



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

ACTIVIDAD DE LA CATALASA, VIABILIDAD MITOCONDRIAL E HISTOLOGÍA
EN EL HÍGADO DE RATAS EXPUESTAS A HIPEROXIA Y
TRATADA CON TAURINA
(Modalidad: Tesis de Grado)

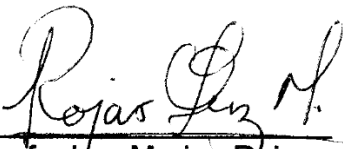
MIGUEL ANTONIO CAMPOS VALLEJO

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

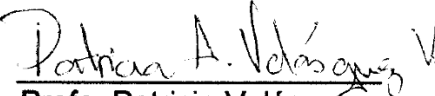
CUMANÁ, 2020

ACTIVIDAD DE LA CATALASA, VIABILIDAD MITOCONDRIAL E HISTOLOGÍA
EN EL HÍGADO DE RATAS EXPUESTAS A HIPEROXIA Y
TRATADA CON TAURINA

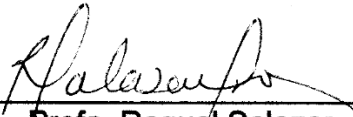
APROBADO POR:



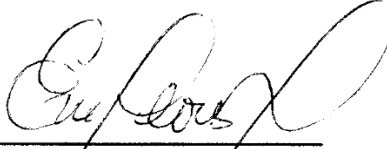
Profa. Luz Marina Rojas
Asesora



Profa. Patricia Velásquez
Co-asesor



Profa. Raquel Salazar
Jurado



Profa. Evelin flores
Jurado

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	4
Muestra poblacional	5
Inducción a la hiperoxia	5
Análisis bioquímico	6
Toma de la muestra	6
Aislamiento de la fracción mitocondrial	7
Ensayo de viabilidad mitocondrial	8
Análisis histológicos	8
Análisis estadístico	9
RESULTADOS.....	10
Actividad enzimática de la catalasa	10
Viabilidad mitocondrial	11
Análisis histológico.....	12
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
APÉNDICES	35
HOJAS DE METADATOS	38

DEDICATORIA

A

Mi Dios y a la santísima virgen del Carmen por haberme dado salud y vida para ser realidad esta meta propuesta porque todo lo alcanzado se lo debo a ustedes, pues son mi todo incondicional, me han brindado las fuerzas, el ánimo, apoyo, protección e inteligencia en cada paso que he dado durante mi carrera. Las palabras se quedan cortas para agradecerle todo lo que me han brindado.

El espíritu sagrado del Profesor Lino Valles, por haber sido mi protector durante toda mi carrera, por haber alejado de mí cualquier pena o calamidad. ¡Oh! Apóstol de la Diosa de la montaña, muchas gracias.

Mis Padres, Isidro Antonio Campos y María del Valle Vallejo, quienes han sido mi motor de arranque en todo momento, por haber creído en mí, por darme su apoyo, comprensión y esos abrazos y palabra de fuerza y resistencia que me alentaron a continuar. Son la columna que Dios colocó en mi vida para bendecirme. A ustedes debo lo que soy. Son mi orgullo y motivación. Es por esto que les dedico especialmente este gran logro a estas dos personas que con mucha paciencia y sacrificio, supieron orientarme a lo que hoy en día soy. Su sacrificio, si valió la pena. Gracias.

Mi hermano Manuel Alejandro Campos, por su apoyo en los momentos difíciles y sus palabras de aliento y ser ese compañero inseparable.

Mi hermano Daniel Castellar, que aunque la vida no nos ha permitido estar juntos y compartir, siempre estas presente en cada paso que doy y no lo olvidare.

Mi abuelo Andrés Rafael Vallejo (†) y Fernanda Perdomo (†), por cuidarme desde mi nacimiento, y aunque ya en el cielo sé que me guían y protegen. Aun los extraño mucho y esto es por ustedes siéntanse orgullosos. Aunque también debo reconocer que no ha sido un año nada fácil y pensé que cumpliría tu deseo de verme con toga y birrete Dios te llamo a su morada abuela Macarina del Rosario Mago (†) y tía (meche), Inés Mercedes Campos (†), aunque no en un plano físico estarás a mi lado sé que en lo espiritual lo celebrarás, Javier Antonio Otero (†) mi hermano.

AGRADECIMIENTO

A

Mi asesora la Dra. Luz Marina Rojas Oviedo, en primer lugar, por haberme aceptado en su proyecto, por brindarme su asesoría, apoyo, amistad y tiempo necesario para la realización de este trabajo de grado. Mil gracias profe, la aprecio muchísimo. Por su conocimiento, tiempo, dedicación y esfuerzo para que esto fuera un hecho. Además, por su persistencia, paciencia y su valiosa amistad.

Mi coasesora la MSc. Patricia Velásquez, por su apoyo y asesoría en la ejecución y análisis de la bioquímica del trabajo.

El licenciado Ángel Camacho por su valioso apoyo, disposición, colaboración y lo más importante su confianza y amistad para el buen desarrollo del trabajo de investigación.

El Dr. Edgar Zapata por su asesoría en la ejecución de la bioquímica.

La TSU Milagros Moreno, por su amistad, apoyo y tiempo para el procesamiento de las muestras histológicas.

Mis compañeras de clase, Joselin Cortez, Oscarly Guzmán y Franzmary Guzmán, por transformar los momentos más duros y difíciles de la carrera en una razón para sonreír, por su apoyo desinteresado y su cariño. Gracias a ustedes no visité el piso 10.

Mis compañeros de Tesis: quienes compartieron conmigo experiencias únicas, brindándome su apoyo y amistad, es una lista larga de personas, pero vale la pena mencionar a: Ana María Lizardo, Athina Maniscalchi, Ahixabeth Salazar, Glendys Velásquez, Horiannys Hernández, Jennifer Ortiz, Carmen Cortesia,

El Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por haber financiado el proyecto: Efecto de la hiperoxia sobre la retina y el sistema nervioso central, de ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia postnatal y tratadas con taurina (Nº G-2005000388).

“MUCHAS GRACIAS”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Actividad específica de la enzima catalasa (U/gmh) en el hígado de ratas de los grupos control, control-taurina, hiperoxia, hiperoxia-taurina en los días postnatales P6, P9 y P12.	10
Figura 2. Viabilidad mitocondrial del hígado de ratas expuestas a hiperoxia desde el nacimiento hasta el día postnatal P12.	11
Figura 3. Micrografías a nivel de la vena central del hígado de ratas del grupo control de los días postnatales P6 y P12.	13
Figura 4. Micrografías a nivel de la triada portal del hígado de ratas del grupo control de los días postnatales P6 y P12.	14
Figura 5. Micrografías del parénquima del hígado de ratas del grupo control de los días postnatales P6 y P12.	15
Figura 6. Micrografías a nivel de la vena central del hígado de ratas del grupo hiperoxia de los días postnatales P6 y P12.	16
Figura 7. Micrografías a nivel de la triada portal del hígado de ratas del grupo hiperoxia de los días postnatales P6 y P12.	17
Figura 8. Micrografías del parénquima del hígado de ratas del grupo hiperoxia de los días postnatales P6 y P12.	18
Figura 9. Micrografías a nivel de la vena central del hígado de ratas del grupo hiperoxia-taurina de los días postnatales P6 y P12.	19
Figura 10. Micrografías a nivel de la triada portal del hígado de ratas del grupo hiperoxia-taurina de los días postnatales P6 y P12.	20
Figura 11. Micrografías del parénquima del hígado de ratas del grupo hiperoxia-taurina de los días postnatales P6 y P12.	21

RESUMEN

En esta investigación se evaluó la actividad de la catalasa (CAT), la viabilidad mitocondrial e histología en el hígado de ratas expuestas a hiperoxia y tratadas con taurina. Para esto, cuatro 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, hasta los días postnatales P6, P9 y P12. A dos de los grupos se les colocó una solución taurina al 3% ($240 \mu\text{mol/l}$) como agua de beber (grupos hiperoxia-taurina) y a los dos grupos restantes se les colocó solamente agua filtrada (grupos Hiperoxia). En otra incubadora pero en normoxia ($21\% O_2$), se ubicaron cuatro grupos similares identificados como grupos control y control-taurina. El análisis histológico se realizó el día posnatal 6 y 12 (P6 y P12), mientras que el análisis bioquímico se realizó los días postnatal 6, 9 y 12 (P6, P9 y P12). La actividad de la catalasa se determinó por espectrofotometría, basada en el descenso de la concentración del H_2O_2 a una longitud de onda de 240 nm. Para el análisis histológico, las muestras fueron procesadas con técnicas para la microscopía óptica de alta resolución con muestras incluidas en resina epóxica. En el día P6 la actividad de la CAT en el hígado del grupo hiperoxia ($1,18E-04 \pm 2,12E-06$ U/gmh) fue significativamente más alta comparada con el grupo control ($3,83E-05 \pm 6,47E-06$ U/gmh). El día P9 la actividad de la CAT en el hígado de los grupos hiperoxia ($3,44E-04 \pm 6,72E-05$ U/gmh) y control-taurina ($3,29E-04 \pm 7,70E-05$ U/gmh) fue significativamente superior ($F_s = 3.69$; $p \leq 0,05$) comparados con el grupo control. Para el día P12 no hubo cambios significativos en la actividad de la enzima. El porcentaje de viabilidad mitocondrial del tejido hepático de las ratas del grupo hiperoxia ($72,13 \pm 7,05 \%$) descendió significativamente comparado con los grupos control (100%) e hiperoxia-taurina ($92,89 \pm 4,58 \%$). Histológicamente, en el grupo hiperoxia se observó la pérdida de la integridad estructural del tejido hepático con presencia de edema en los sinusoides hepáticos y procesos de necrosis en las zonas circundantes a la vena central. En el grupo hiperoxia-taurina la estructura del tejido hepático se observó mejor conservada estructuralmente comparada con el grupo hiperoxia. Se sugiere que altos niveles de oxígeno causaron el aumento de la actividad de la CAT en el hígado del grupo hiperoxia quizás como una protección del órgano contra el estrés oxidativo. La hiperoxia también provocó la disfunción mitocondrial y procesos de necrosis y edematización del parénquima hepático y de su sistema vascular. La ingesta de taurina a través de la leche materna aumentó la producción de CAT, incrementó significativamente la viabilidad mitocondrial y actuó como un antioxidante eficaz preservando la estructura del tejido hepático de la acción tóxica de la hiperoxia postnatal.

INTRODUCCIÓN

El hígado es una glándula exo- y endocrina que tiene muchas funciones en el cuerpo, como la producción de proteínas y factores de coagulación de la sangre, la fabricación de triglicéridos y el colesterol, la síntesis de glucógeno y la producción de bilis (Hall, 2016). Este órgano está recubierto por una delgada capa de tejido conectivo (cápsula de Glisson) y formado por un parénquima lobular. El parénquima hepático está compuesto por células epiteliales derivadas del endodermo, denominadas hepatocitos. Se trata de células poliédricas con citoplasma eosinófilo granuloso y pálido, debido a la presencia de glucógeno (Geneser, 2014). Ultra-estructuralmente, los hepatocitos presentan un núcleo de gran tamaño y, en el citoplasma, son notables el retículo endoplasmático rugoso y liso, gotas lipídicas, peroxisomas, además de abundantes mitocondrias (Devlin, 2004).

El número y la actividad de las mitocondrias en los diferentes tejidos refleja la función fisiológica y determina su capacidad para llevar a cabo las funciones metabólicas aerobias (Alberts y Bray, 2006). El hígado es dependiente de las mitocondrias para poder desarrollar sus diversas funciones ya que éstas son las principales productoras de energía celular, capaces de producir de 90% a 95% del ATP total, consumiendo, aproximadamente, un 95% del oxígeno que utiliza la célula (Devlin, 2004; Carretero, 2010).

Las mitocondrias son muy bien conocidas por su función energética a través de la respiración celular (Friedman y Nunnari, 2014). Pero, además de abastecer de energía a toda la célula, las mitocondrias también intervienen en la apoptosis, sintetizan proteínas, en el metabolismo de varias sustancias y parecen estar implicadas en la aparición de la reproducción sexual (Alberts y Bray, 2006; King, 2017). Las mitocondrias producen ATP a través de una red metabólica interconectada a partir de diferentes fuentes de energía, como aminoácidos, lípidos y azúcares. Estos son organelos altamente especializados y dinámicos, que juegan un papel importante en la adaptación al estrés, modificando tanto sus procesos metabólicos como su morfología para adaptarse a diferentes

situaciones ambientales. Una de las adaptaciones mejor descrita para las mitocondrias es su actividad reguladora de las especies reactivas de oxígeno (ERO), para evitar daños por estrés oxidativo.

La cadena respiratoria mitocondrial es la principal fuente de producción de ERO (Bai y Cederbaum, 2001). El anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) es una de las ERO más tóxicas formadas en el interior de las mitocondrias. Este anión tiene una vida media muy corta debido a la rápida conversión en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la superóxido dismutasa dependiente de magnesio (MnSOD) localizada en el espacio de la matriz mitocondrial (Menon y Goswami, 2006). El H_2O_2 es una ERO menos tóxica que el $O_2^{\bullet -}$ (Doi *et al.*, 2014); su producción normalmente está controlada por los mecanismos de defensa antioxidantes que incluyen enzimas intracelulares (Timón, 2016).

La catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) junto con pequeñas moléculas antioxidantes, como el glutatión (GSH), la vitamina C y E, son las principales reductores de H_2O_2 . La CAT es una metaloproteína tetramérica, cuya masa molar se encuentra en el rango de 210 a 280 KDa siendo una de las enzimas más abundantes en la naturaleza, se encuentra ampliamente distribuida, en la naturaleza tanto plantas como animales incluyendo los humanos, teniendo una alta actividad en el hígado, riñón y eritrocitos (Gholamian *et al.*, 2017). La CAT puede catalizar de manera eficiente el H_2O_2 a H_2O y oxígeno.

La glutatión peroxidasa (GPx) la principal reductora de H_2O_2 en las mitocondrias. El H_2O_2 acumulado en el interior de las mitocondrias puede interactuar fácilmente con $O_2^{\bullet -}$ para producir radical hidroxilo (OH^{\bullet}), extremadamente reactivo u oxígeno singlete a través de la reacción de Haber-Weiss (Kanta, 2011). Cuando la producción de ERO supera la capacidad de los sistemas antioxidantes, se producen daños perjudiciales en las biomoléculas, en la membrana, en los complejos mitocondriales y en el ADN mitocondrial que puede provocar una disfunción del sistema de cadena respiratoria, producción de energía insuficiente e incluso muerte celular (Radak *et al.*, 2013; Angelova y Abramov, 2016).

La hiperoxia (altos niveles de oxígeno), aplicada tanto al humano como al animal en experimentación, afecta el flujo sanguíneo y puede generar daños en la síntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en el neonato de término, pero es más tóxico aun en el pretérmino (Cortina y Arizmendi, 2012). Algunas patologías hepáticas que presenta el niño prematuro han sido relacionadas con la hiperoxia postnatal (Frauca y Muñoz, 2010). Ibarreto, (2017), analizando el efecto de la hiperoxia sobre la concentración de tioles en el hígado de ratas recién nacidas, encontró que los altos niveles de oxígeno provocaron el agotamiento de los tioles solubles en ácido (TSA) y estimularon el aumento en la síntesis de proteínas totales. Según este autor, la hiperoxia también fue la responsable de las alteraciones estructurales y ultraestructurales (retículo endoplasmático distendido, mitocondrias edematizadas y con las crestas segmentadas) observadas en las células del hígado de ratas.

Uno de los antioxidantes no enzimáticos con gran efecto protector contra el estrés oxidativo es la taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico). Esta molécula es un β -aminoácido, cuya estructura química contiene un grupo sulfónico en lugar del grupo carboxilo; metabólicamente se forma en el organismo a partir de la cisteína y su ubicación es principalmente intracelular (Koh *et al.*, 2014). Su síntesis tiene lugar fundamentalmente en el hígado y en el cerebro, aunque puede producirse en otros tejidos y a partir de sustratos como la N-acetilcisteína, el glutatión o la metionina. La capacidad biosintética endógena de la taurina en el organismo es limitada, por tanto, se requiere un aporte exógeno a partir de la dieta (Lourenco y Camilo, 2002). La taurina participa en una amplia gama de funciones biológicas y fisiológicas, que incluyen la desintoxicación, la osmorregulación, la estabilización de la membrana, la modulación del calcio, la antioxidación y la inmunomodulación (Burini *et al.*, 2018).

La taurina tiene un papel importante en la mitocondria de células animales (Hansen *et al.*, 2010). La hipótesis se basa en el hecho de que la taurina se encuentra en concentraciones muy altas en los tejidos oxidativos (músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado y cerebro), pero en concentraciones más bajas en el tejido glicolítico (tejido que no depende de las mitocondrias para la

producción de energía sino del glucógeno como fuente de energía). En el tejido oxidativo la taurina es almacenada dentro de las mitocondrias con el propósito de combatir los radicales libres (RL)

En el neonato humano nacido prematuro, la taurina ha sido caracterizada como un β -aminoácido semi-esencial, razón por la cual se encuentra generalmente incorporada como suplemento en la mayoría de los regímenes alimentarios neonatales (Ruza, 2002). Se conocen pocas investigaciones que analicen el impacto de la hiperoxia postnatal en el hígado de ratas recién nacidas. Es por esta razón, que el propósito de este trabajo es evaluar el efecto que causa las altas concentraciones de oxígeno sobre la actividad enzimática de la catalasa, viabilidad mitocondrial y la histopatología en el hígado de ratas neonatas y la respuesta antioxidante y citoprotectora 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), éstas se colocaron en jaulas de acero inoxidable, durante 3 días para su acondicionamiento a las nuevas condiciones ambientales (21°C y ciclos de 12 horas luz-oscuridad controlados artificialmente). Luego se introdujo en cada jaula, un macho y dos hembras para su apareamiento, proceso que duró 5 días. Al cabo de ese tiempo las hembras fueron separadas de los machos para esperar que transcurriera el período de gestación que dura 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 estuvieron expuestas a $80 \pm 3\%$ de oxígeno (hiperoxia), diariamente, con tres interrupciones por día (30 minutos cada una) de 21% de oxígeno (normoxia); con la intención de reducir un poco el estrés al que son sometidas durante la hiperoxia, según el protocolo sugerido por Lachapelle *et al.* (1999). El nivel de oxígeno se monitoreó utilizando un analizador de oxígeno ambiental (7820 Oxygen Monitoring System), el cual estuvo conectado a la incubadora y fue calibrado diariamente. Para conservar estas condiciones, se mantuvo una vigilancia las 24 horas del día.

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 estuvo compuesto de 10 a 12 crías, con sus respectivas madres. A dos grupos, los cuales fueron identificados como hiperoxia-aurina, se les añadió aurina al 3%, en el agua de beber. La madre ingirió la aurina del agua y se la transfirió a las crías a través de la leche materna. A los dos grupos restantes no se les agregó aurina en el agua, y estuvieron

identificados como grupo hiperoxia. En una incubadora similar, 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, y el segundo como control.

Con el fin de evitar las complicaciones pulmonares que suelen presentar las ratas adultas expuesta a hiperoxia (Lachapelle *et al.*, 1999), las madres fueron alternadas cada día con las madres de las crías controles, que se encontraron en un ambiente normóxico.

Cumplido el período de hiperoxia, 5 o 6 individuos fueron pesados, para luego ser sacrificados por decapitación y rápidamente disecados para obtener el hígado. Parte del tejido se empleó para los análisis histológicos y el resto fue congelado a -20°C para su posterior procesamiento bioquímico.

Análisis bioquímico

Toma de la muestra

Para el análisis bioquímico se utilizaron de 4 a 5 especímenes de cada tratamiento y de cada período experimental, las muestras de los tejidos se guardaron en tubos de Eppendorft y conservados a una temperatura de -40°C hasta el día de su procesamiento.

Para la determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) se usó el protocolo propuesto por Zapata y Nusetti (2007). Se homogenizó 0,1 g de tejido en una relación 1:8 m/v del buffer de extracción. El buffer de extracción consistió en Tris-HCl (hidroximetilmetilamina) 20 mmol/l pH 7,6 conteniendo ácido etilendiamino-tetracetato (EDTA) un mmol/l, ditioneitol (DTT) 4 mmol/l, sacarosa 500 mmol/l, cloruro de potasio (KCl) 150 mmol/l y ácido fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) en alcohol isopropílico 1 mmol/l. El extracto resultante se centrifugó inicialmente a 2 000 x g por 10 minutos a 4°C en una centrifuga Eppendorft 5702 R refrigerada. El sobrenadante se centrifugó

nuevamente a 1 000 x g durante 30 minutos a 4°C. El volumen final colectado se usó como fuente de enzimas.

La actividad de la CAT se determinó de acuerdo con la técnica de Aebi (1984), basada en el descenso de la concentración del H₂O₂ a una longitud de onda de 240 nm (coeficiente de extinción: 40 mmol/l). Para ello, se prepararon los siguientes reactivos: buffer fosfato de potasio 100 mmol/l pH 7,40 y H₂O₂ 25 mmol/l.

En una cubeta de cuarzo se añadió un ml de buffer fosfato de potasio 100 mmol/l pH 7,40 y 40 µl de H₂O₂ 25mmol/l; seguidamente se mezcló por inversión y se midió el cambio de absorbancia en un espectrofotómetro Perkin Emer UV/VIS a una longitud de onda de 240 nm durante 1 minuto Se agregaron 20 µl del sobrenadante de la muestra, se mezcló nuevamente y se midió el cambio de absorbancia durante un minuto. El blanco utilizado estuvo constituido solo por el buffer de incubación.

Para la determinación de la actividad enzimática primero se determinó la pendiente de decaimiento de la absorbancia del H₂O₂ en relación al tiempo, este valor se dividió entre el coeficiente de extinción molar del H₂O₂, el valor obtenido se multiplicó por el volumen de la celda de reacción obteniendo así la actividad de la enzima. La actividad específica es el resultado de dividir la actividad de la enzima entre los mg de masa húmeda o de proteína del tejido.

Los resultados fueron expresados en U/gmh, donde U es la cantidad de enzima necesaria para catalizar un µmol de H₂O₂ en un minuto y gmh significa gramos de masa húmeda.

Aislamiento de la fracción mitocondrial

Para aislar la fracción mitocondrial del tejido hepático de las ratas del día P12 se utilizó el protocolo de centrifugación diferencial en sacarosa (Saz y Lascure, 1969). A 0,50 g de tejido se le agregó 3 ml de medio mitocondrial pH 7,40 (sacarosa 0,24 mol/l, EDTA 0,05 x 10⁻² mol/l y BSA 0,15%), y se dejó reposar 15 minutos para luego adicionar 7 ml de éste medio y homogenizar en frío con

un homogeneizador de vidrio. El homogenizado fue centrifugado a 100 x g a 4°C durante un minuto, y el sobrenadante filtrado con una lana de vidrio se centrifugó nuevamente a 7 800 x g por 30 minutos. El sobrenadante fue descartado rápidamente y el sedimento resuspendido en 1 ml de medio mitocondrial, usando el homogeneizador de vidrio, y luego se centrifugó a 4°C a 7 800 x g durante 30 minutos. Los sedimentos marrones que representan la fracción mitocondrial, se almacenaron a -20°C, a fin de ser utilizados en los análisis posteriores. A fin de comprobar la integridad de las mitocondrias aisladas en el protocolo anterior, se midió la extinción de NADH a 340 nm con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25/35/45 UV/Vis.

Ensayo de viabilidad mitocondrial

El ensayo de viabilidad mitocondrial se aplicó según el protocolo de (Ghazi *et al.* 2006). 1 ml de suspensión mitocondrial se mezcló con 1 ml de Janus Green β (1 ppm). La solución blanco se preparó de la misma manera, sin la adición de la suspensión mitocondrial. Cada muestra se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 607 nm.

El porcentaje de viabilidad mitocondrial (%VM) de cada muestra se calculó de la siguiente manera:

% de viabilidad = 100 % - % de toxicidad mitocondrial (TM)

$$\%TM = 1 - \frac{\text{Abs. promedio de la muestra expuesta al tóxico}}{\text{Abs. promedio del control negativo}} \times 100\%$$

Abs= absorbancia

Análisis histológicos

Para el análisis histológico, una porción del hígado 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 post-fijaron en OsO₄ (1%) por 90 minutos, para después realizar dos lavados

de 10 minutos homogenizado 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 dejó 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; se ha teñido con azul de toluidina al 1%, y se examinó en el fotomicroscopio Axioskop FL-40 marca Zeiss, con cámara digital incorporada, y la ayuda de un software analizador de imágenes AxioVision LE Cannon Modul, Carl Zeiss, Germany (Rojas *et al.*, 2013).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico aplicando un ANOVA simple con prueba *a posteriori* de Duncan al 95%, empleando el programa de *Statgraphics Plus 4.1*, para comparar la actividad enzimática de catalasa y el %VM en los distintos grupos experimentales estudiados (Sokal y Rohlf, 1989). Los resultados se expresaron en gráficas de barras (medias y desviación estándar. Los análisis histológicos se hicieron de manera descriptiva a partir de fotomicrografías hechas a cortes histológicos del hígado en un fotomicroscopio.

RESULTADOS

Actividad enzimática de la catalasa

En la figura 1 se observa la actividad específica de la enzima catalasa (CAT) en el hígado de ratas de los grupos control, control-taurina, hiperoxia, hiperoxia-taurina en los tres días postnatales analizados (P6, P9 y P12).

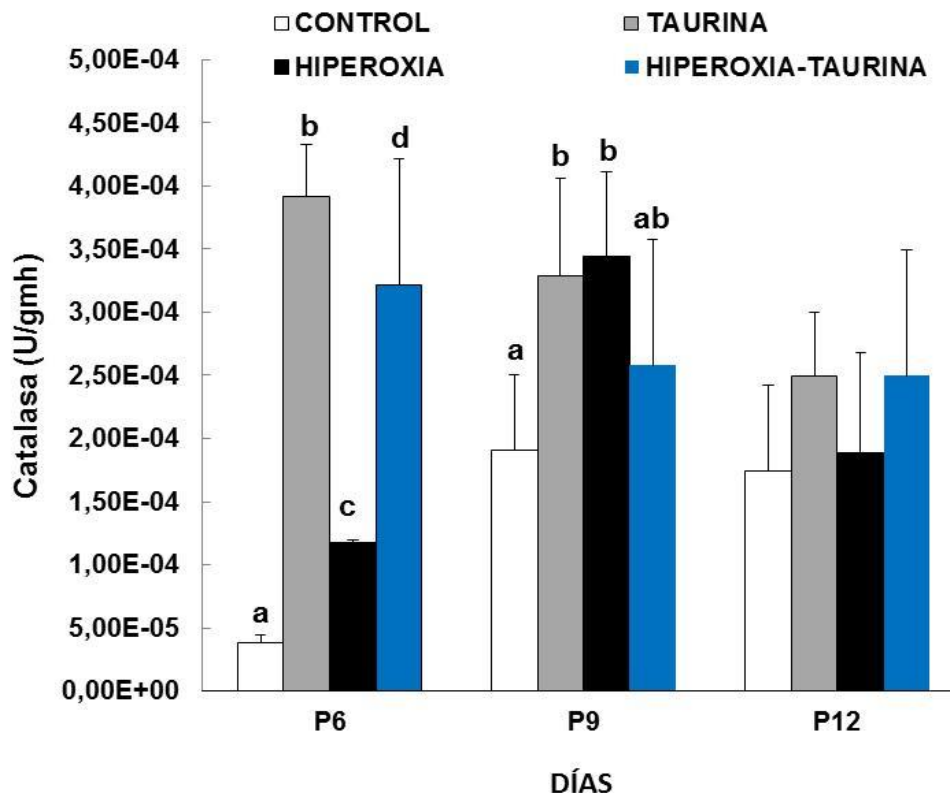


Figura 1. Actividad específica de la enzima catalasa (U/gmh) en el hígado de ratas de los grupos control, control-taurina, hiperoxia, hiperoxia-taurina en los días postnatales P6, P9 y P12. Los superíndices indican diferencias significativas entre grupos.

En el día P6 la actividad promedio de la CAT en el hígado del grupo hiperoxia ($1,18E^{-04} \pm 2,12E^{-06}$ U/gmh) fue más alta comparada con el grupo control ($3,83E^{-05} \pm 6,47E^{-06}$ U/gmh) ($F_s = 94,08$; $p \leq 0,05$). No obstante, esta fue menor en contraste con los grupos control-taurina ($3,92E^{-04} \pm 4,09E^{-05}$ U/gmh) e hiperoxia-taurina ($3,22E^{-04} \pm 7,32E^{-05}$ U/gmh).

En el día P9 la actividad de la CAT de los grupos hiperoxia ($3,44E^{-04} \pm$

6,72E⁻⁰⁵ U/gmh) y control-aurina (3,29E⁻⁰⁴ ± 7,70E⁻⁰⁵ U/gmh) fue superior (Fs=3.69; p≤0,05) comparado con el grupo control (1,91E⁻⁰⁴ ± 5,94E⁻⁰⁵ U/gmh). El grupo hiperoxia-aurina (2,58E⁻⁰⁴ ± 1,42E⁻⁰⁴ U/gmh) mostró una actividad similar al resto de los grupos analizados.

El día P12 no se observaron diferencias significativas entre los grupos control (1,74E⁻⁰⁴ ± 6,86E⁻⁰⁵ U/gmh), control aurina (2,49E⁻⁰⁴ ± 5,07E⁻⁰⁵ U/gmh), hiperoxia (1,88E⁻⁰⁴ ± 7,94E⁻⁰⁵ U/gmh) e hiperoxia-aurina (2,50E⁻⁰⁴ ± 1,52E⁻⁰⁴ U/gmh).

Viabilidad mitocondrial

Los resultados de VM están representados en la figura 2. El porcentaje de VM del tejido hepático de las ratas del grupo hiperoxia (72,13 ± 7,05%) descendió, comparado con el grupo hiperoxia-aurina (92,89 ± 4,58%) (Fs= 36,55; P<0,05).

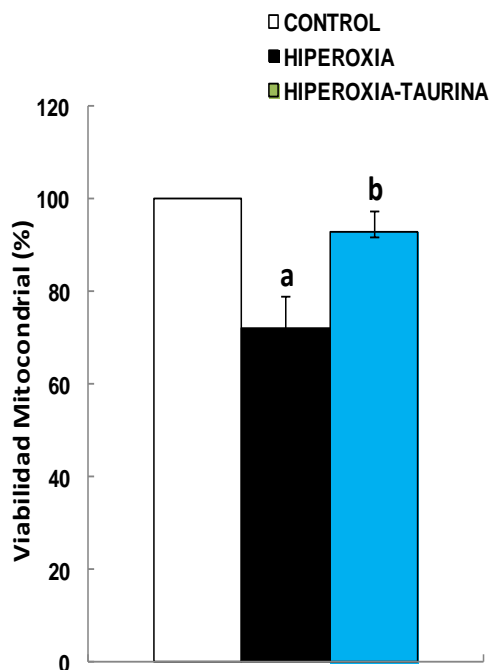


Figura 2. Viabilidad mitocondrial del hígado de ratas expuestas a hiperoxia desde el nacimiento hasta el día postnatal P12. Los superíndices indican diferencias significativas (P< 0,05) entre grupos.

Análisis histológico

Histológicamente, el hígado de las ratas del grupo control muestra una estructura normal tanto en el día P6 como en P12. En el parénquima, los hepatocitos se evidencian uniformes, con un núcleo central y un nucléolo prominente (Figura 3). Mezclados con los hepatocitos se observan los sinusoides hepáticos por donde circula el tejido sanguíneo. En la Figura 3 también se observa la vena central con un endotelio bien estructurado. En el día P6 se observa un corte transversal de la vena central mientras que en P12 se evidencia un corte longitudinal. Alternando con el parénquima, se puede avistar islotes o áreas productoras de células sanguíneas con el predominio de linfocitos y neutrófilos. Aunque también pueden hallarse células sanguíneas inmaduras (Figura 4). Además, se distingue la triada portal conformada por la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar (Figura 5). Tanto éstas estructuras como el área portal (tejido conjuntivo que sostiene las estructuras de la triada).

La histología del hígado del grupo hiperoxia, por el contrario, muestra algunas alteraciones estructurales en comparación con el grupo control tanto en el día postnatal P6 como en P12. Se observan procesos necróticos en las zonas circundantes a la vena central (Figura 6). Por otro lado, en contraste con el hígado control, los sinusoides del grupo hiperoxia se evidencian edematizados (Figura 6). Además se perciben procesos necróticos en los islotes de tejido sanguíneos y sus zonas aledañas (Figura 7). Estos islotes estuvieron conformados principalmente por linfocitos. En la zona portal del sistema porta, se evidencian procesos de edematización (Figura 8).

En el grupo hiperoxia-aurina, sin embargo, el hígado guarda una mejor integridad estructural tanto en día P6 como en P12. En el parénquima, los hepatocitos tienen menos acumulación de gotas lipídicas comparados con el grupo hiperoxia, los senos venosos no se observan edematizados y la vena central no muestra procesos necróticos en sus zonas circundantes (Figura 9).

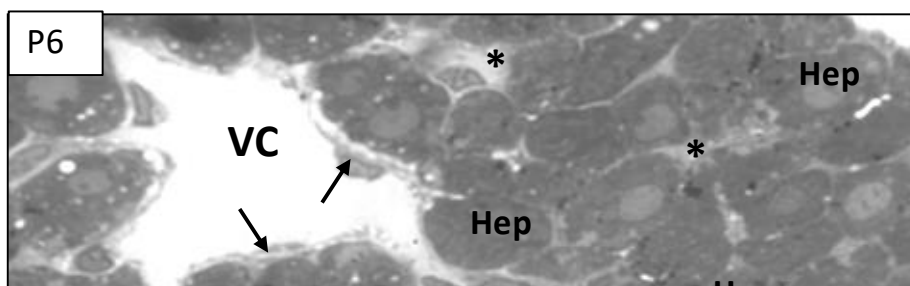


Figura 3. Micrografías a nivel de la vena central del hígado de ratas del grupo control de los días postnatales P6 y P12. El parénquima, formado por los hepatocitos, se observa uniforme. El corte de la vena central en P6 es transversal mientras que en P12 es longitudinal. En ambos días postnatales el endotelio de la vena central no muestra alteraciones. Los sinusoides se observan normales. Hepatocitos: Hep; Vena central: VC; Endotelio capilar: flecha; Sinusoides: asterisco.



Figura 4. Micrografías a nivel de la triada portal del hígado de ratas del grupo control de los días postnatales P6 y P12. El espacio portal se observa compacto. En ambos días postnatales el endotelio de la vena porta no muestra alteraciones. Los conductos biliares se evidencian bien constituidos. Vena porta: VP; Hepatocitos: Hep; Arteria hepática: AH; conducto biliar: CB.

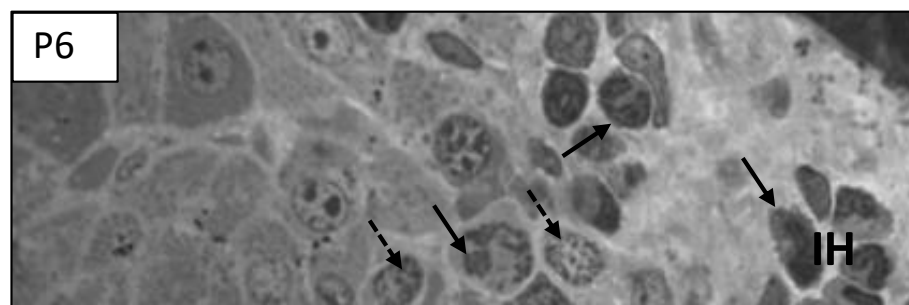


Figura 5. Micrografías del parénquima del hígado de ratas del grupo control de los días postnatales P6 y P12. Se evidencian islotes de tejido hematopoyético. En P6 se observa la presencia de neutrófilos y de linfocitos y en P12 se evidencian linfocitos. Islote hematopoyético: IH; Hepatocitos: Hep; Neutrófilos: Flechas negras; Linfocitos: Flechas blancas.

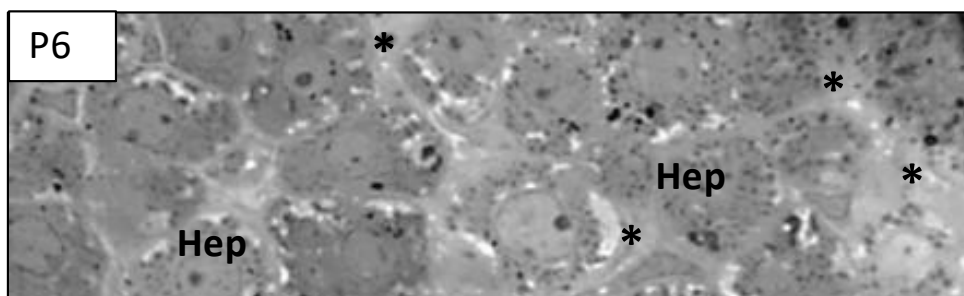


Figura 6. Micrografías a nivel de la vena central del hígado de ratas del grupo hiperoxia de los días postnatales P6 y P12. En las zonas cercanas a la vena central se observan procesos necróticos tanto en P6 como en P12. Los sinusoides se evidencian edematizados en P12. Hepatocitos: Hep; Vena central: VC; Necrosis: Ne; Sinusoides: asterisco.

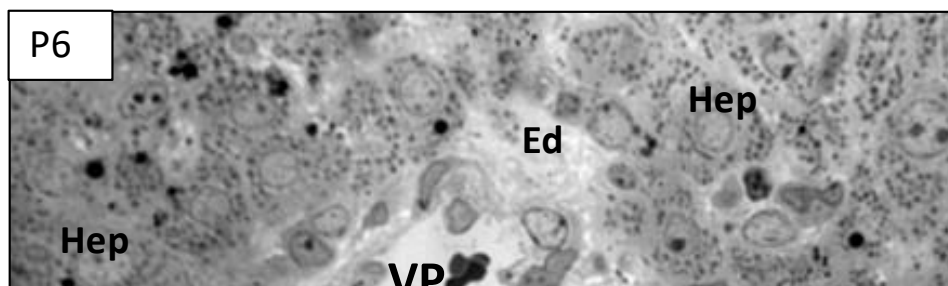


Figura 7. Micrografías a nivel de la triada portal del hígado de ratas del grupo hiperoxia de los días postnatales P6 y P12. El espacio portal se observa edematizado en ambos días postnatales analizados. Vena porta: VP; Arteria hepática: AH; Conducto biliar. CB; Hepatocitos: Hep; Edematización: Ed.

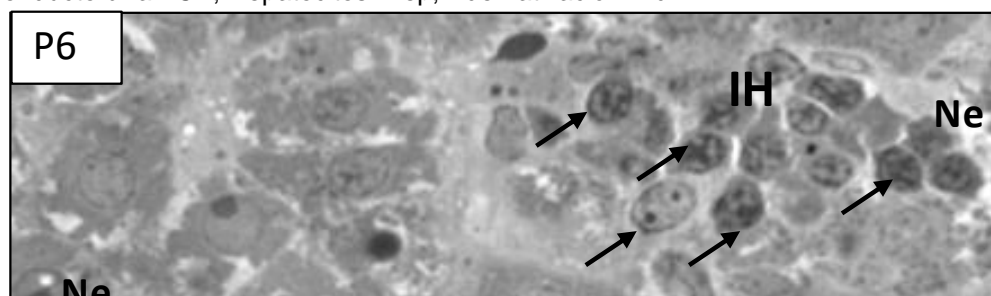


Figura 8. Micrografías del parénquima del hígado de ratas del grupo hiperoxia de los días postnatales P6 y P12. En ambos días postnatales analizados se evidencian islotes de tejido hematopoyéticos. En P6 se observan signos de necrosis celular. Tanto en P6 como en P12 se nota la presencia solo de linfocitos. Islote hematopoyético: IH; Linfocitos: flechas negras; Necrosis: Ne.

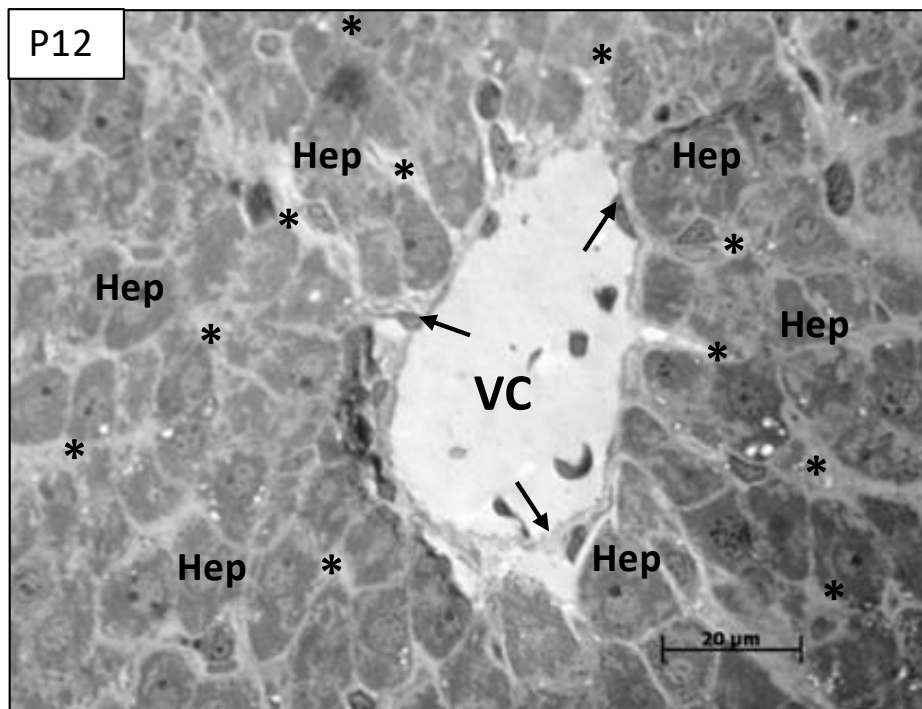
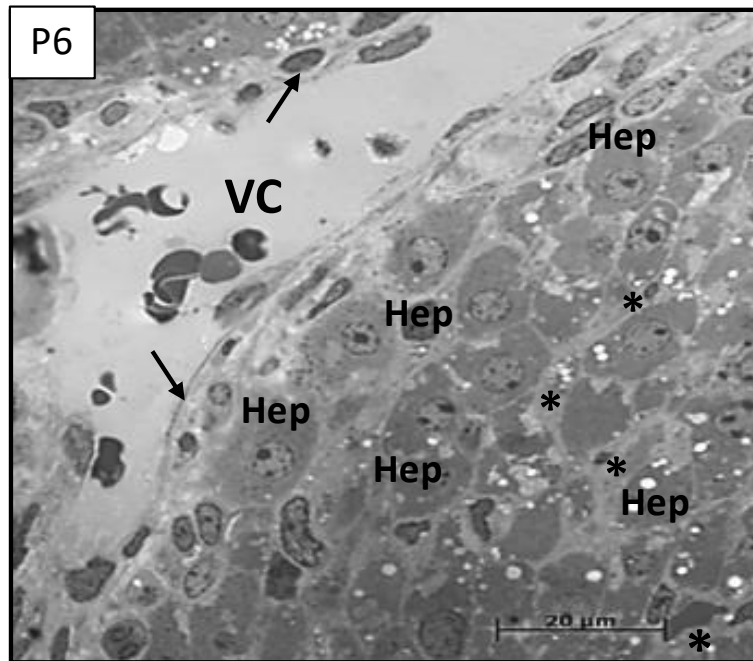


Figura 9. Micrografías a nivel de la vena central del hígado de ratas del grupo hiperoxia-taurina de los días postnatales P6 y P12. El parénquima formado por los hepatocitos se observa compacto. El corte de la vena central en P6 es longitudinal mientras que en P12 es transversal. En ambos días postnatales el endotelio de la vena central se observa normal. Hepatocitos: Hep; Vena central: VC; Endotelio capilar: flecha; Sinusoides: asterisco.

Las triadas portales se observan aparentemente bien estructuradas (Figura 10). En la figura 11 se evidencian islotes de tejido sanguíneo sin signos de edematización ni de necrosis comparados con el grupo hiperoxia. No obstante, se observó el predominio de linfocitos.

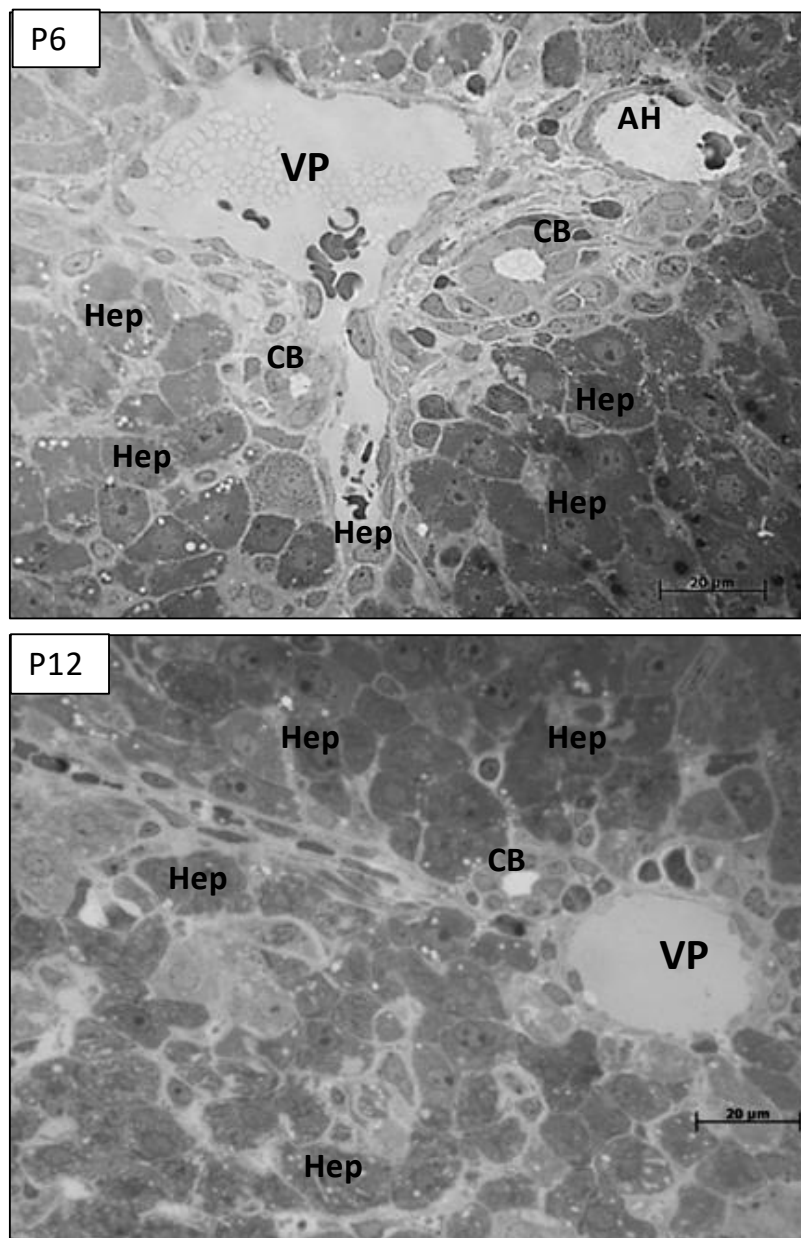


Figura 10. Micrografías a nivel de la triada portal del hígado de ratas del grupo hiperoxia-aurina de los días postnatales P6 y P12. El espacio portal muestra una estructura normal. En ambos días postnatales el endotelio de la vena porta no presenta alteraciones. Los conductos biliares se observan bien constituidos. Vena porta: VP; Hepatocitos: Hep; Arteria hepática: AH; Conducto biliar: CB

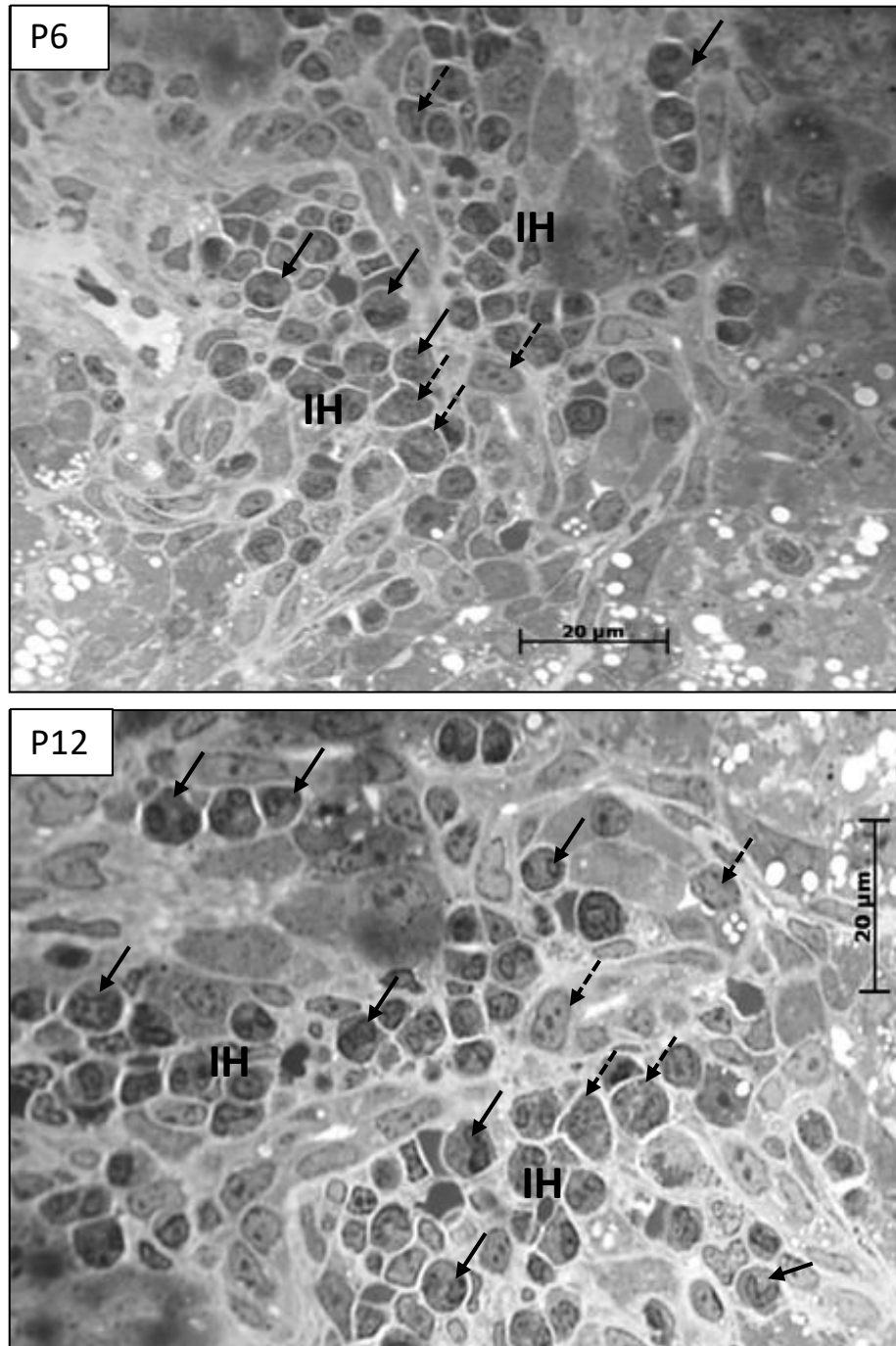


Figura 11. Micrografías del parénquima del hígado de ratas del grupo hiperoxia-taurina de los días postnatales P6 y P12. En ambos días postnatales analizados se evidencian islotes de tejido hematopoyéticos bien estructurados. Tanto en P6 como en P12 se observa la presencia de neutrófilos y linfocitos. Islote hematopoyético: IH; Neutrófilos: flechas continuas; Linfocitos: flechas punteadas.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que la taurina fue capaz de contrarrestar los efectos tóxicos de la hiperoxia postnatal en el hígado de ratas recién nacidas.

En los días postnatales P6 y P9 la actividad específica de la CAT en el grupo hiperoxia aumentó en 68% y 45%, respectivamente, comparada con el grupo control, para luego disminuir a niveles normales el día P12. La elevada actividad de la CAT en el grupo hiperoxia el día P9 se puede justificar por los altos niveles de H_2O_2 (que le sirve de sustrato) y segundo por el desarrollo del sistema antioxidante a esa edad postnatal comprobado por el evidente aumento de la CAT en el grupo control. La disminución de actividad catalítica de la CAT en el grupo hiperoxia para el día P12 coincide con la leve disminución observada en el grupo control. La CAT cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua (H_2O) y O_2 , protegiendo los tejidos contra el daño oxidativo (De la Calle, 2008).

Bajo un diseño experimental similar al del presente estudio, Álvarez (2018), analizó la concentración de TBARS en el hígado. La autora encontró que la concentración de TBARS en el grupo hiperoxia aumentó con respecto al control en 50% en P6, 74% en P9 y 41% en P12. Estos resultados concuerdan con la alta actividad enzimática de la CAT encontrados en el presente estudio esos mismos días postnatales. El descenso de la actividad de la CAT observado el día P12 coincide con el descenso de los niveles de TBARS encontrados por Álvarez (2018) ese mismo día postnatal.

Por otro lado, Córdova (2016), analizó la actividad de la CAT en el pulmón de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia. La autora encontró que en el grupo hiperoxia la actividad enzimática de la CAT aumentó con respecto al control siendo 44% en P6, 54% en P9 y 40% en P12. Se infiere la gran capacidad de respuesta antioxidante que posee el pulmón de las ratas en la edad perinatal.

La CAT es muy abundante y activa tanto en hígado como a nivel eritrocitario (Aebi, 1984). Las células que conforman el parénquima del hígado

(hepatocitos) contienen una gran cantidad de organelas llamadas peroxisomas y son las encargadas de almacenar CAT en el citoplasma de los hepatocitos (Jiménez y Silva, 2003).

Con respecto al grupo hiperoxia-aurina, en el día P6 los niveles de CAT aumentaron en un 63% con respecto al grupo hiperoxia, lo que sugiere el aumento en la actividad de la enzima que podría significar una protección del tejido por parte de la aurina aportada a las crías a través de la leche materna. El día P9 los niveles de CAT descienden con respecto a P6 y para el día P12 la CAT se observa estabilizada. Se infiere que P6 es el día de mayor impacto de la hiperoxia, sin embargo, la aurina con su efecto antioxidante disminuye el estrés oxidativo e induce al descenso de la actividad de la CAT.

El H_2O_2 puede generar daño oxidativo hacia macromoléculas, y a su vez es capaz de atravesar las membranas celulares y reaccionar con cloro, hierro o cobre, formando especies reactivas más dañinas, lo que se conoce como la reacción de Fenton o Häber-Weiss. Cuando el H_2O_2 es oxidado con ayuda de la enzima mieloperoxidasa por el cloro, se genera ácido hipocloroso y $\bullet OH$, ambos, productos muy reactivos (Stoys y Bagchi, 1995). El ácido hipocloroso es producido principalmente en neutrófilos activados y se ha demostrado que la aurina puede competir efectivamente con el H_2O_2 , logrando ser oxidada por el cloro más rápidamente, generando un producto estable, la cloramina (Tau-Cl). Las Tau-Cl estables pueden proteger a la célula de la autólisis (Englert y Scharter, 2002).

Investigando el impacto de la hiperoxia y el efecto antioxidante de la aurina en el cerebelo de ratas recién nacidas, (Maniscalchi, 2015) halló resultados similares al del presente estudio. La autora encontró que los niveles de catalasa del grupo hiperoxia-aurina aumentaron con respecto al grupo hiperoxia que no ingirió el aminoácido.

Por otro lado, Abdel-Daim *et al.* (2019) estudiaron el efecto protector hepático-renal de la aurina y la N-acetilcisteína (NAC) contra las lesiones inducidas por Fipronil (FPN), un pesticida que induce daño oxidativo. Los autores

mostraron que el FPN provocó daño oxidativo indicado por un aumento de la formación de malondialdehído (MDA) y óxido nítrico (NO) y una disminución de la concentración de glutatión y las actividades de los antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) en los tejidos hepáticos y renales. Según los autores, el agotamiento de los agentes antioxidantes, podría atribuirse a su uso excesivo en la extinción de los radicales libres, producidos durante el metabolismo de la FPN. La taurina y la NAC, solos o en combinación, disminuyeron la concentración de MDA y NO aumentando los niveles de las enzimas antioxidantes y proporcionando una protección hepatorenal significativa contra el estrés oxidativo y la apoptosis inducida por FPN.

En relación a la viabilidad mitocondrial (VM), se observó un descenso importante en el porcentaje de VM en el hígado del grupo hiperoxia. Las mitocondrias son los principales consumidores de O₂ molecular dentro de las células durante la respiración aeróbica; aunque la mayor parte del oxígeno consumido se reduce a agua (H₂O), el O₂ se reduce, parcialmente, dentro de la cadena transportadora de electrones mitocondrial resultando en la generación ERO (Kaeling, 2005). La formación endógena ERO en la respiración aeróbica se incrementa, dramáticamente, bajo condiciones de estrés oxidativo (García y Fernández, 2006). Posiblemente, el estrés oxidativo causó un aumento en los radicales libres (RL) y las ERO y por consiguiente una mayor lipoperoxidación, trayendo como consecuencia la disfunción mitocondrial en el hígado. Los RL pueden causar la peroxidación de lípidos, la fragmentación del ADN y la oxidación de proteínas en múltiples tipos de células (Wang *et al.*, 2015).

El bajo porcentaje de VM observado en el grupo hiperoxia del presente estudio podría ser explicado por una elevada lipoperoxidación tal como lo demostró Alvarez (2018) en el hígado de ratas expuestas a hiperoxia postnatal. Esta autora también observó una disminución en la concentración de tioles totales al igual que Ibarreto (2017) en tioles solubles en ácido. Según Ibarreto (2017), la exposición a hiperoxia posiblemente generó una mayor cantidad de ERO, a través de la cadena transportadora de electrones contribuyendo a la

disminución de los niveles de TSA. Cabe destacar, que las mitocondrias tienen una alta tasa de respiración y en consecuencia producen una alta tasa de ERO. Para combatir el principal ERO, el H_2O_2 , las mitocondrias están dotadas de un eficiente sistema antioxidante como lo es el sistema glutatión. El glutatión mitocondrial (mGSH) desempeña un papel esencial en la defensa mitocondrial contra la constante generación de ERO. Por lo tanto el agotamiento de mGSH, puede ser perjudicial para la célula, ya que conduce a mayores niveles de ERO y especies reactivas de nitrógeno, modificando los componentes mitocondriales oxidativos, provocando la disfunción mitocondrial y el agotamiento de ATP (Zhou, 2000; Lu, 2009). Se infiere la disminución del glutatión (GSH) pudo haber sido el causante del descenso de la VM observada en el presente estudio (Zhou, 2000).

Resultados similares a los del presente estudio fueron obtenidos por Calzadilla y Caraballo (2016), donde analizando la VM en el corazón de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia, reportaron un descenso significativo en el porcentaje de VM con respecto al grupo control.

En el grupo hiperoxia-aurina el porcentaje de VM en el hígado fue superior comparada con el grupo hiperoxia. Jong *et al.* (2012) reportaron que la aurina juega un papel antioxidante en la protección de la estructura y la función mitocondrial. Estos investigadores encontraron que la deficiencia de aurina reduce la expresión de los componentes de la cadena respiratoria requeridos para la traducción normal de las proteínas codificadas por las mitocondrias. La cadena respiratoria disfuncional bien sea por estrés oxidativo o por cualquier otra alteración, puede acumular donadores de electrones, desviando los electrones de la cadena respiratoria al oxígeno y formando aniones superóxido en el proceso. Se infiere que la aurina puede servir como un regulador de la síntesis de proteínas mitocondriales; por lo tanto, mejora la actividad de la cadena de transporte de electrones y protege las mitocondrias contra la generación excesiva de superóxido (Hansen *et al.*, 2010).

El elevado porcentaje de VM en el grupo hiperoxia-aurina hallado en el trabajo actual concuerda con los resultados de Álvarez (2018) quien encontró que

la taurina disminuyó significativamente la concentración de TBARS, aumentó la concentración de tioles totales y protegió la estructura del hígado demostrando su carácter antioxidante. Posiblemente la taurina ayudó a crear las condiciones adecuadas para que se preservaran las membranas mitocondriales y se mantuvieran los complejos de la cadena respiratoria dando paso a un mayor porcentaje de VM en el hígado de las ratas del grupo hiperoxia-taurina.

Resultados similares al del presente estudio fueron hallados por Calzadilla y Caraballo (2016). Estas autoras analizaron el porcentaje de viabilidad mitocondrial en el corazón ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia postnatal y tratadas con taurina.

Resultados similares fueron hallados por Calzadilla y Caraballo (2016) quienes trabajaron con un diseño experimental similar al del trabajo actual. Las autoras observaron un alto porcentaje de VM en el corazón de ratas expuestas a hiperoxia y tratadas con taurina comparadas con el grupo hiperoxia. Según Chang *et al.* (2012), la taurina posee una serie de propiedades citoprotectoras a través de su acción como osmoregulador, antioxidante, antiinflamatorio y estabilizador de membranas celulares.

Los estudios histológicos del hígado en las ratas del grupo hiperoxia mostraron alteraciones histopatológicas. Procesos de necrosis y edematización se observaron en el parénquima hepático, alrededor de la vena central en los islotes productores de tejido sanguíneo y en los sinusoides. La necrosis se ha definido como la muerte patológica de un conjunto de células provocada por una pérdida en el control de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática que conlleva al detrimento de la homeostasis celular (Syntichaki y Tavermarakis, 2002). Estos procesos son, sin duda, producto del estrés oxidativo causado por la hiperoxia. El edema se debe a que los RL y las ERO oxidan los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos que conforman la bicapa lipídica de las membranas celulares y mitocondriales abriendo brechas por donde entra agua causando la tumefacción celular y en consecuencia el edema mitocondrial (Vaquero, 2005). Las mitocondrias son muy susceptibles al oxígeno ya que bajo

hiperoxia se rompe el equilibrio oxidante-antioxidante que ellas tienen para su supervivencia causando su disfunción.

Ibarreto (2017) y Alvares (2018), analizaron el efecto de la hiperoxia sobre la ultraestructura y la estructura del hígado de ratas recién nacidas y encontraron numerosas alteraciones. Ultraestructuralmente, Ibarreto (2017) encontró que la hiperoxia ocasionó la muerte significativa de un gran número de mitocondrias, la distorsión del retículo endoplasmático rugoso y células de Kuffer alteradas. Estructuralmente, Alvares (2018) observó la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos, edemas, procesos fibrilares en la zona portal y procesos necróticos.

Con respecto a los islotes de tejido sanguíneo en el parénquima de hígado, se infiere que la presencia casi exclusiva de linfocitos en los islotes del grupo hiperoxia pudo haber ocurrido como una respuesta a los procesos de edematización y necrosis productos del estrés oxidativo en este grupo experimental.

Analizando las etapas del desarrollo de la hematopoyesis en el embrión de ratones, Cañete (2012) encontró que el hígado es un órgano fundamentalmente hematopoyético. Esta etapa es llamada “fase hepática de la hematopoyesis” y ocurre entre los estadios embrionarios E10 - 14 cuando se produce el mayor crecimiento del volumen celular eritroide. Las primeras células madre hematopoyéticas (CMHs) se detectan a partir del estadio E11,5. Es en el hígado donde, entre los estadios E12 - E14, se produce la mayor expansión de CMHs en todo el embrión (50 - 100 veces). Los estudios de Alexander *et al.* (1997) demostraron que el hígado de la rata Sprague-Dawley alcanza la madurez completa en el día postnatal 28. Como las ratas nacen inmaduras, el hígado postnatal aún conserva la función hematopoyética pero no tan intensa como en la etapa fetal; esto lo hace conjuntamente con el bazo y la médula ósea (Cañete, 2012). Según Rojas (2017), la hiperoxia ocasionó daños severos al bazo tales como necrosis e inflamación, así como pérdida de la integridad estructural de la pulpa blanca.

En el grupo hiperoxia-aurina, los resultados muestran que la aurina aminoró la aparición de procesos necróticos y de edematización en el tejido hepático. La acción antiinflamatoria es otra propiedad notable de la aurina, que ejerce este efecto con la formación de Tau-CI en los neutrófilos activados. Tau-CI tiene propiedades antiinflamatorias y se considera un modulador fisiológico de la respuesta inflamatoria (Schuller y Park, 2004). Los datos han demostrado que Tau-CI se puede transportar activamente a los leucocitos y puede regular la producción de mediadores inflamatorios (Schuller y Park, 2003). Se ha demostrado que la Tau-CI inhibe la síntesis y producción de sustancias proinflamatorias, ERO y especies reactivas de nitrógeno en células inflamatorias (Burini *et al.*, 2018).

Ibarreto (2017) y Álvarez (2018) analizaron el efecto de la aurina sobre el hígado de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia y encontraron que la aurina protegió la estructura de éste órgano evitando en gran parte, los procesos de edematización, necrosis y procesos fibrilares. La aurina también evitó en gran medida la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos. Ibarreto (2017) reportó que la aurina ayudó a disminuir la cantidad de mitocondrias y retículos endoplasmático rugoso alterados. Por otro lado, Rojas (2017) encontró que la aurina, aplicada a las ratas expuestas a hiperoxia, mejoró la capacidad antioxidante del bazo aumentando la concentración de tioles y protegiendo su estructura de los efectos tóxicos del oxígeno.

Los resultados emanados de este estudio sostienen que la aurina preserva el hígado de las ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia perinatal contra el estrés oxidativo aumentando los niveles de catalasa, protegiendo la viabilidad mitocondrial y evitando las alteraciones estructurales del tejido hepático.

CONCLUSIONES

De este estudio se desprende que los altos niveles de oxígeno causaron un aumento en la actividad de la CAT en el hígado de las ratas del grupo hiperoxia quizás como una protección del órgano contra el estrés oxidativo. La hiperoxia

también provocó la disfunción mitocondrial y procesos de necrosis y edematización del parénquima hepático y de su sistema vascular. La ingesta de taurina a través de la leche materna aumentó la producción de CAT, incrementó significativamente la viabilidad mitocondrial y protegió la estructura del tejido hepático de la acción toxica de la hiperoxia postnatal.

Se sugiere que la taurina actúa como un potente antioxidante ante los efectos tóxicos de la hiperoxia postnatal. No obstante, aún se requiere de muchos estudios antes de ser implementado como terapia en las unidades de cuidados intensivos neonatales.

BIBLIOGRAFÍA

Aebi, H. 1984. Catalasa in vitro. *Methods in Enzimology*, 105: 121-126.

Abdel-Daim M.; Dessouki A.; Abdel-Rahman H.; Eltaysh R. y Alkahtani S. 2019. Hepatorenal protective effects of taurine and N-acetylcysteine against fipronil-induced injuries: The antioxidant status and apoptotic markers expression

in rats. *Science of the Total Environment*, 650: 2063-2073.

Alexander, B.; Guzail, M. y Foster, C. 1997. Morphological changes during hepatocellular maturity in neonatal rats. *The Anatomical Record (Hoboken)* 248:104-109.

Álvarez, P. 2018. Histopatología de hígado, actividad de la catalasa y tióles totales en ratas expuestas a hiperoxia postnatal y tratadas con taurina. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Alberts, B. y Bray, D. 2006. *Introducción a la Biología Celular*. Segunda edición. Medica Panamericana. Buenos Aires.

Angelova, P. y Abramov, A. 2016. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free Radical Biology and Medicine*, 100: 81-85.

Bai, A. y Cederbaum, A. 2001. Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biology Signals and Receptors*, 10(3-4): 189-199.

Bohinski, R. 1986. *Bioquímica*. Addison Wesley Longman. México. P 230.

Burini, R.; Borges-Santos, M.; Moreto, F. y Ming-Yu, Y. 2018. "Taurine and Oxidative Stress in HIV". In HIV/AIDS. "Elsevier" <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809853-0.00015-8>.revisa> (12/05/2019).

Calzadilla, L. y Caraballo, F. 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.

Cañete, A. 2012. Estudio de los precursores hemato-vasculares durante el desarrollo embrionario de ratón. Tesis Doctoral. Universidad Pablo De Olavide, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular. Andalucía, España.

Carretero, M. 2010. Prevención del envejecimiento en ratones con senescencia acelerada mediante melatonina; estudios en cerebro y pulmón. Editorial de la Universidad de Granada. Granada.

Chang, Y.; Chou, C.; Chiu, C.; Yang, K.; Lin, Y.; Weng, W. y Chen, Y. 2012. Effects of taurine on hepatic lipid metabolism and anti-inflammation in chronic alcohol-fed rats. *Journal of Food Chemistry*, 135: 24-30.

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.

Cortina, M. y Arizmendi, J. 2012. Importancia clínica del estrés oxidativo perinatal. *Anales médicos*, 57: 217-222.

Das J.; Ghosh J.; Manna P. y Sil P. 2010. Protective role of taurine against arsenic-induced mitochondria-dependent hepatic apoptosis via the inhibition of PKC δ -JNK pathway. *PLoS One* 2010; 5:e12602.

De la Calle, M. 2008. Efecto del tratamiento crónico con una mezcla de ácidos grasos omega-3/6/9 sobre la reactividad vascular y el estrés oxidativo en ratas. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, España.

Devlin, T. 2004. *Bioquímica. Libro de textos con aplicaciones clínicas*. Cuarta edición. Editorial Reverte, S. A.

Doi, H.; Hoshino, Y.; Nakase, K. y Usuda, Y. 2014. Reduction of hydrogen peroxide stress derived from fatty acid beta-oxidation improves fatty acid utilization in *Escherichia coli*. *Biotechnological products and process engineering*, 98: 629-639.

Englert, R. y Scharter, E. 2002. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species aminoacyl-chloramines mediate hypochlorous acid induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 20518-20526.

Frauca, E. y Muñoz, G. 2010. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica*. SEGHNPA-AEP. Madrid.

Friedman, J. y Nunnari, J. 2014. *Mitochondrial form and functions*. Nature. 505: 335-343.

Geneser, F. 2014. *Histología*. 4 ed. Editorial Médica Panamericana.

Ghazi, M.; Mohammadi, A. y Hosseini, M. 2006. Using janus green to study paraquat toxicity in rat liver mitochondria role of ACE inhibitors (thiol and non thiolase). *Annals New York Academy of Sciences*, 1090: 98-107.

Gholamian, A.; Divsalar, A.; Saiedifar, M.; Ghalandari, B.; Akbar, A. Koohshekan, B. 2017. Generation of reactive oxygen species via inhibition of liver catalase by oxali-palladium: A spectroscopic and docking study. *Process Biochemistry*, 52: 165-173.

Hall, J. 2016. *Guyton and Hall textbook of Medical Physiology*. Thirteenth edition. Elsevier, Philadelphia, PA. EEUU.

Hansen, S.; Andersen M.; Cornett C.; Gradinaru R. y Grunnet N. 2010. A role for taurine in mitochondrial function. *Journal of Biomedical Science*, 17: 1-8.

Heidari R.; Ghanbarinejad V.; Ommati M.; Jamshidzadeha A.; Niknahad H. 2018. Mitochondria protecting amino acids: Application against a wide range of mitochondria-linked complications. *Pharma Nutrition*. 6: 180-190.

Hracsko, Z.; Orvos, H.; Novak, Z., Attila Pal, A. y Varga, I. 2008. Evaluation of oxidative stress markers in neonates with intra-uterine growth retardation. *Redox Report* (13): 11-16.

Ibarreto, P. 2017. Análisis ultraestructural y bioquímico del contenido de proteínas y tioles en el hígado de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia y tratadas con taurina. Trabajo de Grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Jiménez-Sánchez, G. y Silva-Solezzi, I. 2003. Bases Bioquímicas y Fisiopatológicas de las enfermedades peroxisomales. Mensaje Bioquímico. Vol. XXVII. Eds. Flores O., Rivero H, Sosa A. y Vásquez Contreras E. Depto. de Bioquímica. Universidad Autónoma de México.

Jong C.; Azuma, J. y Schaffer, S. 2012. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids*, 42: 2223-2232.

Kanta, J. 2011. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Médica*, 54(3): 97-101.

King, M. 2017. "La Página de la Bioquímica Clínica". "Bioquímica medica". <<https://themedicalbiochemistrypage.org/es/cholesterol-sp.php>>. (12/05/2019).

Koh, J.; Lee, E.; Hyun., M.; Kim, H.; Choi Y.; Lee, E.; Yadav, D. y Chung, C. 2014. Taurine alleviates the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetic rat model. *International Journal of Endocrinology*, 2014(3):397307. doi: 10.1155/2014/397307.

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 of Physiology and Pharmacology*, 77: 1-8.

Lewis, P. y Knight, D. 1990. *Staining methods for sectioned material*. Sexta edición. North-Holland Publishing Company. New York.

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.

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.

Menon, S y Goswami, P. 2006. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene*, 26(8):1101-1109.

Radak, Z.; Zhao, Z.; Koltai, E.; Ohno, H. y Atalay, M. 2013. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxidant Redox Signal*, 18(10): 1208-1246.

Rojas, L.; Liscano, A.; Boada-Sucre, 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.

Rojas N. 2017. Histopatología y tioles solubles en el bazo de ratas expuestas a hiperoxia y el posible efecto antioxidante de la taurina. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Ruza, F. 2002. *Tratado de cuidados intensivos pediátricos. Volumen II*. Tercera edición. Norma. Las Rozas.

Saz, H. y Lascure, O. 1969. The functions of phosphoenol pyruvate carboxikinase and malic enzyme in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 30: 49-60

Schuller, G. y Park E. 2003. Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiology Letters*, 226: 195-202.

Schuller, G. y Park E. 2004. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochem Research*, 29: 117-26.

Sinha, M.; Manna, P. y Sil, P. 2009. Induction of necrosis in cadmium-induced hepatic oxidative stress and its prevention by the prophylactic properties of taurine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23: 300-313.

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

Stohs, S. y Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18: 321-336.

Syntichaki, P. y Tavernarakis, N. 2002. Death by necrosis: uncontrollable catastrophe, or there is order behind the chaos? *EMBO Reports*, 3: 604-609.

Timón, A. 2016. Mecanismos de adaptación de la actividad mitocondrial en respuesta a estrés. Tesis Doctoral en Biotecnología. Universidad politécnica de Valencia.

Vaquero-Raya, E. y Molero-Richard. 2005. Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica?. *Gastroenterología y Hepatología*. 28(8):473-84

Wang, Z.; Li, S.; Ren, R.; Li, J. Y Cui, X. 2015. Recombinant buckwheat trypsin inhibitor induces mitophagy by directly targeting mitochondria and causes mitochondrial dysfunction in Hep G2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 7795-7804.

Zapata, 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.

Zhou, Z. 2000. Cellular and subcellular localization of catalase in the heart of transgenic mice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 48: 585-594.

APÉNDICES

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

Fuente de variable	Sc	Gl	Mc	Fs	P
A:TRATAMIENTOS	5,0035E-7	3	1,66783E-7	44,25	0,0000
RESIDUOS	3,5454E-8	20	1,7727E-9		

TOTAL 5,3580E-7 23

Apéndice 2. Contraste múltiple de rango de la concentración de CAT en el hígado de ratas del día P6, de los grupos control, hiperoxia e hiperoxia-aurina. f: frecuencia, M: media, Gh: grupos homogéneos.

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Grupo	F	M	Gh
Control	6	0,0000383	X
Hiperoxia	6	0,0001177	X
Hiperoxia taurina	6	0,000322	X
Control-taurina	6	0,0003913	X

Contraste	Diferencia
Control - Control-taurina	*-0,000353533
Control - Hiperoxia	*-0,0000793667
Control - Hiperoxia taurina	*-0,0002837
Control-taurina - Hiperoxia	* 0,000274167
Control-taurina - Hiperoxia taurina	* 0,0000698333
Hiperoxia - Hiperoxia taurina	*-0,000204333

*Indica una diferencia significativa

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

Fuente de variable	Sc	Gl	Mc	Fs	P
A:TRATAMIENTOS	8,20637E-8	03	1,89578E-8	3,69	0,0290
RESIDUOS	1,48182E-7	20	9,40473E-9		
TOTAL	2,30245E-7	23			

Apéndice 4. Contraste múltiple de rango de la concentración de CAT en el hígado de ratas del día P9, de los grupos control, hiperoxia e hiperoxia-aurina. f: frecuencia, M: media, Gh: grupos homogéneos.

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Grupo	F	M	Gh
Control	6	0,00019819	X
Hiperoxia taurina	6	0,000258	XX
Control-aurina	6	0,000329	X
Hiperoxia	6	0,00034417	X

Contraste	Diferencia
Control - Control-aurina	*-0,000138333
Control - Hiperoxia	*-0,000146
Control - Hiperoxia taurina	-0,0000598333
Control-aurina - Hiperoxia	-0,0000151667
Control-aurina - Hiperoxia taurina	0,000071
Hiperoxia - Hiperoxia taurina	0,0000861667

*Indica una diferencia significativa

Apéndice 5. Análisis de varianza de la concentración de CAT en el hígado de ratas del día P12, de los grupos control, hiperoxia e hiperoxia-aurina. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad

Fuente de variable	Sc	Gl	Mc	Fs	P
A:TRATAMIENTOS	2,64325E-8	03	8,29216E-9	1,02	0,4035
RESIDUOS	1,72269E-7	20	1,03294E-8		
TOTAL	1,98701E-7	23			

Apéndice 6. Contraste múltiple de rango de la concentración de CAT en el hígado de ratas del día P12, de los grupos control, hiperoxia e hiperoxia-aurina. f: frecuencia, M: media, Gh: grupos homogéneos.

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Grupo	f	M	Gh
Control	6	0,0001738	X
Hiperoxia	6	0,0001886	X
Hiperoxia taurina	6	0,0002438	X
Control-taurina	6	0,0002495	X

Contraste	Diferencia
Control - Control-taurina	-0,00007
Control - Hiperoxia	-0,0000148333
Control - Hiperoxia taurina	-0,0000756667
Control-taurina - Hiperoxia	0,0000551667
Control-taurina - Hiperoxia taurina	-0,00000566667
Hiperoxia - Hiperoxia taurina	-0,0000608333

*Indica una diferencia significativa

HOJAS DE METADATOS

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

Título	Actividad De La Catalasa, Viabilidad Mitocondrial E Histología En El Hígado De Ratas Expuestas A Hiperoxia Y Tratada Con Taurina.
Subtítulo	

--	--

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Campos V. Miguel A	CVLAC	18.903.618
	e-mail	miguelcamposc31@gmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Hiperoxia
Hígado
Taurina
Catalasa
Supervivencia Mitocondrial
Antioxidante
Histología

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Escuela de Ciencias	Departamento de Bioanálisis

Resumen (abstract):

En esta investigación se evaluó la actividad de la catalasa (CAT), la viabilidad mitocondrial e histología en el hígado de ratas expuestas a hiperoxia y tratadas con taurina. Para esto, cuatro 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, hasta los días postnatales P6, P9 y P12. A dos de los grupos se les colocó una solución taurina al 3% ($240 \mu\text{mol/l}$) como agua de beber (grupos hiperoxia-taurina) y a los dos grupos restantes se les colocó solamente agua filtrada (grupos Hiperoxia). En otra incubadora pero en normoxia (21% O_2), se ubicaron cuatro grupos similares identificados como grupos control y control-taurina. El análisis histológico se realizó el día posnatal 6 y 12 (P6 y P12), mientras que el análisis bioquímico se realizó los días postnatal 6, 9 y 12 (P6, P9 y P12). La actividad de la catalasa se determinó por espectrofotometría, basada en el descenso de la concentración del H_2O_2 a una longitud de onda de 240 nm. Para el análisis histológico, las muestras fueron procesadas con técnicas para la microscopía óptica de alta resolución con muestras incluidas en resina epóxica. En el día P6 la actividad de la CAT en el hígado del grupo hiperoxia ($1,18E-04 \pm 2,12E-06$ U/gmh) fue significativamente más alta comparada con el grupo control ($3,83E-05 \pm 6,47E-06$ U/gmh). El día P9 la actividad de la CAT en el hígado de los grupos hiperoxia ($3,44E-04 \pm 6,72E-05$ U/gmh) y control-taurina ($3,29E-04 \pm 7,70E-05$ U/gmh) fue significativamente superior ($F_s = 3.69$; $p \leq 0,05$) comparados con el grupo control. Para el día P12 no hubo cambios significativos en la actividad de la enzima. El porcentaje de viabilidad mitocondrial del tejido hepático de las ratas del grupo hiperoxia ($72,13 \pm 7,05 \%$) descendió significativamente comparado con los grupos control (100 %) e hiperoxia-taurina ($92,89 \pm 4,58 \%$). Histológicamente, en el grupo hiperoxia se observó la pérdida de la integridad estructural del tejido hepático con presencia de edema en los sinusoides hepáticos y procesos de necrosis en las zonas circundantes a la vena central. En el grupo hiperoxia-taurina la estructura del tejido hepático se observó mejor conservada estructuralmente comparada con el grupo hiperoxia. Se sugiere que altos niveles de oxígeno causaron el aumento de la actividad de la CAT en el hígado del grupo hiperoxia quizás como una protección del órgano contra el estrés oxidativo. La hiperoxia también provocó la disfunción mitocondrial y procesos de necrosis y edematización del parénquima hepático y de su sistema vascular.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Luz Marina Rojas	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	4.339.741
	e-mail	lmarinarojas@yahoo.com
Patricia Velásquez	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	17.446.999
	e-mail	patriciavelasquezv@gmail.com
Raquel Salazar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.855.836
	e-mail	rsalazarlugo50@gmail.com
Evelin Flores	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	11.825.759
	e-mail	emflorfer@gmail.com

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

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

Lenguaje: SP

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

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis de Grado-CamposM.doc	Word 2016
Tesis-CamposMlguel.doc	

Alcance:

Espacial: _____ Nacional _____ (Opcional)

Temporal: _____ Temporal _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

_____ Licenciado(a) en Bioanálisis _____

Nivel asociado con el Trabajo: _____ Licenciado(a) _____

Área de Estudio: _____ Bioanálisis _____

Institución (es) que garantiza (n) el Título o grado:

_____ UNIVERSIDAD DE ORIENTE – VENEZUELA _____

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

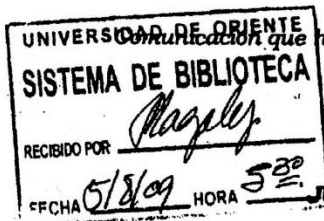
Cumaná, 04 AGO 2009

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"**.

Letido 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.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNPELE
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/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

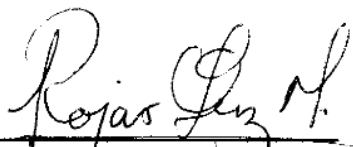
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

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”.



Miguel Campos

AUTOR



Profa. Luz Marina Rojas

ASESOR ACADÉMICO



Profa. Patricia Velásquez

COASESOR ACADÉMICO