

Daño pulmonar difuso en la rata por la administración endovenosa del factor activador plaquetario

E. Novoa, G. Arenas, G. Varas*, M.E. Lathrop* y M.J. Oyarzún*

Departamentos de Medicina Experimental Norte y * Ciencias Preclínicas Oriente. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

El factor activador plaquetario (PAF) ha sido propuesto como un posible intermediario en la patogénesis del síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA).

Nuestro objetivo fue evaluar el papel del PAF como mediador de daño pulmonar y su efecto sobre el contenido de surfactante alveolar de ratas al ser administrado por vía endovenosa.

Se administró 8 µg de PAF/kg de peso corporal a 21 ratas Wistar de peso promedio 254 ± 55 g (DS), sacrificadas al cabo de 1-4 y 24 horas. Como controles se utilizaron ratas sacrificadas en iguales tiempos, pero tratadas con NaCl 0,9 % ev. En el lavado broncoalveolar (LBA) se determinó contenido de proteínas, fosfolípidos totales (PLT), fosfatidilcolina disaturada (DSPC), recuento celular y actividad de las enzimas fosfatasa alcalina (F.Alc) y gama-glutamyltranspeptidasa (GGT). En cada serie se efectuó un estudio histológico y determinación de gases en sangre arterial antes y después de la administración de PAF.

La administración de PAF provocó una disminución del contenido de PLT y de DSPC que fue significativa ($p < 0,05$) al cabo de 1 y 4 horas. A las 4 horas hubo aumento del recuento celular del LBA, hiperventilación y lesiones histológicas leves. No se observaron cambios en el contenido de proteínas, ni en la actividad enzimática en ninguna de las series tratadas con PAF.

El PAF administrado por vía endovenosa en la rata, produce una disminución del contenido de surfactante alveolar, hecho que se acompaña de lesiones pulmonares leves aunque difusas.

Diffuse pulmonary damage by intravenous administration of the platelet activator factor to the rat

The platelet activator factor (PAF) has been postulated as a likely mediator in the pathogenesis of adult respiratory distress syndrome (ARDS).

The aim of the present study was to assess the role of PAF as a mediator of pulmonary damage and its effect on alveolar surfactant content.

The effect of intravenous perfusion of PAF (8 µg/kg of body weight) was studied in 21 Wistar rats, with an average weight of 254 ± 55 g (SD). This serie was compared with control rats injected with NaCl 0.9 % solution, at the end of 1-4 and 24 hours respectively. Total proteins, total phospholipid (TPL), disaturated phosphatidylcholine (DSPC), cell counting and enzymatic activity: alkaline phosphatase (P.alc) and gammaglutamyltranspeptidase (GGT) were analyzed in the bronchoalveolar lavage (BAL). In each experimental series an histologic study and determinations of arterial blood gases before and after the intravenous administration of PAF were carried out.

The administration of PAF caused a decrease of TPL and DSPC contents at the end of 1 and 4 hours ($p < 0.05$). An increase in cell counting, hyperventilation and slight histologic lesions of the lung 4 hours after administering PAF were also observed. However, none significant changes were found in these experiments in total proteins nor in enzymatic activity from bronchoalveolar lavage.

It is concluded that the intravenous administration of PAF in rats produced a decrease in the alveolar surfactant content which was associated to slight but diffuse pulmonary lesions.

Arch Bronconeumol 1993; 29:264-269

Introducción

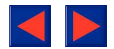
El factor activador plaquetario (PAF) pertenece a una familia de fosfolípidos estructuralmente relacionados y con una amplia actividad biológica. El componente más activo de esta familia es el 1-O-hexadecil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolcolina. Este mediador insoluble

en fase acuosa, es liberado por una variedad de tipos celulares entre los cuales se encuentran las plaquetas, los macrófagos y los polimorfonucleares¹.

Numerosos estudios han proporcionado evidencias indirectas que este fosfolípido probablemente juega un rol en la fisiopatología pulmonar provocando en el pulmón bronco y vasoconstricción, aumento de permeabilidad vascular y acumulación de células inflamatorias^{2,3}. Además se ha encontrado que los macrófagos alveolares sintetizan PAF después de su estimulación *in vitro* por el agente ionosforo A-23187⁴ o *in vivo* por la inhalación de endotoxinas o por la hipoxia^{5,6}. El PAF puede ser recuperado en el lavado

Trabajo presentado en la VI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, Santiago, Chile, Junio de 1991 y en el IX Congreso de Medicina Intensiva, Santiago, Chile, Septiembre 1991. (Parcialmente financiado por el Departamento Técnico de Investigación (DTI), proyecto N.º 2.709, Universidad de Chile.)

Recibido el 1-9-1992 y aceptado el 11-11-1992.



broncoalveolar (LBA) y es metabolizado por las células epiteliales tipo II del alveolo.

Por otra parte, estudios previos sugieren que el PAF puede aumentar la secreción de surfactante en células alveolares aisladas⁷ y también puede aumentar el contenido de surfactante en el lavado broncoalveolar al ser instilado en las vías aéreas⁸.

El propósito de este trabajo ha sido analizar el efecto del PAF endovenoso como mediador de daño pulmonar difuso y su efecto sobre el contenido alveolar de surfactante.

Material y métodos

Se utilizó ratas Wistar de un peso promedio de 254 ± 55 g DS. Una vez anestesiados los animales con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corporal) administrado por vía intraperitoneal, se practicó una traqueostomía para colocar un tubo de polietileno y se canuló la arteria carótida para extraer muestras de sangre arterial al comienzo y al final del experimento para determinar PaO₂, PaCO₂ y pH en un equipo Astrup (Radiometer, Dinamarca, semi-automático, modelo B-6 A-3).

También se canuló la vena yugular utilizando un tubo de polietileno heparinizado, el que fue conectado al equipo de perfusión (Perfusor VI, B. Braun, Alemania). Se utilizó una velocidad de infusión de 12 ml/h, por un tiempo aproximado de 20 min, para perfundir ya sea una solución de NaCl al 0,9 % o bien 8 µg de PAF/kg de peso corporal suspendidos en NaCl al 0,9 %. El tiempo de observación del efecto del PAF (Sigma Chemical Co. St Louis, Missouri, USA) se realizó al cabo de 1-4 y 24 horas.

Cumplido el tiempo de observación, cada rata fue sacrificada por exanguinación y los pulmones y el corazón fueron extraídos y pesados para obtener la relación peso pulmón/peso corazón y peso pulmón/peso corporal. Estas relaciones se usaron como índice del contenido acuoso del pulmón. Los pulmones fueron desgasificados y se efectuó lavado broncoalveolar (LBA) utilizando NaCl al 0,9 % a 4 °C a capacidad pulmonar total; la operación se repitió 3 veces instilando la solución salina mediante una jeringa conectada a una cánula traqueal. La recuperación del líquido de los lavados broncoalveolares fue $81,2 \pm 3,5$ % del volumen inicial sin que se observaran diferencias en el volumen del LBA recuperado entre las series con PAF y los controles. En alícuotas de la mezcla de los LBA se determinó: a) contenido de fosfolípidos totales (PLT) mediante el método de Bligh y Dyer⁹, seguido por el método de Bartlett¹⁰; b) fosfatidilcolina disaturada (DSPC) usando tetróxido de osmio¹¹; c) contenido de proteínas usando el método de Lowry et al¹²; d) actividad de gamma-glutamiltanspeptidasa¹³; e) actividad de fosfatasa alcalina por el método de Bessey et al¹⁴; y f) recuento celular utilizando una cámara de Neubauer y violeta de genciana.

Se efectuó recuento plaquetario antes y después de la infusión ya sea de NaCl 0,9 % (vehículo) o del PAF en suspensión.

En cada serie experimental de 1-4 y 24 horas se realizó un estudio histológico en los pulmones para evaluar el posible daño producido por la administración de PAF. Como se observaron lesiones al cabo de 4 horas del PAF ev se examinó la histología pulmonar en cuatro ratas de esta serie experimental. Los pulmones se fijaron mediante la inyección de formalina al 5 % en las vías aéreas hasta alcanzar la capacidad pulmonar total y luego los pulmones se sumergieron en formalina al 20 %. Se usó la tinción de hematoxilina-eosina

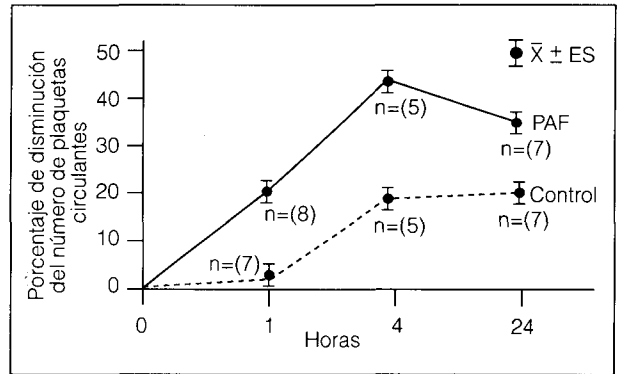


Fig. 1. Recuento de plaquetas en sangre periférica de ratas inyectadas con 8 µg de PAF/kg ev. Serie control: ratas inyectadas con NaCl 0,9 % ev. En cada punto se representa la media aritmética y su error estándar.

y se estudió la morfología al microscopio óptico, utilizando un puntaje preestablecido¹⁵ para la evaluación de las lesiones.

El análisis estadístico de los resultados se realizó usando las pruebas pareada o no pareada de Student, análisis de varianza y la prueba de Newman-Keuls según el caso¹⁶. Un valor de p menor de 0,05 se consideró significativo.

La actividad biológica del PAF endovenoso se evidenció en cada serie experimental a través del recuento plaquetario. Se encontró una caída en el recuento de plaquetas en sangre periférica mayor que en los controles. En las series sacrificadas a 1 y 4 horas la plaquetopenia fue más del doble de su respectivo valor control (fig. 1).

Resultados

En las ratas controles, la gasometría mostró un aumento significativo de la PaO₂ y una disminución significativa de la PaCO₂ sólo al cabo de 24 horas en relación a su valor inicial (tabla I). En las ratas tratadas con 8 µg de PAF/kg ev se observó un aumento significativo de la PaO₂ a las 4 y 24 horas comparadas con su valor basal. La PaCO₂ disminuyó significativamente al cabo de 1-4 y 24 horas de la administración de PAF (tabla I). También se observó un aumento significativo del pH 4 horas después de la administración de PAF o su vehículo.

Los índices peso pulmón/peso corazón y peso pulmón/peso corporal no mostraron variaciones significativas en las series tratadas con PAF respecto a sus controles en ninguno de los casos estudiados. Tampoco hubo diferencias significativas en el contenido de proteínas en el LBA en las diversas series tratadas con PAF ev en relación a su respectiva serie control (fig. 2).

La administración endovenosa de PAF en las ratas sacrificadas a la primera y cuarta hora produjo una disminución significativa del contenido de PLT ($p < 0,001$ y $p < 0,02$ respectivamente, t no pareado) y de DSPC ($p < 0,005$ y $p < 0,05$ respectivamente, t no pareado). En cambio, en la serie de ratas sacrificadas a las 24 horas no hubo cambio significativo en los PLT ni en la DSPC en relación a su respectiva serie control (fig. 3).

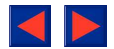


TABLA I
Gasometría arterial en ratas tratadas con PAF ev (8 µg/kg)

		PaO ₂ (mmHg)		PaCO ₂ (mmHg)		pH	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1 h	Control (n = 6)	80,2 (9,4)	82,0 (13,6)	40,4 (10,7)	28,3 (5,5)	7,4 (0,08)	7,4 (0,06)
	PAF (n = 7)	98,8 (10,7)	101,8 (17,4)	40,4 (6,5)	28,5* (6,6)	7,4 (0,06)	7,4 (0,14)
4 h	Control (n = 6)	91,6 (10,1)	81,7 (12,5)	48,9 (8,9)	33,5 (7,9)	7,3 (0,11)	7,4* (0,07)
	PAF (n = 6)	83,2 (6,6)	92,0* (4,2)	35,8 (8,6)	21,2* (8,9)	7,4 (0,08)	7,5* (0,12)
24 h	Control (n = 7)	97,8 (12,3)	106,3* (9,3)	33,8 (9,9)	26,9* (7,5)	7,4 (0,07)	7,5 (0,08)
	PAF (n = 5)	96,3 (7,5)	109,0* (4,2)	35,0 (6,0)	24,8* (3,3)	7,5 (0,07)	7,5 (0,04)

Cada valor representa la media, entre paréntesis error estándar de la media; n: número de ratas. Inicial: previo a la administración de PAF.

Final: al término del experimento.

* p < 0,05 (prueba pareada de Student comparando el valor inicial vs final).

El recuento celular total en el LBA aumentó significativamente sólo en la serie tratada con PAF y sacrificada a las 4 horas (fig. 4).

El estudio histológico del pulmón de las ratas tratadas con PAF endovenoso reveló que este mediador no provocó daños apreciables al cabo de 1 o 24 horas. Sin embargo, en la serie tratada con PAF y sacrificada a las 4 horas se observó un aumento de polimorfonucleares (PMN) intravasculares e intrapleurales, además de edema perivascular (tabla II y fig. 5).

La actividad de las enzimas P.alc. y GGT en el LBA no mostró variaciones significativas en ninguna de las series tratadas con PAF respecto a sus controles (tabla III).

Discusión

El hallazgo más relevante de este estudio es que la administración de PAF endovenoso en la rata provocó una disminución del contenido de PLT y de DSPC

al cabo de 1 y 4 horas de su administración (fig. 3). Este hecho difiere de otros estudios que demuestran aumento del surfactante pulmonar por el PAF. Esta discrepancia podría estar relacionada con las diferentes vías de administración del PAF, ya que se han observado diferencias en las respuestas fisiológicas analizadas, según la vía de administración utilizada¹, en los estudios de King et al⁸, el PAF fue administrado directamente en las vías aéreas por medio de un catéter en la bifurcación del bronquio principal. En estas condiciones se encontró un aumento de DSPC de 1,5 a 6 veces en su contenido en el LBA, en tanto que en nuestro estudio la administración de PAF se efectuó por vía endovenosa a través de la vena yugu-

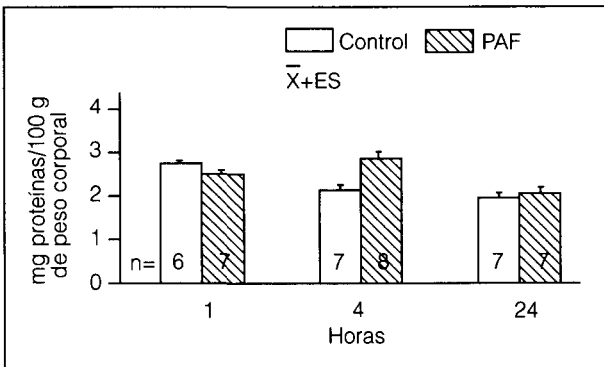


Fig. 2. Contenido de proteínas en el lavado broncoalveolar de ratas inyectadas con 8 µg de PAF/kg ev. Serie control: ratas inyectadas con NaCl 0,9 % ev. En cada columna se representa la media aritmética y su error estándar. Las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

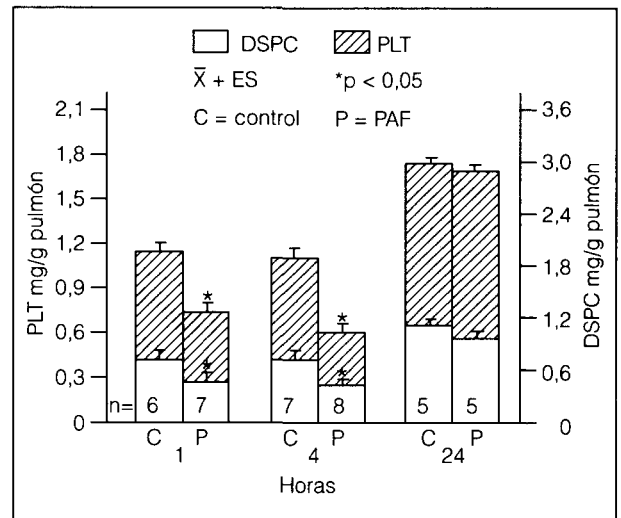


Fig. 3. Contenido de fosfolípidos totales (PLT) y de fosfatidilcolina disaturada (DSPC) en el lavado broncoalveolar (LBA) de ratas inyectadas con 8 µg de PAF/kg ev. Serie control: ratas inyectadas con NaCl 0,9 % ev. Se observa una disminución significativa del contenido de PLT y de DSPC al cabo de 1 y 4 h del PAF ev.

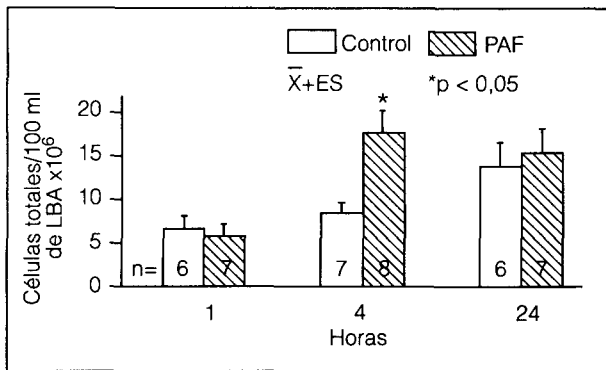


Fig. 4. Recuento celular del lavado broncoalveolar (LBA) de ratas inyectadas con 8 µg de PAF/kg ev. Serie control: ratas inyectadas con NaCl 0,9 % ev. Se observó un aumento significativo de células en el LBA al cabo de 4 h de la administración de PAF.

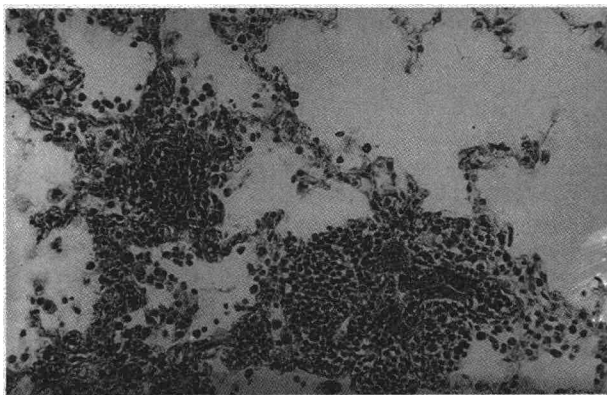


Fig. 5. Pulmón de rata sacrificada luego de 4 horas después de la inyección ev de PAF (8 µg/kg). Se observan tabiques alveolares engrosados e infiltrados inflamatorios focales intersticiales y perivascularares. Se aprecia también la presencia intraalveolar de macrófagos de citoplasma espumoso (HE 20X).

lar por infusión continua. Es importante señalar que la dosis utilizada por King et al⁸ fue de 0,003 µg de PAF por rata directamente instilada en las vías aéreas *in vivo*, en tanto que nosotros usamos 8 µg/kg de PAF por vía endovenosa. Por lo tanto, la dosis utilizada en este estudio fue considerablemente mayor que la empleada por King et al y estaba en el rango subletal para la rata¹⁷. En nuestras condiciones experimentales no nos es posible estimar la concentración que alcanzó el PAF a nivel de las células alveolares tipo II.

En nuestro estudio la dosis de 8 µg de PAF/kg se escogió realizando experimentos pilotos con dosis crecientes ev de este mediador. De los 32 animales tratados con infusión endovenosa de PAF, 11 ratas murieron con dosis que fluctuaron entre 10 y 33 µg/kg de peso corporal. Aún cuando el mecanismo por el cual el PAF provoca la muerte de animales de experimentación no está claramente dilucidado¹⁷, creemos que en nuestros animales con PAF ev la muerte probablemente se debió a una broncoconstricción e hipertensión arterial agudas.

Sin embargo, no creemos que la disminución de PLT y de DSPC en el LBA de las ratas inyectadas con

TABLA II
Histopatología pulmonar de ratas a las 4 h de la administración de 8 µg de PAF/kg ev o solución salina

Histopatología	NaCl 0,9 % n = 4	PAF 8 µg/kg n = 4
Edema alveolar	0	0
Hemorragia	0	0
PMN alveolares	1	1
Macrófagos alveolares	2	1
PMN intravasculares	1	2
Edema perivascular	1	2
Atelectasia	0	0
PMN pleurales	0	1

(a): 0-100 %, según la extensión de la lesión en el parénquima. (b): 0-4; (0: ausentes; 1: escasos; 2: infiltrados pequeños; 3: moderados; 4: intensos). (c): Polimorfonucleares intravasculares (0 = ausentes; 1 = 1-5; 2 = 5-10; 3 = 10-20; 4 > 20).

TABLA III
Actividad de fosfatasa alcalina y de gamma-glutamil-transpeptidasa en el LBA de ratas inyectadas con PAF ev (8 µg/kg) o con solución salina

Tiempo	Serie	Fosfatasa alcalina*	GGT*
1 h	Control (n = 6)	1,5 (0,6)	2,5 (0,5)
	PAF (n = 6)	1,9 (0,7)	2,9 (1,1)
4 h	Control (n = 6)	1,6 (1,2)	3,0 (0,9)
	PAF (n = 8)	1,5 (1,8)	4,4 (1,5)

* Actividad enzimática expresada en mmoles/min/ml de LBA; n: número de ratas; cada valor representa la media y entre paréntesis su error estándar.

PAF sea explicable por una menor recuperación del LBA por broncoconstricción ya que no observamos diferencias en el volumen de LBA recuperado al comparar las series controles con las tratadas con PAF.

King et al^{7,8} encontraron que el PAF producía un aumento de la secreción de DSPC, tanto en células alveolares tipo II en cultivo (5 a 6 veces su nivel basal), como en el animal entero, aplicado intratraquealmente, en niveles de 1,5 a 6 veces su valor inicial. En ambas condiciones es posible que la dosis alcanzada en el efector haya sido mucho mayor que en nuestros experimentos, en los cuales al aumentar la dosis aumentaba proporcionalmente la mortalidad. En nuestro estudio, la dosis de PAF no llegó en forma directa o local al pulmón, por lo cual es factible que este mediador sea metabolizado parcialmente por sistemas enzimáticos, tales como hidrolasas¹⁸ y/o fosfolipasas del tipo C y D¹⁹, lo cual también incidiría en su concentración final en el tejido pulmonar.

Otros factores que podrían contribuir a explicar en menor grado las diferencias en el efecto del PAF sobre el pulmón podrían ser: a) la diversidad de especies utilizadas (conejo, cobayo, rata y ratón); b) el tipo de



modelo usado en los estudios del efecto del PAF *in vitro* e *in vitro* en tejidos u órganos aislados que no necesariamente reflejan la respuesta en el animal intacto; y c) la composición del PAF que varía considerablemente en su cadena hidrocarbonada por lo que podría influir en su actividad.

En nuestros experimentos, la disminución del surfactante alveolar producido por el PAF podría deberse a vasoconstricción pulmonar, la cual podría afectar su síntesis de modo tal que la cantidad de material tensoactivo sintetizado por las células tipo II decayera notoriamente. Otra causa podría ser la obstrucción mecánica de la circulación pulmonar debida a la formación de trombos, situación que no se observó en el examen visual de los pulmones (no se observó petequias subpleurales) como tampoco en el estudio morfológico efectuado (tabla II). Estudios previos han demostrado que en el infarto pulmonar se produce una disminución del contenido de material tensoactivo²⁰, también se ha visto que la obstrucción unilateral de la circulación pulmonar, con un balón inflado en una arteria pulmonar²¹, provoca una respuesta bifásica, un aumento seguido de una disminución del contenido de surfactante.

Otra posibilidad es que se produzca liberación de otros mediadores que a su vez pudiesen causar la disminución del surfactante. Por ejemplo, el PAF podría inducir un aumento de los niveles de las enzimas destinadas a su metabolización, tales como hidrolasas o fosfolipasas C y D principalmente que eventualmente pudiesen afectar el contenido de material tensoactivo metabolizándolo parcialmente y ocasionando, por lo tanto, la disminución de su contenido en el LBA.

Es interesante destacar que el período post PAF en que se encontró la mayor disminución del surfactante (4 h), coincidió con el hallazgo de daño histológico y de aumento del recuento de células en el LBA. El daño pulmonar, aunque difuso fue leve, ya que no estuvo acompañado de un aumento de proteínas ni de la actividad de fosfatasa alcalina o de GGT en el LBA.

La actividad biológica del PAF se evidenció por una disminución importante (a más del doble), en las series de 1 y 4 horas de las plaquetas circulantes en relación a sus respectivos controles (fig. 1). Este resultado también difiere del de otros estudios que sugieren que las plaquetas de ratas no son sensibles a la acción del PAF debido a que no poseen o pierden sus receptores específicos para PAF²². Nuestros resultados sugieren que este efecto sería dependiente de la cepa de rata utilizada.

En nuestros experimentos se observa cierto grado de hiperventilación que es especialmente significativo en las ratas tratadas con PAF (tabla I). Esta hiperventilación fue evidenciada por un aumento de la PaO₂ y una disminución de la PaCO₂, con una alcalinización del pH arterial, hecho especialmente evidente al cabo de 4 horas de la administración de PAF *ev*. En nuestros experimentos esta hiperventilación parece deberse en parte a la manipulación de los animales, lo que provoca estrés y a la disminución del nivel anestésico y también en parte al PAF *ev* ya que la serie tratada

con PAF y sacrificada 4 horas después es la que presenta los cambios más significativos.

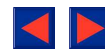
Otro hallazgo que llama la atención es el mayor contenido de PLT en el LBA tanto en las ratas controles como en las tratadas con PAF a las 24 horas de observación con un $p < 0,052$ utilizando análisis de varianza y la prueba de Newman-Keuls. Este hecho permite especular que en esta serie se agregó al menos un factor que provocó el aumento de PLT, este factor pudiera estar relacionado con el estrés más prolongado que sufrieron estos animales, el cual podría provocar liberación de sustancias biológicamente activas, entre ellas catecolaminas y corticoides, que son mediadores que aumentan el contenido de surfactante²³.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la patóloga, Dra. María Capetillo y al Dr. Javier Puente su valiosa colaboración profesional, como también al Dr. Diego Mezzano por proporcionarnos el PAF.

BIBLIOGRAFÍA

- McManus LM, Deavers SI. Platelet activating factor in pulmonary pathobiology. *Clin Chest Med* 1989; 10:107-118.
- Stenmark KR, Eyzaguirre M, Wescott JY, Henson PM, Murphy RC. Potential role of eicosanoids and PAF in the pathophysiology of bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:770-788.
- Hanahan DJ. Platelet activator factor: A biologically active phosphoglyceride. *Ann Rev Biochem* 1986; 55:483-509.
- Arnoux B, Duval D, Benveniste J. Release of platelet activator factor (PAF-acether) from alveolar macrophages by the calcium ionophore A23187 and phagocytosis. *Eur J Clin Invest* 1980; 10:437-441.
- Rylander R, Beijer L. Inhalation of endotoxin stimulates alveolar macrophage production of platelet-activating factor. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:83-86.
- Prevost MC, Cariven C, Simon MF, Chap H, Douste-Blazy L. Platelet-activating factor (PAF-acether) is released into rat pulmonary alveolar fluid as a consequence of hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 119:58-63.
- King RJ, Kumar R, Martin HM, Hanahan DJ. Platelet activating factor (PAF) stimulates the secretion of surfactant by rat type II cells with the same increment and time course as tetradecanoyl phorbol acetate (TPA). *Fed Proc* 1986; 45(A): 1530.
- King RJ, Martin H, Kumar R, Hanahan DJ. Platelet activator factor (PAF) stimulates the metabolism of intracellular and alveolar pool of disaturated phosphatidylcholine (DSPC) in rat lung when tested *in vivo*. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:376.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem* 1959; 37:911-917.
- Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959; 234:466-468.
- Mason RJ, Nullehnogon J, Clements JA. Isolation of disaturated phosphatidylcholine with osmium tetroxide. *J Lipid Res* 1976; 17:281-284.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall EJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.



13. Puente J. Gamma-glutamyltranspeptidasa y metabolismo del glutatión en glándula mamaria e hígado de rata. Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 1985.
14. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946; 164:321-329.
15. Mendoza R, Capetillo M, Lathrop ME, Oyarzún MJ. Intoxicación experimental por paraquat: Correlación entre el recuento celular diferencial del lavado broncoalveolar y la histopatología pulmonar. *Enf Respir Cir Torac* 1990; 6:4-10.
16. Zar JH. Multiple comparisons. En: *Biostatistical analysis*. 2nd ed. Prentice Hall Inc, Englewood Cliffs, New Jersey 1984; 185-205.
17. Criscuoli M, Subissi A. PAF-acether-induced death in mice: involvement of arachidonate metabolites and beta-adrenoceptors. *Br J Pharmac* 1987; 90:203-209.
18. Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Purification of human plasma platelet activating factor acetylhydrolase. *Fed Proc* 1986; 45:1.530.
19. Wilcox RW, Wykle RL, Schmitt JD, Daniel LW. The degradation of platelet-activating factor and related lipids: Susceptibility to phospholipases C and D. *Lipids* 1987; 22:800-807.
20. Moser KM. Pulmonary embolism. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115:829-852.
21. Baritussio A, Clements JA. Acute effects of pulmonary artery occlusion on the pool of alveolar surfactant. *Respir Physiol* 1981; 45:323-331.
22. Namm DH, Tadepalli AS, High JA. Species specificity of the platelet responses to 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Thromb Res* 1982; 25:341-350.
23. Perelman RH, Farrell PM, Engle MJ, Kemnitz JW. Developmental aspects of lung lipids. *Ann Rev Physiol* 1985; 47:803-822.