

Hospital de la Santa Cruz y San Pablo.
Barcelona. Servicio de Asmatología y Alergia
Servicio de Cirugía Experimental, Servicio
de Bioquímica

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LAS PROPIEDADES TENSIOACTIVAS DEL SURFACTANTE PULMONAR DEL PERRO POR LA PRODUCCION DE UN ENFISEMA EXPERIMENTAL PAPAÍNICO

B. Vicens, J. Reventós y E. Concustell

Introducción

Diferentes estudios han mostrado que diversas sustancias potencialmente polucionantes del gas alveolar son capaces de aumentar la actividad tensioactiva del surfactante pulmonar. Así por ejemplo la tensión superficial de los extractos de pulmón fue disminuida por el efecto del humo del cigarrillo (Miller y Bondurant¹ Bonduraint²) la de los lavados de pulmón por el azono (Mendenhall y cols.³). Asimismo la exposición al SO₂ del animal de laboratorio disminuyó su tensión superficial pulmonar (Kahana y Aronovitch⁴. Estos y otros resultados dieron base a que diferentes autores postularan que en la patogénesis del enfisema podría ocupar un papel importante una disminución de la tensión superficial del surfactante pulmonar ya que esta provocaría una menor tendencia, que la normal, al colapso alveolar y consecuentemente una hiper-inflabilidad pulmonar con una estabilización de los alveolos a un nivel de contenido de gas superior al normal (Bondurant², Scarpelli⁵ Morgan⁶).

Laurell y Erikson⁷ comunicaron los primeros ejemplos de la asociación de un déficit hereditario de α -1-anti-

tripsina y bronconeumopatía crónica obstructiva. Este déficit aparecía como una tara hereditaria transmitida de forma autosómica recesiva, siendo los afectados homocigotos. Erikson⁷ sugirió que el enfisema hallado frecuentemente en los homocigotos (Pi ZZ) podría deberse a una digestión proteica intrapulmonar anormal secundaria a una inhibición insuficiente de las proteasas liberadas en el pulmón por los leucocitos o macrófagos o por las bacterias o (Vidal y cols.⁸).

Multitud de estudios han enriquecido la casuística y argumentos que dieron lugar a esta teoría⁸⁻¹⁸. Por otra parte desde que Gross y cols.¹⁹ demostraron que la instilación intratraqueal de papaína en el animal de laboratorio producía enfisema y que trabajos posteriores demostraron que este enfisema experimental parece ser morfológica y funcionalmente muy similar al enfisema panlobulillar humano²⁰⁻²², se ha pensado en la existencia de una posible relación entre el enfisema experimental desarrollado en el animal de laboratorio con papaína y el enfisema humano ligado al déficit de α -1-antitripsina.

En el presente trabajo hemos estudiado las diferencias en las propiedades tensioactivas del surfactante pulmonar obtenido por un lavado de pulmón en el mismo perro antes y después de haberle provocado un enfisema panlobulillar experimental

mediante papaína para tratar de establecer si puede haber o no un nexo de unión entre los dos mecanismos patogénicos del enfisema antes involucados.

Material y Métodos

Técnica de extracción del surfactante.

Nueve perros bastardos fueron operados de lobectomía inferior derecha, bajo anestesia general, inducida con pentotal y mantenida con fluothane, a través de una intubación traqueal y un respirador. Se tuvo especial cuidado en ligar rápidamente la arteria pulmonar correspondiente, así como seccionar el bronquio y su arteria bronquiales, de forma que no pudiera producirse ingurgitación en el lóbulo que iba a ser extraído. La vena fue ligada en último lugar. Durante todo el acto quirúrgico se procuró tratar con el mayor cuidado al lóbulo, evitando toda manipulación innecesaria sobre él.

Una vez extraída la pieza, se pesó y se obtuvo una biopsia de la misma sobre ligadura. Seguidamente la pieza fue suspendida por el bronquio mediante unos puntos. A través de este último se introdujo hasta los alveolos una solución salina (ClNa) 0,15 molar tamponada con Tris/ClH 0,02 molar a pH 7,4 a razón de 3 ml por gramo de peso del lóbulo. Seguidamente se aspiró el líquido a través de los bronquios, ayudándose de vez en cuando con ligeras y cuidadosas presiones sobre la pieza. Sistemáticamente se realizaron dos lavados empleándose el mismo líquido. El aspecto del líquido obtenido varió desde un color ligeramente rosado a un color blanco grisáceo.

En el animal se cerró el bronquio del lóbulo extraído y el tórax, dejándose un drenaje durante algunas horas. A continuación se le inyectó por el tubo endotraqueal una solución de 2 mg de papaína por kg de peso del animal en 10 ml de suero fisiológico. Inmediatamente se conectó el respirador al tubo endobronquial a fin de facilitar la llegada de la solución hasta

Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda de las Fundaciones María Francisca Roviralta y Picasso-Reventós de Barcelona.



los espacios alveolares. A continuación, cada semana, durante tres semanas, se administró a dichos perros un aerosol de papaína a la dosis de 2 mg/kg de peso del animal.

Al cabo de un mes se practicó una lobectomía inferior izquierda, biopsia y lavado del lóbulo, siguiendo el protocolo antes descrito.

Estudios biofísicos y bioquímicos efectuados sobre el líquido de lavado

Una parte del líquido obtenido por lavado (fracción A) se analizó para determinar su contenido en fosfolípidos totales por el método de Beginski y cols.²³ Otra parte de la muestra se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 20 minutos, separándose luego el sobrenadante (fracción B) y el sedimento (fracción C). Se restituyó cada una de estas partes a su volumen inicial y se determinó por el mismo método analítico su concentración en fosfolípidos.

En otra parte de la muestra se realizó el estudio de las propiedades tensioactivas, mediante una balanza de Dognon y Abbribat, cual permite medir la tensión superficial (σ) de las soluciones de forma continua por el método de la lámina sumergida. Se estudió la cinética de la formación del film superficial tensioactivo, mediante la medición de las variaciones de la muestra en función del tiempo (σ -t). Una vez formado el film, se procedió al estudio de sus cualidades elásticas, por medio de la medición de las variaciones tensionales cuando era estirado. Para ello, la solución, contenida en una cápsula de Petri de 4 cm de diámetro, se colocó sobre la platina que lleva a tal efecto el pie de la balanza, y se mantuvo a 21° C mediante un dispositivo calefactor. Inmediatamente antes de empezar la medición, la solución fue agitada perfectamente para conseguir que el material tensioactivo de la misma estuviera repartido de forma completamente homogénea. A continuación se efectuó la primera medición de la σ , la cual se repitió cada minuto hasta que el film estuvo constituido, es decir la tensión superficial estabilizada. Entonces el film fue estirado mediante el descenso de la platina que sostenía la cápsula de Petri, la cual va montada sobre un tornillo micrométrico; el desplazamiento se realizó a pasos de 0,1 mm efectuándose cada vez una medición de la σ originada por el estiramiento del film, mediciones que se siguieron hasta producirse la ruptura del film.

Para caracterizar la cinética de la formación del film se midieron sobre las curvas tensión superficial-tiempo (σ -t) de cada experimento las pendientes que presentaban en los intervalos comprendidos entre 30 y 29 dinas/cm, 29 y 28 dinas/cm, y 28 y 27 dinas/cm y finalmente entre 27 y 26 dinas/cm. En la construcción gráfica de las curvas σ -t, 1 dina/cm y 1 minuto se representaron con la misma longitud.

Para caracterizar el film se midió su tensión superficial, o sea la tensión superficial final alcanzada en el proceso de su formación y su elasticidad global que nosotros hemos definido como la relación existente entre el incremento que experimenta la tensión superficial del film durante su estiramiento hasta el punto de ruptura y el recorrido vertical de la lámina que se ha precisado para alcanzar este punto de ruptura. $E = \Delta P/\Delta l$.

Se realizó el proceso estadístico de los resultados obtenidos.

Resultados

En las tablas I, II, III y IV se analizan los parámetros determinados en el estudio bioquímico y físico de las propiedades del surfactante pulmonar

TABLA I

Análisis bioquímico de la muestra. Contenido en fosfolípidos (μ g/ml)

Perro n.º	Muestra total	Sobrenadante	Sedimento
<i>Antes de la administración de la papaína</i>			
1	436,01	150,45	299,73
2	400,96	152,75	270,01
3	318,64	117,80	85,28
4	268,62	161,20	86,80
5	208,38	191,08	64,61
6	136,68	64,02	182,91
7	127,38	72,72	77,72
8	171,60	80,23	118,40
9	630,63	241,28	242,45
<i>Después de la administración de papaína</i>			
1	238,92	127,16	161,20
2	485,07	202,34	234,32
3	186,73	95,81	95,88
4	497,00	435,10	108,85
5	254,80	166,32	173,55
6	266,56	132,00	370,65
7	170,40	54,51	85,88
8	176,28	74,88	176,12
9	398,72	104,52	330,15

TABLA II

Estudio de las características tensioactivas de la muestra. Estudio de la pendiente de la curva de formación del film a diferentes intervalos de tensión superficial

Perro n.º	30-29	29-28	28-27	27-26 dinas/cm
<i>Antes de la administración de la papaína.</i>				
1	0,625	0,415	0,275	0,227
2	0,415	0,415	0,332	0,250
3	0,178	0,166	0,125	-
4	0,151	0,147	0,100	-
5	0,250	0,208	0,125	0,80
6	0,185	0,172	0,142	0,111
7	0,071	0,131	0,131	-
8	0,111	0,104	0,104	0,096
9	5,000	5,000	5,000	5,000
<i>B) Después de la administración de la papaína</i>				
1	-	-	0,077	0,055
2	0,500	0,250	0,227	0,192
3	-	-	-	-
4	0,166	0,111	0,077	-
5	0,500	0,166	0,138	0,111
6	1,000	0,500	0,200	0,160
7	0,332	0,295	0,250	0,227
8	0,625	0,227	0,262	0,250
9	0,715	0,237	0,192	0,178

TABLA III

Valor final de la tensión superficial para las curvas de formación del film antes y después de la administración de la papaína. (dinas/cm)

Perro n.º	Antes	Después
1	17,40	17,65
2	17,40	19,50
3	26,45	28,95
4	26,45	25,62
5	17,87	19,70
6	17,65	17,85
7	18,08	18,20
8	17,70	18,40
9	17,40	18,20

Anatomía patológica

En ninguna de las biopsias practicadas previamente a la inhalación de papaína, se hallaron alteraciones anatómicas compatibles con enfisema pulmonar.

Tras la administración de papaína, en todos los animales se observó macroscópicamente en el momento de la toracotomía un parénquima pulmonar eréctil, similar al del enfisema hipertrófico del lactante, y microscópicamente se observaron lesiones enfisematosas, aunque la intensidad de las mismas varió de un animal a otro, sin que mediase causa diferencial alguna. Las lesiones enfisematosas predominaron en áreas subpleurales. Acompañando al enfisema se observaron también otras lesiones histológicas como edema y hemorragia intraalveolar, atelectasia y neumonía (figs. 1 y 2).

Estudiamos la correlación existente entre el contenido en fosfolípidos del líquido de lavado antes y después de la producción del enfisema experimental papaínico y la pendiente de la curva σ -t en los intervalos ya mencionados, así como con los parámetros que caracterizan al film, tensión superficial final y elasticidad del film. Hallamos una correlación estadísticamente significativa entre el contenido en fosfolípidos de las fracciones A y B y la pendiente de la curva de formación del film antes de la producción del enfisema papaínico (30-29, 29-28 y 28-27 dinas/cm $p = 0,05$; 27-26 dinas/cm no significativo). Esta correlación no se mantuvo tras la producción del enfisema experimental. Tampoco existió correlación entre el contenido en fosfolípidos de las diferentes fracciones y los parámetros que caracterizan el film, ni antes ni después de la producción del enfisema experimental.

Estudiamos también la variación de cada uno de los parámetros estudiados con la producción del enfisema experimental mediante el test de la diferencia de medias para dos series de datos aparejados. La variación en los valores del contenido en fosfolípidos así como de la pendiente de las curvas σ -t en los intervalos examinados no fue estadísticamente significativa, mientras que la variación de los valores de los parámetros que caracterizan el film fue estadísticamente significativo para $p = 0,05$. En efecto, la tensión superficial de los films de surfactante así como su elasticidad global aumentó tras la producción del enfisema experimental.

TABLA IV

Elasticidad del film antes y después de la administración de la papaína (dinas/cm²)

Perro n.º	Antes	Después
1	1,75	7,50
2	2,90	3,00
3	5,00	8,15
4	5,43	6,90
5	3,25	5,70
6	3,05	3,65
8	4,30	4,30
9	2,10	3,75

Discusión

Como ya hemos dicho, la aparición de enfisema esencial en los sujetos con déficit de α -1-antitripsina o en el animal de laboratorio tras la instilación de papaína al interior de las vías aéreas ha sido explicada por una digestión proteica intrapulmonar anormal. De hecho el remodelado arquitectónico del pulmón enfisematoso sugiere que realmente ha habido una alteración de las proteínas del tejido conjuntivo pulmonar, a pesar de ello la mayoría de los datos bioquímicos que tenemos sobre el particular no concuerdan con este supuesto, así como por ejemplo diversos autores han hallado que el contenido en colágeno y elastina del pulmón enfisematoso es normal²⁴⁻²⁶. No obstante, como resultado de sus investigaciones Johanson y cols.²⁷ encuentran una explicación a esta discordancia. Estos autores opinan que la papaína ataca selectivamente el componente amorfo de las fibras elásticas dejando intacto su armazón microfibrilar, posteriormente a partir de este armazón se regeneran las fibras elásticas, teniendo estas fibras regeneradas una composición y estructura normales, si bien se hallan desplazadas con respecto a su posición inicial. Esta teoría unifica los resultados de las observaciones morfológicas con los resultados de las observaciones bioquímicas y debería ser extensible a la etiopatogenia del enfisema humano en los afectos de un déficit del poder antitripsico del suero.

No parece que haya ninguna duda actualmente de que el sistema surfactante no está compuesto exclusivamente por fosfolípidos, una prueba más de ello es que no hemos encontrado correlación entre el contenido en fosfolípidos de las diferentes fracciones estudiadas y los parámetros que caracterizan el film. Parece ser que en el sistema surfactante juegan un papel muy importante las lipoproteínas^{5,28-30} y es conocido también que

las sustancias proteolíticas inhiben al surfactante pulmonar (Clements³¹), no obstante no hemos encontrado en la literatura ninguna sugerencia sobre que la digestión proteica intrapulmonar normal invocada como mecanismo etiopatogénico del enfisema, pudiera actuar también afectando a las lipoproteínas del sistema surfactante disminuyendo su actividad tensioactiva y coadyuvar con ello a la patogenia de las lesiones. Tal vez se deba a que la teoría de Scarpelli

de la hiperinflabilidad alveolar como causa de enfisema invoca como causa originaria un aumento de la actividad surfactante. No obstante a nuestro modo de ver a la teoría de Scarpelli se le pueden hacer diversas objeciones.

En primer lugar no todos los autores están de acuerdo con los resultados de algunos trabajos que dieron pie a esta teoría patogénica. Así por ejemplo, Giammona y cols.³² no encontraron ningún cambio signifi-

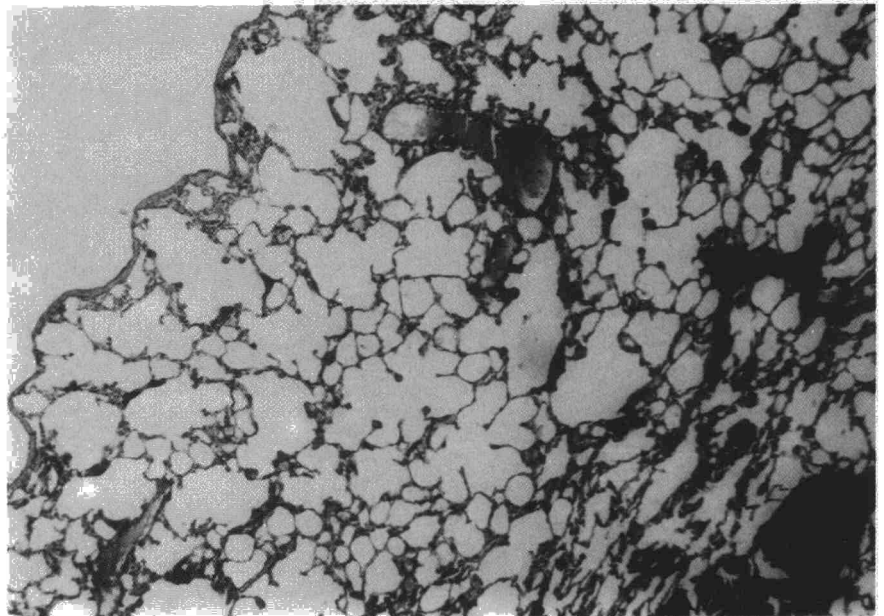


Fig. 1. Imagen a pequeño aumento del enfisema panlobulillar experimental obtenido en el perro mediante inhalación de papaína según la técnica descrita en el texto.

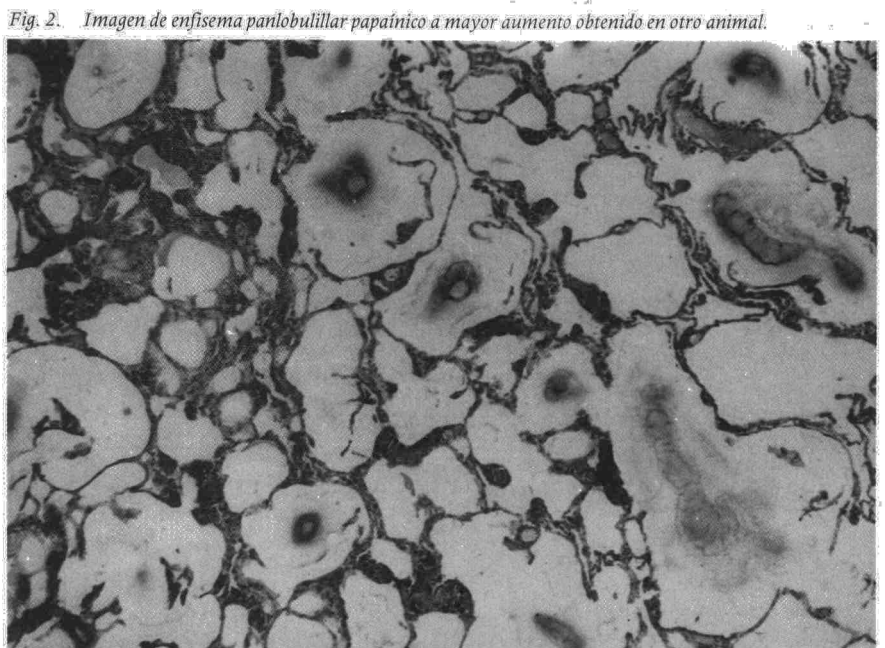


Fig. 2. Imagen de enfisema panlobulillar papaínico a mayor aumento obtenido en otro animal.

ficativo en la tensión superficial de los extractos de pulmón de perros expuestos *in vivo* al humo de cigarrillo. Por su parte Weeb y cols.³³ así como Cook y cols.³⁴ sostienen que la tensión superficial de los lavados de pulmón de los sujetos fumadores está elevada con respecto a la de los no fumadores. Finley y cols.³⁵ comentando los resultados de los anteriores autores opina que el aumento hallado por ellos de la tensión superficial, podría deberse a que en estos lavados pulmonares el surfactante se encontrara mucho menos concentrado, basándose en su observación de que el análisis químico de los lavados de pulmón de sujetos fumadores mostró un déficit de material tensioactivo en comparación con el hallado en lavados de pulmón de sujetos no fumadores. En segundo lugar algunos autores opinan que la disminución de la tensión superficial no constituye por sí sola una causa capaz de provocar hiperinflabilidad alveolar Finley y cols.³⁵ En tercer lugar el mismo Scarpelli⁵ junto con Colacicco³⁶ para unificar la teoría «anti-edema o de la tensión superficial nula» de Pattle y la teoría «anticolapso o de la tensión superficial variable» de Clements, sugiere que durante todo el ciclo respiratorio la tensión superficial alveolar es igual o próxima a cero dinas/cm con lo que difícilmente se podrá aumentar más la actividad surfactante. Por último, a nuestro modo de ver, la teoría patogénica del enfisema que invoca un estado de hiperinflabilidad pulmonar consecutivo a una disminución de la tensión superficial del surfactante pulmonar, sólo podría explicar el comienzo de la afección, dado que la destrucción del parénquima pulmonar rápidamente produciría una disminución de la actividad surfactante.

Por lo que respecta a la actividad surfactante del pulmón enfisematoso, Brown³⁷ encontró que la tensión superficial de extractos de pulmones obtenidos post-mortem de pacientes enfisematosos era normal, mientras que Kahana y cols.³⁸ en piezas similares hallaron una disminución de la actividad surfactante. Por su parte Thomas³⁹ usando muestras de pulmón con bullas enfisematosas, obtenidas en el curso de intervenciones torácicas, encontró consistentemente un aumento de la tensión superficial.

En nuestro estudio, hemos podido comprobar que tras la producción de un enfisema experimental papaínico en el perro, disminuye la actividad del sistema surfactante presente en el líquido de lavado de sus pulmones.

Ello se manifestó de dos maneras, por una parte por el aumento de la tensión superficial del film tensioactivo que se produce en la superficie del líquido de lavado y por otra por un aumento de la elasticidad del film.

Esta disminución de la actividad tensioactiva del sistema surfactante en el enfisema podría explicarse por la destrucción del parénquima pulmonar noble que se produce en esta enfermedad (Kahana y cols.³⁸), destrucción que da lugar a una disminución del número de células productoras de las sustancias tensioactivas, así como un déficit en la irrigación de muchas de las restantes por su inclusión en tejido cicatricial.

Creemos que podría teorizarse que contrariamente a lo pensado hasta el momento fuera una disminución de la actividad surfactante lo que contribuyera a la génesis del enfisema. La disminución de la actividad surfactante produciría una disminución de la distensibilidad alveolar, debido al aumento de la presión de retracción de la esfera que constituye el film de surfactante en cada alveolo, con lo que se facilitaría el colapso de los alveolos de pequeño tamaño, los cuales se vaciarían en los de gran tamaño que se hiperinflarían y finalmente se romperían. El proceso sería en cadena, a más destrucción alveolar menos actividad surfactante, y los alveolos más pequeños seguirían vaciándose en los de mayor tamaño con lo que continuaría el estallido de los más distendidos. A esto contribuiría probablemente una disminución concomitante de la capacidad estabilizadora del tamaño de los alveolos que tiene el surfactante, pues como hemos podido comprobar tras el enfisema papaínico aumenta la elasticidad del sistema surfactante, es decir que para un determinado aumento de su área la tensión superficial aumenta más que en condiciones normales, con lo que se altera la relación $2\sigma/R = P$, relación cuya constancia es la que determinó la estabilidad alveolar.

Asimismo un aumento de la tensión superficial del surfactante, según la teoría «anti-edema o de la tensión superficial nula» de Pattle tendería a producir un trastorno del balance normal de líquidos y por lo tanto una extravasación de suero al interior del alveolo. De todas formas, creemos con Scarpelli⁵ que dado que los alveolos inestables se colapsan rápidamente, no llegaría a producirse edema intraalveolar por una alteración del sistema surfactante.

Como hemos podido comprobar en

el examen histopatológico del enfisema papaínico hay frecuentemente atelectasia junto con el enfisema, por el contrario en el enfisema esencial no hay nunca atelectasias alveolares asociadas (Lynne Reid⁴⁰) Ello podría explicarse pensando que el enfisema esencial no se produce de una forma masiva y brusca como en el caso de la agresión papaínica y por ello las atelectasias alveolares son escasas, no se producen focos neumónicos y se reexpanden rápidamente.

Hay que tener presente que en análisis químico del surfactante alveolar pulmonar obtenido por micropuntura alveolar ha demostrado que no contiene albúmina ni otras proteínas plasmáticas (Reinfenrath y cols.⁴¹), y que la contaminación del surfactante por suero produce diferentes efectos según los autores, unos opinan que disminuye la tensión superficial³⁷, y otros que la aumenta^{38,42}. Según Scarpelli⁴³ no está claro si estos cambios de tensión superficial son primarios o debidos a una dilución del sistema surfactante por el fluido del edema o a su inactivación por los componentes del plasma.

En nuestro estudio hemos hallado una correlación significativa entre el contenido en fosfolípidos de las fracciones A y B y la pendiente de la curva de formación del film en los intervalos estudiados antes de la producción del enfisema y no después, asimismo tras la producción del enfisema los valores del contenido en fosfolípidos y los de la pendiente de las curvas de formación del film variaron de una manera anárquica con respecto a los valores observados antes de la producción del enfisema, ello nos sugiere que en el líquido de lavado los fosfolípidos del sistema surfactante estaban en una proporción casi constante respecto a los fosfolípidos totales antes de la producción del enfisema, lo que dejaba de ocurrir tras la producción del enfisema debido probablemente a diferencias en la contaminación plasmática del líquido de lavado de uno a otro animal tras la producción del enfisema seguramente a causa de una mayor o menor reacción inflamatoria en uno y otro animal tras la agresión papaínica. Según Reinfenrath y cols.⁴¹ en las preparaciones de surfactante alveolar pulmonar obtenidas mediante la técnica convencional de lavado a través de las vías aéreas hay siempre contaminación por albúmina y otras proteínas plasmáticas lo que puede afectar fuertemente las propiedades de superficie de los films de surfac-

tante. De ello concluyen los autores que los films naturales de surfactante en el pulmón pueden diferir sustancialmente en sus propiedades de superficie de los preparados de surfactante alveolar pulmonar obtenidos por lavado.

Por lo tanto se debe ser muy cauto al enjuiciar todas estas hipótesis basadas en observaciones de otros autores y en las nuestras propias.

Resumen

En el presente trabajo se han estudiado las propiedades tensioactivas y la composición bioquímica del surfactante pulmonar obtenido por lavado en nueve perros bastardos antes y después de haberles provocado un enfisema panlobulillar experimental mediante papaína, para tratar de establecer un nexo de unión entre dos teorías etiopatogénicas invocadas

para el enfisema, por un lado la disminución de la tensión superficial del surfactante pulmonar, y por otro la digestión proteica intrapulmonar anormal secundaria a una disminución de la inhibición de las proteasas liberadas en el pulmón por diferentes mecanismos. Los resultados sugieren que en la génesis del enfisema podrían jugar un papel tanto el aumento de la proteólisis intrapulmonar como la alteración de la actividad tensioactiva del surfactante pulmonar, probablemente dependiendo el segundo hecho del primero, si bien de forma diferente a la que inducían a pensar los estudios realizados hasta la fecha.

Summary

STUDY OF THE ALTERATIONS OF THE TENSIOACTIVE PROPERTIES OF THE PULMONARY SURFACTANT IN DOG, BY THE PRODUCTION OF A PAPAINE EMPHYSEMA

The tensoactive properties as well as the Biochemical composition of the pulmonary surfactant obtained by washlung in nine mongrel dogs, before and after papain-induced panlobulillar experimental emphysema was obtained, are studied. A relationship between the two advocated theories for the production of emphysema is tried to establish: a) The diminution of surface tension of pulmonary surfactant and b) The abnormal intrapulmonary proteic digestion secondary to a diminution of the inhibition of the proteases liberated by the lung by various mechanisms. The results suggest that in the genesis of emphysema the increase of the intrapulmonary proteolysis, as well as the alteration of the tensoactivity of the surfactant could play an important role. Possibly the latter fact is secondary to the former one, but in a different way as it is considered at present.

BIBLIOGRAFIA

1. MILLER, D. y BOBDURANT, S.: Effects of cigarette smoke on surface characteristics of lung extracts. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 85: 692, 1962.
2. BONDURANT, S.: The alveolar lining. A method of extraction; the surface tension lowering effect of cigarette smoke. *L. Clin. Invest.*, 39: 973, 1960.
3. MENDEN HALL, R.M. y STOKINGER, H.E.: Films from lung washings as a mechanism model for injury by ozone. *J. Appl. Physiol.*, 17: 28, 1962.
4. KAHANA, L.M. y ARONOVITCH, M.: Pulmonary surface tension after sulfur dioxide exposure. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 98: 311, 1968.
5. SCARPELLI, E.M.: The pulmonary surfactant system. *Clin. Notes Resp. Dis.* 9: 3, 1970.
6. MORGAN, T.E.: Pulmonary surfactant. *New Engl. J. Med.* 284: 1.185, 1971.
7. LAURELL, C.B. y ERIKSON, S.: The electrophoretic globulin-pattern of serum in alpha-1-abtitypsin deficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 15: 132, 1963.
8. VIDAL, J., CAZAL, P., ROBINET-LEVY, N. y MICHEL, F.B.: Bronchopneumopathies chroniques familiales et déficit homozigote en α -antitrypsine. *Poumon et Coeur*, 27: 79, 1971.
9. BRUN, J., KOFMAN, J., GUICHARD, A. y PERRIN-FAYOLE, M.: L'emphysème Bulleux disséminé à évolution progressivement destructive. *Poumon et Coeur*, 23: 1.049, 1967.
10. GALY, P., BRUNE, J., QUINCY, C.L., WIESENDANGER, T. y BERTHOU, J.D.: Bronchite chronique et emphysème familial, déficit en α -antitrypsine. *J. Franç. Méd. Chir. Thor.*, 22: 449, 1968.
11. HUNTER, C.C., PIERCE, J.A. y LABORDE, J.B. α 1-Antitrypsin deficiency. *J.A.M.A.*, 205: 23, 1968.
12. TALAMO, R.C., ALLEN, J.D., KAHAN, M.G. y AUSTEN K.F.: Hereditary α 1-antitrypsin deficiency. *New Engl. J. Med.*, 278: 345, 1968.

13. GUENTER, C.A., WELCH, M.H., RUSSELL, T.R., HYDE, R.M. y HAMMARSTEN, J.F.: The pattern of lung disease associated with α 1-antitrypsin deficiency. *Arch. Inter. Med.*, 122: 254, 1968.
14. TARKOFF, M.P., KUEPPERS, F. y MILLER, W.: Pulmonary emphysema and α 1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Med.* 45: 220, 1968.
15. HAAS, CH., MOUTTE, A., RUEFF, D., UZZAN, D., CHEBAT, J. e ISRAEL-ASSELAIN, R.: Recherche du déficit en α 1-antitrypsine dans 100 cas de broncho-pneumopathie chronique obstructive. *Rev. Tuberc. (Paris)*, 33: 1.063, 1969.
16. LEMERCIER, J.P., ROPARTZ, C.I., LANGLOIS, A., DURDAS, N. y DESSEAUVÉ, J.: Pathologie respiratoire et déficit héréditaire en α 1-antitrypsine. *Press. Méd.*, 77: 967, 1969.
17. HEPPEL, N.G., BLACK, L.F., GLEICH, G.J. y KUEPPERS, F.: The prevalence of α 1-antitrypsin deficiency in selected groups of patients with chronic obstructive lung disease. *Mayo Clin. Proc.*, 44: 697, 1969.
18. BRUN, J., KOFMAN, J., BIOT, N. y PERRIN-FAYOLE, M.: Les syndromes emphysémateux essentiels d'origine non bronchitique: facteurs familiaux et génétiques. *Poumon et Coeur* 27: 53, 1971.
19. GROSS, P., BABYAH, M., TOLKER, E. y KASCHAK, M.: Enzymatically produced pulmonary emphysema: A preliminary report. *J. Occup. Med.*, 6: 481, 1964.
20. PARK S.S., GOLDRING, I.P., SHIM C. S. y WILLIAMS, M.H. Jr.: Mechanical properties of the lung in experimental pulmonary emphysema. *J. Appl. Physiol.*, 26: 738, 1969.
21. MARCO, V., MERANZE, D.R., BENTIVOGLIO, I.G. y KIMBEL, P.: Papain induced experimental emphysema in dogs. *Fed. Proc.*, 28: 526, 1969.
22. PUSHPAKOM, R., HOGG, J.C., WOOLCOCK, A.J., ANGUS, A.E., MACKLEM, P.T. y THURBECK, W.M.: Experimental papain-induced emphysema in dogs. *Am. Rev. Dis.*, 102: 778, 1970.
23. BAGINSKI, E., FOA, P. y ZAK, B.: Micro-determination of inorganic phosphate in

- biological material. *Clin. Chem.* 13: 326, 1967.
24. PIERCE, J.A., JOCOTT, J.B. y HEFLEY, B.F.: Elastic properties and geometry of the lungs. *J. Clin. Invest.*, 40: 1.515, 1961.
25. FITZ PATRIK, M. y HOSPELHORN, U.D.: Studies on human pulmonary connective tissue. I. Amino acid composition of elastins isolated by alkaline digestion. *J. Lab. Clin.*, 60: 799, 1962.
26. JOHNSON, JR., y ANDREWS, F.A.: Lung scleroproteins in age and emphysema. *Chrst.* 57: 239, 1970.
27. JOHANSON, W.G. Jr., REYNOLDS, R. C., SCOTT, T.C. y PIERCE, A.K.: Connective tissue damage in emphysema, an electron microscopic study of papain-induced emphysema in rats. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 107: 589, 1973.
28. PRUITT, K.M., CHERUNG, M.J. y SPITZER H.L.: Physical characterization of pig lung surfactant lipoprotein. *Arch. Intern. Med.*, 127: 390, 1971.
29. SPITZER, J.L. y NORMAN, J.R.: The biosynthesis and turnover of surfactant lecithin and protein. *Arch. Intern. Med.*, 127: 429, 1971.
30. MARINCKOVICH, V.A. y KLEIN, R. G.: Immunologic characterization of a lung surfactant preparation. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 105: 229, 1972.
31. CLEMENTS, J.A.: Surface phenomena in relation to pulmonary function. *Physiologist*, 5: 11, 1962.
32. GIAMMONA, S.T., TOCCI, P. y WEBB, W.R.: Effects of cigarette smoke on incorporation of radioisotopically labeled palmitic Ac. into pulmonary surfactant and on surface activity of canine lung extracts. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 104: 358, 1971.
33. WEBB, W.R., COOK, W.A., LANIUS, J.W. y SHAW, R.R.: Cigarette smoke and surfactant. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 95: 244, 1967.
34. COOK, W.A. y WEBB, W.R.: Surfactant in chronic smokers. *An. Thorac. Surg.* 2: 327, 1966.
35. FINLEY, T.N. y LADMAN, A.J.: Low yield of pulmonary surfactant in cigarette smokers. *New Engl. Med.*, 286: 223, 1972.



B. VICENS Y COLS. — ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LAS PROPIEDADES TENSIOACTIVAS DEL SURFACTANTE PULMONAR DEL PERRO, POR LA PRODUCCION DE UN ENFISEMA EXPERIMENTAL PAPAINICO

36. COLACICCO, G. y SCARPELLI, E.M.: Molecular structure and biological activity of pulmonary surfactants in: «Horizons in surface science: Biological applications. L. Prince y F. D. Sears, Appleton-Century Crofts, New York 1973.
37. BROWN, E.S.: Assay of surfactant active material from emphysematous lungs. *Med. Thorac.*, 22: 70, 1965.
38. KAHANA, L.M. y THUBECK, W.M.: Surface tension and static volume-pressure hysteresis in pulmonary emphysema and other conditions. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 105: 217, 1972.
39. THOMAS, P.A.: Diagnostic lung biopsy: A correlative determination of histopathology and pulmonary surfactant. *Am. Rev. Resp. Dis.* 96: 122, 1967.
40. REID, L.: The pathology of emphysema. Capitulo 8, Lloyd-Luke. Londres, 1967.
41. REIFENRATH, R. y ZIMMERMANN, I.: Blood plas, a contamination of the lung alveolar surfactant obtained by various sampling techniques. *Rev. Physiol.*, 18: 238, 1973.
42. SAID, S.T., AVERY, M.E., DAVIS, R.K., BANERJEE, C.M. y EL-GOHARY, M.: Pulmonary surface activity in induced pulmonary edema. *J. Clin. Invest.*, 44: 458, 1965.
43. SACRPELLI, E.M.: The surfactant system of the lung Lea y Ferbigier, Filadelfia, 1968.