ha demostrado que el radical superóxido (O_2^-) estimula la síntesis de colágena y la actividad de las hidroxilasas de prolina y de lisina (50). Además la producción de este radical está en relación directa con la cantidad de oxígeno presente en el medio (44). Considerando que la biosíntesis se realizó a las 24 horas de administrar la segunda dosis de paraquat, y de que su tiempo medio de eliminación es de 20 horas, la cantidad de este herbicida que pudo estar presente en los tejidos pulmonares durante la biosíntesis fue mínima, como para explicar algún efecto directo en la biosíntesis debido al paraquat. Además, la concentración de oxígeno durante la biosíntesis fue la ambiental (21%), y por lo tanto, se elimina la posibilidad de que en las condiciones experimentales haya habido una producción excesiva de radical superóxido. Lo anterior nos sugiere que la actividad de la maquinaria biosin

tética de colágena y de la hidroxilasa de prolina no fueron influenciadas por el radical superóxido, y que la actividad biosintética posiblemente se debe a otros factores que hasta ahora no conocemos.

El aumento en la biosíntesis de proteínas totales puede explicarse por un aumento en la celularidad de los tejidos intoxicados, la cual forma parte del proceso inflamatorio. Se ha observado que a los seis días de administrar una dosis letal media de paraquat o la quinta parte de ésta conjuntamente con oxígeno, hay un aumento en la incorporación de timidina tritiada en el ADN de los tejidos intoxicados (20,37). Lo anterior se correlaciona con los resultados histológicos obtenidos.

La cinética de incorporación de ^3H -Prolina mostró un comportamiento lineal en ambos grupos de ratas (figuras 1 y 4). En las ratas normales los lóbulos del pulmón derecho fueron más activos en la incorporación de ^3H -Prolina que los lóbulos del pulmón izquierdo. En las ratas intoxicadas no se observó este comportamiento y las actividades biosintéticas de los distintos lóbulos mostraron variaciones cuando se compararon con los pulmones de las ratas normales. La síntesis de colágena fue lineal para todos los lóbulos de ambos grupos de ratas, y tam---

bién se observaron variaciones en la actividad biosintética de los distintos lóbulos de las ratas intoxicadas comparadas con las normales (figuras 2 y 5).

Las observaciones histológicas demostraron una pérdida generalizada de la arquitectura alveolar en los lóbulos de los pulmones de ratas intoxicadas, que hizo difícil su identificación como un parénquima pulmonar (figuras 7-11). Las alteraciones morfológicas fueron muy uniformes para los diferentes lóbulos de los pulmones de ratas intoxicadas. Las principales alteraciones consistieron en: engrosamiento de los tabiques alveolares por edema e infiltración celular inflamatoria, descamación celular, hemorragia intraalveolar, dilatación de los espacios aéreos o la pérdida de éstos y hemorragia capilar. Estos resultados correlacionaron con el aumento observado en la síntesis de proteínas totales y en la determinación del contenido de ADN/gramo de tejido seco.

No se conoce cuales son las células responsables de la biosíntesis excesiva de colágena, y aunque ha sido demostrado que en ciertos casos de fibrosis pulmonar los fibroblastos son los responsables de esta síntesis excesiva (19), en este estudio histológico no se encontró una

población abundante de fibroblastos que explicará dichos resultados. La población celular predominante estuvo -- constituida por células mononucleares: neumocitos tipo I y tipo II, macrófagos, neutrófilos y monocitos. No se ha demostrado que estas células sean activas en la síntesis de colágena. Lo anterior podría sugerir que estas células que no son activas en la síntesis de colágena ahora - manifiesten capacidad de sintetizarla, ya que son la población celular predominante. Otra posibilidad es que - los fibroblastos sin que aumenten considerablemente en número y proporción incrementen su actividad biosintética - para colágena.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la administración simultánea de paraquat - (10 mg) y oxígeno (72%) en ratas, produjo alteraciones - bioquímicas y morfológicas que podrían anteceder al establecimiento de una fibrosis pulmonar. Estas alteraciones en los diferentes lóbulos pulmonares de ratas intoxicadas - comparados con los lóbulos de ratas normales consistieron en: un aumento de 10 veces en el contenido de proteínas totales en el tejido pulmonar de las ratas intoxicadas. Aunque el contenido de colágena por gramo de tejido seco no mostró diferencias al comparar ambos grupos, si fue diferente cuando se expresó por gramo de tejido húmedo, -- siendo menor en un 30%. El contenido de ADN/gramos de tejido seco si mostró diferencias significativas comparado con el de ratas normales. La biosíntesis de proteínas expresada por gramo de tejido seco aumentó 112% en las ratas intoxicadas respecto a las normales, pero cuando se - refirió al contenido de ADN (dpm $\times 10^6$ en proteínas totales/mg de ADN) se encontró un aumento de 149%. En el caso de la síntesis de colágena se encontró un aumento de - 352%. Los porcentajes de incorporación del isótopo en co

lágena comparados con los obtenidos para proteínas totales mostraron un aumento de 76% en el grupo de ratas intoxicadas. No se observó ninguna correlación entre el aumento de la síntesis de la colágena y su contenido bioquímico - en los tejidos, las observaciones histológicas tampoco - mostraron un aumento aparente en el contenido de colágena.

Las capacidades biosintéticas de los distintos lóbulos pulmonares de ratas intoxicadas mostraron diferencias cuando se compararon con las ratas normales, tanto - para proteínas totales como para colágena. La observa---ción de una capacidad biosintética aumentada para protef---nas totales en los lóbulos de pulmones de ratas intoxica---das mostró correlación con las observaciones histológicas pero no se encontró correlación entre la capacidad aumen---tada de la síntesis de colágena y su contenido en el teji---do.

Es importante hacer notar que los resultados - obtenidos tienen relevancia, ya que aún tratándose de un proceso de intoxicación pulmonar aguda que no produjo una fibrosis pulmonar establecida, presentó importantes alteraciones bioquímicas, morfológicas y fisiológicas, que - se podrían relacionar con el desarrollo de la fibrosis - pulmonar.

Las alteraciones observadas en los lóbulos de pulmones de ratas intoxicadas comparadas con los lóbulos de ratas normales, y que están relacionadas con el desarrollo de la fibrosis pulmonar son: aumento de 50% en el contenido de células (ADN/gramo de tejido seco). La biosíntesis de proteínas totales aumentó 112% (dpm/gramo de tejido húmedo) y comparada con la celularidad el aumento fue de 149% (tablas III y IV columna 1). La biosíntesis de colágena aumentó 276% (tablas III y IV columna 2) y cuando se determinó el porcentaje de incorporación del isótopo en colágena el aumento fue de 76% (tablas III y IV columna 3). Notoriamente la biosíntesis de colágena expresada por la celularidad de los tejidos (contenido de ADN), mostró un aumento de 352% (tablas III y IV columna 5), sin que las observaciones histológicas demostrarán un aumento en el contenido de colágena, pero si una notable pérdida de la arquitectura alveolar (figuras 7-11).

Dado el hecho de que la síntesis de colágena se encontró aumentada en los lóbulos de pulmones de ratas intoxicadas sin que esto se correlacione con un aumento de su contenido en los tejidos pulmonares se hace necesario la obtención de un modelo de fibrosis pulmonar, que reproduzca las características bioquímicas y morfológicas

de la fibrosis pulmonar humana, y que además sea sencillo y reproducible. Este modelo se podría obtener si se emplean diferentes dosis de paraquat y concentraciones variables de oxígeno con distintos tiempos de exposición. Con este modelo se podrían investigar cuales son los mecanismos que intervienen en el desarrollo y desencadenamiento de la fibrosis pulmonar. Dichos mecanismos deberán estudiarse desde el punto de vista de la biosíntesis de colágena, así como, de la actividad de los ARNm para colágena, de las enzimas que intervienen en la biosíntesis y las modificaciones postraduccionales de la colágena, tanto como de su degradación y depósito en el parénquima pulmonar. Este modelo permitirá desarrollar una terapia para el creciente y dramático número de pacientes que en la actualidad sufren este padecimiento crónico con resultados muy frecuentemente fatales.

B I B L I O G R A F I A

REVISIONES GENERALES.

1. Minor, R.R., 1980. Collagen metabolism. A comparison of diseases affecting collagen. American Journal of Pathology. 98 (1): 227-277.
2. Prockop, D.J., Kivirikko, K.I., Tuderman, L., 1979. The biosynthesis of collagen and its disorders. N. Engl. J. Med. 301 (1,2): 13-23, 77-85.
3. Woodhead-Galloway, J., 1980. Collagen: The Anatomy of a Protein. (Edward Arnold, ed.). Camelot Press Ltd: 61 pp.
4. Miller, E.J., 1976. Biochemical and biological significance of genetically distinct collagens. Mol. Cell. Biochem. 13: 165-192.
5. Prockop, D.J., 1977. Collagen Diseases and the Biosynthesis of Collagen. Hospital Practice. December: 61-68.

6. Bornstein, P., 1980. Structural Distinct Collagen Types. Ann. Rev. Biochem. 49: 957-1003.

ARTICULOS ESPECIFICOS DEL TEMA.

7. Olsen, B.R., 1979. Posttranslational processing and secretion of procollagen in fibroblasts. Proc. Br. Soc. Exp. Biol. 33: 57-78.
8. Blobel, G.H., 1975b. Transfer of proteins across membranes. II Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. J. Cell. Biol. 67: 852-862.
9. Blobel, G., 1976. Extraction from free ribosomes of a factor mediating ribosome detachment from rough microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 68: 1-7.
10. Sandberg, L.B., 1981. Elastin structure, biosynthesis, and correlation to diseased states. N. Engl. J. of Med. 304 (10): 566-579.
11. Barnes, H.J., Constable, B.J., Morton, L.F., 1974: Agerelated variations in hydroxylation lysine and proline in collagen. Biochem. J. 139: 461-468.

12. Minor, R.R., 1973. Somite chondrogenesis: a structural analysis J. Cell. Biol. 56: 27-50.
13. Haushka, S.D., 1972. Cultivation of muscle tissue in growth, nutrition and metabolism of cells in culture, vol. II, (G. Rothblatt y V. Cristofalo, eds.). Academic Press, Inc., New York, 67 pp.
14. Thomas, P., 1978. Fibrosing alveolitis. CMA JOURNAL. 119: 1211-1216.
15. Greenberg, D.H., Karen, R.M., Reiser, M.D., Last, A.J. 1978. Correlation of biochemical and morphologic manifestations of acute pulmonary fibrosis in rats administered paraquat. CHEST. 74(4): 421-425.
16. Wilner, G.G., Nossel, H.L., LeRoy, E.C., 1968. Aggregation of platelets by collagen. J. Clin. Invest. 47(2616): 2616-2621
17. Chang, C., Houck, J.C., 1970. Demonstration of the chemotatic properties of collagen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134: 22-26.

18. Crystal, R., 1974. Lung collagen: definition, diversity and development. Fed. Proc. 33 (11): 2248-2255.
19. Fulmer, J.D., Crystal, R.G., 1976. The Biochemical basis of pulmonary function. (Crystal, R.G. ed.). Marcel Decker Inc, New York 534 pp.
20. Greenberg, D.H., Lyons, S.A., Last, A.J., 1978. Paraquat-induced changes in the rate of collagen biosynthesis by rat lung explants. J. Lab. Clin. Med. 92 (6): 1033-1042.
21. Hamman, L., Rich, A.R., 1935. Fulminating diffuse interstitial fibrosis of the lungs. Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc. 51: 154-163.
22. Wilner, J.D., Nossel, H.L., LeRoy, E.C., 1968. Activation of Hageman factor by collagen. J. Clin. Invest. 47 2608-2615.
23. Crystal, R.G., Fulmer, J.D., Robert, W.C., 1976. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Ann. Int. Med. 85: 769-788.

24. Carrington, B.C., Gaensler, A.E., Coutu, E.R., et al;
1978. Natural history and treated course of usual
and desquamative interstitial pneumonia. N. Engl. J.
Med. 298 (15): 801-808.
25. Fulmer, D.J., Bienkowski, S.R., Cowan, J.M., et al;
1980. Collagen concentration and rates of synthesis
in idiopathic pulmonary fibrosis. Am. Rev. Resp.
Dis. 122 (2): 289-302.
26. Conning, M.D., Fletcher, K., Swan, B.A., 1969. Para-
quat and related bipyridyls. Brit. Med. Bull. 25:
245-249.
27. Harley, J.B., Grinspan, S., Root, R.K., 1977. Para-
quat suicide in a young woman: Results of therapy
directed against the superoxide radical. Yale. J.
Biol. 50: 481-488.
28. Thurlbeck, M.W., Thurlbeck, M.S., 1976. Pulmonary
effects of paraquat poisoning. CHEST. 69 (2): 276-280 .
29. Parkinson, C., 1980. The changing pattern of paraquat
poisoning in man. Histopathology. 4 (2): 171-184.

30. Grant, H.C., Lantos, P.L., Parkinson, C., 1980. Cerebral damage in paraquat poisoning. *Histopathology*. 4 (2): 185-196.
31. Rose, M., Smith, L.L., 1977. The relevance of paraquat accumulation by tissues. In *Biochemical Mechanisms of Paraquat Toxicity* (Autor, A.P. ed.). Academic Press, Inc. New York: pp. 71-90.
32. Smith, L.L., Wyatt, I., Rose, M.S., 1977. A comparison of the uptake and elimination of paraquat in rat lungs slices with that in vivo. In *Biochemical Mechanisms of Paraquat Toxicity* (Autor, A.P. ed.). Academic Press, Inc. New York: pp. 135-140.
33. Kurisaki, E., Sato, S., 1979. Tissue distribution of paraquat and diquat after oral administration in rats. *Forensic Science International*. 14: 165-170.
34. Lock, E., 1976. Inhibition of paraquat accumulation in rat lung slices by a component of rat plasma and a variety of drugs and endogenous amines. *Biochem. Pharmacol.* 25: 1769-1772.

35. Deneke, S.M., Barry, F.L., 1980. Normobaric oxygen toxicity of the lung. N. Engl. J. Med. 303 (2): 76-86.
36. Smith, P., Heath, D., Kay, J.M., 1973. The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. J. Path. 114: 57-67.
37. Smith, L.L., Rose, M., 1977. A comparison of the effects of paraquat and diquat on the water content of rat lung and the incorporation of thymidine into lung DNA. Toxicology. 8: 223-230.
28. Griffin, M., Smith, L.L., Wayne, J., 1979. Changes in transglutaminase activity in a experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. Br. J. Exp. Path. 60: 653-661.
39. Smith, L.L., Rose, M., 1977. Biochemical changes in lungs exposed to paraquat. In Biochemical Mechanisms of Paraquat Toxicity (Autor, A.P. ed.). Academic Press Inc., New York: pp. 187-198.

40. Rose, M.S., Smith, L.L., Wyatt, J., 1976. The relevance of pentose phosphate pathway stimulation in rat lung to the mechanism of paraquat toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 25: 1763-1767.
41. Crapo, J.D., Delong, D.M., Sjostrom, K., et al., 1977. The failure of aereolized superoxide dismutase to modify pulmonary oxygen toxicity. *Am. Rev. Resp. Dis.* 115: 1027-1033.
42. Zamuril, M.H., Bhatnagar, R.S., 1979. Involvement of superoxide in the paraquat-induced enhancement of lung collagen synthesis in organ culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89 (1): 71-76.
43. Chvapil, M., Peng, M.Y., 1975. Oxygen and lung fibrosis. *Arch. Environ. Health.* 30: 528-532.
44. Fisher, K.H., Clements, A.J., Wright, R.R., 1973. Enhancement of oxygen toxicity by the herbicide paraquat. *Am. Rev. Resp. Dis.* 107: 246-251.
45. Bray, G.A., 1960. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1: 279-285.

46. Rojkind, M., González, E., 1971. An improved method for determining specific radioactivities of proline. ^{14}C and hydroxyproline - ^{14}C in collagen and noncollagenous proteins. *Anal. Biochem.* 57 (17): 1-7.
47. Woessner, J.F., Jr. 1961. The determinations of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 93: 440-447.
48. Breitkreutz, D., Díaz de León, L., Paglia, L., Zeichner, M., Wilczek, J., Stern, R., 1978. The synthesis of presumptive procollagen messenger ribonucleic acid in the calvaria of the developing chick embryo, *Biochim. Biophys. Acta* 517: 349-359.
49. Burton, Y.X., 1962. Determination of DNA concentration with diphenylamine. In: *Methods in Enzymology*, vol. VII (Colowick, S.P., and Kaplan, N.O. Eds.). Academic Press, Inc.: New York, N.Y., pp. 163-168.
50. Myllyla, R., Schubotz, L.M., Weser, U., Kivirikko, K. I., 1979. Involvement of superoxide in the prolyl and lysyl hydroxylase reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89 (1): 98-102.

51. Montaña, R.M., 1980. Alteraciones pulmonares inducidas por paraquat y oxígeno en ratas. Tesis. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.: 44 p.