



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

ANÁLISIS DE LA GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA  
E HISTOPATOLOGÍA DEL PULMÓN DE RATAS EXPUESTAS  
A HIPEROXIA Y EL EFECTO PROTECTOR DE LA TAURINA  
(Modalidad: Tesis de Grado)

Ahixabeth del Valle Salazar Gómez

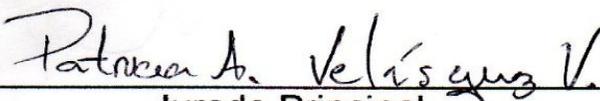
TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

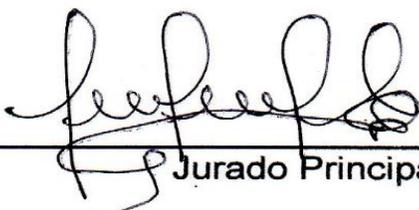
CUMANÁ, 2020

ANÁLISIS DE LA GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA  
E HISTOPATOLOGÍA DEL PULMÓN DE RATAS EXPUESTAS  
A HIPEROXIA Y EL EFECTO PROTECTOR DE LA TAURINA

APROBADO POR:

  
Asesora

  
Jurado Principal

  
Jurado Principal

## DEDICATORIA

A

Mi amado Dios, gracias por permanecer fiel en mi vida y responder siempre con más bendiciones de las que yo me pudiera imaginar, gracias, por renovar constantemente mis fuerzas y darme las oportunidades para conseguir mis objetivos más anhelados.

Mi papá Julio Salazar, mi héroe incondicional, te dedico este logro por enseñarme desde muy pequeña que el conocimiento es una fuente inagotable a nuevas posibilidades, estuviste en mi corazón y mis pensamientos siempre. Nunca dejarás de ser mi mayor ejemplo como profesional.

Mi mamá Ahixa Gómez, mi mundo, gracias por tu amor incondicional, esfuerzo, sacrificio y por todo el apoyo que me diste durante años para que yo pudiera alcanzar esta meta. Gracias por creer en mí, este logro te lo dedico con todo mi corazón.

Luis Salazar, Hexavel Salazar y Julia Salazar, mis hermanos y mi mejor equipo de aventuras. Son la bendición más bonita que he tenido durante toda mi vida, gracias por animarme para no decaer en los momentos difíciles, por a veces tener que priorizar mis necesidades antes que las de ustedes sin importarles, ni pedir algo a cambio, gracias por su gran amor, compañía y sus virtudes infinitas; todo eso hace que siempre los ame y respete cada día más. Les dedico con todo mi amor este logro.

Todos los buenos amigos que hice durante estos años, los cuales afortunadamente son muchos y fueron quienes comprendieron y vivieron cada emoción conmigo durante este camino mientras nos formábamos como profesionales. Gracias por siempre estar dispuestos a acompañarme en los momentos más felices y también por no dejarme en los más tristes.

## **AGRADECIMIENTOS**

A

Mi asesora la Dra. Luz Marina Rojas por aceptarme y permitirme integrarme en su proyecto de investigación. Gracias por su profesionalismo, disponibilidad, apoyo, capacidad y paciencia para poder culminar esta meta. Compartir con usted durante el desarrollo de este trabajo fue una de las experiencias más importante y enriquecedora para mi formación profesional; estoy feliz de haberla conocido y que sea parte de este logro.

El profesor Ángel Camacho por su colaboración durante la realización de este trabajo, por guiarme con sus acertados consejos y conocimientos los cuales fueron de gran ayuda para alcanzar los objetivos perseguidos.

El Dr. Edgar zapata por el apoyo que prestó para que se llevara a cabo algunas de las actividades que comprendía este estudio, así mismo, también agradezco al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA-UDO) y a todo su personal, quienes estuvieron siempre disponible para que todo se desarrollara de la mejor manera.

# INDICE

<b>DEDICATORIA</b> -----	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> -----	<b>iii</b>
<b>INDICE</b> -----	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> -----	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b> -----	<b>vii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> -----	<b>1</b>
<b>METODOLOGÍA</b> -----	<b>6</b>
Muestra poblacional-----	6
Inducción a la hiperoxia-----	6
Determinación de la actividad enzimática-----	7
Determinación de los niveles de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa-----	7
Análisis histológicos-----	8
Análisis estadístico-----	8
<b>RESULTADOS</b> -----	<b>11</b>
Actividad enzimática de la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa-----	11
Análisis histológico-----	12
<b>DISCUSIÓN</b> -----	<b>27</b>
<b>CONCLUSIONES</b> -----	<b>36</b>
<b>HOJAS DE METADATOS</b> -----	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

- Figura 1.** Actividad enzimática de la G6PDH en ratas de los grupos control, hiperoxia e hiperoxia-aurina en los días postnatales P6, P9 y P12. Los superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos. N=6.----- 11
- Figura 2.** Fotomicrografías panorámicas de alvéolos del pulmón de ratas del grupo control de los días P6 y P12. A: alvéolos; SA: saco alveolar; TA: tabique inter-alveolar; Br: bronquio; Ar: arteria. ----- 13
- Figura 3.** Fotomicrografías de alvéolos del pulmón de ratas del grupo control. A: alvéolos; TA: tabique inter-alveolar; S: célula septal; flecha curva continua: neumocitos tipo I; flecha blanca: neumocitos tipo II; C: capilar; E: eritrocito. ----- 14
- Figura 4.** Fotomicrografías panorámicas de alvéolos del pulmón de ratas del grupo hiperoxia de los días P6 y P12. Se nota modificación estructural del tejido. A: alvéolos; TA: tabique inter-alveolar; círculo y flecha punteada: ruptura de tabique inter-alveolar Ar: arteria; Br: bronquio; estrella blanca: edema; flecha negra: derrame eritrocitario. - 15
- Figura 5.** Fotomicrografías de alvéolos del pulmón de ratas del grupo hiperoxia de los días P6 y P12. A: alvéolos; TA: tabique inter-alveolar; flecha curva continua: neumocito tipo I; C: capilar normal; estrella negra: capilar edematizado; estrella blanca: capilar poco desarrollado; flecha blanca: neumocito tipo II normal; flecha blanca punteada: neumocito tipo II atrofiado; S: células septales. ----- 16
- Figura 6.** Fotomicrografías panorámicas de alvéolos del pulmón de ratas del grupo hiperoxia-aurina de los días P6 y P12. A: alvéolos; SA: saco alveolar; TA: tabique inter-alveolar; Ar: arteria.----- 17
- Figura 7.** Fotomicrografías de alvéolos del pulmón de ratas del grupo hiperoxia-aurina. A: alvéolos; TA: tabique inter-alveolar; SA: saco alveolar; S: célula septal; flecha curva continua: neumocitos tipo I; flecha blanca: neumocitos tipo II; C: capilar normal; estrella blanca: capilares superficiales pequeños. ----- 18
- Figura 8.** Detalle de arteria del pulmón de ratas del grupo control del día postnatal P6. A: alvéolos; Ar: arteria; En: endotelio; flecha curva continua: neumocitos tipo I; flecha blanca: neumocitos tipo II; C: capilar; flecha negra punteada: fibroblastos. ----- 19
- Figura 9.** Detalle de arteria cercana a un bronquiolo del pulmón de ratas del grupo hiperoxia del día postnatal P12. El tejido conjuntivo se observa edematizado. Ar: arteria; En: endotelio; Ed: edema; TC: tejido conjuntivo; flecha curva continua: neumocitos tipo I; flecha negra punteada: fibroblastos; C: capilar. ----- 20
- Figura 10.** Detalle de arteria del pulmón de ratas del grupo hiperoxia-aurina del día postnatal P6. Se observa una buena integridad estructural en el tejido. A: alvéolos; Ar: arteria; flecha negra continua: fibroblastos; TC: tejido conectivo. ----- 21
- Figura 11.** Detalle de bronquiolo cercano a una arteria del pulmón de ratas del grupo control del día postnatal P6. Br: bronquiolo; flecha negra continua: células de Clara;

flecha negra punteada: células ciliadas; flecha blanca: neumocito tipo II; Ar: arteria.-- 22

**Figura 12.** Detalle de bronquiolo del pulmón de ratas del grupo control del día postnatal P12. Se nota la presencia de moco en el borde luminal del bronquiolo. BR: bronquiolo respiratorio; BT: bronquiolo terminal; M: moco; flecha negra continua: células de Clara; flecha negra punteada: célula ciliada. ----- 23

**Figura 13.** Detalle de bronquiolo del pulmón de ratas del grupo hiperoxia del día postnatal P12. Se nota la presencia de células desprendidas en el lumen. BT: bronquiolo terminal; ML: músculo liso; flecha negra continua: células de Clara; flecha negra punteada: cilios; C: capilar; cabeza de flecha blanca: células desprendidas. ----- 24

**Figura 14.** Detalle de bronquiolo del pulmón de ratas del grupo hiperoxia del día postnatal P12. Se observa la pérdida casi total de las células del epitelio bronquiolar. Br: bronquiolo; ML: músculo liso; Flecha curva continua: neumocitos tipo I; A: alvéolos; TA: tabique interalveolar. ----- 25

**Figura 15.** Detalle de bronquiolo del pulmón de ratas del grupo hiperoxia-aurina del día postnatal P12. Se observa la integridad normal estructural del epitelio. Br: bronquiolo; flecha negra: células de Clara; Ar: arteria; A: alvéolo. ----- 26

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto protector de la taurina contra el daño oxidativo y estructural en el pulmón de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia, 4 grupos de animales constituidos por 10 crías y su madre, fueron colocados en una incubadora a  $80 \pm 3\%$  de  $O_2$  desde el primer día de nacimiento y hasta los días postnatales P6, P9 y P12. A dos de los grupos se le suministró una solución de taurina al 3% (240  $\mu\text{mol/l}$ ) como agua de beber (grupo hiperoxia-taurina) y a los otros dos grupos se le colocó solo agua (grupo hiperoxia). Del mismo modo, se tomaron como control cuatro grupos similar a los de hiperoxia, pero expuestos a normoxia (21%  $O_2$ ). Después del sacrificio se tomaron muestras del pulmón tanto para el análisis bioquímico como histológico. Bioquímicamente, se determinó la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) mediante técnicas espectrofotométricas. No obstante, la estructura del pulmón se analizó mediante cortes semifinos (0,7 $\mu\text{m}$ ) de muestras incluidas en resina epóxica. Los resultados muestran un aumento de la actividad enzimática de la G6PDH en el día P6 del grupo hiperoxia. Esto sucede posiblemente, por la necesidad de combatir las ERO mediante la producción de la enzima NADPH necesaria para catalizar las diferentes reacciones enzimáticas. El tratamiento con taurina condujo a la disminución de la G6PDH ese mismo día postnatal, probablemente como una reacción a la actividad antioxidante del aminoácido. Histológicamente en el grupo hiperoxia se observó alteraciones estructurales con respecto al grupo control. Entre los daños figuran la ruptura de los tabiques alveolares, hemorragia alveolar por daño capilar, edema intersticial arterial y desprendimiento celular en el epitelio bronquiolar que pueden alterar la homeostasis pulmonar. Estos daños fueron posiblemente provocados por la lipoperoxidación de las membranas celulares debido al estrés oxidativo. En el grupo hiperoxia-taurina el pulmón se observó más protegido estructuralmente lo que conlleva a pensar que es menos susceptible a enfermedades producidas por estrés oxidativo. Los resultados posicionan la taurina como un posible agente antioxidante contra el daño pulmonar causado por la hiperoxia postnatal en el prematuro.

## INTRODUCCIÓN

Las células que constituyen los tejidos del cuerpo humano necesitan de un suministro continuo de oxígeno para poder desarrollar sus funciones. Por lo tanto, los individuos se encuentran en la necesidad de contar con el sistema respiratorio, el cual proporciona de manera eficiente el intercambio de gases para la administración adecuada de este elemento por todo el organismo. En los mamíferos este sistema se encuentra constituido por el diafragma, los músculos del tórax, la nariz, la boca, la faringe, la tráquea, el árbol bronquial y los pulmones (Pérez y Fernández, 2000).

Para optimizar sus funciones, el sistema respiratorio se vincula ampliamente con el sistema circulatorio. De esta forma, los glóbulos rojos captan el oxígeno del aire, para ser distribuido por los capilares sanguíneos y abastecer a cada una de las células de los distintos tejidos. A su vez, el dióxido de carbono que surge tras el aprovechamiento del oxígeno junto con la glucosa dentro de las mitocondrias, regresa hacia los pulmones luego de ser recogido por la sangre y transportado por las venas hasta el corazón; esto con la finalidad de ser removido del organismo (Thibodeau y Patton, 2000).

Aunque el oxígeno es un elemento necesario para que se desarrolle la vida, desde el siglo XVIII se conoce como una sustancia tóxica por su gran poder oxidante (Saugstad, 1999). Sin embargo, en niños prematuros la oxigenoterapia es utilizada para evitar la hipoxia en los tejidos (Alda *et al.*, 2000). En el intento de compensar la deficiencia de oxígeno, es muy frecuente que se genere un estado de hiperoxia (altas concentraciones de oxígeno) que surge por el uso prolongado de la oxigenoterapia (Jobe y Bancalari, 2001; Baraldi y Filippone, 2007), de este modo se propicia la formación de lesiones pulmonares, convirtiéndose en una de las complicaciones más comunes que se produce en los prematuros. Es por esto que el oxígeno debe ser monitorizado, medido y vigilado para evitar los efectos adversos que puede generar al ser utilizado como medicamento (Weinberger *et al.*, 2002). Cuando el pulmón se expone a hiperoxia, se genera una al

reactividad de este elemento en el organismo mediante una serie de procesos metabólicos, formándose lo que se denomina especies reactivas de oxígeno (ERO), radicales libres o productos intermedios reactivos; quienes pueden ser perjudicial para los tejidos (Auten y Davis, 2009).

Los radicales libres surgen cuando cualquier especie química presenta en su estructura atómica un electrón desapareado o impar, de esta forma son capaces de existir independientemente. Se caracterizan porque esta condición los hace altamente reactivos y al presentar una vida media muy corta, es común que actúen cercano al sitio donde se generan (Cheesman y Slater, 1998; Vento y Viña, 2009). Existe un término donde aquellas especies no radicálicas, son capaces de contribuir y participar en procesos prooxidantes, denominándose ERO; este grupo está constituido por el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radicales hidroxilos ( $OH^\bullet$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), entre otros (Dorada y Revilla, 2000).

La formación endógena de radicales libres y las ERO es un proceso natural, por lo tanto, el cuerpo se encuentra dotado de mecanismos de defensa antioxidante que permiten eliminar constantemente las concentraciones de estos compuestos, evitando que los mismos actúen sobre macromoléculas y generen daños estructurales, funcionales y genéticos (Nagato *et al.*, 2012). Cuando existe un desbalance en la generación de ERO y de los mecanismos de defensa antioxidante, se produce el estrés oxidativo (Maltepe y Saugstad, 2009). Este proceso se encuentra ampliamente vinculado a su formación cuando hay una excesiva producción de especies reactivas y por la actividad deficiente o biosíntesis disminuida de mecanismos antioxidantes endógenos (Hernández *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2015).

El estrés oxidativo es conocido como un causante de daño celular ya que se asocia con muchos síndromes y patologías, dado por su capacidad de producir alteraciones funcionales y estructurales de cualquier sistema especializado, siendo la peroxidación lipídica la consecuencia más importante que causa a nivel de los tejidos (Bertrand, 1985; Fink, 2002). Su mecanismo de acción se caracteriza en el daño directo a las estructuras

ricas en ácidos grasos poliinsaturados, éstos son componentes esenciales de las membranas celulares e indispensables para su funcionamiento adecuado; sin embargo, al ser vulnerables al ataque oxidativo, la permeabilidad de la membrana puede verse afectada, generando edema y muerte celular (Reylli y Burkley, 1990; Jerlick *et al.*, 2000).

Los sistemas antioxidantes se constituyen de moléculas cuya función se centra en generar protección; evitando o retardando la oxidación de biomoléculas como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Céspedes y Sánchez, 2014). Se caracterizan porque presentan la particularidad de ceder fácilmente electrones, generando la oxidación y transformación de los radicales libres y ERO, gracias a la afinidad que presenta y la facilidad que tienen para interactuar en medios hidrofóbicos e hidrofílicos; sin embargo, no todos los antioxidantes actúan de esta manera, algunos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos permitiendo la reacción con los radicales libres (Moreno *et al.*, 2001; Mayor, 2010).

Los sistemas antioxidantes constituyen un complejo de defensa primario, clasificado en enzimático y no enzimático; así mismo, este último se clasifica en endógeno (se encuentra en el organismo y es sintetizado por sus células) y exógeno (ingresa a través de la dieta) (Carmeliet *et al.*, 1996; Patiño, 2006; O'Reilly *et al.*, 2008). Dentro de los elementos enzimáticos se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión transferasa (GST). Los elementos no enzimáticos endógenos se constituyen de: glutatión (GSH), taurina, coenzima Q, ácido úrico, entre otros. Dentro de los elementos no enzimáticos exógenos, se encuentra las vitaminas C y E, y las metalotioneínas (Singh y Tuteja, 2010).

La taurina, es un  $\beta$ -aminoácido semi-esencial se encuentra presente en altas concentraciones en la mayoría de las células de todas las especies animales. Se sintetiza en las células a partir de la metionina en una ruta metabólica donde intervienen una serie de moléculas azufradas, formando reacciones de desmetilación, descarboxilación y

oxidación (Lourenco y Camilo, 2002). En su estructura química se puede notar que carece del grupo carboxilo típico de otros aminoácidos, pero contiene un grupo sulfonato. La ruta principal para la biosíntesis de la taurina, es a partir de la metionina y la cisteína a través de la descarboxilasa del ácido cisteinesulfínico (CSD), y generalmente requiere la oxidación de la hipotaurina en taurina (Han *et al.*, 2010).

La taurina es sin duda, una de las sustancias más esenciales del cuerpo, aunque es uno de los pocos aminoácidos que no se usa en la síntesis de proteínas, esta razón lo condiciona a que muy seguido se conozca como un aminoácido "no esencial". La capacidad biosintética de los humanos para producir taurina es limitada en los recién nacidos, también disminuye con el envejecimiento y en algunas etapas patológicas (trauma, sepsis). En estas situaciones, es probable que la dieta sea una fuente importante de taurina (Menx *et al.*, 2004). Entre sus funciones destaca, la regulación del volumen celular, proporciona un sustrato para la formación de sales biliares y desempeña un papel en la modulación de la concentración de calcio libre intracelular, así mismo, se le atribuye la propiedad de ser un buen protector celular (Guz y Lortlar, 2007). En el sistema inmune desempeña un rol antiinflamatorio propiciando la disminución de la inflamación pulmonar que es causada por el estrés oxidativo (Bhavsar *et al.*, 2009 y Jeon *et al.*, 2009).

Por otra parte, para que se lleven a cabo algunas respuestas celulares ante agentes oxidantes es necesaria la presencia de enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Mehta *et al.*, 2000). El mantenimiento frecuente de los eritrocitos ante el estrés oxidativo depende en gran parte de la acción de esta enzima, ya que proporciona nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), molécula precursora de procesos importantes en el organismo en la vía metabólica de las pentosas fosfato (Danzig *et al.*, 2011). La producción de NADPH es de gran importancia, esta coenzima actúa donando electrones en algunas reacciones enzimáticas y es un cofactor indispensable en el metabolismo del glutatión, permitiendo su transformación de glutatión oxidado a glutatión reducido. Los eritrocitos se encuentran

dotados de una cantidad de glutatión reducido que actúa frente al daño oxidativo generado por productos oxidantes como el  $H_2O_2$  (Frank, 2005; Cappellini y Fiorelli, 2008). La supervivencia de los glóbulos rojos puede verse comprometida si se genera un fallo en la disponibilidad o actividad de la G6PDH, afectando la producción de NADPH, promoviendo la hipoxia en los pulmones y los tejidos, causando así la destrucción de los eritrocitos que se da por el estrés oxidativo (Acosta *et al.*, 2003).

Se han realizado numerosos estudios analizando el estrés oxidativo causado por la hiperoxia en diferentes órganos de ratas recién nacidas y el efecto antioxidante de la taurina. Los órganos estudiados son el cerebelo (Maniscalchi, 2015; Rojas, 2015), el cerebro (González, 2015; Carvajal, 2015); riñón (Márquez y Vázquez, 2017), corazón (Caraballo y Calzadilla, 2016). Los resultados han mostrado que la hiperoxia causa altos niveles de peroxidación lipídica y un desbalance del sistema antioxidante. No obstante, se ha demostrado que la taurina puede proteger estos tejidos del efecto dañino de la hiperoxia postnatal. Por ésta razón, con el presente estudio se pretende analizar el impacto de la hiperoxia sobre la enzima G6PDH y la estructura del pulmón de ratas recién nacidas y el posible efecto antioxidante de la taurina.

## METODOLOGÍA

### Muestra poblacional

Para este estudio se utilizaron ratas de la especie *Rattus norvegicus*, cepa Sprague-Dawley, proveniente del bioterio de la Universidad de los Andes. Una vez trasladadas al laboratorio de mantenimiento de ratas del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA), estas se colocaron en jaulas de acero inoxidable, durante 3 días para que se condicionaran a su nuevo ambiente (21°C y ciclos de 12 horas luz-oscuridad controlados artificialmente). Las jaulas fueron organizadas con 1 macho y 2 hembras para su apareamiento, proceso que duró 5 días. Una vez finalizado el período de apareamiento, las ratas fueron separadas para esperar que transcurriera el período de gestación que duraba 21 días. Los animales fueron alimentados con ratarina comercial y agua filtrada.

### Inducción a la hiperoxia

Desde el día de su nacimiento hasta los días 6, 9 y 12 de desarrollo postnatal (P6, P9 y P12) las ratas fueron expuestas a  $80 \pm 3\%$  de oxígeno (hiperoxia) diariamente con tres interrupciones por día de 30 minutos, con la intención de exponerlas a 21% de oxígeno (normóxia) y reducir un poco el estrés al que son sometidas las ratas durante la hiperoxia, según el protocolo sugerido por Lachapelle *et al.* (1999). El nivel de oxígeno monitoreo utilizando un analizador de oxígeno ambiental (7820 Oxygen Monitoring System), el cual estaba conectado a la incubadora y era calibrado diariamente.

La hiperoxia se aplicó en una incubadora elaborada de plexiglás transparente y dividida en 4 secciones donde se colocaron por separado, 4 grupos de ratas. Cada grupo estaba compuesto por 8 a 10 crías, con sus respectivas madres. A dos grupos, los cuales fueron identificados como hiperoxia-aurina (HT), se les añadió aurina al 3%, en el agua de beber. La madre ingería la aurina del agua y se la transfería a las crías a través de la leche materna. A los dos grupos restantes no se les colocó aurina en el agua, y estaban

identificados como hiperoxia (H). En una incubadora, pero sin oxígeno, fueron mantenidos los 4 grupos de ratas controles bajo condiciones similares que los expuestos a hiperoxia, es decir, con taurina y sin taurina en el agua de beber de la madre, el primero identificado como control-taurina (CT) y el segundo como control (C).

Con el fin de evitar las complicaciones pulmonares que suelen presentar las ratas adultas expuesta a hiperoxia, las madres fueron alternadas cada día con las madres de las crías controles, que se encontraban en un ambiente normóxico (Lachapelle *et al.*, 1999). Cumplido el período de hiperoxia, 5 o 6 individuos fueron pesados, para luego ser sacrificados por decapitación y rápidamente disectados para obtener el pulmón. Parte del tejido se empleó para los análisis histológicos y el resto fue congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior procesamiento bioquímico.

### **Determinación de la actividad enzimática**

Para este análisis se utilizaron de 4 a 5 especímenes de cada tratamiento y de cada período experimental. Para la determinación de la actividad enzimática se usó el protocolo propuesto por Zapata-Vivenes y Nusetti (2007). Para esto, se homogenizó 0,1 g en una relación 1:8 m/v del buffer de extracción. El buffer de extracción consistía en Tris-HCl (hidroximetilmetilamina) 20 mmol/l pH 7,6 conteniendo ácido etilendiaminotetracetato (EDTA) 1 mmol/l, ditioneitol (DTT) 4 mmol/l, sacarosa 500 mmol/l, KCl 150 mmol/l y ácido fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) 1 mmol/l en alcohol isopropílico. El extracto resultante se centrifugó inicialmente a  $2000 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrifuga (Eppendorf 5702 R) refrigerada. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a  $1000 \times g$  durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El volumen final colectado fue usado como fuente de enzimas.

### **Determinación de los niveles de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa**

La velocidad de reacción se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 340 nm como resultado de la reducción de  $\text{NADP}^{+}$ . Para tal fin, se añadió en la cubeta de reacción: 800  $\mu\text{l}$  de imidazol-HCl 50 mmol/l, a pH 7,5; 20  $\mu\text{l}$   $\text{MgSO}_4$  5 mol/l; 50  $\mu\text{l}$

NADP<sup>+</sup> 0,05 mol/l, 100 µl de extracto.

La actividad de la enzima se determinó en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S, bajo condiciones de temperatura controlada a  $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Las estimaciones de pendiente y actividad enzimática específica se realizaron en el programa UV Winlab Lambda 25, bajo ambiente Windows.

### **Análisis histológicos**

Para el análisis histológico una porción del pulmón se cortó en pequeños fragmentos y se fijó de inmediato durante 90 minutos en glutaraldehído al 2,5%, luego se sometió a dos lavados de 10 minutos con buffer fosfato. Seguidamente se procedió a la post-fijación en OsO<sub>4</sub> (1%) por 90 minutos, para después realizar dos lavados de 10 minutos con agua destilada. Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70 hasta 100%) por 20 minutos cada uno. Para la infiltración se sustituyó el etanol por óxido de propileno (30 minutos), después se utilizó una mezcla 3:1 de óxido de propileno, seguido de una mezcla 1:1 de óxido de propileno, ambas mezclas se dejaron actuar por 30 minutos y luego se dejaron toda la noche en una mezcla de epón puro. Finalmente, las muestras fueron incluidas en epón, en moldes de silicona y polimerizadas en una estufa a 60°C por 48 horas (Lewis y Knight, 1990).

Una vez obtenidos los bloques con las muestras se realizaron cortes semifinos (0,7 µm) en un ultramicrotomo Leica UM-UC6 con cuchilla de diamante; estos se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se examinaron en el fotomicroscopio Axioskop FL-40 marca Zeiss, con cámara digital incorporada, y la ayuda de un software analizador de imágenes AxioVision LE CannonModul, Carl Zeiss, Germany (Rojas *et al.*, 2013).

### **Análisis estadístico**

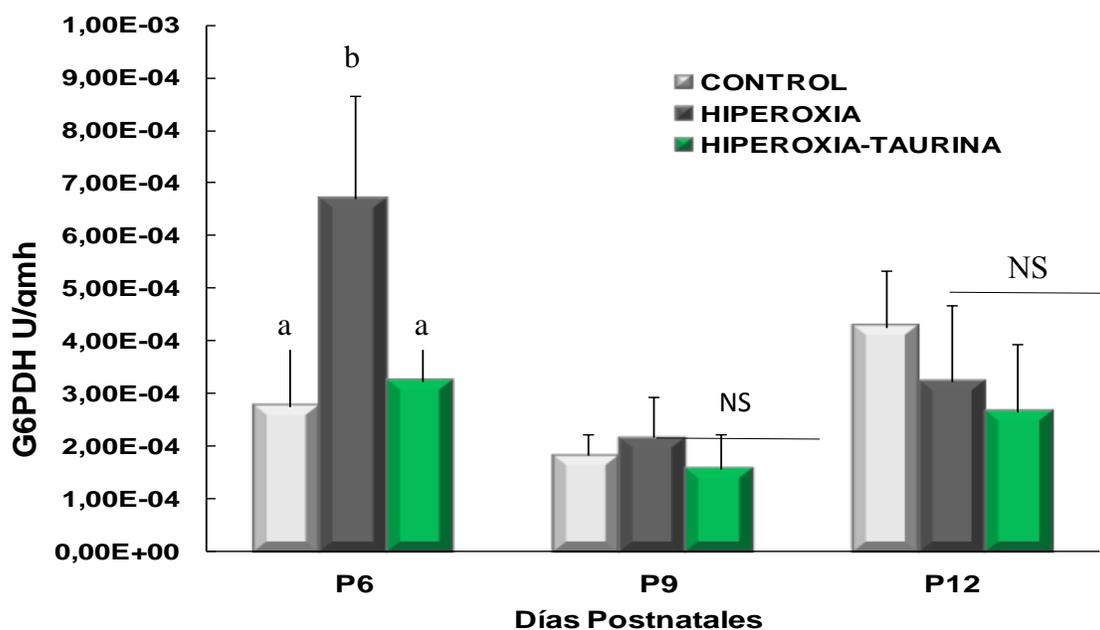
Los resultados obtenidos en este trabajo fueron sometidos a un estudio estadístico de confiabilidad del 95%, utilizando un análisis de varianza multifactorial (ANOVA). Para el contraste *a posteriori* se utilizó la prueba Duncan (Sokal y Rohlf, 1989). Se empleó el

paquete estadístico Statgrafic Plus, versión 5.1 en ambiente Windows, cuyos resultados se expresaron en gráficas de barras (medias y desviación estándar) para comparar los niveles de G6PDH entre los distintos grupos estudiados (control, hiperoxia e hiperoxia – taurina).

## RESULTADOS

### Actividad enzimática de la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

Los resultados de la concentración de G6PDH en el pulmón de ratas Sprague-Dawley de los grupos control, hiperoxia e hiperoxia- taurina se reflejan en la figura 1.



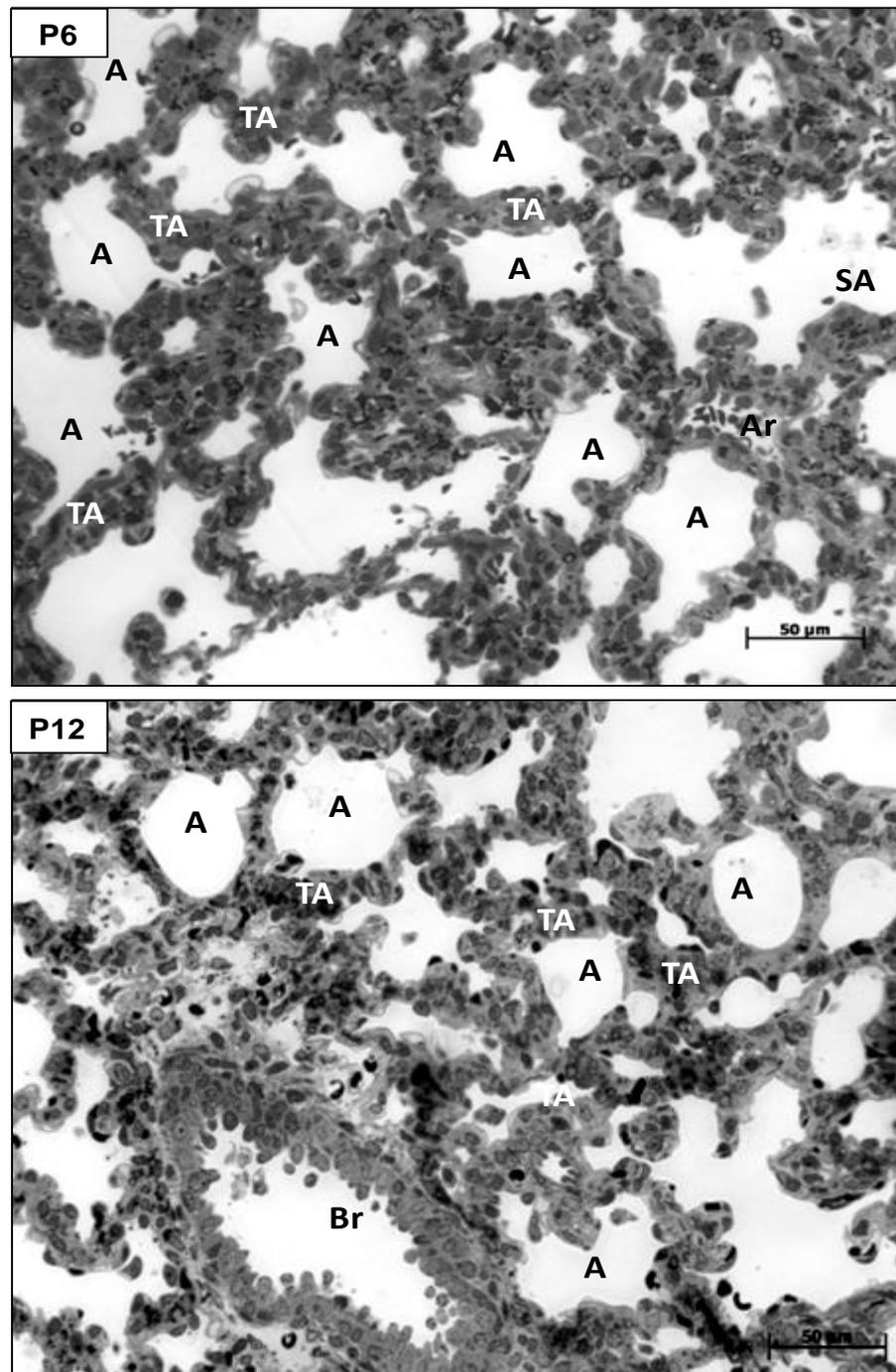
**Figura 1.** Actividad enzimática de la G6PDH en ratas de los grupos control, hiperoxia e hiperoxia-taurina en los días postnatales P6, P9 y P12. Los superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos.  $N=6$ .

En el día postnatal P6 la actividad enzimática media de la G6PDH fue más alta en el grupo hiperoxia ( $6,70E-04 \pm 1,97E-04$  U/ml) comparada con los grupos control ( $2,76E-04 \pm 1,4E-04$  U/ml) e hiperoxia-taurina ( $3,23E-04 \pm 1,16E-04$  U/ml) ( $P < 0,05$ ). En el día P9 no se observaron diferencias entre los grupos control ( $1,82E-04 \pm 4,17E-05$  U/ml), hiperoxia ( $2,16E-04 \pm 7,83E-05$  U/ml) e hiperoxia-taurina ( $1,56E-04 \pm 6,69E-05$  U/ml) ( $P > 0,05$ ). En el día P12 al igual que en P9 no se observaron diferencias entre los grupos control ( $4,25E-04 \pm 1,09E-04$  U/ml), hiperoxia ( $3,23E-04 \pm 1,44E-04$  U/ml) e hiperoxia-taurina ( $2,65E-04 \pm 1,29E-04$  U/ml) ( $P > 0,05$ ).

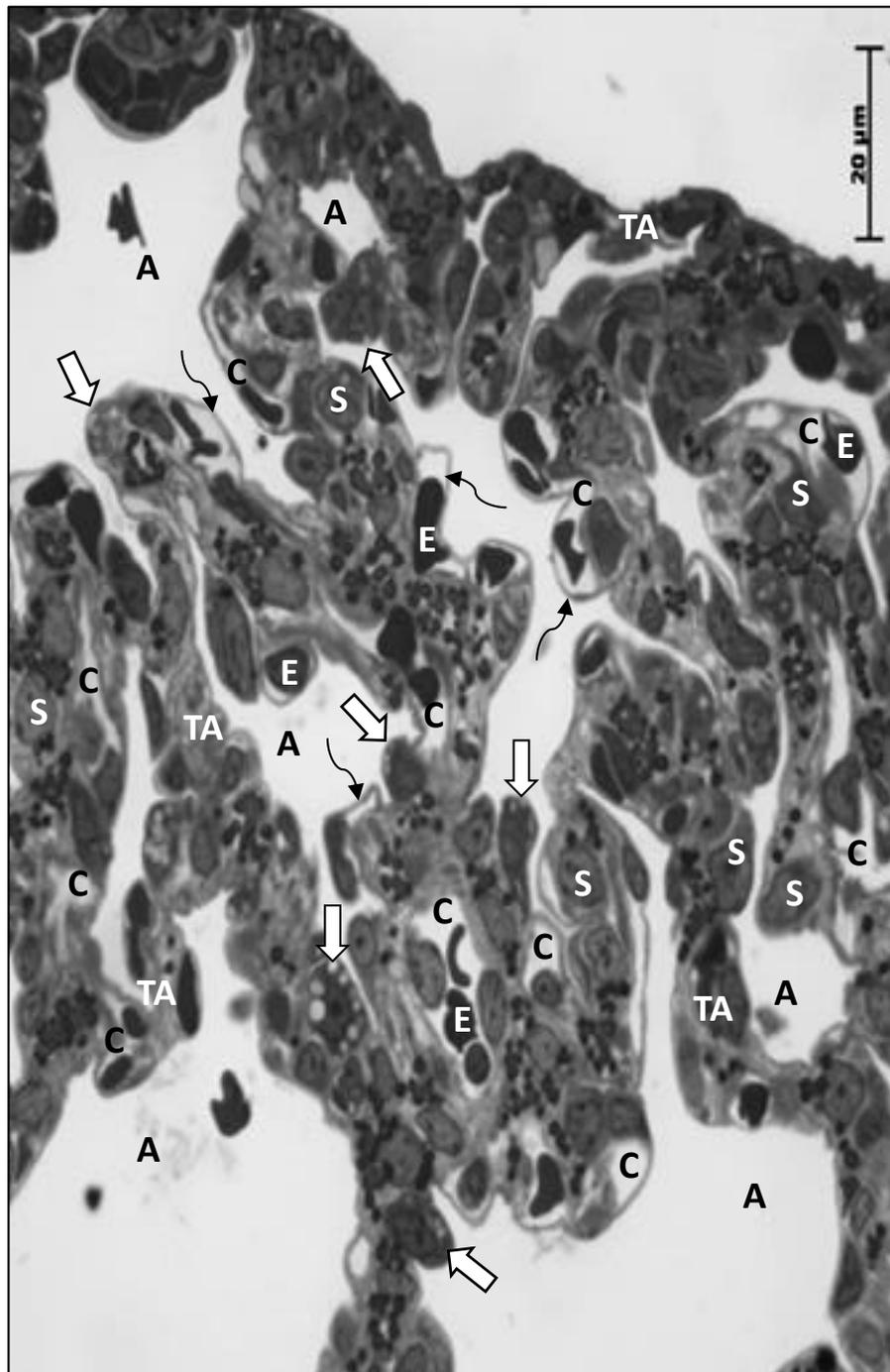
### **Análisis histológico**

El pulmón de las ratas del control presentó morfología similar en P6 y P12 (Figura 2). Se caracterizó por contener alvéolos que son espacios bien definidos formados por septos llamados tabiques inter-alveolares de un grosor variable (Figura 3). Este tabique está formado por tejido conectivo que le da su consistencia y soporte a las células que lo conforman (células septales) y a la red de capilares alveolares que ocupan la mayor parte de la superficie del tabique inter-alveolar (Figura 3). En el epitelio alveolar se distinguen dos tipos de células, las células epiteliales superficiales planas o neumocitos tipo I y las células alveolares grandes o neumocitos tipo II (Figura 3). Los neumocitos tipo I son las células más abundantes de los alvéolos y revisten casi la totalidad de la superficie alveolar. Conjuntamente con el endotelio de los capilares superficiales de los tabiques, estas células conforman la barrera hemato-alveolar. Los neumocitos tipo II son más escasos y son células redondeadas que pueden sobresalir en los espacios alveolares, se caracterizan por presentar un núcleo grande y citoplasma vacuolado (Figura 3).

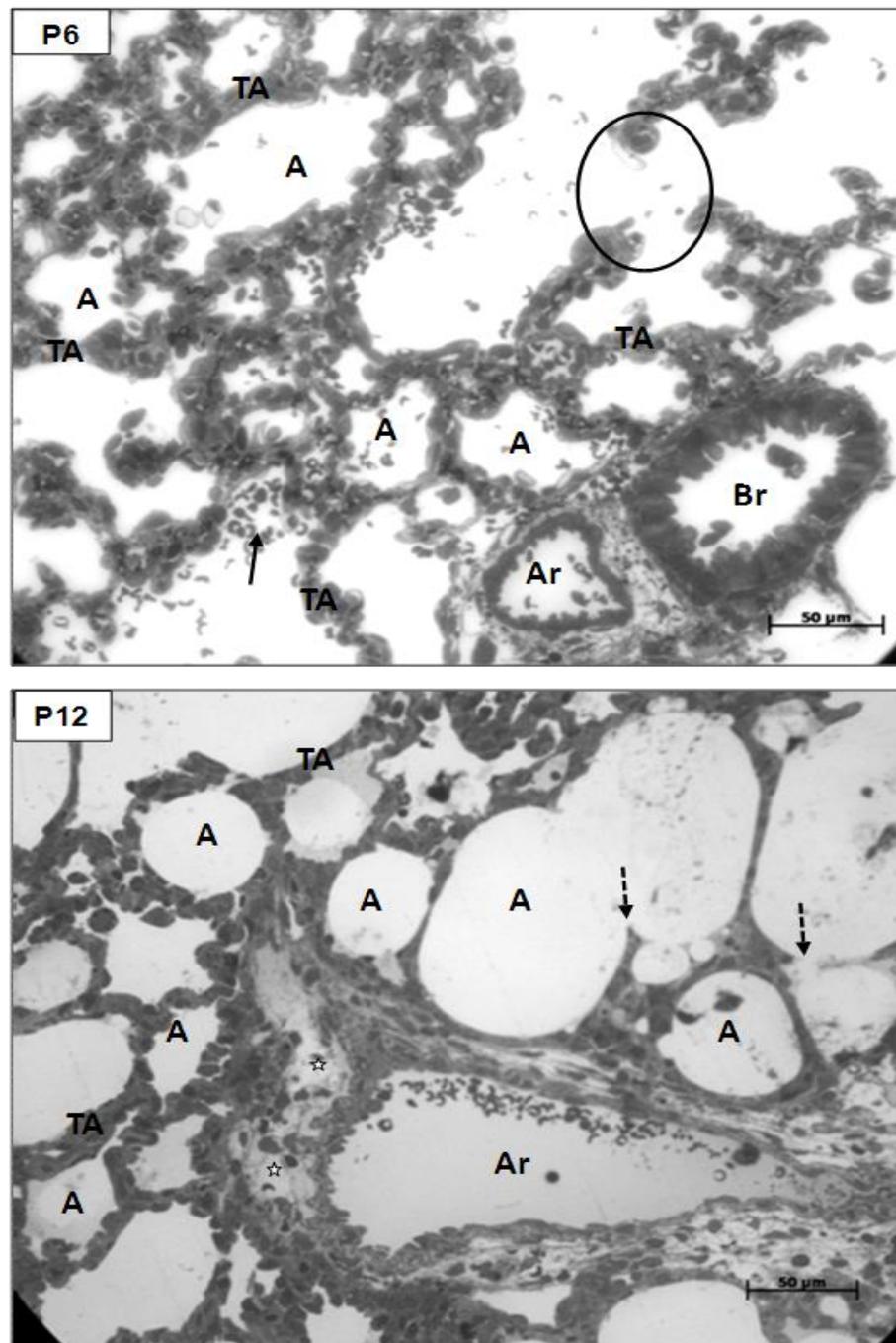
Con respecto al grupo hiperoxia en los alvéolos pulmonares de los días P6 y P12 se observaron ciertas alteraciones estructurales. Los tabiques inter-alveolares se presentaron más delgados y algunas veces rotos, lo que conduce a espacios alveolares más grandes en comparación con el grupo control (Figuras. 4). En algunos espacios alveolares se evidenció la presencia de células sanguíneas posiblemente por la ruptura de capilares alveolares (Figuras. 4). La mayoría de los capilares superficiales de los tabiques alveolares mostraron una luz pequeña en comparación con los capilares del grupo control, haciendo más lisa la superficie del tabique, otros capilares se evidenciaron edematizados (Figura 5). En la superficie de los alvéolos se observó escasez de los neumocitos tipo II los cuales se presentaron pequeños y con ausencia de vacuolas (Figura 5).



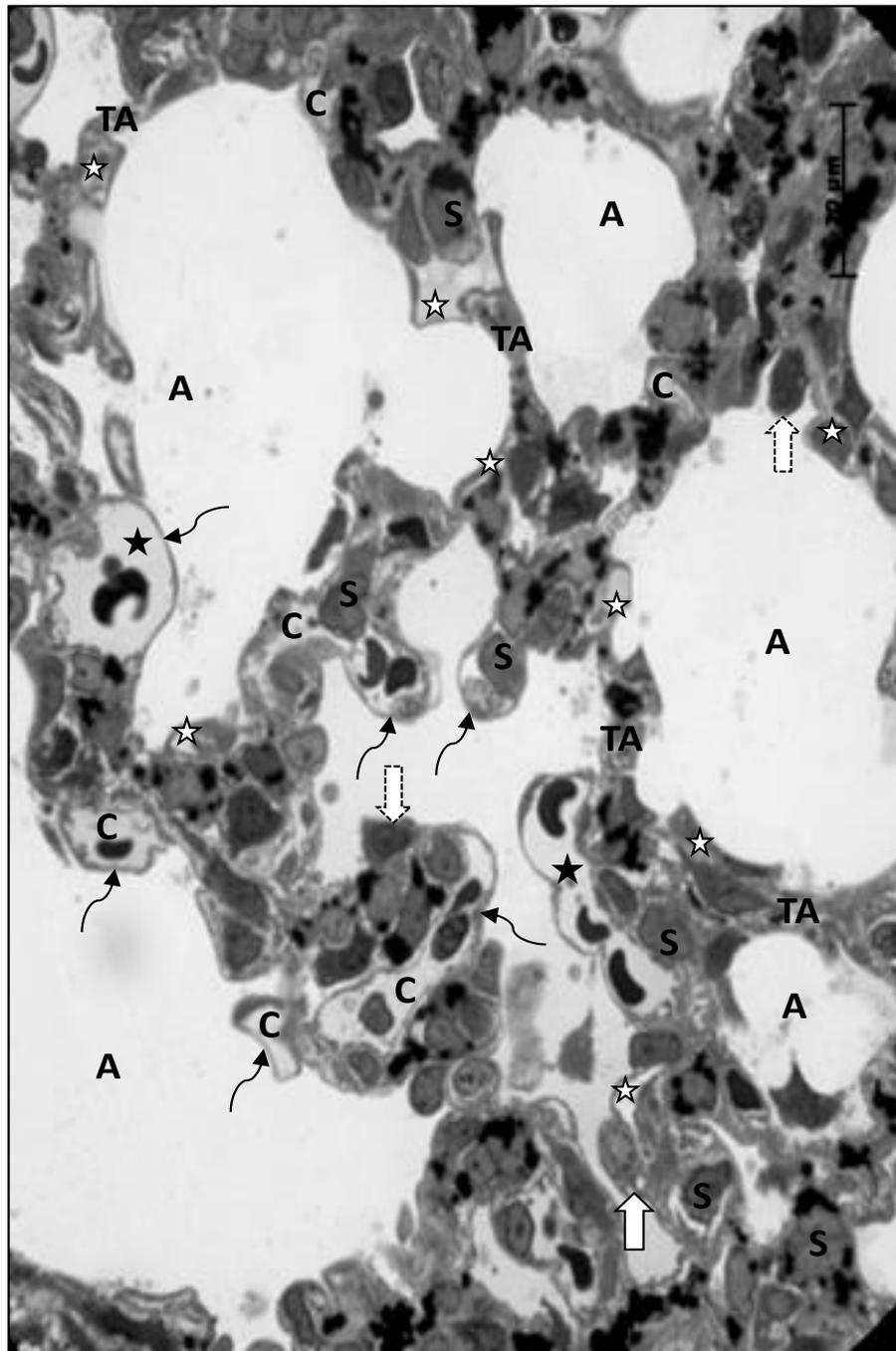
**Figura 2.** Fotomicrografías panorámicas de alvéolos del pulmón de ratas del grupo control de los días P6 y P12. A: alvéolos; SA: saco alveolar; TA: tabique inter-alveolar; Br: bronquio; Ar: arteria.



**Figura 3.** Fotomicrografías de alvéolos del pulmón de ratas del grupo control. A: alvéolos; TA: tabique inter-alveolar; S: célula septal; flecha curva continua: neumocitos tipo I; flecha blanca: neumocitos tipo II; C: capilar; E: eritrocito.

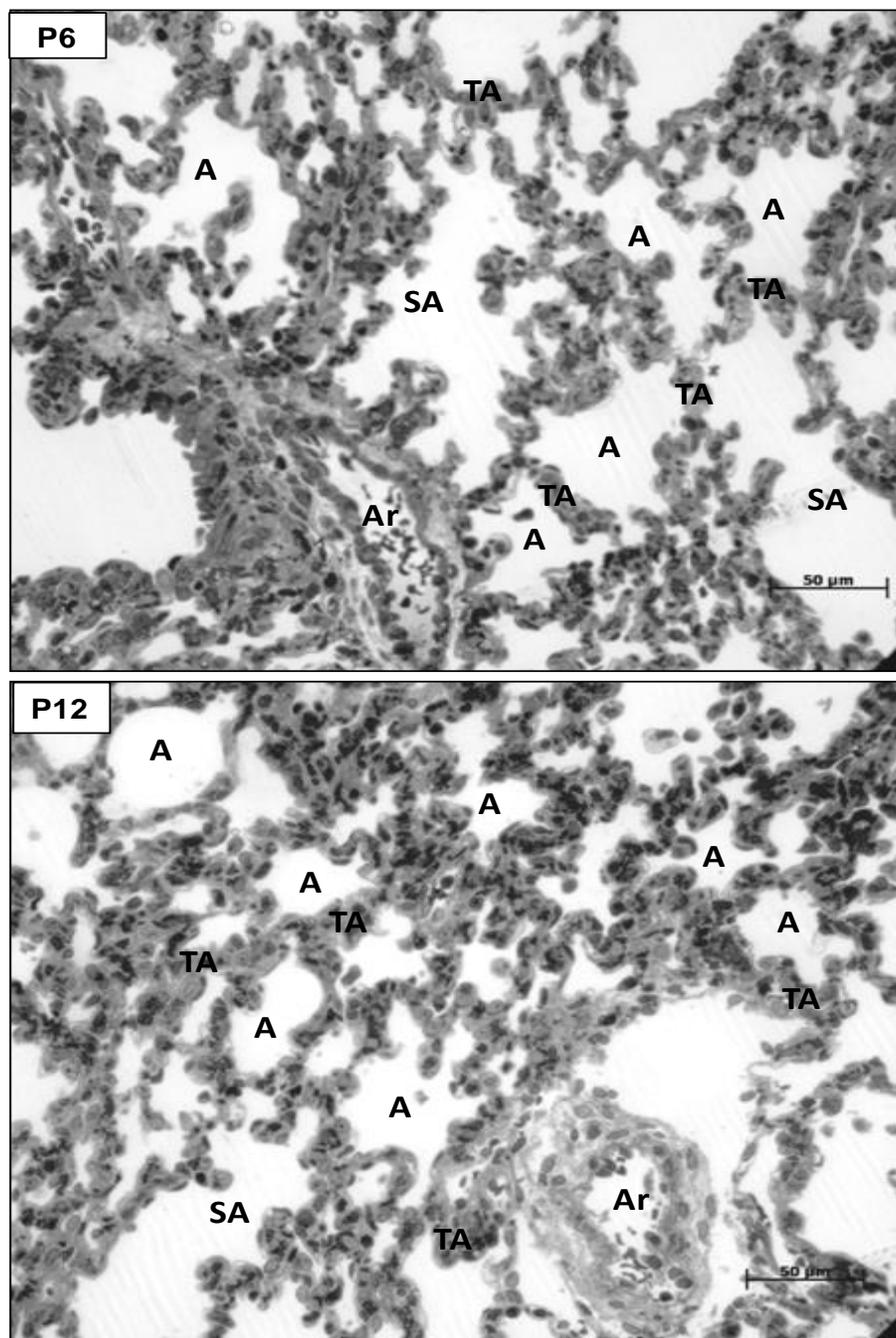


**Figura 4.** Fotomicrografías panorámicas de alvéolos del pulmón de ratas del grupo hiperoxia de los días P6 y P12. Se nota modificación estructural del tejido. A: alvéolos; TA: tabique inter-alveolar; círculo y flecha punteada: ruptura de tabique inter-alveolar Ar: arteria; Br: bronquio; estrella blanca: edema; flecha negra: derrame eritrocitario.



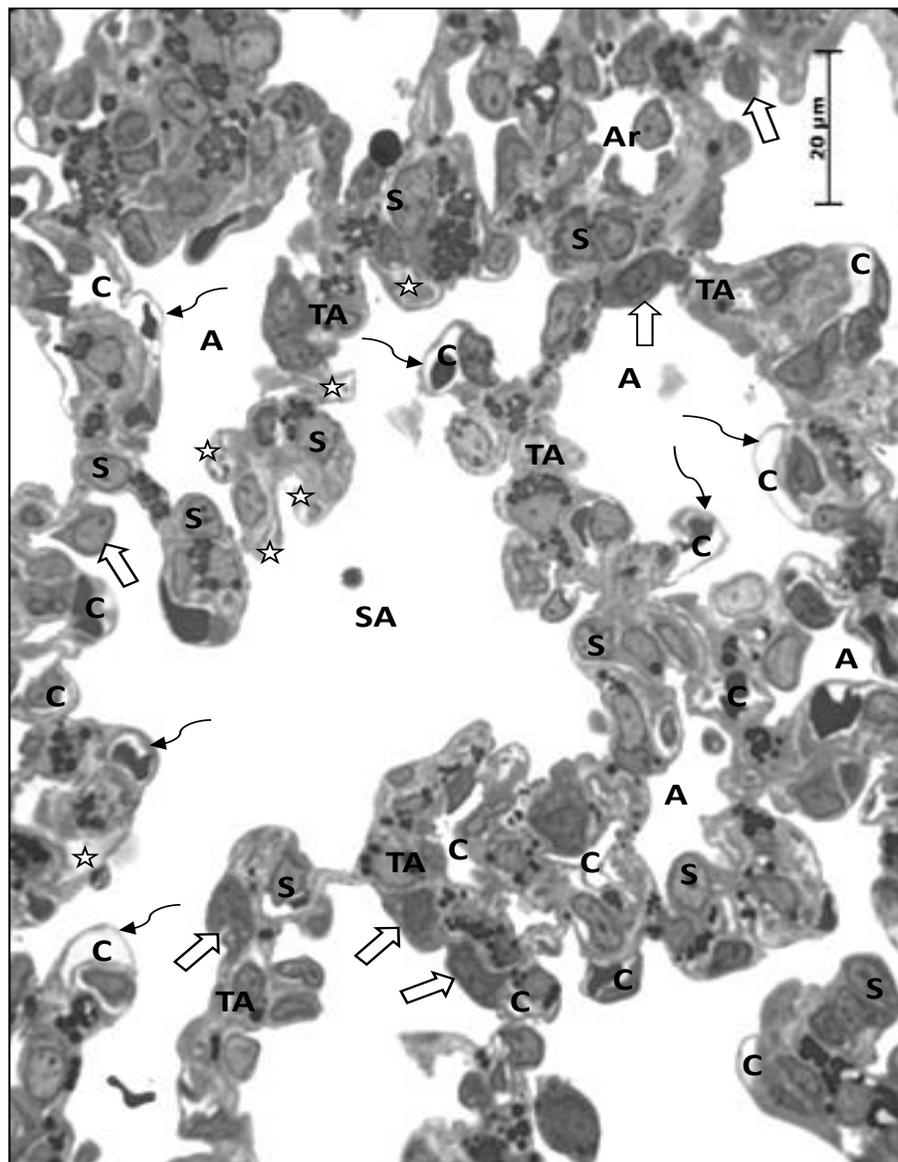
**Figura 5.** Fotomicrografías de alvéolos del pulmón de ratas del grupo hiperoxia de los días P6 y P12. A: alvéolos; TA: tabique inter-alveolar; flecha curva continua: neumocito tipo I; C: capilar normal; estrella negra: capilar edematizado; estrella blanca: capilar poco desarrollado; flecha blanca: neumocito tipo II normal; flecha blanca punteada: neumocito tipo II atrofiado; S: células septales.

En el grupo hiperoxia-taurina los alvéolos pulmonares presentan características similares a las del grupo control (Figura 6). Los alvéolos y tabiques se encuentran bien definidos y con conservados, no hay evidencia de ruptura inter-alveolar ni derrame eritrocitario.



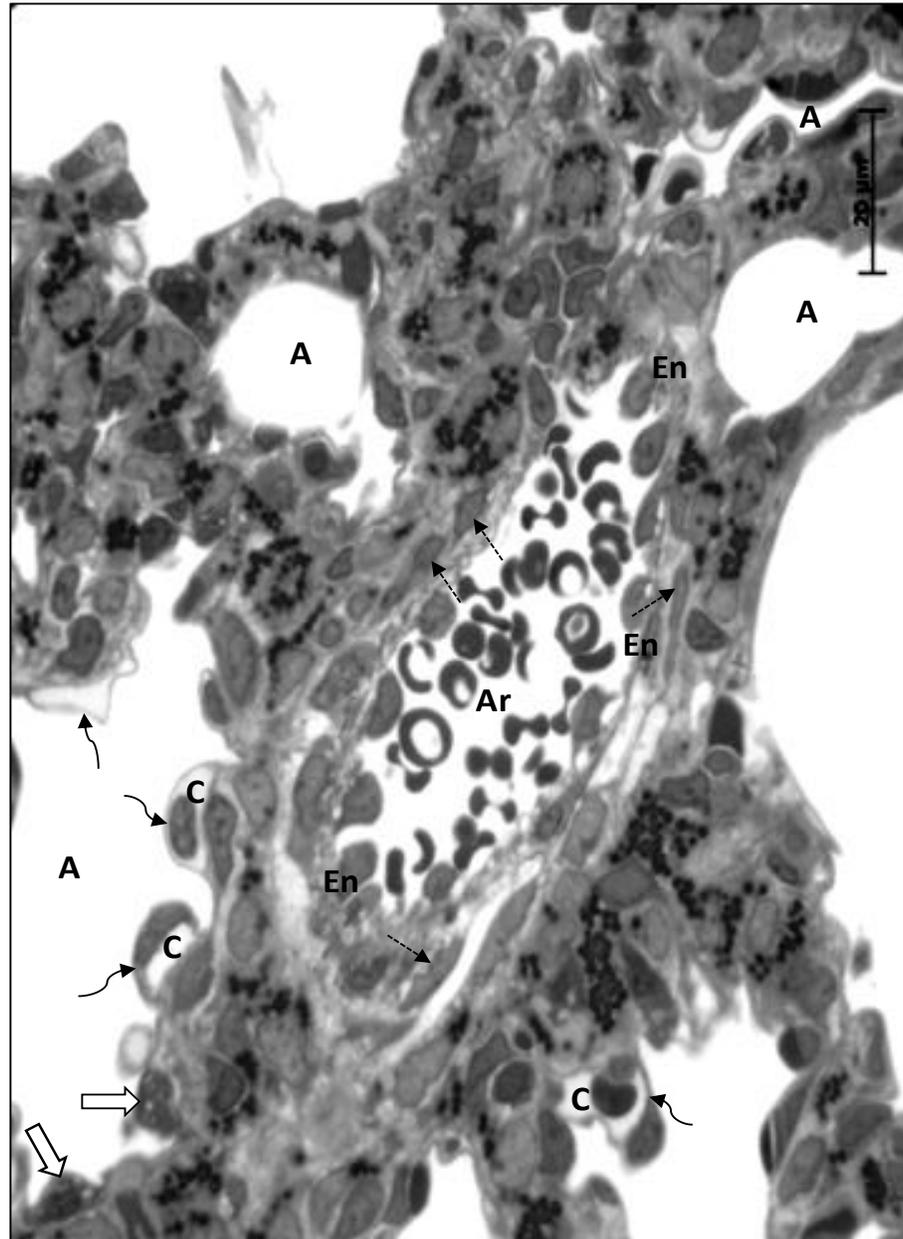
**Figura 6.** Fotomicrografías panorámicas de alvéolos del pulmón de ratas del grupo hiperoxia-taurina de los días P6 y P12. A: alvéolos; SA: saco alveolar; TA: tabique inter-alveolar; Ar: arteria.

Los tabiques inter-alveolares mostraron una buena integridad estructural y no se observaron células sanguíneas en el interior de los alvéolos (Figura 7). Algunos neumocitos tipo I se observaron pequeños y los neumocitos tipo II fueron más abundantes comparados con el grupo hiperoxia.



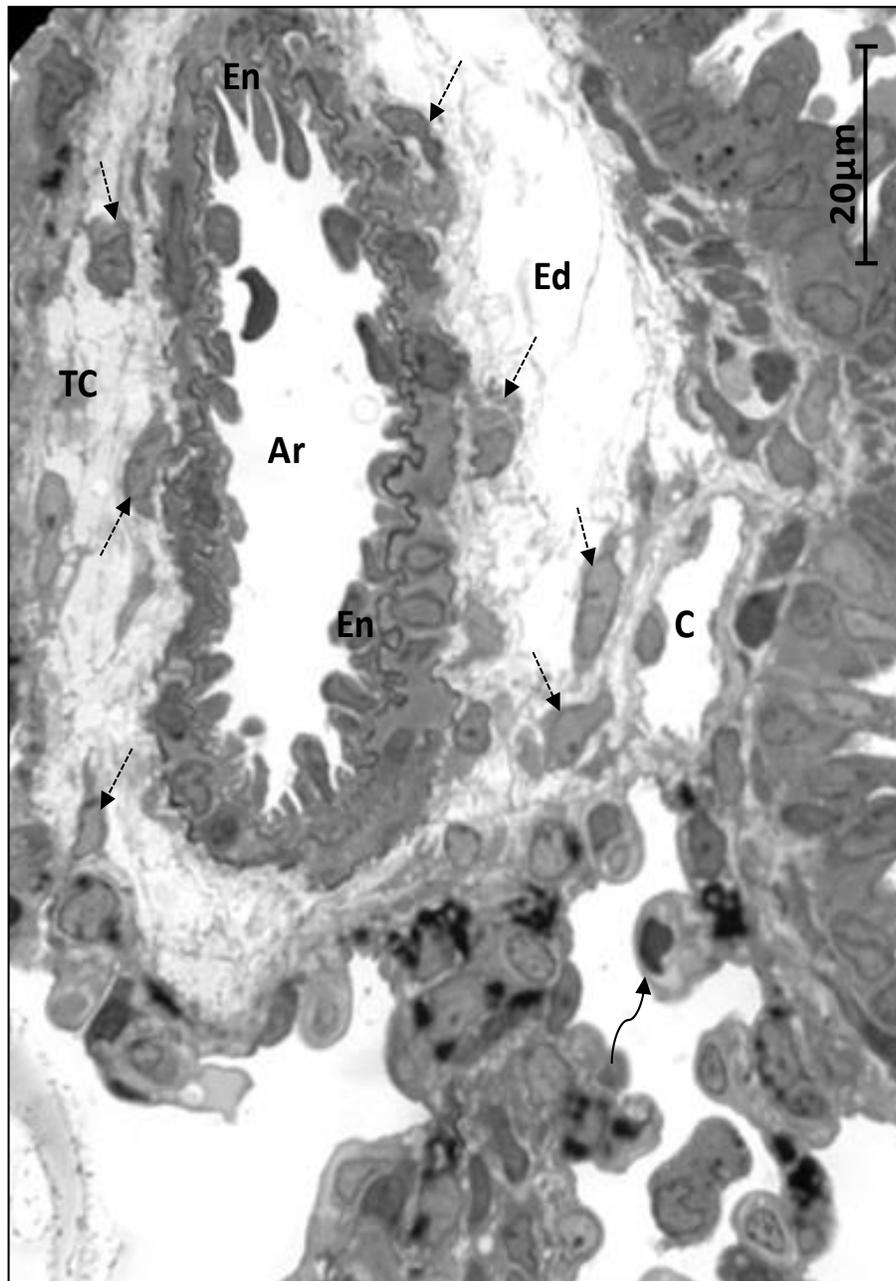
**Figura 7.** Fotomicrografías de alvéolos del pulmón de ratas del grupo hiperoxia-taurina. A: alvéolos; TA: tabique inter-alveolar; SA: saco alveolar; S: célula septal; flecha curva continua: neumocitos tipo I; flecha blanca: neumocitos tipo II; C: capilar normal; estrella blanca: capilares superficiales pequeños.

Los tabiques alveolares están irrigados internamente por una densa red sanguínea compuesta por capilares y arteriolas. Los capilares son relativamente pequeños (Figura 3) comparados con las arteriolas. Éstas últimas se encuentran revestidas por tejido conjuntivo producido por los fibroblastos (Figura 8).



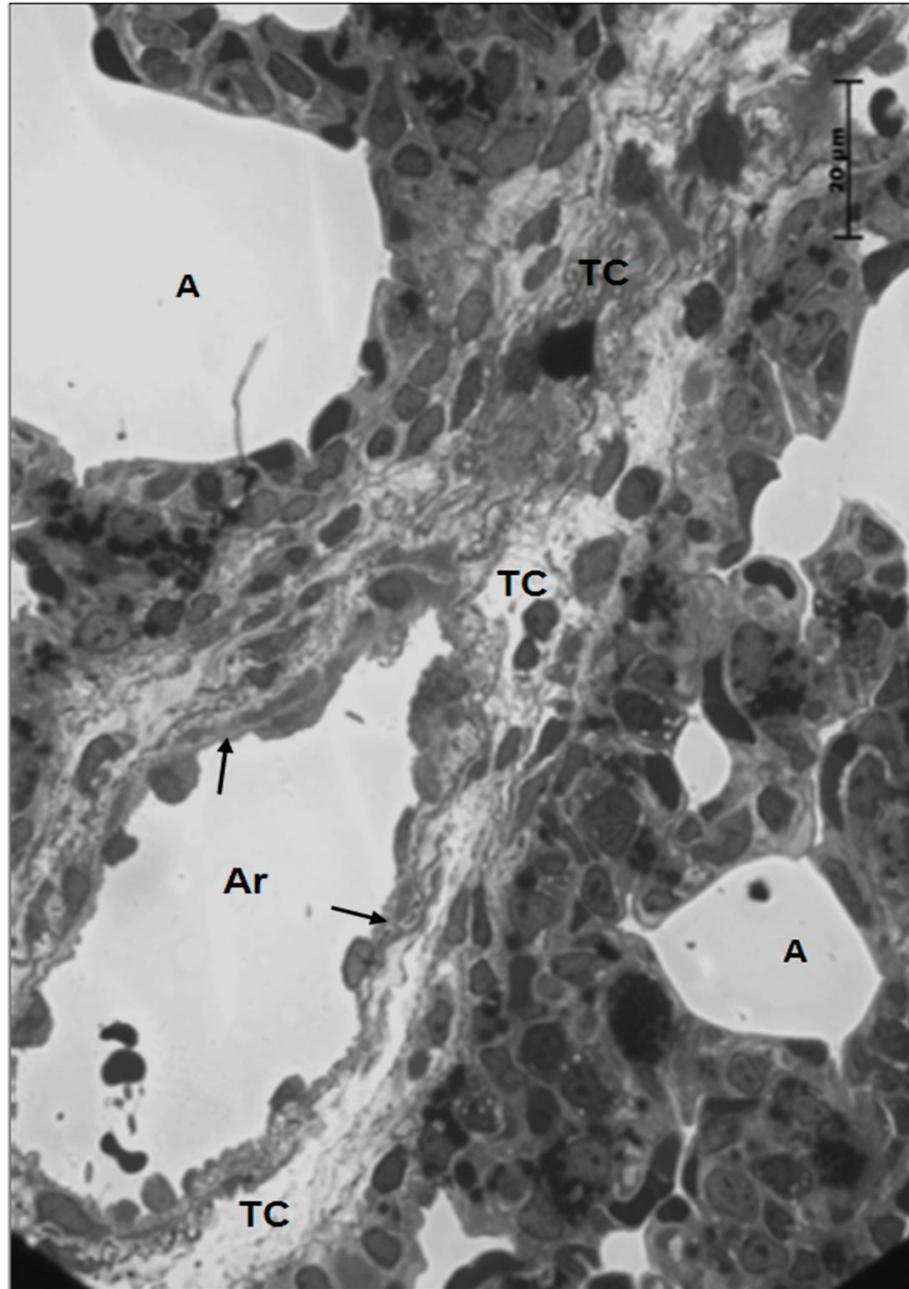
**Figura 8.** Detalle de arteria del pulmón de ratas del grupo control del día postnatal P6. A: alvéolos; Ar: arteria; En: endotelio; flecha curva continua: neumocitos tipo I; flecha blanca: neumocitos tipo II; C: capilar; flecha negra punteada: fibroblastos.

En el grupo hiperoxia las arterias muestran signos de edematización en el tejido conjuntivo que las rodea. En la zona edematizada se evidencia la falta organización en el tejido fibrilar y escasos fibroblastos (Figura 9).



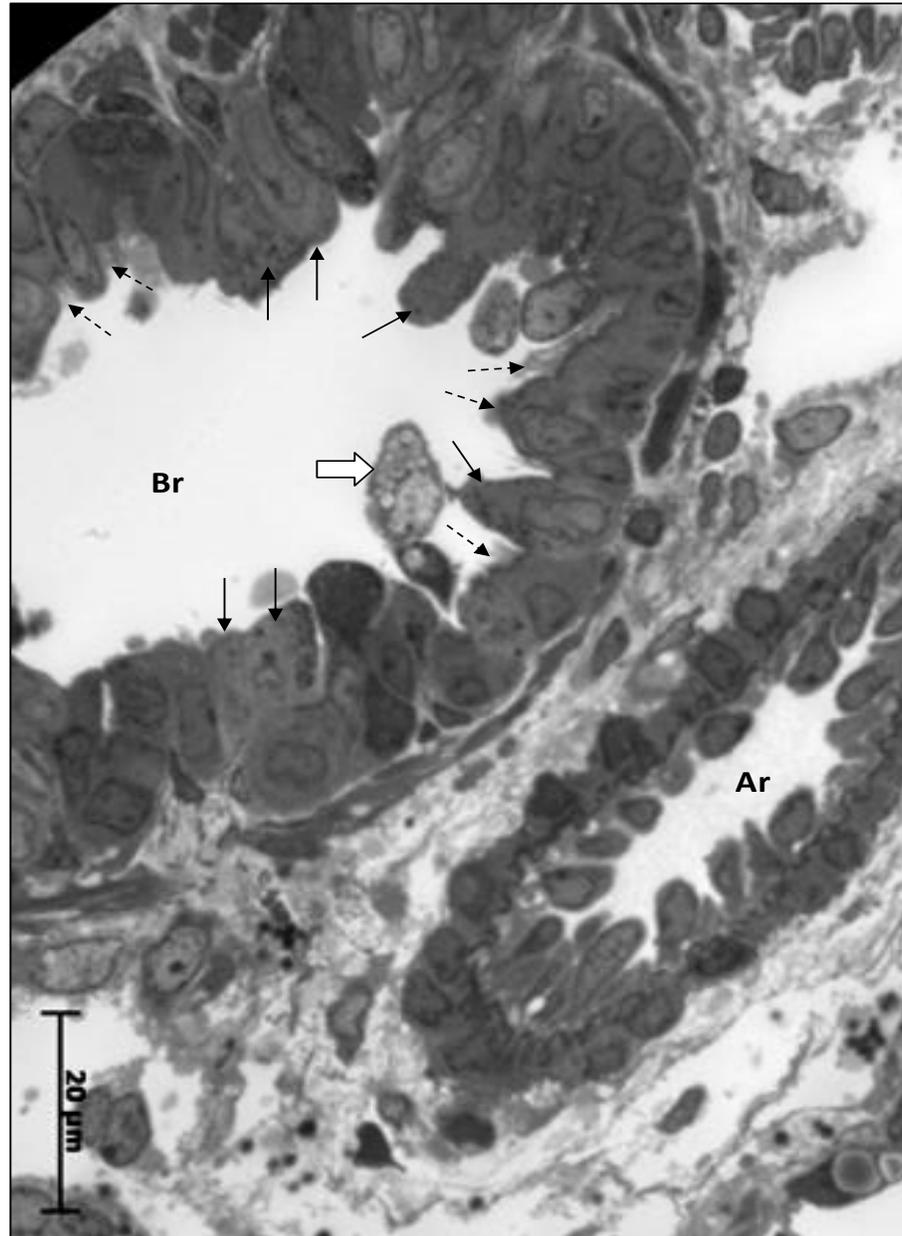
**Figura 9.** Detalle de arteria cercana a un bronquiolo del pulmón de ratas del grupo hiperoxia del día postnatal P12. El tejido conjuntivo se observa edematizado. Ar: arteria; En: endotelio; Ed: edema; TC: tejido conjuntivo; flecha curva continua: neumocitos tipo I; flecha negra punteada: fibroblastos; C: capilar.

Las arterias del grupo hiperoxia-taurina muestran características normales comparadas con el grupo control. Los fibroblastos son abundantes y guardan un orden dentro del tejido conjuntivo el cual se observa compacto y bien estructurado (Figura 10)

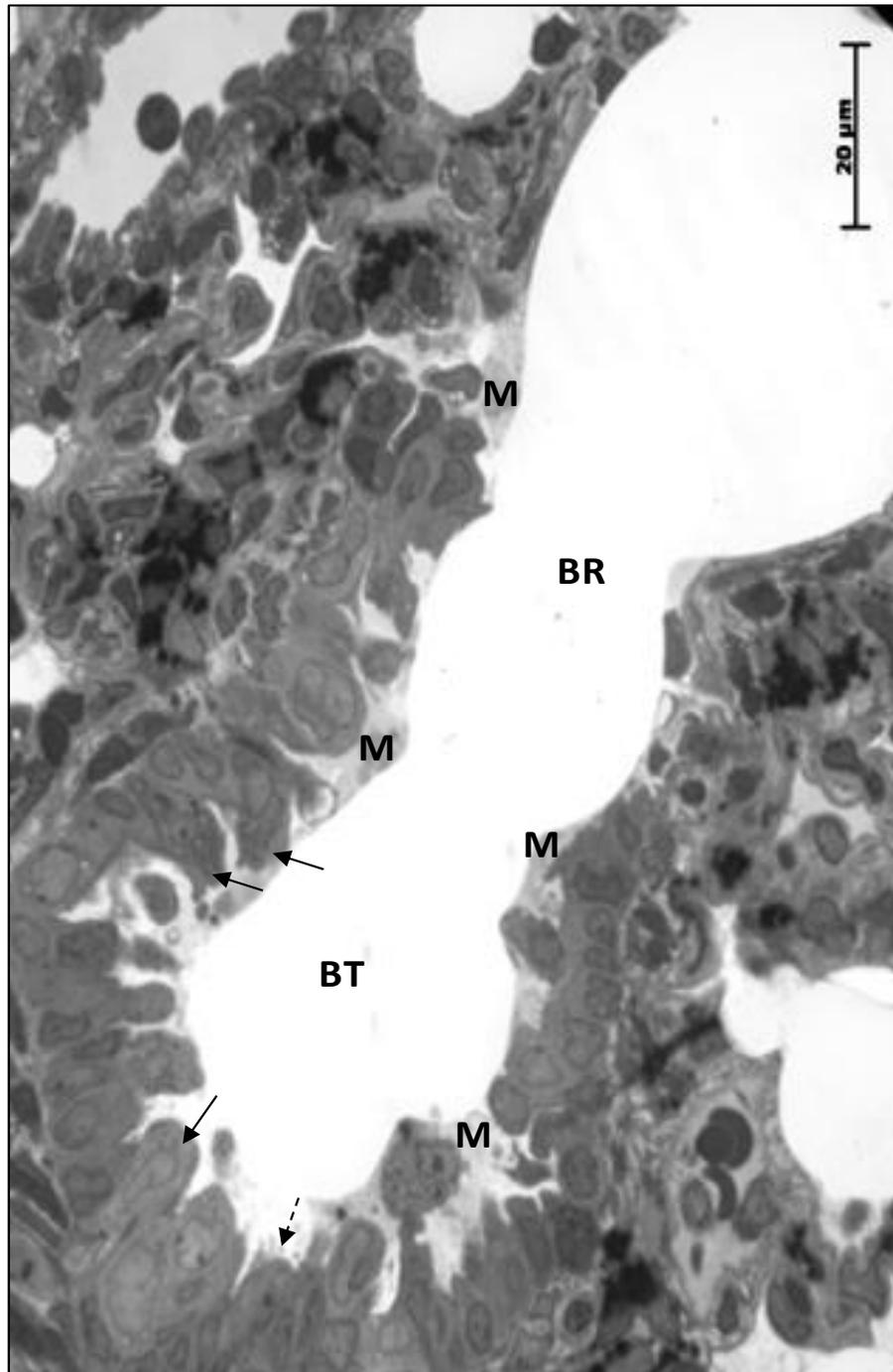


**Figura 10.** Detalle de arteria del pulmón de ratas del grupo hiperoxia-taurina del día postnatal P6. Se observa una buena integridad estructural en el tejido. A: alvéolos; Ar: arteria; flecha negra continua: fibroblastos; TC: tejido conectivo.

Con respecto a los bronquiolos del grupo control se encuentran recubiertos internamente por un epitelio simple cúbico ciliado compuesto por las células caliciformes que son ciliadas y las células de Clara que producen un moco o material de revestimiento para proteger los alvéolos (Figuras 11 y 12).

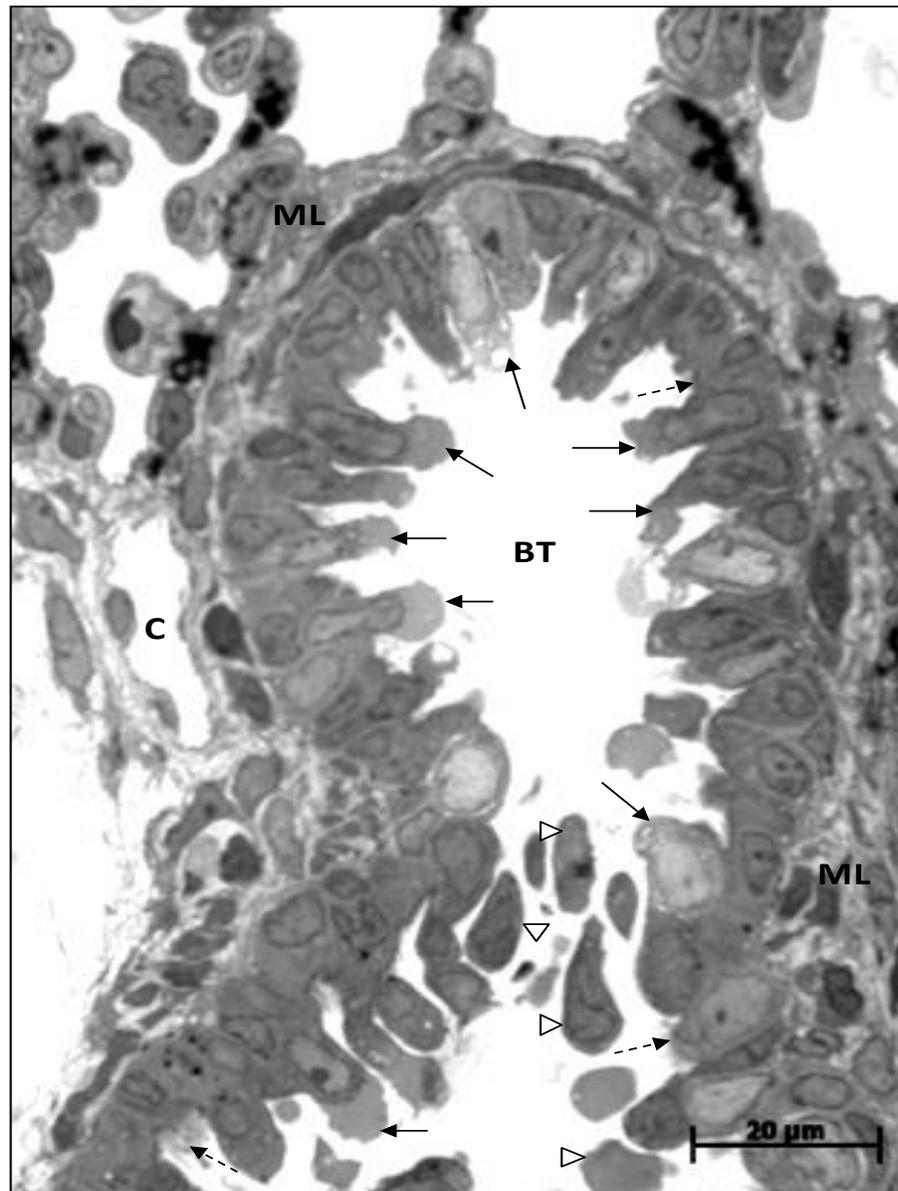


**Figura 11.** Detalle de bronquiolo cercano a una arteria del pulmón de ratas del grupo control del día postnatal P6. Br: bronquiolo; flecha negra continua: células de Clara; flecha negra punteada: células ciliadas; flecha blanca: neumocito tipo II; Ar: arteria.

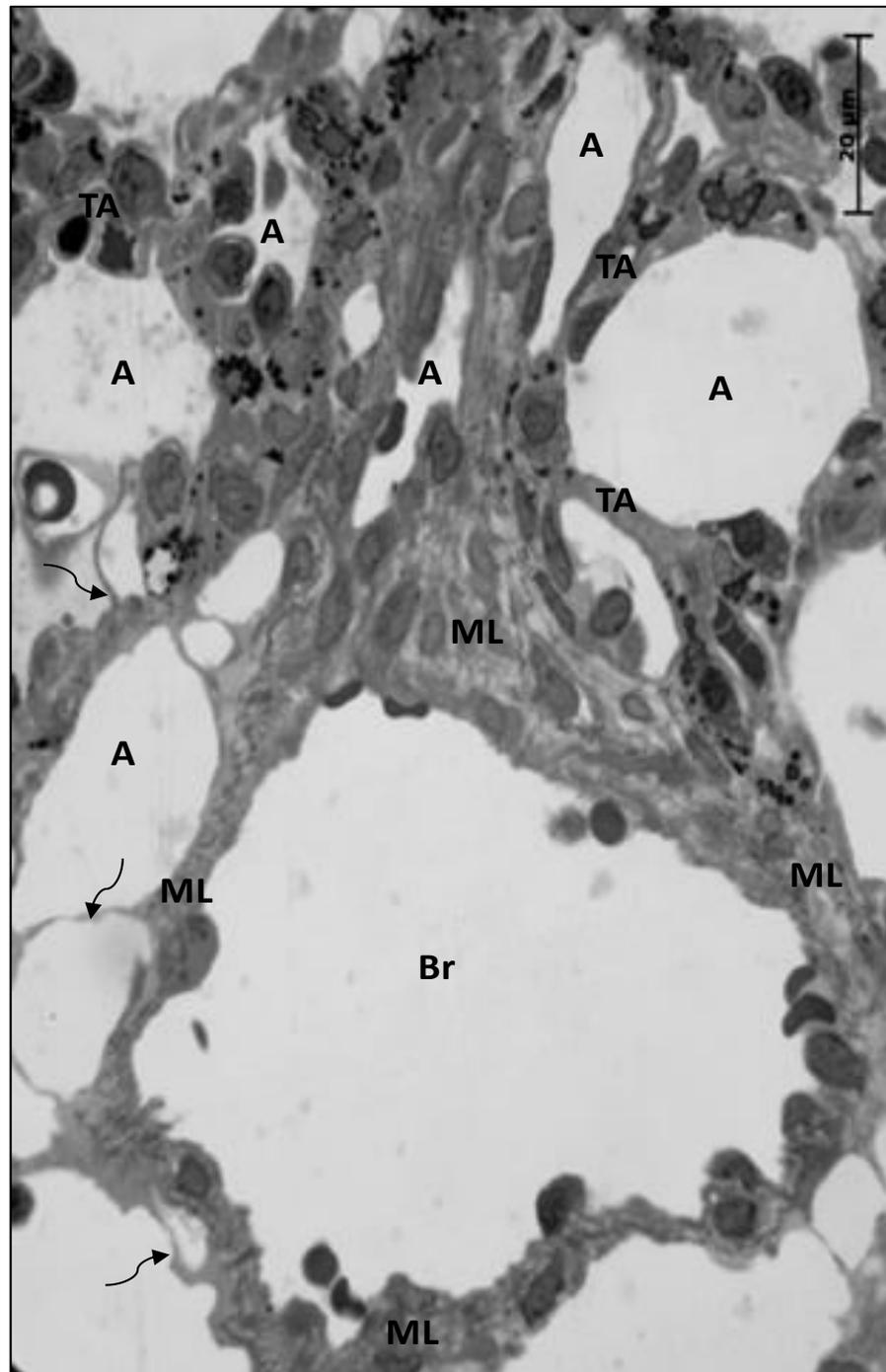


**Figura 12.** Detalle de bronquiolo del pulmón de ratas del grupo control del día postnatal P12. Se nota la presencia de moco en el borde luminal del bronquiolo. BR: bronquiolo respiratorio; BT: bronquiolo terminal; M: moco; flecha negra continua: células de Clara; flecha negra punteada: célula ciliada.

En el grupo hiperoxia, el epitelio de los bronquiolos presenta alteraciones estructurales debido al desprendimiento de las células que conforman el epitelio en el borde luminal (Figura 13). En algunas ocasiones el desprendimiento celular es casi total perdiéndose por completo el epitelio (Figura 14).

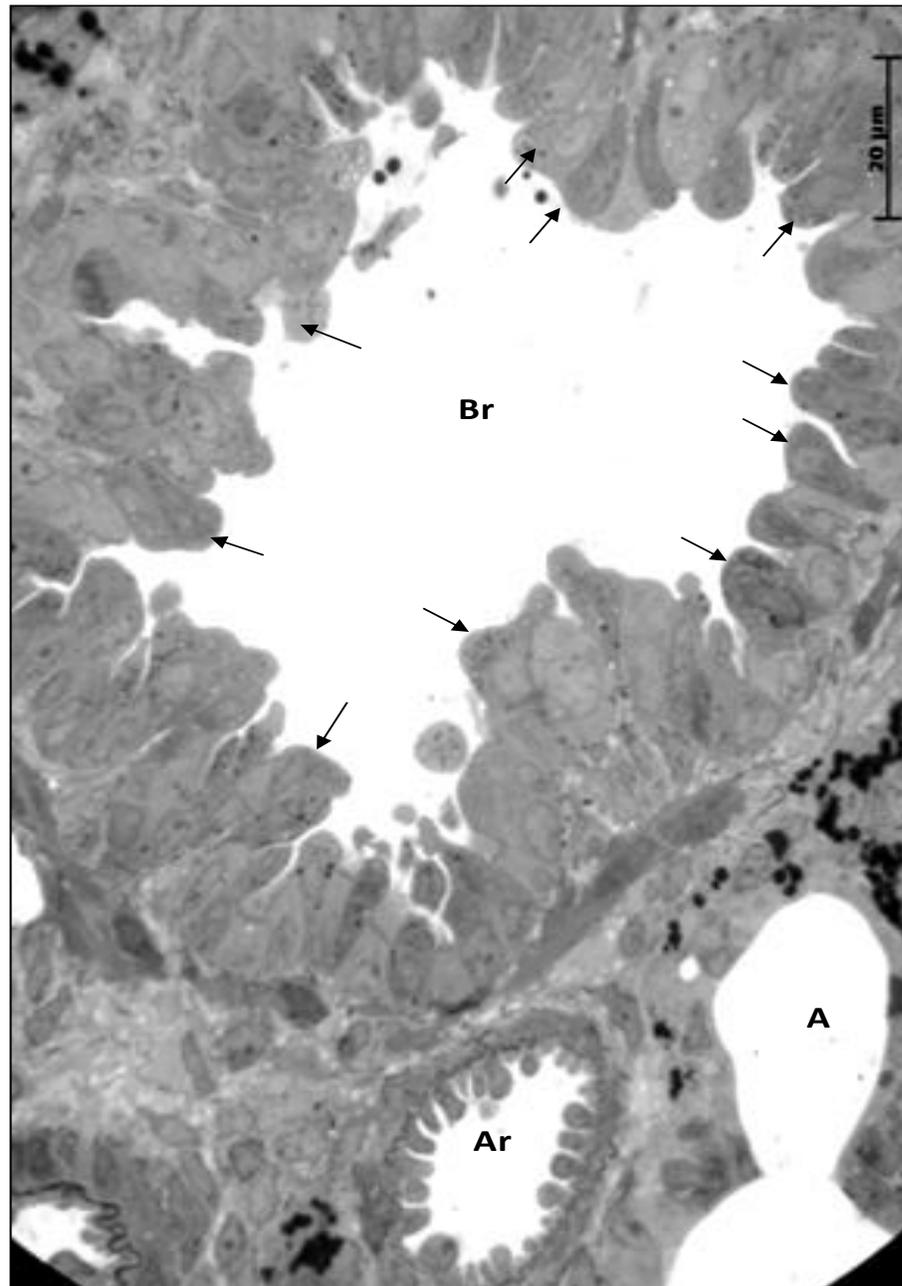


**Figura 13.** Detalle de bronquiolo del pulmón de ratas del grupo hiperoxia del día postnatal P12. Se nota la presencia de células desprendidas en el lumen. BT: bronquiolo terminal; ML: músculo liso; flecha negra continua: células de Clara; flecha negra punteada: cilios; C: capilar; cabeza de flecha blanca: células desprendidas.



**Figura 14.** Detalle de bronquiolo del pulmón de ratas del grupo hiperoxia del día postnatal P12. Se observa la pérdida casi total de las células del epitelio bronquiolar. Br: bronquiolo; ML: músculo liso; Flecha curva continua: neumocitos tipo I; A: alvéolos; TA: tabique interalveolar.

En el grupo hiperoxia-taurina el epitelio de los bronquiolos presenta una estructura preservada comparada con el control (Figura 15). A diferencia del grupo hiperoxia no se observan células desprendidas en el lumen bronquiolar.



**Figura 15.** Detalle de bronquiolo del pulmón de ratas del grupo hiperoxia-taurina del día postnatal P12. Se observa la integridad normal estructural del epitelio. Br: bronquiolo; flecha negra: células de Clara; Ar: arteria; A: alvéolo.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demostraron que la hiperoxia alteró la actividad media de G6PDH y modificó la estructura del pulmón de las ratas en los días de desarrollo post natal P6, P9 y P12. Sin embargo, la taurina con su acción antioxidante llevó la actividad de la G6PDH a niveles normales y preservó el tejido pulmonar.

En el grupo hiperoxia la actividad media de la G6PDH en el pulmón de las ratas del día P6 aumentó 69% comparada con el grupo control. En contraste, en los días postnatales P9 y P12 esta actividad descendió a niveles normales. Con un diseño experimental similar al de presente estudio, Córdova (2016) analizó la peroxidación lipídica con la técnica de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los pulmones de ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia postnatal. Los resultados arrojaron que la mayor peroxidación lipídica fue el día P6 con un 80% con respecto al control, seguido de P9 con 64% y P12 con 56%. Esta autora también analizó la concentración de tioles totales encontrando niveles ligeramente superiores a los normales y una actividad enzimática importante de la catalasa en los 3 días postnatales analizados. El aumento en la actividad media de la G6PDH, en el presente estudio, en el día P6 se debió posiblemente como protección del tejido pulmonar contra el estrés oxidativo experimentado por los pulmones debido a la hiperoxia y que trajo como consecuencia la activación del sistema antioxidante.

La G6PDH es una enzima que se encuentra presente en el citoplasma de todas las células de los mamíferos; desempeña un papel muy importante en muchas vías metabólicas, y está involucrada en el control de la generación de ERO contribuyendo en la limpieza de las células por medio de reacciones de óxido reducción gracias a la producción de energía mediante NADPH. El sistema antioxidante celular desempeña una función elemental en la regulación del estrés metabólico, en donde las moléculas oxidativas están directamente controladas por la naturaleza reductora de la NAPDH (Gómez *et al.*, 2014). La G6PD cataliza el paso de entrada de glucosa-6-fosfato (G6P) en la vía de las pentosas fosfato, específicamente en la de la hexosa monofosfato, reacción que produce

oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona, reduciendo NADP a NADPH. En el glóbulo rojo, este paso anaeróbico en el metabolismo de la glucosa es la única fuente de NADPH, el cual es requerido para la acción normal de la metahemoglobina reductasa y el mantenimiento de un nivel adecuado de glutatión reducido (Howes *et al.*, 2013).

Con respecto al grupo hiperoxia-aurina, la G6PDH mostró una actividad similar a la del grupo control en los tres días postnatales analizados. Esto se debe posiblemente a la acción antioxidante de la aurina. Córdova (2016) analizó el papel de la aurina contra el estrés oxidativo generado en el pulmón de ratas expuestas a hiperoxia los días postnatales P6, P9 y P12. La concentración de TBARS fue un 69%, 48% y 28%, menor en los días P6, P9 y P12 respectivamente, en comparación al grupo hiperoxia de la misma edad. Esta pudo haber sido la causa del descenso del 52% de la actividad de la G6PDH en el día P6 con respecto al grupo hiperoxia y su posterior estabilización a niveles normales en los días P9 y P12.

Márquez y Vásquez (2017) analizaron el impacto de la hiperoxia sobre la actividad enzimática de la G6PDH en el riñón de ratas en desarrollo y el efecto antioxidante de la aurina. Los autores encontraron que en el grupo hiperoxia, ocurrió un incremento de la actividad enzimática de la G6PDH de 27% en el día postnatal P6 con respecto al grupo control, lo que coincidió con un incremento significativo de la peroxidación lipídica. La aurina ingerida por los neonatos a través de la leche materna provocó el descenso de la peroxidación lipídica y por consiguiente de los niveles de la actividad de la G6PDH.

Se ha demostrado que la aurina se encuentra en concentraciones particularmente altas en los tejidos expuestos a niveles elevados de oxidantes, lo que sugiere su papel en la atenuación del estrés oxidativo. La acción antioxidante mejor establecida de la aurina es la neutralización del ácido hipocloroso (HOCl), un oxidante extremadamente tóxico generado por el sistema de haluro de mieloperoxidasa (MPO). Esta actividad explica las propiedades antiinflamatorias de la aurina, ya que su reacción con HOCl resulta en la generación de aurina cloramina (TauCl), un mediador antiinflamatorio más estable y

menos tóxico (Barua *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2005). Por lo tanto, la taurina puede considerarse un componente importante en el impacto del desarrollo de la inflamación aguda. No obstante, también puede actuar en sistemas que no estén relacionados con HOCl. Aunque la taurina es incapaz de eliminar directamente las ERO, se ha demostrado que evita la generación de RL y ERO. Así mismo, se ha evidenciado que la taurina mejora la expresión y las actividades de las enzimas antioxidantes, como la SOD, la CAT y la GPX (Huxtable, 2002).

Histológicamente, los pulmones de las ratas del grupo hiperoxia mostraron alteraciones en la arquitectura tanto del parénquima pulmonar como en los bronquiolos. Se evidenció la sobre-expansión de los espacios alveolares con una consecuente ruptura de los tabiques inter-alveolares, este tipo de alteraciones encontradas en los pulmones de las ratas del grupo hiperoxia cumple con los criterios morfológicos para la formación del enfisema pulmonar. El enfisema de tipo intersticial es una enfermedad pulmonar muy frecuente en prematuros y está relacionada con la implementación de terapias de oxígeno. En este contexto, el aire puede acceder al intersticio pulmonar a lo largo de los paquetes vasculares bronquiales debido a cambios súbitos en los volúmenes pulmonares y a la presión transpulmonar. Los cambios secundarios que se producen en los sacos alveolares causan la ruptura de los septos inter-alveolares y genera alvéolos sobredistendidos. (Guyton, 2005). Los tabiques inter-alveolares están compuestos por los neumocitos tipo I, las células septales y los capilares septales. Los neumocitos tipo I son células delgadas que se extiende sobre la membrana basal, es decir a lo largo del alvéolo tapizándolo casi completamente. Estas células están unidas una con otras por uniones ocluyentes o uniones estrechas evitando que el fluido extracelular pase a los alvéolos. Estas células desempeñan un papel importante en el mantenimiento del fluido alveolar ya que expresan canales iónicos. Son las células más sensibles a los efectos tóxicos y no pueden replicarse (Borok, 2014; Matthay *et al.*, 1993).

En el grupo hiperoxia también fue notoria la presencia de hemorragia en el espacio alveolar. Frecuentemente esto es producto del debilitamiento de las membranas de las células endoteliales que constituye los capilares, quienes son susceptibles al daño

producido por las ERO (Leung *et al.*, 2008). Así mismo, el daño observado en los septos alveolares de las ratas expuestas a hiperoxia puede estar relacionado con la lipoperoxidación de las membranas celulares. Los lípidos son compuestos químicos fundamentales en la arquitectura celular, no obstante, son los componentes más vulnerables frente al ataque de las ERO mediante una reacción denominada peroxidación lipídica (Semenza, 2000). Los ácidos grasos polinsaturados (AGPI), son los constituyentes de los lípidos, y estos suelen ser más susceptibles a peroxidarse debido a que sus hidrógenos bisalílicos son fácilmente extraíbles comparados con los hidrógenos alifáticos, una vez iniciado este proceso, se genera una reacción en cadena involucrando las etapas de propagación, ramificación y terminación (Bertrand, 1985; Schieber y Chandel, 2014).

En un paciente con enfisema, las paredes de algunos alvéolos están dañadas y cuando esto sucede, los alvéolos pierden su elasticidad y atrapan aire. De este modo es difícil expulsar todo el aire de los pulmones, además estos no se vacían de forma eficaz, por lo tanto, hay mucho más oxígeno disponible en los alvéolos del que se puede eliminar por el flujo de sangre. Este tipo de trastorno disminuye notablemente la efectividad de los pulmones como órganos para el intercambio de gases (Stewart y Voelke, 2008).

Otra alteración hallada en los pulmones de las ratas del grupo hiperoxia fue la disminución de la población de neumocitos tipo II en los alvéolos, comparada con el grupo control. Se infiere que la escasa población de este tipo celular podría estar asociada a la exposición del pulmón a la hiperoxia. Se ha determinado que el estrés oxidativo conlleva al mal funcionamiento de las bombas de agua y electrolitos en los neumocitos (comúnmente el tipo II), causando el estancamiento de electrolitos generando edema que a su vez induce la muerte celular temprana de estas células (Serje, 1998). Los RL producidos por la hiperoxia también podrían modificar el sistema de membranas produciendo alteración de las mitocondrias y daño en el ADN lo que puede conducir a la muerte celular bien sea por necrosis o por apoptosis (Wiegman *et al.*, 2014).

Los neumocitos tipo II son células cuboidales que se encuentran en las uniones septales alveolares y sobre la membrana basal fijándose a otras células por uniones estrechas. Están implicados en el transporte de fluidos a través de sus canales de sodio y a la ATPasa sodio/potasio, pueden diferenciarse a neumocitos tipo I en caso de daño en el pulmón (Kotton y Mulligan, 2005). Estas células se caracterizan por sus núcleos vesiculares y el citoplasma vacuolado, en donde poseen inclusiones características llamadas cuerpos multilamelares. Los cuerpos lamelares poseen fosfolípidos, mucopolisacáridos y proteínas (incluyendo hidrolasas lisosómicas), dichos cuerpos son productos de la síntesis del componente tensoactivo del material que reviste los alvéolos (surfactante), el cual es importante para desarrollar su función secretora. La falta de esta sustancia provoca el colapso de los alvéolos, ocasionando estados patológicos en el recién nacido. A diferencia de los neumocitos tipo I, éstas células pueden replicarse y reemplazar a los neumocitos tipo II dañados (Isakson *et al.*, 2001).

La carencia de neumocitos tipo II en el grupo hiperoxia pudo traer graves consecuencias para el buen funcionamiento de los pulmones ya que el déficit de surfactante produce colapso alveolar y microatelectasias difusas (presión en la parte externa del pulmón y que puede darse también por obstrucción de bronquios y bronquiolos), con edema y daño celular, produciéndose como consecuencia una disminución de la distensibilidad pulmonar, de la capacidad residual funcional y alteración de la relación ventilación perfusión; este trastorno es descrito como enfermedad de la membrana hialina (EMH) (González y Omaña, 2006). La EMH se da luego del nacimiento, en recién nacidos prematuros, con pulmones inmaduros incapaces de secretar surfactante. Es una enfermedad respiratoria compleja que se caracteriza cuando la deficiencia de surfactante a nivel de la interfase aire-líquido dentro del alvéolo conlleva al aumento de la tensión superficial, situación que a su vez propicia a que éste se colapse en la espiración, no quede volumen residual funcional y disminuya la distensibilidad pulmonar. Todo esto genera una mayor tensión superficial en el alvéolo, que interfiere en el normal intercambio de  $O_2$  y  $CO_2$ . Al presentarse un desequilibrio en el intercambio gaseoso por la disfuncionalidad de unidades alveolares se produce hipoxemia la cual aumenta la

permeabilidad capilar, y a su vez se produce edema (Fehlmann *et al.*, 2010; Hintz *et al.*, 2007).

En el grupo hiperoxia también se evidenció la edematización en el tejido conjuntivo que rodea las arterias. El endotelio microvascular pulmonar es una estructura metabólicamente esencial para mantener la homeostasis pulmonar y cardiovascular. Los estímulos dañinos comprometen la integridad estructural y funcional endotelial pulmonar, y conducen a la formación de edema pulmonar no cardiogénico e inflamación parenquimal (Silverman *et al.*, 1998). El edema es una lesión muy frecuente y algunas veces importante caracterizada por acumulación de líquido en el intersticio pulmonar o alvéolos. En condiciones normales los pulmones producen trasudados (líquido bajo en proteína) el cual es absorbido por los vasos linfáticos. Si la producción de líquido excede la remoción, ya sea por exceso en producción o por falla en la absorción, el líquido se acumula causando edema pulmonar (Sweet *et al.*, 2010).

La alteración de la membrana del endotelio vascular como consecuencia de la hiperoxia postnatal posiblemente propició el aumento de la permeabilidad celular conduciendo a la filtración de líquido dentro del intersticio circundante (edema). Además, los daños causados a las uniones estrechas formado por los neumocitos tipo I en el tejido alveolar permiten al líquido proteico permear e inundar el alvéolo. La acumulación de edema en sus espacios aéreos inactiva el surfactante y aumenta la distancia de difusión para el intercambio de gases; esto es característico en ciertas patologías como el de la fase temprana exudativa del síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) (Saugstad *et al.*, 2008).

En la zona edematizada alrededor de las arterias se evidenció la falta de organización en el tejido fibrilar y escasos fibroblastos. Esto pudo darse por la pérdida de la capacidad del endotelio capilar de controlar la entrada y salida de líquido provocado por la lipoperoxidación inducida por la hiperoxia. Los fibroblastos son células versátiles que se diferencian a miofibroblastos y secretan proteínas de matriz extracelular (MEC) durante la reparación tisular fisiológica en casi todos los órganos (Kulkarni *et al.*, 2016). Los

miofibroblastos promueven la producción y el remodelamiento de la matriz extracelular ya que produce diversas enzimas de la familia de las metaloproteinasas (MMPs), tales como la colagenasa intersticial (MMP-1), gelatinasa A (MMP2); proteoglicanasas, glicosaminoglicanasas y los inhibidores tisulares de metaloproteinasa (TIMPs). Así mismo, sintetiza colágeno tipo I y III, fibras elásticas, proteoglicanos, fibronectina, además de otras proteínas y proteasas, tanto constitutivas como inducibles (Fries *et al.*, 2004).

La síntesis de productos de los fibroblastos debe ser altamente controlada para el correcto funcionamiento de la homeostasia de MEC. Tanto la producción elevada y descontrolada de productos que conforman MEC como la disminución de la síntesis de los mismos pueden traer como consecuencia múltiples enfermedades. En los pulmones la exagerada activación de los miofibroblastos conlleva a la fibrosis pulmonar idiopática y a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). No obstante, la inhibición de su actividad se puede traducir en una falla en la reparación de la MEC en caso de daño (Cottin, 2012).

El desprendimiento casi total de las células que conforman el epitelio bronquiolar (células de clara y células ciliadas) en su borde luminal fue posiblemente causado por una enfermedad pulmonar provocada por la exposición postnatal a la hiperoxia. Se ha demostrado que los epitelios de las vías aéreas pulmonares pueden ser remodelados después de un daño para recuperar la homeostasis pulmonar, no obstante, dependiendo de la severidad de la agresión tisular el epitelio puede ser recuperado o no. En una revisión bibliográfica Crosby y Waters (2010), explican el mecanismo de reparación epitelial en los pulmones después de una lesión epitelial. Según esos autores todo comienza por el reclutamiento de células inmunes y la propagación y migración de células epiteliales sobre una matriz temporal fabricada de forma autóloga. En resumen, la lesión provoca la liberación del factor de crecimiento epidérmico y las familias de factores de crecimiento de fibroblastos (TGF-, KGF, HGF), quimiocinas (MCP-1), interleucinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-13) y prostaglandinas (PGE2). Estos factores

coordinan procesos que involucran integrinas, materiales de matriz (fibronectina, colágeno, laminina), metaloproteinasas de matriz (MMP-1, MMP-7, MMP-9), adherencias focales y estructuras del citoesqueleto para promover la propagación y migración celular. Las células madre progenitoras localizadas y distales se reclutan en el área lesionada, y la proliferación y diferenciación fenotípica de estas células conduce a la recuperación de la función epitelial.

La eliminación celular del epitelio afectado también puede ser por apoptosis de las células dañadas o por autofagia. De acuerdo con Levine y Kroemer (2008) la apoptosis puede servir como un proceso de adaptación al eliminar las células disfuncionales, limitar la inflamación en el tejido dañado, y también puede actuar como una protección contra la proliferación celular patológica y la carcinogénesis. Así mismo, algunos estudios orientan, que el desanclaje celular está vinculado con un tipo de apoptosis denominada anoikis (Cardone *et al.*, 2007). Este proceso se caracteriza por la interrupción de la unión celular a la matriz extracelular y da como resultado la activación de la muerte celular programada (Frisch y Francis, 1994). El papel de las ERO en anoikis no es muy claro, pero hay investigaciones que indican que la interrupción del contacto celular se da por un aumento en los niveles intracelulares de ERO. Por otra parte, este tipo de procesos degenerativos del epitelio bronquiolar se asocia a estados de inflamación y en infecciones respiratorias virales. Si las células afectadas no se eliminan por apoptosis u otro mecanismo y permanecen vivas en el lado luminal del bronquiolo, éstas pueden crecer independiente y desarrollar enfermedades metastásicas. (kim *et al.*, 2005).

El desprendimiento de las células de Clara es una alteración muy grave ya que éstas desempeñan una función principal en la secreción de una sustancia denominada la proteína secretora de la célula de Clara (CCSP), la cual es un polipéptido cuya función es proteger el epitelio bronquiolar de la intoxicación por sustancias nocivas inhaladas en los pulmones (gases tóxicos, polvo). También actúan como células madre ya que a partir de ellas se multiplican y diferencian las células ciliadas, para regenerar el epitelio

bronquiolar (Woywodt *et al.*, 2010). Por otra parte, se hizo notorio que las células ciliadas del epitelio bronquiolar presentaban ausencia de cilios. Este daño que es causado por la hiperoxia, evita que las secreciones de moco puedan ser distribuidas en todo el epitelio, de esta forma se hace más susceptible el tejido, aumentando la posibilidad de que los microorganismos patógenos lo colonicen al no ser atrapados por la barrera mucoide del epitelio bronquiolar (Sinha *et al.*, 2009).

Se ha planteado que las ERO son las responsables de generar vasoconstricción de la microcirculación pulmonar, este efecto es muy característico en aquellas situaciones donde se implementa oxigenación en prematuros (Vanhoute *et al.*, 2009). La finalidad del organismo al generar este mecanismo es evitar la entrada de altas concentraciones de O<sub>2</sub> en tejidos donde se puede producir un efecto dañino, además estudios han demostrado que la hiperoxia acelera la degradación del óxido nítrico y esto propicia de forma directa la obliteración de capilares debido a que este gas es producido por las células endoteliales y actúa relajando estas células permitiendo de este modo la dilatación de los capilares y vasos sanguíneos (Leung, 2008).

En el grupo hiperoxia-aurina se observó en el parénquima pulmonar y en los bronquiolos estructuras bien conservadas comparada con el grupo hiperoxia, esto posiblemente se dio por la administración de aurina, la cual actuó preservando el tejido pulmonar del efecto provocado por el estrés oxidativo inducido por la exposición a altas concentraciones de O<sub>2</sub>.

Los tabiques inter-alveolares del grupo hiperoxia-aurina mostraron una buena integridad estructural sin evidencia de ruptura gracias a la preservación morfológica de las células. Probablemente, la aurina con su capacidad antioxidante evita la lipoperoxidación de las membranas celulares y en consecuencia su ruptura. Por otro lado, los capilares alveolares mostraron una estructura normal, evitando la vasoconstricción que generalmente es ocasionada por la exposición a la hiperoxia. La ingesta de aurina posiblemente ayudo a la preservación del óxido nítrico, un gas indispensable para que se pueda ejercer el correcto funcionamiento del ajuste del

volumen en las células endoteliales (Huxtable, 1990).

Las arterias del grupo hiperoxia-aurina muestran una estructura con características normales comparadas con el grupo hiperoxia. No se evidenció signos de edematización en el tejido conjuntivo, también la aurina ayudo a que se preservaran los fibroblastos evitando que se generara la necrosis del tejido adyacente a la arteria. Por otra parte, a nivel del bronquiolo, la aurina mantuvo la integridad estructural del tejido, evitando el desprendimiento de células del epitelio que lo constituye. Se ha demostrado que la aurina evita la lesión tisular gracias a la protección que le brinda al ADN celular tras la eliminación de radicales hidroxilos, mediante el metabolismo de la cisteína (Nandhini *et al.*, 2005).

Los resultados de este estudio sostienen que la aurina actúo preservando el tejido pulmonar de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia y evito que se formaran daños en el pulmón luego de ser expuesto a hiperoxia los primeros días de desarrollo post natal. Así mismo, mantuvo la actividad de la G6PDH en niveles normales para que esta enzima pudiera actuar regulando de manera eficiente el estrés metabólico.

## CONCLUSIONES

La G6PDH aumentó en el grupo hiperoxia el día P6 posiblemente como un mecanismo para proteger el sistema antioxidante del pulmón. El tratamiento con taurina probablemente redujo el estrés oxidativo lo que condujo a la disminución de la G6PDH ese mismo día postnatal.

La hiperoxia provocó diferentes daños estructurales en el pulmón como: ruptura de los tabiques alveolares, hemorragia alveolar, edema intersticial arterial y desprendimiento celular en el epitelio bronquiolar que pueden alterar la homeostasis pulmonar.

La ingesta de taurina protegió la estructura de alvéolos y bronquiolos lo que induce a pensar que el pulmón de las ratas tratadas, es menos susceptible a enfermedades causadas por estrés oxidativo.

Los resultados infieren que en un futuro la taurina podría ser utilizada como un antioxidante para evitar el estrés oxidativo y las alteraciones estructurales en el pulmón del prematuro expuesto a hiperoxia.

## BIBLIOGRAFÍA

Acosta, T.; Nuñez, D. y Suárez, M. 2003. Anemia hemolítica por deficiencia de G6PD y estrés oxidativo. *Investigation Biomedical*, 22(3): 186-191.

Alda, E.; Bauer, G.; Benítez, A.; Bouzas, L. y Brussa, M. 2000. Therapeutic oxygen for prethreshold retinopathy of prematurity. A randomized, controlled trial. *Primary Care Pediatrics*, 105(2): 295-310.

Auten, R. y Davis, J. 2009. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatric Research*, 66(2): 121-127.

Baraldi, E. y Filippone, M. 2007. Chronic lung disease after premature birth. *The New England Journal of Medicine*, 357(19): 1946-1955.

Bhavsar, T.; Cantor, J.; Patel, S. y Lau-Cam, C. 2009. Attenuating effect of taurine on lipopolysaccharide induced acute lung injury in hamsters. *Pharmacological Research*, 60: 418-428.

Barua, M.; Liu, Y. y Quin, M. 2001. Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-kappaB activation and IkappaB kinase activity. *The Journal of Immunology*, 167(4): 2275-2281.

Bertrand, Y. 1985. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Medicine*, 11: 56-60.

Borok, Z. 2014. Alveolar epithelium: beyond the barrier. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(5): 853-856.

Cardone, M.; Salvesen, G.; Widman, C.; Johnson, G. y Frisch, S. 2007. La regulación de los anoikis: la activación de MEKK-1 requiere escisión. *Celular*, 90: 315-323.

Caraballo, E. y Calzadilla, A. 2016. Histopatología, estrés oxidativo y muerte mitocondrial en el corazón de ratas expuestas a hiperoxia postnatal y tratadas con taurina. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Carmeliet, P.; Ferreira, V.; Breier, G.; Pollefeyt, S.; Kieckens, L. y Gertsenstein, M. 1996. Anormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380: 435-439.

Carvajal, M. 2015. Efecto protector de la taurina contra el estrés oxidativo en el cerebro de ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia: un estudio histológico y bioquímico. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

- Cappellini, M. y Fiorelli, G. 2008. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 371: 64-74.
- Céspedes, T. y Sánchez D. 2014. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Cardiology and Cardiovascular Surgery*, 14(7): 55-60.
- Cheesman, K. y Slater, T. 1998. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49: 481-493.
- Córdova, N. 2016. Efecto de la taurina contra daños lipoperoxidativos y estructurales en el pulmón inmaduro de ratas expuestas a hiperoxia. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Crosby, L. y Waters, C. 2010. Epithelial repair mechanisms in the lung. *The American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 298: 716-726.
- Cottin, V. 2012. Changing the idiopathic pulmonary fibrosis treatment approach and improving patient outcomes. *European Respiratory Review*, 21: 161-167.
- Danzig, J.; Moser, J.; Belfield, P. y Alter, C. 2011. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency diagnosed in an adolescent with type 1 diabetes mellitus and hemoglobin A1c discordant with blood glucose measurements. *The Journal of Pediatrics*, 158: 849-851.
- Dorada, L. y Revilla, J. 2000. Radicales libres de oxígeno y distres respiratorio agudo. *Revista Cubana de Pediatría*, 72(3): 214-219.
- Fehlmann, E.; Tapia, J.; Fernández, R.; Bancalari, A. y Fabresb, J. 2010. Impacto del síndrome de dificultad respiratoria en recién nacidos de muy bajo peso. *Argentine Archives of Pediatrics*, 108(5): 393-400.
- Fink, M. 2002. Role of reactive oxygen and nitrogen species in acute respiratory distress syndrome. *Current Opinion Critical Care*, 8(7): 6-11.
- Frank, J. 2005. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *American Family Physician*, 72: 127-132.
- Fries, K.; Blieden, T.; Looney, R.; Sempowski, G.; Silvera, M. y Willis, A. 2004. Evidence of fibroblast heterogeneity and role of subpopulations in fibrosis. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 72: 283-292.
- Frisch, S y Francis, H. 1994. La distribución de las interacciones célula-matriz epitelial induce apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 124: 619-626.
- Gómez, S.; López, G.; García, I.; Hernández, G.; Méndez, S.; Marcial, J.; Castillo, A.; Enríquez, S.; De la Mora, I.; Torres, A.; Reyes, H. y Oria, J. 2014. Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: De lo clínico a lo bioquímico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(4): 409-420.

González, M. 2015. Histopatología, daño lipoperoxidativo y actividad de la enzima lactato deshidrogenasa del cerebro de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia y tratadas con taurina. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

González, A. y Omaña, Alonso. 2006. Síndrome de distrés respiratorio neonatal o enfermedad de membrana hialina. *Boletín de Pediatría*, 46: 160-165.

Guyton A. 2005. Physical bases of the gases replacement; oxygen diffusion and carbone dioxide across to respiratory membrane. *Medical Physiology*, 3: 479-90.

Guz, G. y Lortlar N. 2007. The effect of taurine on renal ischemia-reperfusion injury. *Amino Acids*, 32: 405-411.

Han, S.; Gao, J.; Guofu, C.; Zhang, L.; Hong, Y.; y Lu, H. 2010. Taurine protects against lung damage following limb ischemia reperfusion in the rat by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Acta Orthopaedica*, 81(2): 263-267.

Hernández, D.; Wood, C. y Castro, S. 2010. Reactive oxygen species: A radical role in development?. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2): 130-143.

Hintz, S.; Meurs, K. y Perritt, R. 2007. Neurodevelopmental outcomes of premature infants with severe respiratory failure enrolled in a randomized controlled trial of inhaled nitric oxide. *The Journal of Pediatrics*, 151: 13-26.

Howes, R.; Battle K.; Satyagraha A. y Baird J. 2013. G6PD Deficiency: Global Distribution, Genetic Variants and Primaquine Therapy. *Advances in Parasitology*, 81(3): 11-20.

Huxtable, R. 1990. The interaction between taurine, calcium and phospholipids: further investigations of a trinitarian hypothesis. Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology. *Wiley-Liss Academic Journals*, 351: 185-186.

Huxtable, R. 2002. Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*, 72: 101-163.

Isakson, B.; Lubman, R.; Seedorf, G. y Boitano, S. 2001. Modulation of pulmonary alveolar type II cell phenotype and communication by extracellular matrix and KGF. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 281: 129-129.

Jeon, S.; Lee, M.; Rahman, M.; Kim, S.; Kim, G.; Park S.; Hong, C.; Kim, S. y Kang, H. 2009. The antioxidant, taurine reduced lipopolysaccharide (LPS)-induced generation of ROS, and activation of MAPKs and Bax in cultured pneumocytes. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 22: 562-566.

Jerlick, A.; Pitt, A.; Schaur, R. y Spickett, C. 2000. Pathway of phospholipids oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. *Free Radical Biology Medicine*, 28(5): 637-682.

Jobe, A. y Bancalari, E. 2001. Bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(7): 1723-1729.

Kim, C.; Jackson, E.; Woolfenden, A.; Lawrence, S.; Babar, I.; Vogel, S.; Crowley, D. y Bronson, R. 2005. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *British Journal Surgery*, 121: 823-835.

Kotton, D. y Mulligan, R. 2005. Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33: 328-334.

Kulkarni, T.; O'Reilly, P.; Veena, A.; Gaggar, A. y Thannickal, V. 2016. Matrix remodeling in pulmonary fibrosis and emphysema. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54: 751-760.

Lachapelle, P.; Dembinska, O.; Rojas, L.; Benoit, J.; Almazan, G. y Chemtop, S. 1999. Persistent functional and structural retinal anomalies in newborn rats exposed to hyperoxia. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology*, 77: 1-8.

Leung, F.; Yung, L.; Laher, I.; Yao, X.; Chen, Z. y Huang, Y. 2008. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases. *The American Journal of Sports Medicine*, 38(12): 109-114.

Levine, B. y Kroemer, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Nature Cell Biology*, 132: 27-42.

Lourenco, R. y Camilo, M. 2002. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *Nutrición Hospitalaria*, 6: 262-270.

Maltepe, E. y Saugstad, O. 2009. Oxygen in health and disease: regulation of oxygen homeostasis clinical implications. *Pediatrics*, 65: 261-268.

Maniscalchi, A. 2015. Ultraestructura de la sustancia blanca, actividad de la catalasa y concentración de tioles totales en el cerebelo de ratas expuestas a hiperoxia postnatal y tratadas con taurina. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Márquez, C. y Vásquez, Z. 2017. Efecto protector de la taurina contra el daño oxidativo y estructural en el riñón de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Matthay, M., Folkesson, H., Campagna, A. y Kheradmand, F. 1993. Alveolar epithelial

barrier and acute lung injury. *Clinical Science*, 11: 613-622.

Mayor, O. 2010. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Instituto de Medicina Tropical*, 5(2): 23-29.

Mehta, A.; Mason, P. y Vulliamy, T. 2000. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Clinical Haematology*, 13: 21-38.

Menx, L.; Lianyuan, Z.; Shuyun, D. y Yibing, Z. 2004. Influence of taurine on apoptosis of acute lung injury following limbs ischemia-reperfusion in rats. *Revista China de Fisiopatología*, 20: 421-444.

Moreno, J.; Galbiatti J.; García, P.; Kai, F.; y Neto, F. 2001. Efeito de vitamina E, da vitamina C e da associacao vitamina E – vitamina C, na síndrome do isquemia-reperfusao, en membro posterior de rato. *Medical Journal Sao Paulo*, 78(7): 526-535.

Nagato, A.; Bezerra, F.; Lanzetti, M.; Lopes, A.; Silva, M.; Porto, L. y Valenca, S. 2012. Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. *International Journal of Experimental Pathology*, 9: 269-278.

Nandhini, A.; Thirunavukkarasu, V. y Ravichandran, M. 2005. Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistan rats. *Singapore Medical Journal*, 46(2): 82-88.

Reylli, P. y Burkley, G. 1990. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *British Journal Surgery*, 77: 1324-1325.

Rojas, A. 2015. Análisis de la concentración de malonaldehído, actividad de la superóxido dismutasa e histología en el cerebelo de ratas expuestas a hiperoxia y el efecto antioxidante de la taurina. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Rojas, L.; Liscano, A.; Palmar, M.; Moreno, M.; Gómez, A. y Prin, J. 2013. Daños observados en la sustancia gris del cerebelo de ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia postnatal. *Acta Microscópica*, 22(2): 160-168.

O'Reilly, M.; Marr, S.; Yee, M.; McGrath-Morrow, S. y Lawrence B. 2008. Neonatal hyperoxia enhances the inflammatory response in adult mice infected with influenza a virus. *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(10): 1103-1110.

Patiño, J. 2006. *Metabolismo, nutrición y shock*. Cuarta edición. Editorial medica panamericana. Bogotá.

Pérez, E. y Fernández A. 2000. *Fisiología Humana*. Tercera edición. McGraw-Hill Interamericana S.A.U. España.

Saugstad, O. 1999. Oxygen toxicity in the neonatal period. *Scandinavian Paediatrics Acta*, 79(10): 881-892.

Saugstad, O.; Ramji, F. y Vento, M. 2008. Resuscitation of newborn infants with 21% or 100% oxygen: an updated systematic review and meta-analysis. *Neonatology*, 94: 176-182.

Schneider, A.; Cack, U.; Rothe, K. y Bennek, J. 2005. Peritoneal taurolidine lavage in children with localized peritonitis due to appendicitis. *Pediatric Surgery International*, 21: 445-448.

Schieber, M. y Chandel, N. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10): 453-462

Silverman, W.; Ferting, J. y Berger, A. 1998. The influence of the thermal environment upon the survival of newly born premature infants. *Pediatrics*, 22: 876-886.

Sinha, S.; Ray, U.; Tomar, O. y Singh, S. 2009. Different adaptation patterns of antioxidant system in natives and sojourners at high altitude. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 167(3): 255-260.

Sweet, D.; Carnielli, V.; Greisen, G.; Hallman, M.; Ozek, E.; Plavka, R.; Simeoni, U.; Speer, C. y Halliday, H. 2010. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm Infants. *Neonatology*, 97: 402-417.

Semenza G. 2000. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circulation Research*, 86: 117-118.

Serje, J. 1998. Exogenous surfactant preserves lung function and reduces alveolar Evans blue dye in flux in a rat model of ventilation-induced lung injury. *Anesthesiology*, 89: 464-474.

Singh, S. y Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.

Sokal, R. y Rohlf, F. 1989. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Blume. Madrid.

Stewart, L. y Voelke, N. 2008. Molecular pathogenesis of emphysema. *Journal of Clinical Investigation*, 118(2): 394-402.

Thibodeau, G. y Patton, K. 2000. *Anatomía y fisiología*. Ediciones Harcourt, S.A. España.

Vanhoute, P.; Shimokawa, H.; Tang, E. y Feletou, M. 2009. Endothelial dysfunction and

vascular disease. *Acta Physiologica*, 196: 193-222.

Vento, M. y Viña, J. 2009. Oxígeno en el periodo neonatal: consecuencias patológicas en edades posteriores de la vida. *Real Academia de Farmacia*, 7: 327-361.

Weinberger, B; Laskin, D; Heck, D. y Laskin, J. 2002. Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 181(7): 60-67.

Wiegman, C.; Li, F. y Clarke, C. 2014. A comprehensive analysis of oxidative stress in the ozone-induced lung inflammation mouse model. *Clinical Science*, 126(6): 425-440.

Woywodt, A.; Lefrack, S. y Matteson, E. 2010. Tainted eponyms in medicine: the “Clara” cell joins the list. *European Respiratory Journal*, 36: 706-708.

Wu, F.; Tian, F. y Lin, Y. 2015. Oxidative stress in placenta: health and diseases. *Biomed*, 29: 32-71.

Zapata-Vívenes, E. y Nusetti, O. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *Journal of Shellfish Research*, 26(2): 1-10.

## APÉNDICE

Apéndice 1. Análisis de varianza de la actividad de la G6PDH, en el pulmón de ratas del día P6 de los grupos control, hiperoxia e hiperoxia-aurina. Sc: sumas cuadráticas, GI: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente variable	SC	GI	Mc	Fs	P
Entre grupos	0,104	02	0,052	33,30	0,001
Intra grupos	0,023	14	0,001		
Total corregido	0,127	16			

Apéndice 2. Contraste múltiple de rango de la actividad de la G6PDH, en el pulmón de ratas del día P6 de los grupos control, hiperoxia e hiperoxia-aurina. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

Método 95,0: Porcentaje Duncan

Grupo	F	M	Gh
CON	6	0,245	X
HIP-TAU	6	0,291	X
HIP	6	0,425	X

	Contraste	Diferencias
CON-HIP		*-0,18
CON-HIP-TAU		-0,046
HIP-HIP-TAU		*0,133

\*indica una diferencia significativa

Apéndice 3. Análisis de varianza de la actividad de la G6PDH, en el pulmón de ratas del día P9 de los grupos control hiperoxia e hiperoxia-aurina. Sc: sumas cuadráticas, GI: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente variable	SC	GI	Mc	Fs	P
Entre grupos	0,00760104	03	0,0017352	3,41	0,0667
Intra grupos	0,00213591	11	0,000371031		
Total corregido	0,009736	14			

Apéndice 4. Análisis de varianza de la actividad de la G6PDH, en el pulmón de ratas del día P12 de los grupos control hiperoxia e hiperoxia-aurina. Sc: sumas cuadráticas, GI: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente variable	SC	GI	Mc	Fs	P
Entre grupos	0,00114892	7	0,0056219	4,12	0,0621
Intra grupos	0,00823476	7	0,000984326		
Total corregido	0,009383	14			

## HOJAS DE METADATOS

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	Análisis De La Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa E Histopatología Del Pulmón De Ratas Expuestas A Hiperoxia Y El Efecto Protector De La Taurina
<b>Subtítulo</b>	

#### Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Salazar G. Ahixabeth Del V.</b>	<b>CVLAC</b>	<b>24.402.614</b>
	<b>e-mail</b>	<b>ahixabeths@gmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	

#### Palabras o frases claves:

<b>Hiperoxia</b>
<b>Pulmón</b>
<b>Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa</b>

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Departamento de Bioanálisis

### Resumen (abstract):

Con el objetivo de evaluar el efecto protector de la taurina contra el daño oxidativo y estructural en el pulmón de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia, 4 grupos de animales constituidos por 10 crías y su madre, fueron colocados en una incubadora a  $80 \pm 3\%$  de  $O_2$  desde el primer día de nacimiento y hasta los días postnatales P6, P9 y P12. A dos de los grupos se le suministró una solución de taurina al 3% (240  $\mu\text{mol/l}$ ) como agua de beber (grupo hiperoxia-taurina) y a los otros dos grupos se le colocó solo agua (grupo hiperoxia). Del mismo modo, se tomaron como control cuatro grupos similar a los de hiperoxia, pero expuestos a normoxia (21%  $O_2$ ). Después del sacrificio se tomaron muestras del pulmón tanto para el análisis bioquímico como histológico. Bioquímicamente, se determinó la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) mediante técnicas espectrofotométricas. No obstante, la estructura del pulmón se analizó mediante cortes semifinos (0,7 $\mu\text{m}$ ) de muestras incluidas en resina epóxica. Los resultados muestran un aumento de la actividad enzimática de la G6PDH en el día P6 del grupo hiperoxia. Esto sucede posiblemente, por la necesidad de combatir las ERO mediante la producción de la enzima NADPH necesaria para catalizar las diferentes reacciones enzimáticas. El tratamiento con taurina condujo a la disminución de la G6PDH ese mismo día postnatal, probablemente como una reacción a la actividad antioxidante del aminoácido. Histológicamente en el grupo hiperoxia se observó alteraciones estructurales con respecto al grupo control. Entre los daños figuran la ruptura de los tabiques alveolares, hemorragia alveolar por daño capilar, edema intersticial arterial y desprendimiento celular en el epitelio bronquiolar que pueden alterar la homeostasis pulmonar. Estos daños fueron posiblemente provocados por la lipoperoxidación de las membranas celulares debido al estrés oxidativo. En el grupo hiperoxia-taurina el pulmón se observó más protegido estructuralmente lo que conlleva a pensar que es menos susceptible a enfermedades producidas por estrés oxidativo. Los resultados posicionan la taurina como un posible agente antioxidante contra el daño pulmonar causado por la hiperoxia postnatal en el prematuro.

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

#### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Rojas, Luz Marina	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	4.339.741
	e-mail	lmarinarojas@yahoo.com
	e-mail	
Velásquez, Patricia	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	14.560.301
	e-mail	<a href="mailto:patriciavelasquezv@gmail.com">patriciavelasquezv@gmail.com</a>
	e-mail	
Camacho, Angel	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	16.308.651
	e-mail	angelcamacho@udo.edu.ve
	e-mail	

#### Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

Colocar fecha de discusión y aprobación:

2020	02	13
------	----	----

Lenguaje: SPA

**Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6**

**Archivo(s):**

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-A.Salazar.docx	Application/Word

**Alcance:**

Espacial: Internacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

**Título o Grado asociado con el trabajo:** Licenciado en Bioanálisis

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciado

**Área de Estudio:** Bioanálisis

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:** Universidad de Oriente

---



---

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
SISTEMA DE BIBLIOTECA  
RECIBIDO POR *[Signature]*  
FECHA *5/8/09* HORA *5:30*

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

*[Signature]*  
JUAN A. BOLANOS CUNPELO  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) :** “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.

  
Autor

  
Asesora