



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

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL Y BIOQUÍMICO DEL CONTENIDO DE
PROTEÍNAS Y TIOLAS EN EL HÍGADO DE RATAS RECIÉN NACIDAS
EXPUESTAS A HIPEROXIA Y TRATADAS CON TAURINA
(Modalidad: Tesis de Grado)

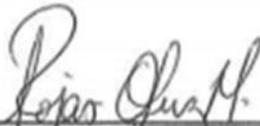
PAOLA CAROLINA IBARRETO ANDARCIA

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

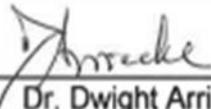
Cumaná, 2017

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL Y BIOQUÍMICO DEL CONTENIDO DE
PROTEÍNAS Y TIOLAS EN EL HÍGADO DE RATAS RECIÉN NACIDAS
EXPUESTAS A HIPEROXIA Y TRATADAS CON TAURINA

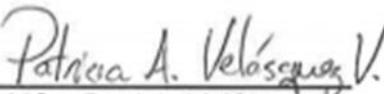
APROBADO POR:



Dra. Luz Marina Rojas
Asesora



Dr. Dwight Arrieche
Coasesor



MSc. Patricia Velásquez
Coasesora



Jurado Principal



Jurado Principal

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
LISTA DE FIGURAS	III
RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Muestra poblacional.....	7
Inducción de hiperoxia en las ratas.....	7
Obtención de la muestra.....	8
Análisis bioquímico	8
Determinación de tioles solubles en ácido.....	8
Determinación de proteínas totales	9
Análisis histológicos.....	10
Análisis estadísticos	11
RESULTADOS.....	12
Análisis bioquímico	12
Análisis histológico	13
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
APÉNDICES	49
ANEXOS.....	52
HOJAS DE METADATOS	56

DEDICATORIA

A

Dios, porque todo lo alcanzado se lo debo a Él, pues fue mi amigo incondicional, me brindó fuerzas, ánimo, apoyo, protección e inteligencia en cada paso que di durante mi carrera. Las palabras se quedan cortas para agradecerle todo lo que me ha dado.

Mis Padres, Pablo Ibarreto y Carmen Andarcia, quienes han sido mi motor de arranque en todo momento, por haber creído en mí, por darme su apoyo, comprensión y esos abrazos 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, aun en la ausencia. LOS AMO ETERNAMENTE MIS AMORES. “Papi mío de mi vida” ésta es por ti.

Mi hermana Yasmín Ibarreto, por ser un ejemplo a seguir, por su apoyo en los momentos difíciles y sus palabras de aliento.

Mi hermanito Pablo José Ibarreto por su apoyo, colaboración y confianza. Gracias mi hermano.

Mi abuelo Clemente, por sus oraciones, por sus palabras llenas de bendición y alegrar mis días con su carisma.

La familia Benavidez, por abrirme las puertas de su casa y el apoyo brindado durante la carrera. A ustedes muchas gracias.

Mis “cuchuturas”: Emmarys, Lizmar, Nicaulis, Oriana, Vanessa y Verónica, por hacer de mi estadía en Cumaná una completa bendición, transformando 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.

Los compañeros de clases quienes compartieron conmigo experiencias únicas, brindándome su apoyo y amistad, es una lista larga de personas pero vale la pena mencionar a: Johana Márquez, Manuel Ramos, Jesús Lorenzo Vásquez, Didiber Ramos, Elizabeth Rondón, Verónica Marcano, Maides González entre otros. Mi cariño y respeto.

AGRADECIMIENTO

A

Mi asesora la Dra. Luz Marina Rojas, por brindarme su asesoría, apoyo, amistad y tiempo necesario para la realización de este trabajo de grado. Mil gracias profe, la aprecio muchísimo.

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

Mi coasesor el Dr. Dwight Arrieche por su asesoría en la ejecución de la histología.

Los licenciados José Prin y Antonio Gómez, y a la TSU Milagros Moreno, por su amistad, apoyo, paciencia y tiempo para el procesamiento de las muestras histológicas.

Patricia Álvarez, por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

Mis compañeros de Tesis: Carlos Márquez, Cinthya Maza, Franyi Caraballo, Lyrays Calzadilla, Luisa Malavé, Emmarys Marín, Emilennys Veliz, Nathalie Rojas, Nazaret Córdova, Rolando Balbás, Vanessa Rodríguez, Zomirka Vásquez por su apoyo, colaboración, compañerismo y lo más importante su amistad.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Comparación de la concentración de TSA en el hígado de ratas Sprague-Dawley en desarrollo, entre los grupos: control, hiperoxia e hiperoxia-taurina de los días P6 y P12. Los superíndices (a y b) indican diferencias entre grupos, TSA: tioles solubles en ácido. 12
- Figura 2. Comparación de la concentración de proteínas totales en el hígado de ratas Sprague-Dawley en desarrollo, entre los grupos: control, hiperoxia e hiperoxia-taurina de los días P6 y P12. Los superíndices (a y b) indican diferencias entre grupos..... 13
- Figura 3. Microscopía de luz de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo control. Se observa tejido hepático. Hep: hepatocito; flechas continuas: células de Kupffer; flechas punteadas: eritrocitos; asteriscos: sinusoides hepáticos; círculo: gotas lipídicas..... 15
- Figura 4. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo control. Se observa la estructura interna de un hepatocito. N: núcleo; n: nucléolo; M: mitocondrias; P: peroxisomas; flechas continuas: retículo endoplasmático rugoso; flechas punteadas: lisosoma. 16
- Figura 5. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo control. Detalle de hepatocito. Se observa cisternas de retículo endoplasmático rugoso abundantes en disposición paralela. RER: retículo endoplasmático rugoso; M: mitocondrias. 17
- Figura 6. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 del grupo control. Se observa una célula de Kupffer y una célula de Ito con características normales. Kup: célula Kupffer; Ito: célula de Ito; Lv: lumen vascular; N: núcleo; n: nucléolo; flecha: retículo endoplasmático rugoso; asteriscos: gotas lipídicas. 18
- Figura 7. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo control. Se observa una célula oval situada entre dos

hepatocitos. Ov: célula oval; N: núcleo; n: nucléolo; M: mitocondrias; P: peroxisomas; RER: Retículo endoplasmático rugoso.	19
Figura 8. Microscopía de luz de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia. Se observan hepatocitos que contienen abundantes gotas lipídicas en su citoplasma. Hep: hepatocito; flechas continuas: células de Kupffer; flechas punteadas: eritrocitos; asteriscos: sinusoides hepáticos; círculos: gotas lipídicas.	20
Figura 9. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia. Se observa hepatocito con pérdida de su integridad estructural y proliferación del retículo endoplasmático rugoso. N: núcleo; M negra: mitocondrias con forma normales; M blanca: mitocondrias de forma irregular; RER: retículo endoplasmático rugoso; Gl: gota lipídica; flechas continuas: retículo endoplasmático rugoso tumefacto; flechas punteadas: lisosomas.	21
Figura 10. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia. Detalle de hepatocito. N: núcleo; M: mitocondrias; RER: retículo endoplasmático rugoso, flechas: mitocondrias con pérdida de su integridad.	22
Figura 11. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia. Se observa una célula Kupffer activada. Kup: célula de Kupffer; N: núcleo; Hep: hepatocito, M: mitocondrias; RER: retículo endoplasmático rugoso; Gl: gota lipídica; circulo: glucógeno.	23
Figura 12. Microscopía de luz de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia-aurina. El tejido hepático presentó una estructura aparentemente normal. Hep: hepatocito; flechas continuas: células de Kupffer; flechas punteadas: eritrocitos; asteriscos: sinusoides hepáticos; círculos: gotas lipídicas.	24
Figura 13. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia-aurina. Se observa hepatocito con	

preservación de su estructura. N: núcleo; M: mitocondrias; flecha: doble membrana nuclear; RER: retículo endoplasmático rugoso; Flechas punteadas: lisosoma; Gl: gota lipídica.	25
Figura 14. Microscopía electrónica de hepatocito de rata del grupo hiperoxia- taurina del día P12. Detalle de la figura 13, retículo endoplasmático rugoso. N: núcleo; M: mitocondrias, RER: retículo endoplasmático rugoso; asteriscos: gotas lipídicas.	26
Figura 15. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia- taurina. Se observa hepatocito. N: núcleo; M: mitocondrias; RER: retículo endoplasmático rugoso; P: peroxisomas; flechas punteadas: lisosomas; Gl: gotas lipídicas.	27
Figura 16. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia- taurina. A. célula de Kupffer inactiva y B. célula de Kupffer activa en contacto con un hepatocito en proceso de necrosis. Kup: célula de Kupffer; N: núcleo; n: nucléolo, ED: espacio de Disse.....	28

RESUMEN

Se analizó la ultraestructura y la concentración de tioles solubles en ácido (TSA) y proteínas totales en el hígado de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia y tratadas con taurina. Para esto, cuatro grupos de ratas recién nacidas fueron colocadas en una incubadora y expuestas a $80 \pm 3\%$ de oxígeno desde el primer día de nacidas hasta los días postnatal P6 y P12. A dos grupos se les añadió taurina al 3% en el agua de beber (grupo hiperoxia-taurina) y a los dos grupos restantes solo se le dio agua filtrada de beber (grupo hiperoxia). En otra incubadora, pero en normoxia ($21\% O_2$), se ubicaron cuatro grupos similares identificados como grupos control y control-taurina. La concentración de TSA y proteínas totales se determinó a partir de métodos colorimétricos. Para el análisis histológico, las muestras fueron procesadas con técnicas de microscopía electrónica de transmisión. Bioquímicamente, en el día P6 el grupo hiperoxia mostró una disminución significativa de la concentración de TSA con respecto a los grupos control e hiperoxia-taurina, no obstante en P12 no se observó diferencia entre los grupos comparados. La concentración de proteínas totales en los grupos hiperoxia e hiperoxia-taurina aumentó con respecto al grupo control, sin embargo, en P12 todos los grupos presentaron concentraciones muy similares. En P12 las concentraciones tanto de TSA como de proteínas totales no mostraron diferencias significativas entre los grupos, posiblemente producto de una mayor madurez del animal o al desarrollo de otros mecanismos antioxidantes. Histológicamente, en el grupo hiperoxia se evidenciaron hepatocitos con alteración en las membranas mitocondriales, tumefacción del RER y la presencia de gran cantidad de gotas lipídicas en sus citoplasmas; así mismo, se apreciaron células Kupffer activadas en los sinusoides hepáticos. En el grupo hiperoxia-taurina, la ultraestructura del tejido hepático se observó mejor conservada, a pesar de la moderada cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos. En líneas generales, los resultados demuestran el papel antioxidante y citoprotector que ejerció la taurina en el tejido hepático de las ratas expuestas a hiperoxia.

INTRODUCCIÓN

Durante la vida fetal, la presión parcial de oxígeno (PaO_2) es de 25-30 mmHg; este estado de hipoxemia relativa permite el crecimiento y la diferenciación fetal normal. En los primeros minutos posteriores al pinzamiento del cordón umbilical durante el nacimiento, la PaO_2 se eleva, gradualmente, hasta 80 a 90 mmHg, lo que genera un estado de estrés oxidativo fisiológico y limitado, que favorece el período de adaptación postnatal normal (Cortina y Arizmendi, 2012).

En neonatología, el oxígeno es usado frecuentemente en las salas de parto y en las unidades de cuidado intensivo (Sánchez *et al.*, 2010). Los prematuros al nacer presentan tejidos inmaduros, con escasa capacidad de respuesta antioxidante, por ello, suelen ser más propensos a la oxidación, ya que precisan de suplementos importantes de oxígeno para alcanzar el 100% de la fracción inspiratoria (Vento y Viña, 2009). El uso excesivo del oxígeno en el neonato provoca enfermedades graves, como retención de CO_2 , displasia broncopulmonar, retinopatía, activación de mastocitos, enterocolitis necrosante (muerte del tejido intestinal), daño oxidativo agudo al miocardio y riñón (Cortina y Arizmendi, 2012). Se ha señalado que la utilización de oxígeno puro por más de tres minutos en el periodo neonatal causa la aparición de ciertos tipos de cáncer en la edad infantil, considerando que el oxígeno debe ser dosificado, monitorizado, medido y vigilado (Vento y Viña, 2009).

El estrés oxidativo es definido como el desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las moléculas antioxidantes (Repetto y Repetto, 2009). Las ERO pueden conducir al daño de macromoléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleídos) y a la alteración de los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, entre otros) (Elejalde, 2001; Cortina y Arizmendi, 2012).

La lipoperoxidación, mediada por las ERO, consiste en la interacción de

radicales libres con ácido graso insaturado, lo que lleva a la fragmentación de la molécula lipídica, generando una cascada de reacciones y produciendo radicales libres con formación de hidroperóxidos, provocando procesos autocatalíticos incontrolables (Contreras, 2005; Córdoba, 2010). Debido a que las membranas celulares contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados son el objetivo predilecto de este tipo de daño; lo que provoca cambios perjudiciales en la fluidez de las mismas, alterando significativamente sus funciones de transporte de iones, reconocimiento del receptor, señalización, y gradientes osmóticos (Gorman *et al.*, 1996).

De igual manera, las proteínas al constituir más del 50% del peso seco de las células, representan un blanco importante para las ERO (Betancur, 2015). La interacción de los radicales libres con los aminoácidos genera cambios en la estructura de las proteínas, provocando daño a receptores, enzimas, vías de traducción de señales, sistemas de transporte, mecanismos de mantenimiento de la homeostasis intracelular de iones, mecanismos enzimáticos de reparación del ADN, entre otros (Astiz, 2009; Carretero, 2010). Los aminoácidos comúnmente atacados, son la histidina, la prolina, la lisina y la arginina (Contreras, 2005). Además, las proteínas oxidadas pueden ser reconocidas como extrañas, estimulando una respuesta inmune (Webb y Twedt, 2008).

Galicia y Gutiérrez (2014) sugieren que el daño oxidativo a las proteínas se lleva a cabo en 3 etapas: en la primera etapa, una proteína puede estar ligeramente modificada, pero la estructura principal sigue intacta, lo que conlleva a una ligera disminución de su actividad; en la segunda etapa, el daño ocasionado en la proteína es suficiente para causar un despliegue parcial de la proteína, incluso las secuencias hidrofóbicas, que generalmente se encuentran cubiertas dentro de proteínas solubles globulares, quedan expuestas en la superficie. Por último, en la tercera etapa, si la proteína dañada no ha sido identificada y degradada en proteosomas, forma un agregado con otras proteínas, lípidos y azúcares.

Las moléculas antioxidantes son compuestos que se encuentran a bajas

concentraciones y presentan la capacidad de inhibir y/o limitar significativamente la tasa de oxidación (Patiño, 2006). El sistema antioxidante puede dividirse en dos líneas principales de defensa: sistema antioxidante enzimático y no enzimático (Halliwell y Gutteridge, 1989). En el grupo de antioxidantes enzimáticos se encuentran las enzimas superóxido dismutasa, catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx); estas enzimas antioxidantes ejercen su función en un sitio de unión concreto, catalizando la ruptura de radicales libres habitualmente a nivel intracelular (Contreras, 2005). Entre las defensas antioxidantes no enzimáticas, tienen lugar el glutatión, la taurina, vitamina E, entre otros (Astiz, 2009).

Los tioles son compuestos orgánicos que contienen un grupo funcional sulfhidrilo (-SH), siendo el azufre análogo de un grupo alcohol (-OH) (Albores *et al.*, 2006). Se ha determinado que el tiol soluble más abundante en la célula es el glutatión reducido (GSH), seguido de la cisteína y la homocisteína (Hultberg *et al.*, 1998).

El tripeptido GSH (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina), está involucrado en el mantenimiento de los niveles de ascorbato, la comunicación intercelular y la protección de la célula contra diferentes especies oxidantes (Astiz, 2009). Se ha comprobado que su participación es clave en desórdenes neurodegenerativos (Molina, 2003).

En las células, el GSH se encuentra en mayor proporción en contraste con la forma oxidada (glutatión disulfuro, GSSG) (Pastore *et al.*, 2003). Tanto el GSH como otras moléculas que contienen tioles tienen alto poder reductor, consecuentemente, poseen propiedades antioxidantes ya que pueden cederle un electrón a las ERO, disminuyendo su reactividad; por lo cual se dice que estos compuestos de baja masa molecular actúan como “barredores” de radicales libres (Molina, 2003). El GSH es capaz de reducir el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), mediante una reacción catalizada por la GPx, cuyo producto final es agua (H_2O) y GSSG (constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro). El GSSG es luego reducido por la enzima glutatión

reductasa (GR), la cual transfiere electrones de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) al GSSG (Maltepe y Saugstad, 2009; Martínez *et al.*, 2011; Betancur, 2015).

La homocisteína es un aminoácido azufrado esencial, producto del metabolismo de la metionina; juega un papel importante en la transferencia de grupo metilos en el metabolismo celular (Cañas, 2002). En el hígado, la homocisteína se transforma en cisteína siguiendo la vía de la transulfuración (Ros y Pintó, 2003; Lu, 2009). La cisteína es un aminoácido azufrado, importante para la síntesis de GSH. Cabe destacar que, de la oxidación del átomo de azufre de la cisteína deriva un grupo de metabolitos, entre los cuales se encuentra la taurina (Aoshiba *et al.*, 1999; Cañas, 2002).

La taurina es una sustancia azufrada producto del metabolismo de los aminoácidos cisteína y metionina (Militante y Lombardini, 2002), la cual se engloba en la categoría de los aminoácidos, aunque no lo es realmente, ya que en lugar del grupo carboxilo contiene un grupo de ácido sulfónico, por lo que no puede incorporarse a estructuras proteicas (Nandhini *et al.*, 2005; Sochor *et al.*, 2014). Esta sustancia está presente en la mayoría de los tejidos, en particular, se encuentra en altas concentraciones en el cerebro, retina, corazón, hígado y riñones de los mamíferos (Huxtable, 1992; Festy, 2007).

La taurina ha sido caracterizada como un β -aminoácido semiesencial, condicional en prematuros y neonatos, generalmente, incorporado como suplemento en la mayoría de los regímenes alimentarios neonatales (Ruza, 2002). En los prematuros las defensas antioxidantes se encuentran comprometidas, por deficiencias relativas de este aminoácido (Sánchez *et al.*, 2010). Cumple funciones de neurotransmisor y neuromodulador en el sistema nervioso central (SNC), interviene en la modulación del flujo celular del sodio, calcio, potasio y magnesio para generar impulsos nerviosos, e inhibe la fosforilación de ciertas proteínas; también, actúa en el sistema de defensa antioxidante celular (Hernández y Sastre, 1999; Festy, 2007). Se ha demostrado que protege a los tejidos, contra el daño oxidativo, mediante el

aumento de la capacidad de defensa de los órganos en las enfermedades intestinal, pancreatitis, lesión de la mucosa gástrica, lesiones hepáticas y cirrosis (Marcinkiewicz *et al.*, 1995; Balkan *et al.*, 2001).

Por otra parte, el hígado es un órgano de gran tamaño comparado con otros órganos del cuerpo humano y se desarrolla tempranamente; a pesar de que representa del 2 a 3% de la masa corporal, este órgano consume del 25 al 30% del oxígeno total que consume el cuerpo (Koolman y Rohm, 2004).

Se estima que los hepatocitos de mamíferos contienen entre 800 y 2 000 mitocondrias (Devlin, 2004). El hígado es muy dependiente de las mitocondrias para poder desarrollar sus diversas funciones, ya que éstas son la principal fuente de energía celular, capaz de producir de 90 a 95% del adenosín trifosfato (ATP) total, consumiendo, aproximadamente, un 95% del oxígeno que utiliza la célula (Devlin, 2004; Carretero, 2010). Se considera que este proceso es la principal fuente de ERO, que actúan mayoritariamente sobre las macromoléculas más próximas, como lo son los lípidos de la membrana mitocondrial, proteínas de su sistema enzimático y, especialmente, el ADN mitocondrial (ADNmt), el cual es muy sensible al daño oxidativo, ya que no dispone de histonas que lo protejan, ni de los sistemas defensivos del ADN nuclear (Carretero, 2010).

Poco se conoce acerca del efecto de la hiperoxia postnatal en el hígado, aunque se ha relacionado la presencia de algunas patologías hepáticas con la prematuridad (Frauca y Muñoz, 2010). Moorthy *et al.* (1997), reportaron que la hiperoxia provoca respuestas hepáticas que pueden inducir lesión y disfunción pulmonar. Por el contrario, Wong *et al.* (2001) encontraron que las respuestas hepáticas a la hiperoxia están influenciadas por los efectos de la hiperoxia sobre el pulmón. Estos autores encontraron en las mitocondrias del hígado de ratones expuestos a hiperoxia, una disminución en los niveles de la enzima 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa (abundante en el hígado), la cual pudiera estar relacionada con una posible iniciación y evolución de la lesión pulmonar hiperoxica.

Las ratas Sprague-Dawley, son los animales más utilizados para la experimentación, ya que al nacer presenta un estado prematuro muy similar al del humano (Saiz *et al.*, 1983). Se ha demostrado que la hiperoxia postnatal en las ratas recién nacidas, puede causar la abolición de la capa plexiforme externa de la retina, conduciendo a una ceguera parcial o total, debido a que este tejido del SNC se encuentran inmaduros al momento del nacimiento (Lachapelle *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2005). Estudios realizados recientemente (Rojas *et al.*, 2013; Maniscalchi, 2015; Rojas, 2015), bajo el mismo diseño experimental, evidenciaron vacuolización y estado de necrosis en las células de Purkinje (CPK) en la sustancia gris y oligodendrocitos en la sustancia blanca del cerebelo de las ratas del grupo hiperoxia, mientras que en las ratas del grupo tratado con taurina, estas células a pesar de que se vieron afectadas y en proceso de degeneración, en general, se mostraron bien preservadas. Otros investigadores apuntan que la taurina mejora la migración celular y protege la ultraestructura de las neuronas de la corteza cerebelosa en las ratas expuestas a hiperoxia (Ramírez, 2009; Liscano, 2014).

Los estudios sobre el efecto de la hiperoxia postnatal sobre un órgano tan importante como el hígado son escasos, es por ello que el propósito de este trabajo es estudiar el daño que causa la hiperoxia postnatal sobre el hígado de ratas recién nacidas y la respuesta antioxidante que pueda ejercer la taurina en dicho órgano, mediante el análisis de la ultraestructura y el contenido de proteínas totales y tioles solubles.

METODOLOGÍA

Muestra poblacional

Para la ejecución de este estudio se utilizaron ratas Sprague-Dawley, provenientes del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (Universidad Central de Venezuela), las cuales fueron trasladadas hasta el laboratorio de mantenimiento de ratas del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas “Dra. Susan Tai” de la Universidad de Oriente (IIBCAUDO), Núcleo Sucre. Una vez en el laboratorio, se mantuvieron separadas por sexo y agrupadas en jaulas de acero inoxidable, durante 3 días para su adaptación a las nuevas condiciones ambientales (21°C y ciclos de 12 horas luz-oscuridad controlados artificialmente).

Durante este período se sustrajo un poco de aserrín de las jaulas de los machos y se agregó en las jaulas de las hembras y viceversa, con el fin de estimular las hormonas sexuales de los animales. Finalizado el tiempo, se procedió al apareamiento de las ratas, colocando dos hembras con un macho por jaula, durante 5 días. Luego se separaron y reorganizaron como estaban inicialmente, para esperar que transcurriera, durante 21 días, el periodo de gestación. Los animales se alimentaron con ratarina comercial y agua filtrada.

Inducción de hiperoxia en las ratas

Al nacer las crías, un grupo de ellas fueron sometidas a condiciones de hiperoxia ($80 \pm 3\%$ de oxígeno). Cuatro grupos de ratas recién nacidas, por separado, fueron colocadas en una incubadora, elaborada de plexiglás transparente. Cada grupo estuvo compuesto por 6 crías, con sus respectivas madres. Dos grupos identificados como hiperoxia-aurina (HT), se les añadió aurina al 3% (Sigma, USA), en el agua de beber. Las madres ingirieron la aurina del agua y se la transfirieron a las crías a través de la leche materna. A los dos grupos restantes no se les colocó aurina en el agua, y fueron identificados como hiperoxia (H).

Estas ratas sometidas a condiciones de hiperoxia, tuvieron tres interrupciones diarias en normoxia (21% de oxígeno). Cada interrupción tuvo una duración de 30 minutos, según el protocolo sugerido por Lachapelle *et al.* (1999) y Rojas *et al.* (2005). El nivel de oxígeno en la incubadora fue regulado y mantenido utilizando un analizador de oxígeno (7820 Oxygen Monitoring System), el cual fue calibrado diariamente.

Paralelamente, en una incubadora similar, pero sin oxígeno, se mantuvieron cuatro grupos de ratas controles bajo tratamientos idénticos a los del grupo anterior, es decir, con taurina y sin taurina en el agua de beber de las madres, el primero identificado como control-aurina (CT), y el segundo como control (C).

Con el fin de evitar las complicaciones pulmonares que suelen presentar las ratas adultas expuestas a hiperoxia, cada 24 horas, las madres sometidas a hiperoxia se intercambiaron con las madres controles que recibían el mismo tratamiento; de manera que, las madres en hiperoxia que tomaban taurina, se intercambiaron con las madres controles que también la tomaban; y las madres en hiperoxia que ingerían sólo agua filtrada, se cambiaron con las madres controles que bebían lo mismo (Lachapelle *et al.*, 1999).

Obtención de la muestra

Un grupo de crías por cada tratamiento (control, hiperoxia e hiperoxia-aurina) fueron sacrificadas por decapitación a los días 6 y 12 postnatales (P6 y P12), y rápidamente disectadas para obtener el tejido del hígado, el cual fue debidamente identificado; parte del tejido se empleó para los análisis histológicos; y el resto fue congelado a -20°C para su posterior procesamiento bioquímico.

Análisis bioquímico

Determinación de tioles solubles en ácido

La determinación de tioles solubles en ácido (TSA) se realizó a partir del

protocolo de Sedlak y Lindsay (1968), con modificaciones de Velásquez (2014). Esta técnica se fundamenta en que los grupos tioles libres (-SH) presentes en muestras proteicas pueden ser separados de las proteínas, para esto se utiliza la precipitación ácida de proteínas previo a la cuantificación de los grupos tioles.

Se tomó 0,1 g del tejido y se homogenizó con 0,9 ml del buffer Tris EDTA (Tris HCl 30 mmol.l⁻¹, EDTA 3 mmol.l⁻¹); el homogenizado se centrifugó a 1 500 rpm durante 5 minutos, a una temperatura de 4°C. Del sobrenadante obtenido se tomaron 60 µl, que fueron añadidos a 540 µl de buffer EDTA (ácido etileno-diamina-tetraacético). Posteriormente, de esta dilución se tomaron 250 µl y se mezclaron con 0,05 g de ácido sulfosalicílico (el cual permite la precipitación de las proteínas, y con ello la liberación de los grupos -SH), luego se colocó en el congelador por 15 minutos, para luego centrifugar por 10 minutos a 7 000 rpm a 4°C. Seguidamente, se tomaron 200 µl del sobrenadante y se le agregaron 800 µl de Tris HCl pH 8,9 y 80 µl de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), para ser leídos, inmediatamente, a 412 nm con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25/35/45 UV/Vis.

La curva de calibración se preparó a partir de un estándar de GSH a 100 µmol.ml⁻¹. Se dispuso de patrones con concentraciones de 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 µmol.ml⁻¹ cada uno. Los resultados obtenidos de la lectura en absorbancia fueron expresados en µmol.ml⁻¹.

Determinación de proteínas totales

La cuantificación de la concentración de proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford (1976). Este método se fundamenta en la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 a los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas. La unión del colorante a la proteína provoca un desplazamiento en el máximo de absorción del colorante, de 365 a 595 nm, esto es proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra.

Se tomaron 0,1 g de hígado para homogenizar con 900 µl de buffer lisis

pH 7,2; seguidamente, se procedió a centrifugar el homogenizado durante un tiempo de 15 minutos a 3 500 rpm; del sobrenadante se tomaron 100 μ l y se le añadieron 2,5 ml del reactivo de Bradford, para finalmente leer la absorbancia a 596 nm con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25/35/45 UV/Vis.

La curva de calibración se preparó a partir de un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) a 1 000 μ g. ml^{-1} . Las concentraciones de los patrones preparados fueron de: 200, 400, 600, 800 y 900 μ g. ml^{-1} cada uno. Los resultados obtenidos de la lectura en absorbancia fueron expresados mg.g^{-1} .

Análisis histológicos

Para el análisis histológico una porción del hígado fue cortada en pequeños fragmentos y fijada de inmediato durante 2 horas en glutaraldehído al 2,5%, luego, se sometió a dos lavados de 10 minutos con buffer fosfato pH 7,4. Seguidamente, se procedió a la postfijación en tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% por 90 minutos, para después realizar dos lavados de 10 minutos con agua destilada. Luego, 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 μ m) en un ultramicrotomo Leica UM-UC6 con cuchilla de diamante; los cuales fueron teñidos con azul de toluidina al 1%, y se examinados 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. Posteriormente, se efectuaron cortes finos (80 nm), que fueron contrastados con acetato de uranilo

(27 minutos) y citrato de plomo (20 minutos), con un tiempo de lavado de 10 minutos, para ser observados en un microscopio electrónico de transmisión marca Hitachi H-600 (Rojas *et al.*, 2013).

Análisis estadísticos

Los resultados de este estudios fueron analizados con un ANOVA simple al 95,00% de confiabilidad usando el paquete estadístico Statgraphics plus 4.1 en ambiente Windows, con el fin de comparar las concentraciones de TSA y proteínas totales en los distintos grupos experimentales (control, hiperoxia e hiperoxia-aurina). Para el contraste *a posteriori* se aplicó la prueba Duncan (Sokal y Rohlf, 1989). Este análisis se realizó por separado en cada día postnatal (P6 y P12) y los resultados se expresaron en graficas de barras.

RESULTADOS

Análisis bioquímico

Los resultados de la concentración de tioles solubles en ácido (TSA) en el hígado de ratas controles y expuestas a hiperoxia, tratadas y no tratadas con taurina, se muestran en la figura 1.

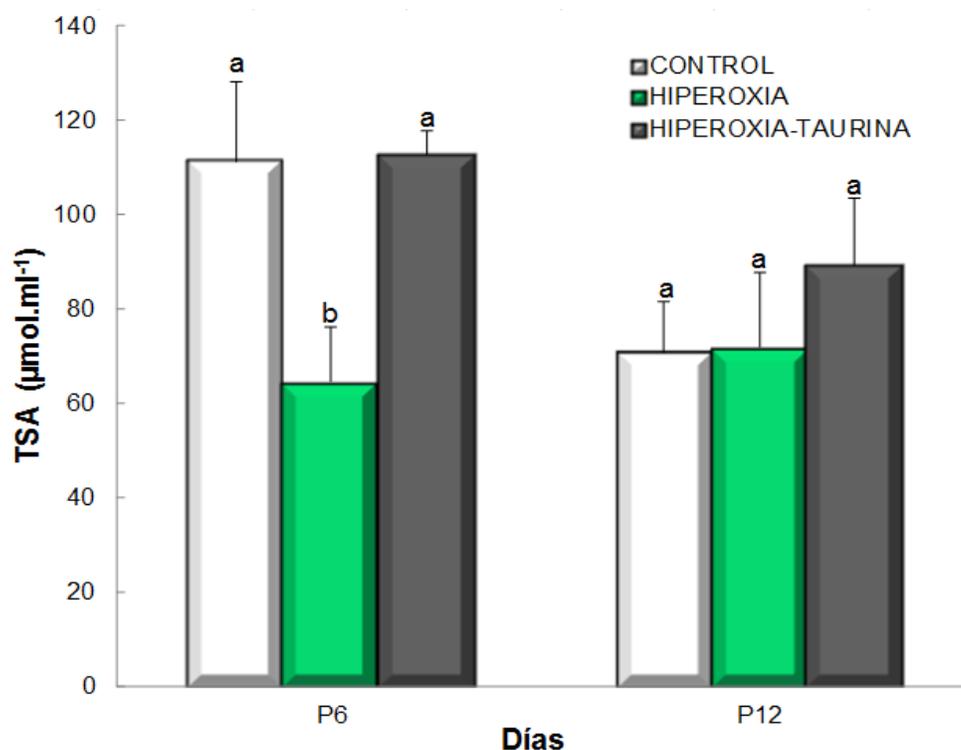


Figura 1. Comparación de la concentración de TSA en el hígado de ratas Sprague-Dawley en desarrollo, entre los grupos: control, hiperoxia e hiperoxia-taurina de los días P6 y P12. Los superíndices (a y b) indican diferencias entre grupos, TSA: tioles solubles en ácido.

En el día P6, la concentración de TSA del grupo hiperoxia ($64,54 \pm 11,69 \mu\text{mol.ml}^{-1}$) fue significativamente menor ($p < 0,05$) comparada con los grupos control ($111,32 \pm 16,77 \mu\text{mol.ml}^{-1}$) e hiperoxia-taurina ($112,66 \pm 5,21 \mu\text{mol.ml}^{-1}$) (FS=15,19). No obstante, en el día P12 todos los grupos fueron estadísticamente iguales (FS=1,90; $p \geq 0,05$).

Los resultados de la concentración de proteínas totales en el hígado de

ratas controles y expuestas a hiperoxia, tratadas y no tratadas con taurina se muestran en la figura 2.

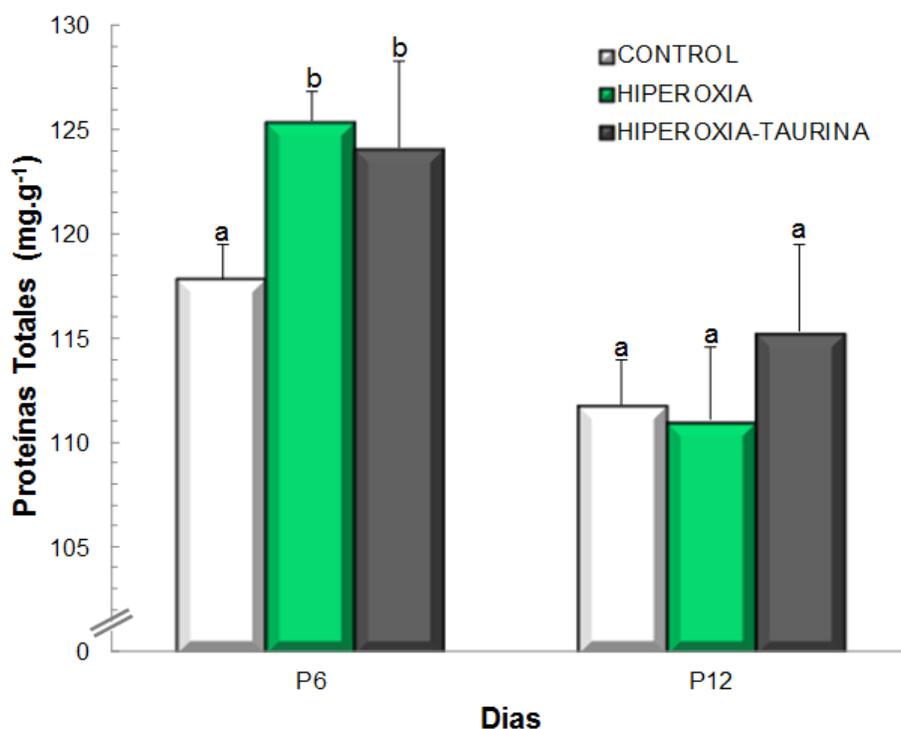


Figura 2. Comparación de la concentración de proteínas totales en el hígado de ratas Sprague-Dawley en desarrollo, entre los grupos: control, hiperoxia e hiperoxia-taurina de los días P6 y P12. Los superíndices (a y b) indican diferencias entre grupos.

En el día P6 la concentración media de proteínas totales de los grupos hiperoxia ($125,41 \pm 1,43 \text{ mg.g}^{-1}$) e hiperoxia-taurina ($124,12 \pm 4,21 \text{ mg.g}^{-1}$) fueron significativamente mayor en comparación al grupo control ($117,84 \pm 1,6 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$) (FS=7,87; $p < 0,05$). Los grupos hiperoxia e hiperoxia-taurina no presentaron diferencias en sus concentraciones medias. Para el día P12, no se observó diferencias significativas entre los grupos comparados (FS=1,97; $p \geq 0,05$).

Análisis histológico

A nivel histológico, en el grupo control la estructura del hígado de las ratas, se observa bien diferenciada. La figura 3, muestra una fotomicrografía panorámica del hígado de una rata perteneciente al grupo control donde se

perciben hepatocitos normales, de núcleos claros, grandes, redondeados y centrados provistos de uno o dos nucléolos. Se observaron sinusoides hepáticos con un trayecto irregular propio de este tejido. En las luz de los sinusoides se aprecian las células de Kupffer, caracterizadas por presentar formas irregulares. También se distinguen un reducido número de gotas lipídicas.

Ultraestructuralmente, se evidencian hepatocitos con un núcleo de membrana nuclear integra y nucléolo claramente diferenciado. En el citoplasma se observan abundantes mitocondrias, alargadas y con aspecto electrondenso debido a la gran cantidad de crestas. Al mismo tiempo, se evidencia abundante retículo endoplasmático rugoso (RER), los peroxisomas y lisosomas igualmente se observan abundantes en este órgano (Figuras 4 y 5).

En la figura 6, se observa una célula Kupffer inactiva, localizada en la luz del sinusoides. Esta célula muestra un contorno irregular, con un núcleo grande conteniendo dos nucléolos y en el citoplasma se observa la presencia de RER. En las proximidades de la célula Kupffer se aprecia una célula de Ito, en cuyo citoplasma se evidencia la presencia de gotas lipídicas, propias de este tipo de célula. En la figura 7, se muestra una célula oval (células progenitoras hepáticas) dispuesta entre dos hepatocitos, la cual presenta un núcleo ovoide, característico, y nucléolo visible, con un citoplasma escaso.

En el grupo hiperoxia se evidencian hepatocitos conteniendo abundantes gotas lipídicas en su citoplasma, las cuales, desplazan el núcleo hacia la periferia (Figura 8).

Al microscopio electrónico se observó un hepatocito de forma irregular conteniendo un núcleo ovalado, muchas mitocondrias normales y otras con formas irregulares (Figura 9). También se aprecia pérdida de la integridad estructural en el patrón de ordenamiento de las cisternas del RER, igualmente se observan tumefactas. Por otro lado, las gotas lipídicas intracitoplasmáticas se observan electrondensas y de diferentes tamaños.

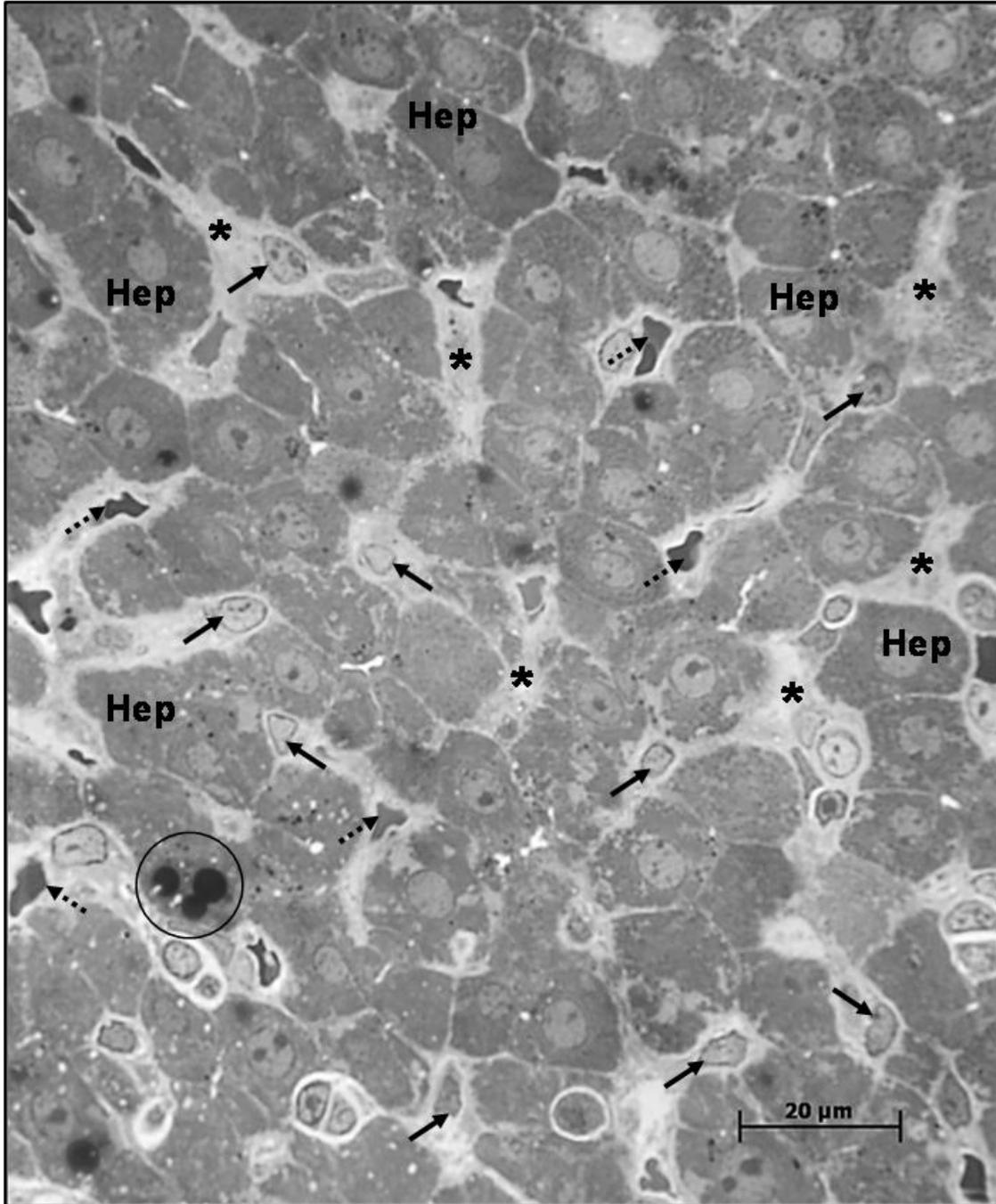


Figura 3. Microscopía de luz de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo control. Se observa tejido hepático. Hep: hepatocito; flechas continuas: células de Kupffer; flechas punteadas: eritrocitos; asteriscos: sinusoides hepáticos; círculo: gotas lipídicas.

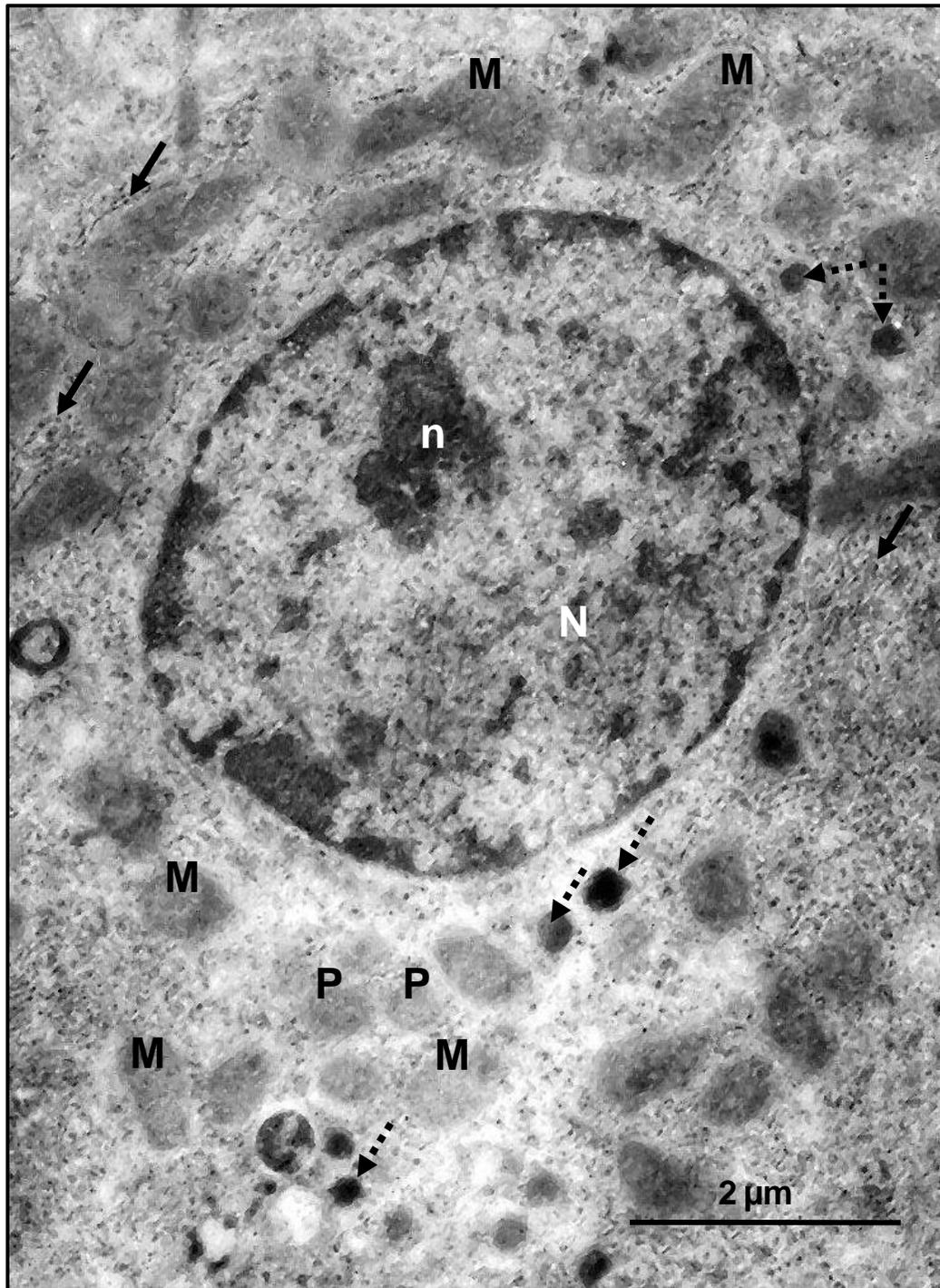


Figura 4. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo control. Se observa la estructura interna de un hepatocito. N: núcleo; n: nucléolo; M: mitocondrias; P: peroxisomas; flechas continuas: retículo endoplasmático rugoso; flechas punteadas: lisosoma.

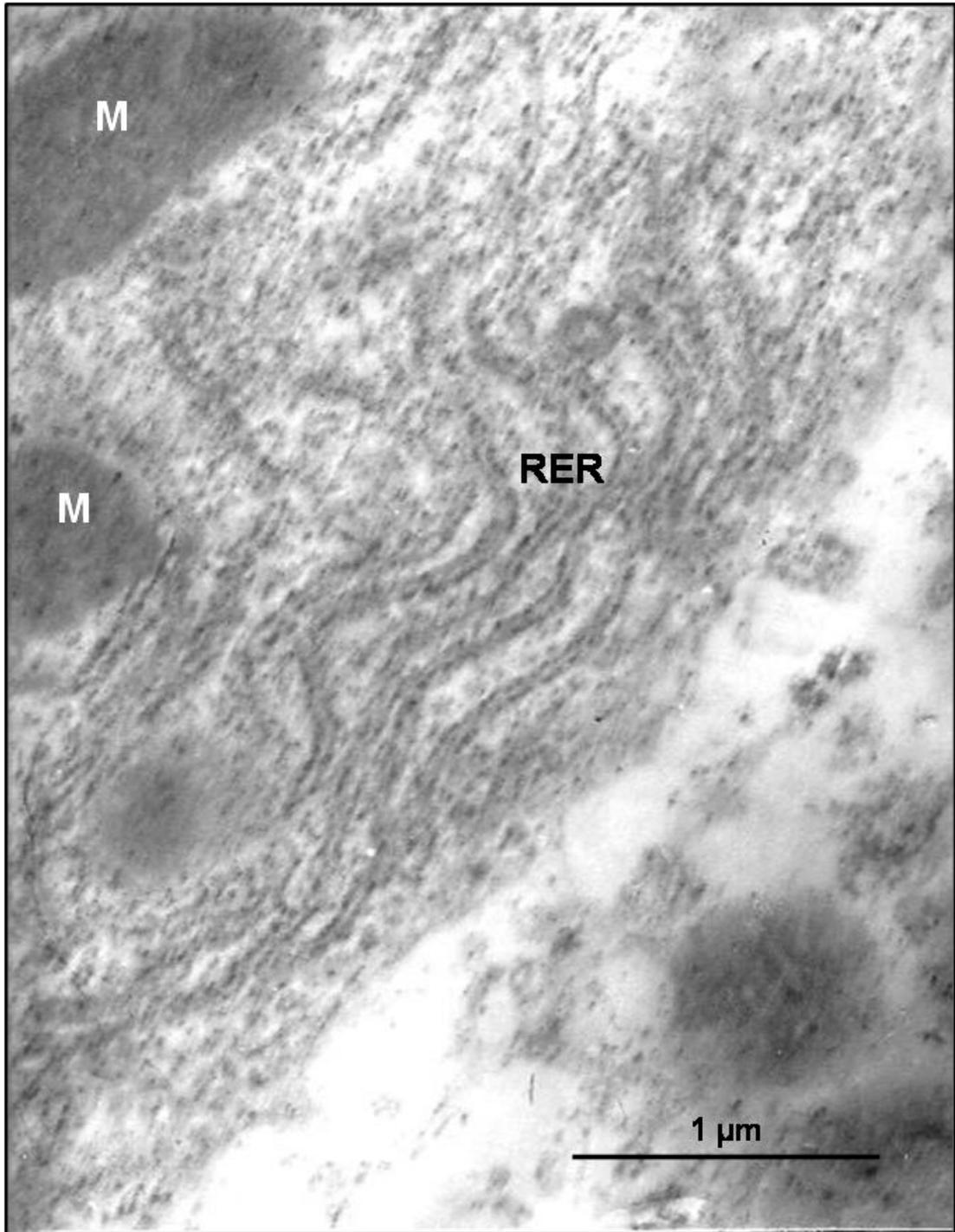


Figura 5. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo control. Detalle de hepatocito. Se observa cisternas de retículo endoplasmático rugoso abundantes en disposición paralela. RER: retículo endoplasmático rugoso; M: mitocondrias.

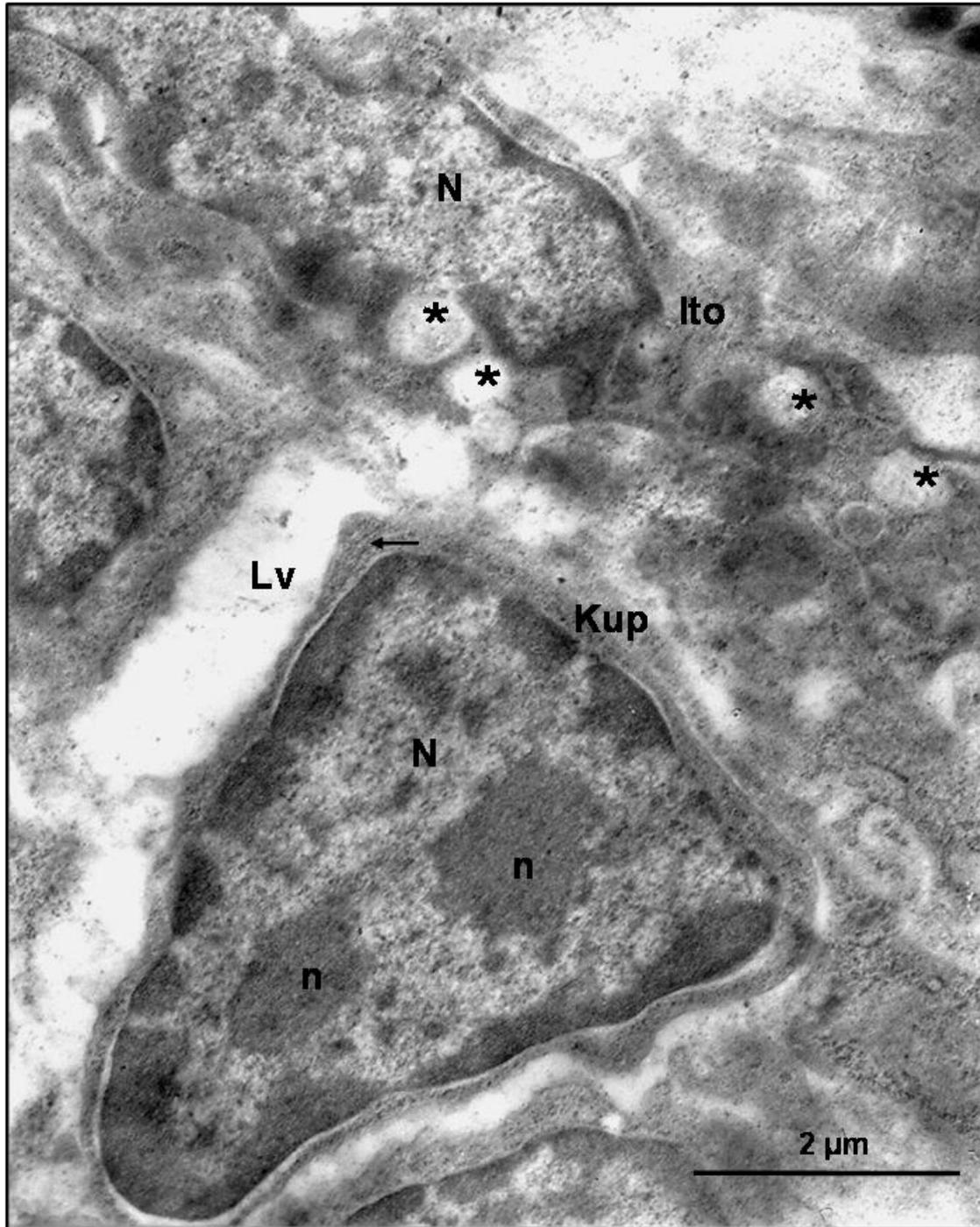


Figura 6. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 del grupo control. Se observa una célula de Kupffer y una célula de Ito con características normales. Kup: célula Kupffer; Ito: célula de Ito; Lv: lumen vascular; N: núcleo; n: nucléolo; flecha: retículo endoplasmático rugoso; asteriscos: gotas lipídicas.

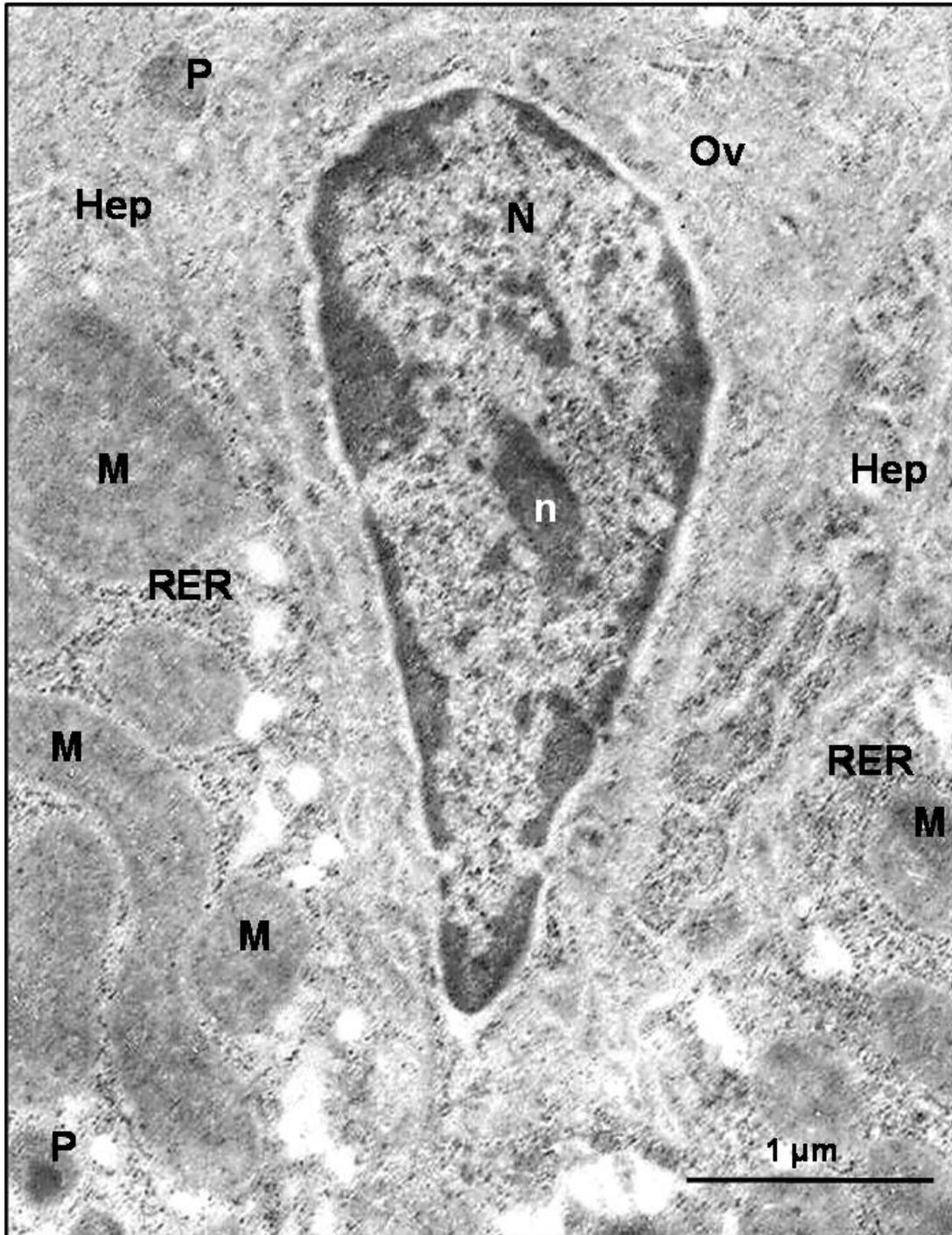


Figura 7. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo control. Se observa una célula oval situada entre dos hepatocitos. Ov: célula oval; N: núcleo; n: nucléolo; M: mitocondrias; P: peroxisomas; RER: Retículo endoplasmático rugoso.

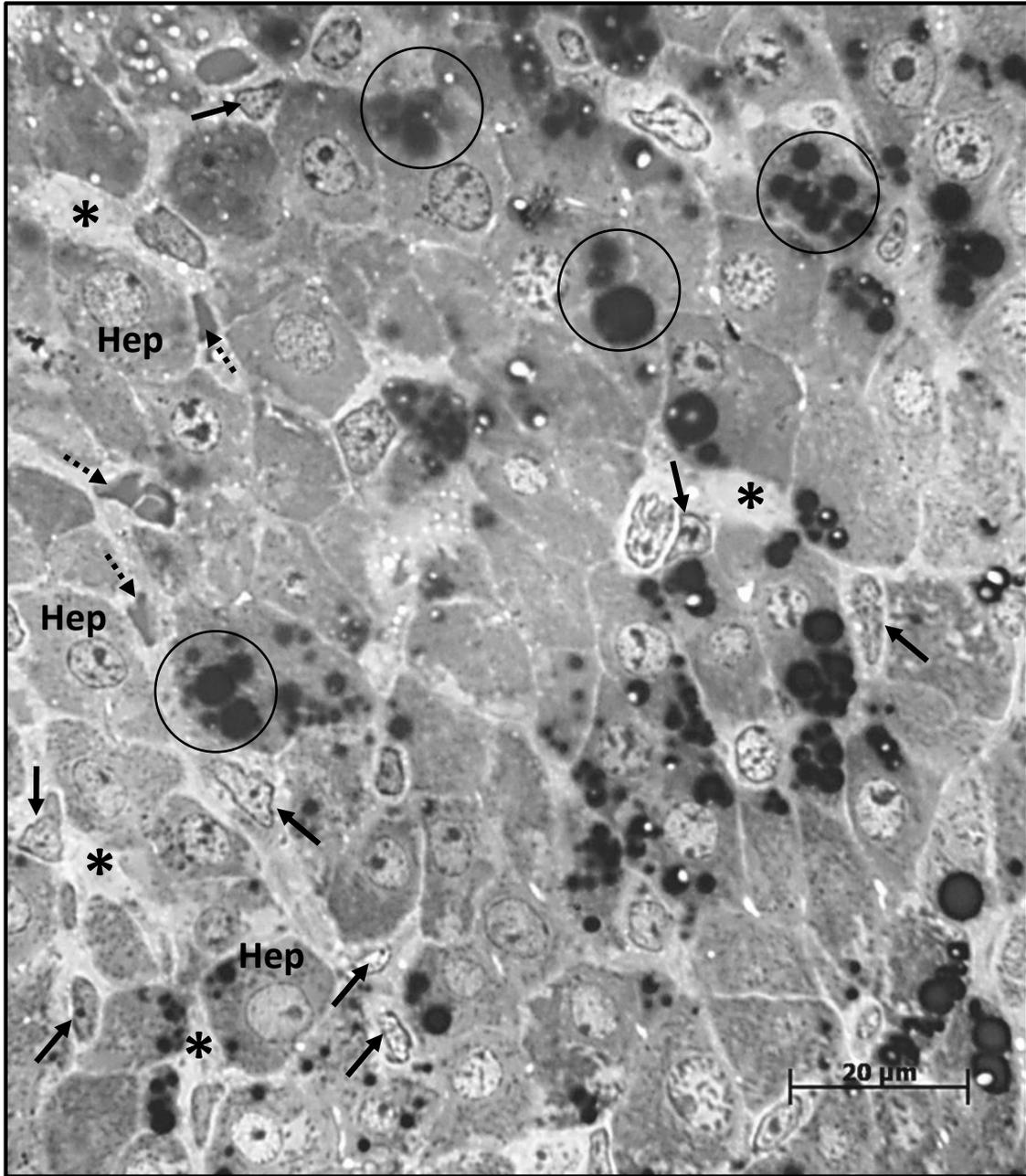


Figura 8. Microscopía de luz de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia. Se observan hepatocitos que contienen abundantes gotas lipídicas en su citoplasma. Hep: hepatocito; flechas continuas: células de Kupffer; flechas punteadas: eritrocitos; asteriscos: sinusoides hepáticos; círculos: gotas lipídicas.

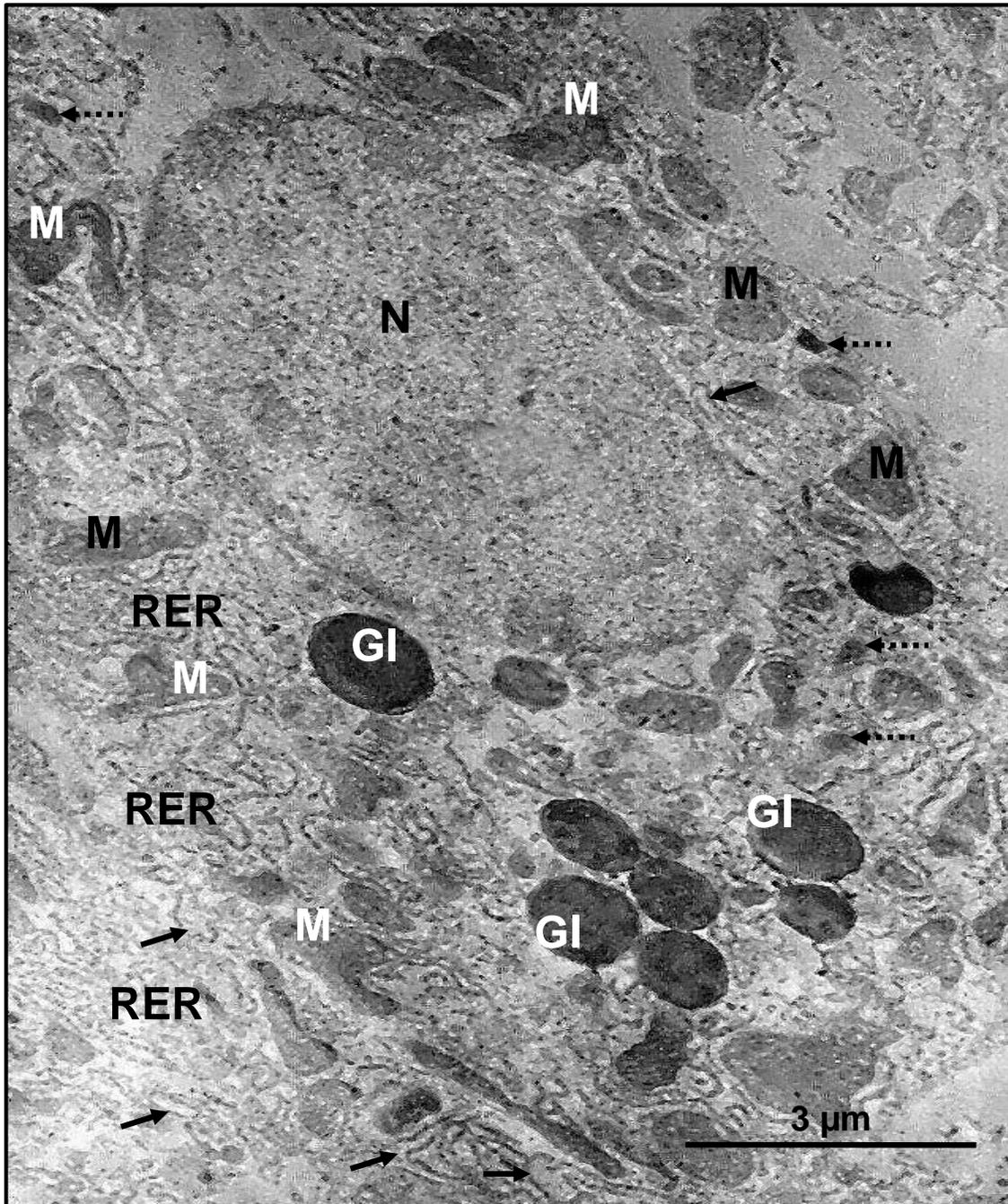


Figura 9. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia. Se observa hepatocito con pérdida de su integridad estructural y proliferación del retículo endoplasmático rugoso. N: núcleo; M negra: mitocondrias con forma normales; M blanca: mitocondrias de forma irregular; RER: retículo endoplasmático rugoso; GI: gota lipídica; flechas continuas: retículo endoplasmático rugoso tumefacto; flechas punteadas: lisosomas.

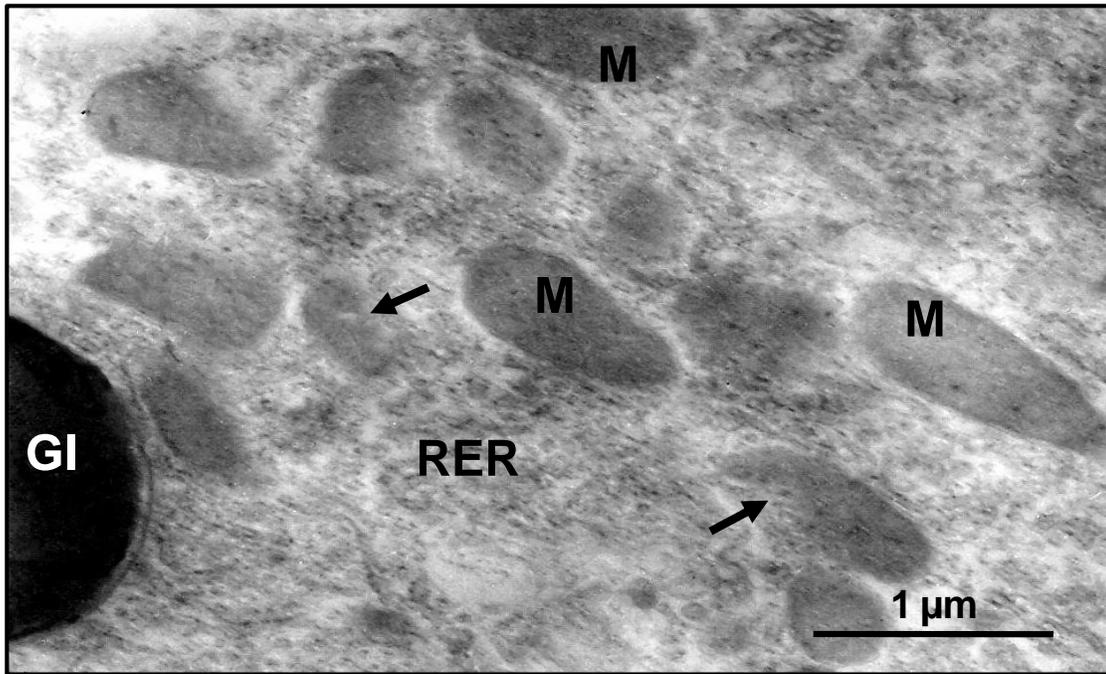


Figura 10. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia. Detalle de hepatocito. N: núcleo; M: mitocondrias; RER: retículo endoplasmático rugoso, flechas: mitocondrias con pérdida de su integridad.

En el grupo hiperoxia también se evidencia un hepatocito con mitocondrias rotas (Figura 10) y se percibe la presencia de una célula Kupffer activada en disposición ameboidea, próxima a un hepatocito (Figura 11).

En el grupo hiperoxia-taurina el tejido hepático presentó una estructura aparentemente normal. Aunque al microscopio de luz se observaron abundantes gotas lipídicas, éstas no fueron tan numerosas comparadas con el grupo hiperoxia (Figura 12).

Las observaciones ultraestructurales revelaron hepatocitos bien estructurados, donde se aprecian mitocondrias normales mostrando formas alargadas o redondeadas (Figura 13). Las cisternas RER se muestran en disposición paralela (Figura 13, 14 y 15), aunque algunas veces se observa de forma irregular (Figura 13). En la figura 16 se observan dos células Kupffer, una inactiva (Figura 16-A) con apariencia similar a la del grupo control y una activa (Figura 16-B) con un borde irregular característico de una Kupffer cuando cumple el papel de macrófago.

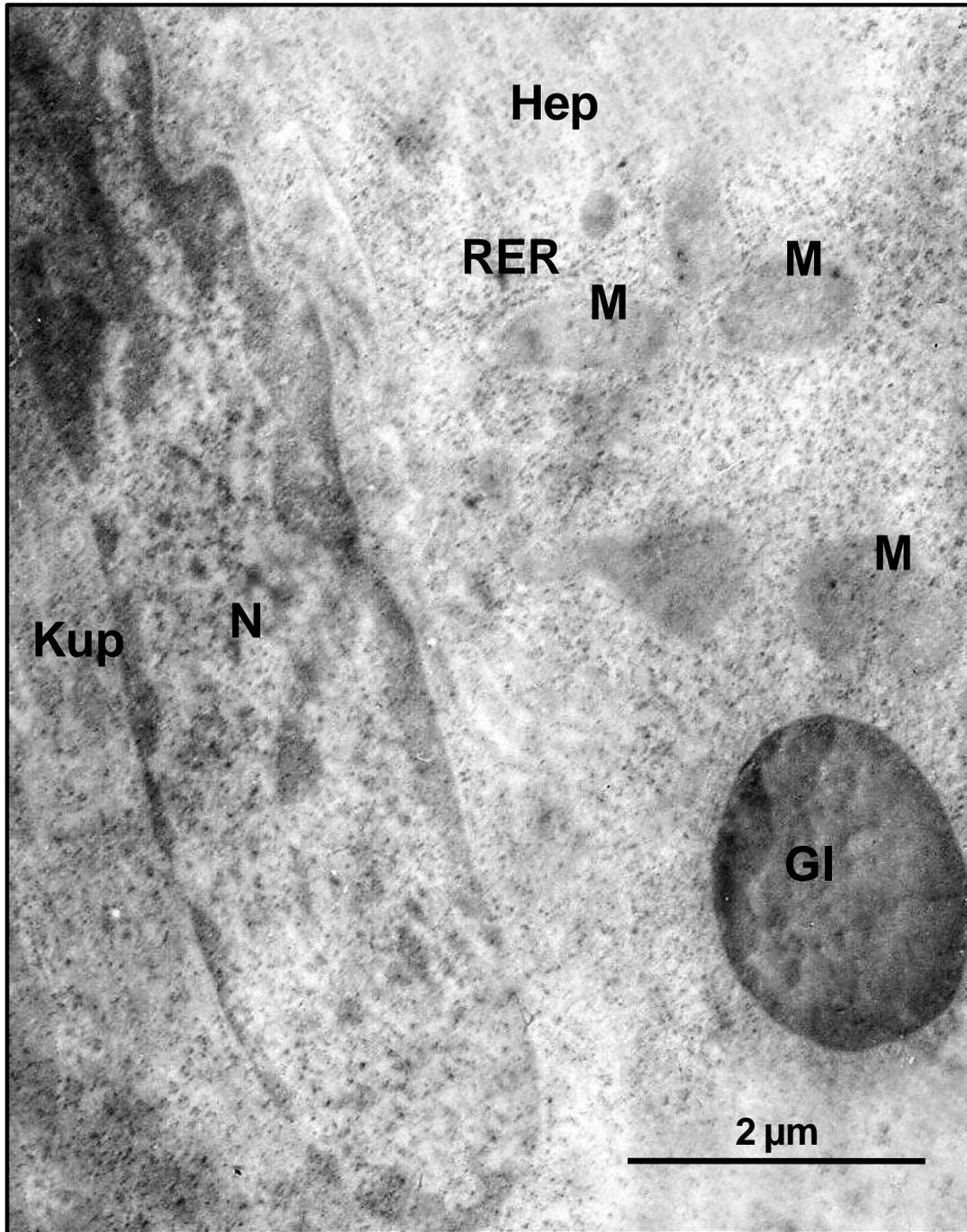


Figura 11. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia. Se observa una célula Kupffer activada. Kup: célula de Kupffer; N: núcleo; Hep: hepatocito, M: mitocondrias; RER: retículo endoplasmático rugoso; Gl: gota lipídica; círculo: glucógeno.

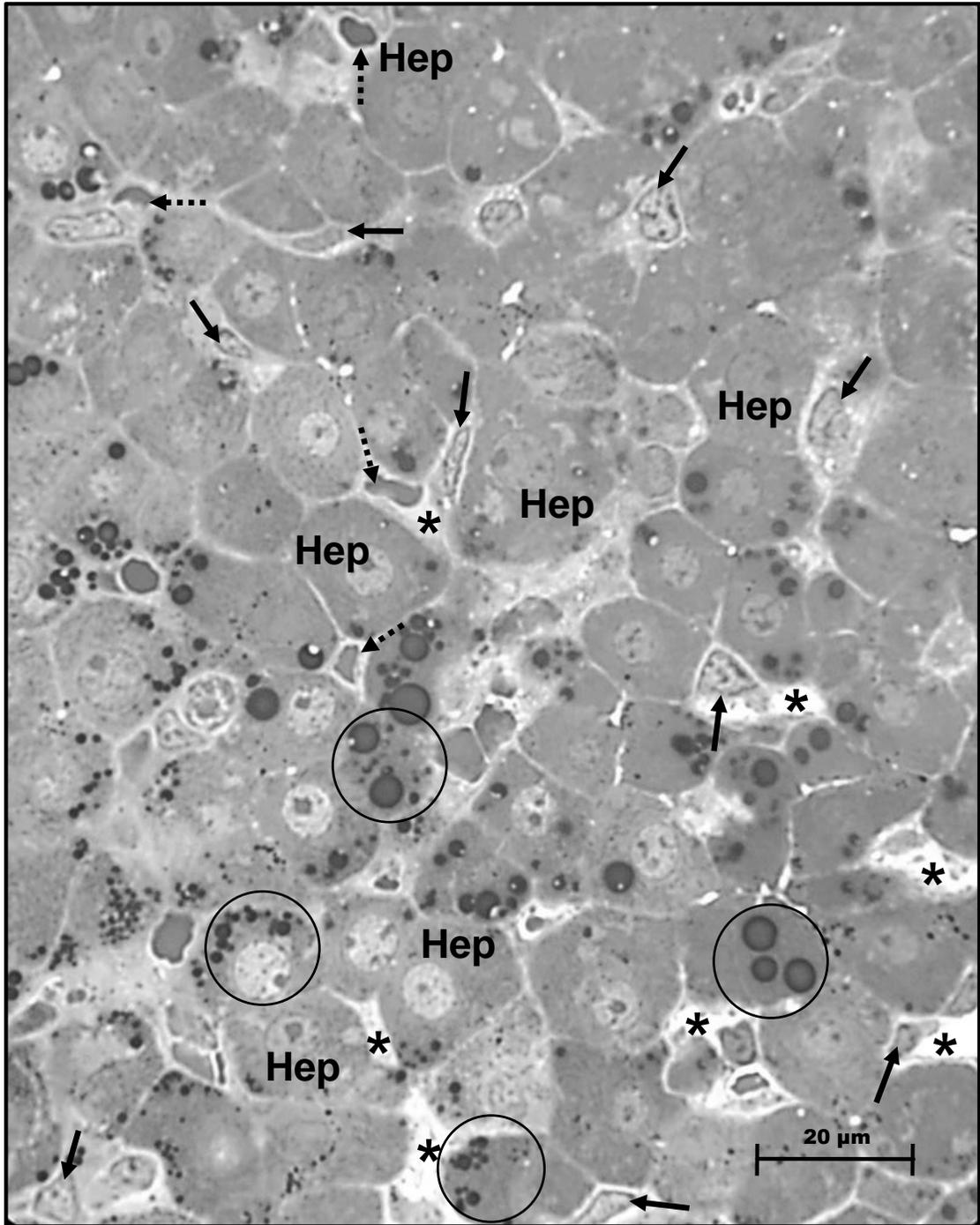


Figura 12. Microscopía de luz de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia-taurina. El tejido hepático presentó una estructura aparentemente normal. Hep: hepatocito; flechas continuas: células de Kupffer; flechas punteadas: eritrocitos; asteriscos: sinusoides hepáticos; círculos: gotas lipídicas.

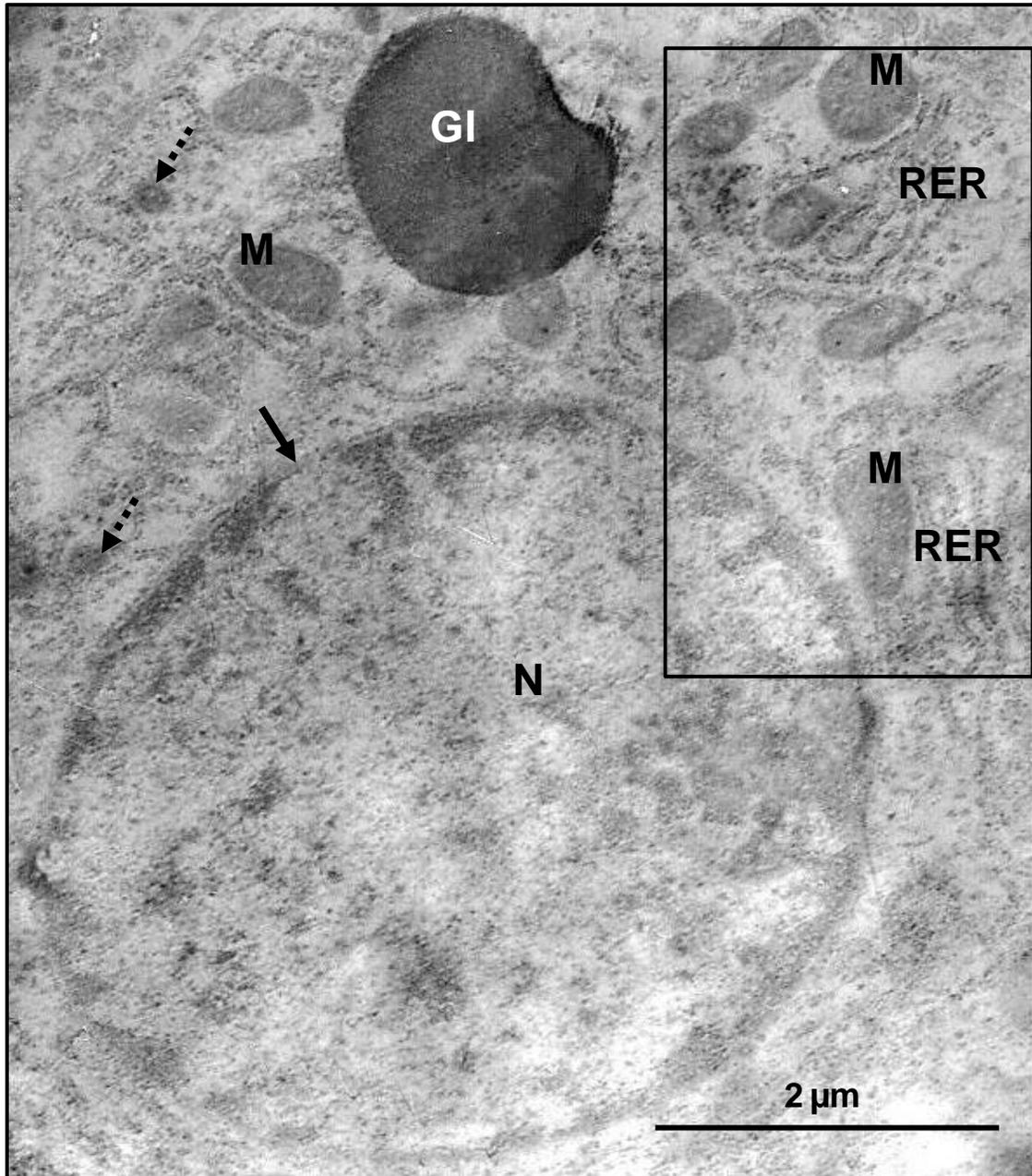


Figura 13. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia-taurina. Se observa hepatocito con preservación de su estructura. N: núcleo; M: mitocondrias; flecha: doble membrana nuclear; RER: retículo endoplasmático rugoso; Flechas punteadas: lisosoma; GI: gota lipídica.

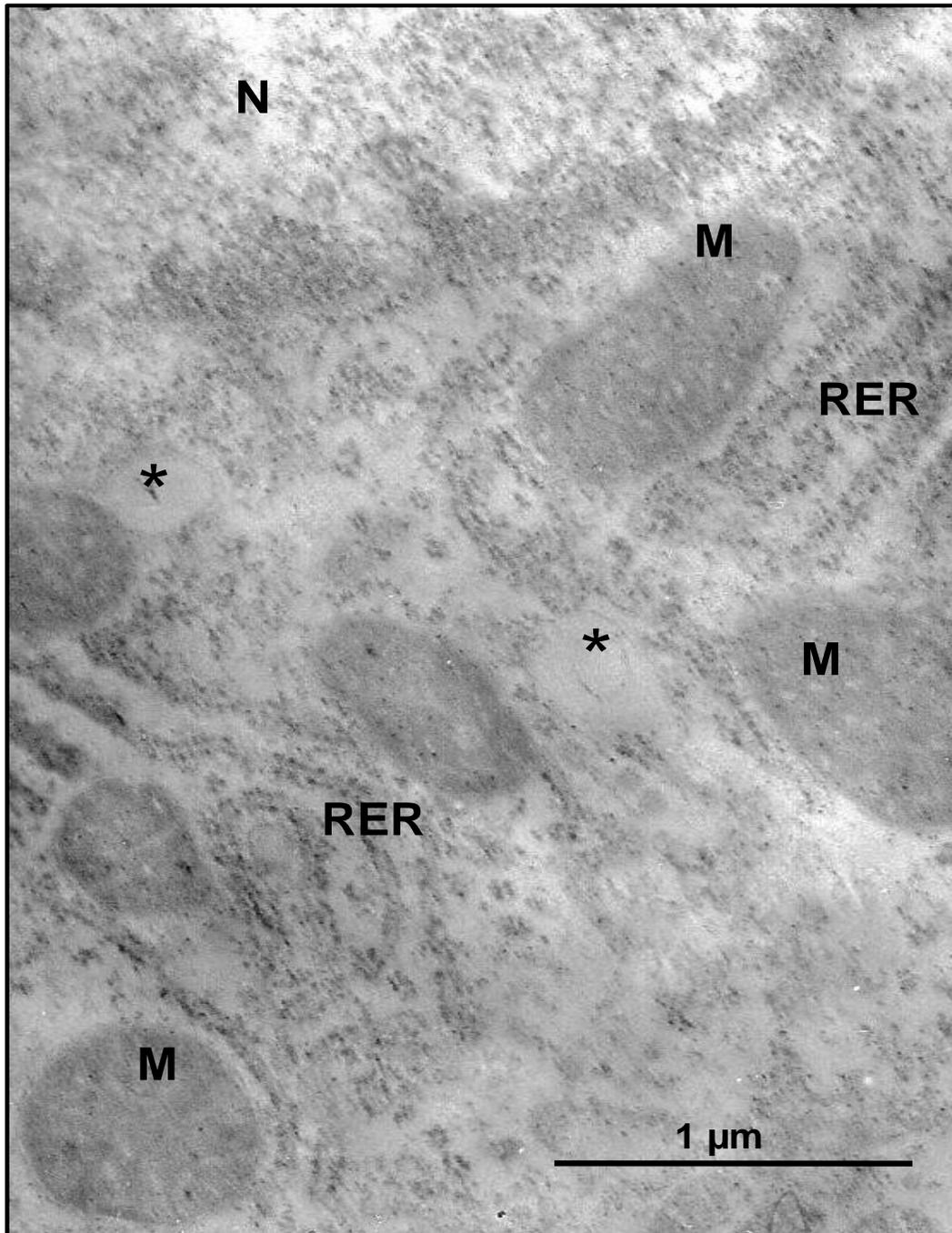


Figura 14. Microscopía electrónica de hepatocito de rata del grupo hiperoxia-
taurina del día P12. Detalle de la figura 13, retículo endoplasmático rugoso. N:
núcleo; M: mitocondrias, RER: retículo endoplasmático rugoso; asteriscos: gotas lipídicas.

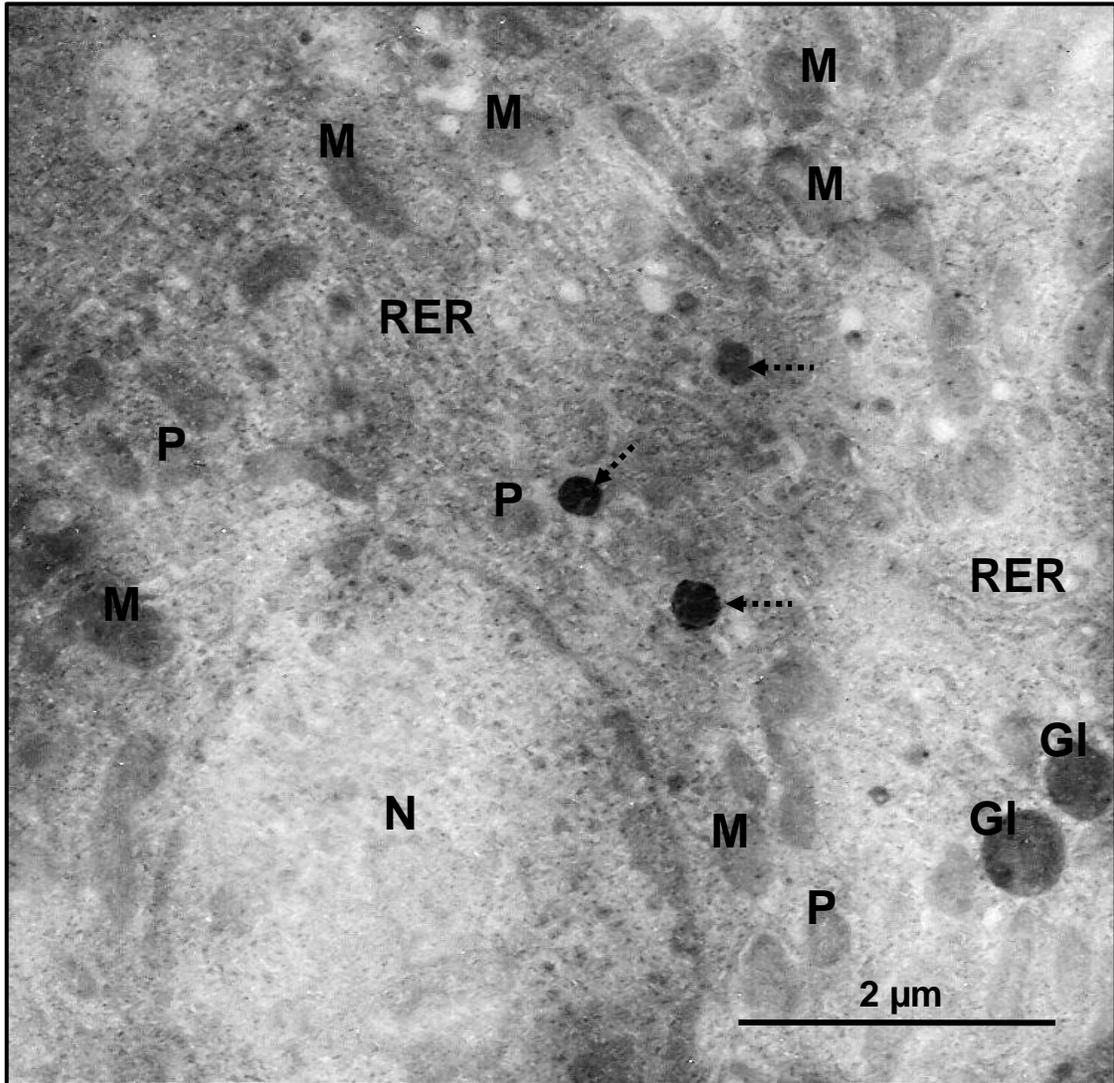


Figura 15. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia-aurina. Se observa hepatocito. N: núcleo; M: mitocondrias; RER: retículo endoplásmico rugoso; P: peroxisomas; fechas puntadas: lisosomas; Gl: gotas lipídicas.

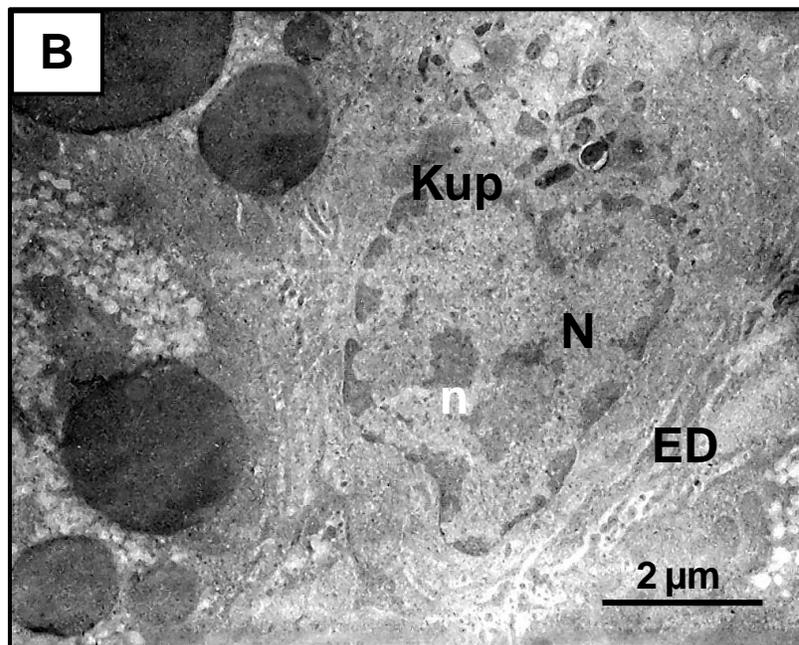
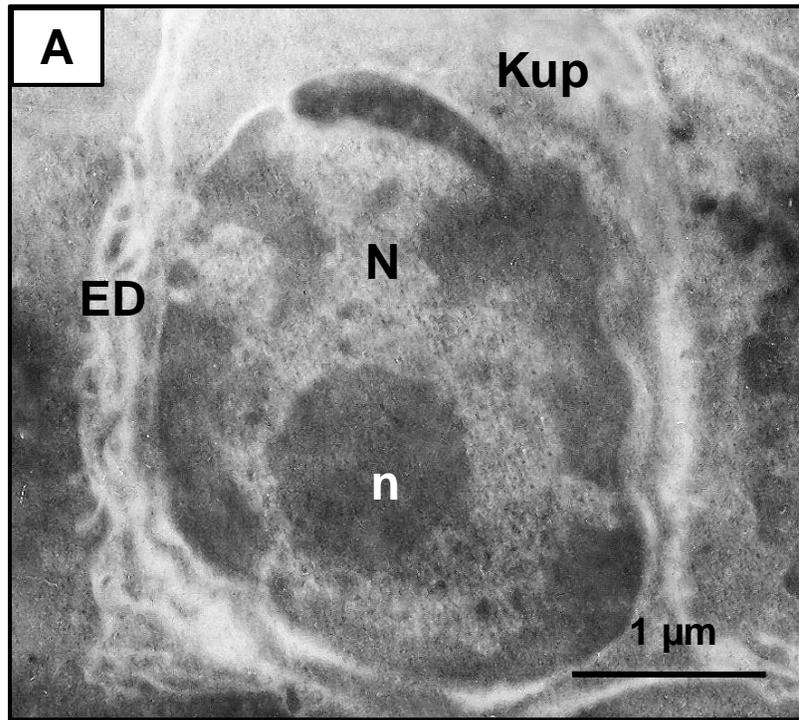


Figura 16. Microscopía electrónica de hígado de rata del día postnatal P12 perteneciente al grupo hiperoxia-aurina. A. célula de Kupffer inactiva y B. célula de Kupffer activa en contacto con un hepatocito en proceso de necrosis. Kup: célula de Kupffer; N: núcleo; n: nucléolo, ED: espacio de Disse.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio revelan que la taurina ejerce un efecto antioxidante y citoprotector en el hígado de ratas expuestas a hiperoxia.

La concentración de tioles solubles en ácido (TSA) en el hígado de ratas del grupo hiperoxia en el día P6 fue significativamente menor (42%) en comparación al grupo control, demostrando que ocurrió un estrés oxidativo en los primeros días de exposición a altos niveles de oxígeno.

Diversos estudios demuestran que la hiperoxia da lugar a la formación de radicales libres (Moison *et al.*, 1997). La lesión oxidativa que sufren las células por acción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) es controlada en gran parte por los antioxidantes tiólicos (Aoshiba *et al.*, 1999). Se ha demostrado que, la reducción del contenido de tioles celulares permite la acumulación de ERO, causando apoptosis en células, sugiriendo que los tioles celulares regulan la apoptosis (Lu, 2009). El tiol más abundante en las células es el glutatión reducido (GSH), el cual interviene en la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o peróxidos de lípidos (Forman *et al.*, 1997). Moison *et al.* (1997) indican que la disminución del GSH en los eritrocitos de recién nacidos con enfermedad pulmonar crónica, corresponde a un aumento en el consumo de GSH a consecuencia del tratamiento prolongado e intensivo de oxígeno al cual fueron sometidos. Además, los cambios en la concentración de GSH en sangre podrían reflejar un estado de estrés oxidativo *in vivo* (Cisneros *et al.*, 2011).

El agotamiento intenso de GSH convierte la apoptosis (muerte celular inducida por una variedad de agentes) a necrosis, sugiriendo que los niveles muy altos de ERO pueden alterar la maquinaria apoptótica (Hall, 1999).

Las mitocondrias son los principales consumidores de oxígeno molecular dentro de las células durante la respiración aeróbica; aunque la mayor parte del oxígeno consumido se reduce a agua (H_2O), un pequeño porcentaje se convierte en ERO, dentro de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Kaeling, 2005). La formación endógena de ERO en la respiración

aeróbica se incrementa, dramáticamente, bajo condiciones de estrés oxidativo (García y Fernández, 2006). Los productos intermedios que se forman, tales como superóxido (O_2^-) y H_2O_2 , pueden conducir a la producción de radicales libres de alta capacidad oxidante, causando lipoperoxidación y daño celular (Lu, 2009). El H_2O_2 es reducido tanto por el GSH como por la catalasa (CAT) (Fernández *et al.*, 1997).

En el presente estudio, un gran número de mitocondrias de los hepatocitos del grupo hiperoxia se vieron afectadas tanto morfológicas como estructuralmente, es posible que la exposición a hiperoxia generó una mayor cantidad de ERO, a través de la cadena transportadora de electrones, contribuyendo a la disminución de los niveles de TSA.

El GSH mitocondrial (mGSH) desempeña un papel esencial en la defensa mitocondrial contra la constante generación de ERO. Por lo tanto, el agotamiento de mGSH, plantea una amenaza crítica a 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 adenosín trifosfato (ATP) (Lu, 2009).

Otra condición que favoreció la disminución de TSA en el hígado de las ratas del grupo hiperoxia pudo ser, el aumento en su exportación a otros órganos donde se necesitaba en mayor concentración de la habitual, principalmente a aquellos con más vulnerabilidad a las ERO. Lu *et al* (1991), indican que durante periodos de estrés el hígado aumenta el transporte de GSH a los sitios donde se requiere. El agotamiento de GSH hepático debido a su liberación en sangre, por parte de este órgano, es una forma de transportar cisteína, siendo capaz de abastecer y mantener la concentración de GSH intracelular en otros órganos (Wong *et al.*, 2001).

La razón por la cual en el día P12 el grupo hiperoxia no presentó diferencias en la concentración de TSA con respecto al grupo control, puede estar relacionado, probablemente, con una mayor madurez del órgano y/o con el desarrollo de otros mecanismos antioxidantes compensatorios. Zirong y

Shijun (2007) relacionan que el aumento GSH a largo plazo (20 días de exposición a cadmio), en el hígado de peces tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), está vinculado con el aumento de la actividad de la enzima γ -glutamil-cisteína sintetasa (γ -GCS), un mecanismo compensatorio adaptativo en este órgano usado para sintetizar de *novo* GSH a fin contrarrestar los efectos oxidativos del metal. Estos autores también aseguran que el aumento de ERO y/o las disminuciones en GSH intracelular son capaces de activar la expresión del gen de la γ -GCS. Un proceso parecido pudo haber sucedido en las ratas expuestas a 12 días de hiperoxia.

En cuanto al grupo hiperoxia-aurina, los resultados revelan que la concentración de TSA en P6 fue significativamente mayor, superando en un 43% a la del grupo hiperoxia. Resultados similares fueron hallados por Maniscalchi (2015), quien analizó el efecto protector de la aurina en la sustancia blanca del cerebelo de ratas recién nacidas sometidas a hiperoxia durante los días P6, P9 y P12, encontrando un incremento de tioles totales en la sustancia blanca de los animales tratados con el aminoácido en comparación a los no tratados. Según Cetiner *et al.* (2005), la aurina no tiene un efecto conocido sobre la síntesis del GSH pero ésta disminuye el consumo de GSH inhibiendo la lipoperoxidación, un marcador de daño oxidativo. Analizando el efecto antioxidante de la aurina sobre el intestino, hígado e íleon, en ratas tratadas con metotrexato sistémico (agente quimioterapéutico citotóxico de enfermedades malignas que baja dramáticamente la concentración de GSH), éstos autores encontraron que el contenido de GSH se restablecía totalmente en estos órganos por la acción de la aurina.

Anand *et al.* (2011), investigando el efecto de la administración oral de aurina sobre los niveles de GSH en el hígado, corazón y estómago de las ratas Wistar normales, observaron después de la administración de aurina, un aumento en los niveles de GSH dependiente de la dosis. Los autores indicaron que la concentración de GSH en los diferentes tejidos depende, principalmente, de la tasa de biosíntesis y de la utilización en las reacciones de

oxidación/reducción.

Por otro lado, Karafakioglu y Aslan (2010) expresan que la taurina podría proteger contra el agotamiento de GSH en los tejidos previniendo la disminución de actividad de la glutatión reductasa (GR), enzima necesaria para la reducción del GSSG de nuevo a GSH.

Se ha demostrado que, en los bebés recién nacidos existe una escasa actividad hepática de las enzimas cistationasa y descarboxilasa, imprescindible en el metabolismo de los aminoácidos sulfurados, cuyo producto final es la taurina (Gaull, 1982); debido a esto, parece indispensable el suministro exógeno este β -aminoácido mediante la alimentación con leche materna, que aporte la cantidad adecuada de taurina para cubrir las necesidades del recién nacido (Rivero *et al.*, 2005). En las ratas, la taurina es transferida rápidamente de la madre a la cría, a través de la leche materna (Rojas, 2015). Sin embargo, bajo un estado de estrés oxidativo el suministro de esta sustancia a través de la leche materna podría ser insuficiente, tal y como lo sugieren los resultados bioquímicos del grupo hiperoxia, siendo posiblemente necesario un consumo adicional de taurina que ayude a un mejor funcionamiento del sistema antioxidante. Respaldando esta aseveración, Sánchez *et al.* (2010) proponen que las defensas antioxidantes en los neonatos prematuros se encuentran comprometidas, entre otras cosas, por deficiencias relativas de taurina y selenio.

Con respecto a las proteínas totales, en el día P6 el hígado de los grupos hiperoxia e hiperoxia-taurina mostraron una concentración similar. No obstante, estas concentraciones son significativamente más altas comparadas con el grupo control. Resultados similares fueron hallados por Palma (2008), al analizar la concentración de proteínas totales en la retina de ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia. Se ha señalado que, la hiperoxia influye en los niveles y actividad de algunas proteínas hepáticas en ratas (Malleske *et al.*, 2006). En el presente estudio, el efecto de la hiperoxia sobre la concentración de proteínas totales en el hígado, posiblemente, estimuló la síntesis de proteínas antioxidantes como las proteínas de estrés (PE) y enzimas antioxidantes como

la CAT, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa (GPx), metalotioneínas, entre otras, presentes en tejidos expuestos a estrés oxidativo (Arrieta *et al.*, 2000; Astiz, 2009).

En todas las células que cumplen función de síntesis proteica se encuentran las PE, las cuales en condiciones normales constituyen entre un 5% y un 10% del contenido proteico celular (Espigares, 2005). Las PE son acompañantes moleculares o “chaperones moleculares”, que actúan cuando se produce una situación de estrés celular y las proteínas intracelulares sufren una desnaturalización (Fazzi y Espigares, 2008). En ese momento, las PE aumentan su presencia y síntesis (hasta 2 y 3 veces) para, de esta manera, reconocer las proteínas desnaturalizadas y unirse a ellas, utilizando energía proveniente del ATP dirigiendo su plegamiento y asegurándose de conducir las a la adquisición de una nueva estructura tridimensional. Además, pueden unirse a péptidos y proteínas dañadas ayudando en su reparación o degradación (Sandoval, 2002). Las PE presentan una localización estratégica ya que se encuentran tanto en citoplasma, como en mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplasmático, lo que proporciona una red organizada para controlar la calidad del plegamiento proteico en los distintos compartimientos subcelulares (Jiménez, 2008).

Un ejemplo de PE es la hemo-oxigenasa (HO) que cataliza la oxidación del grupo hemo en hierro ferroso (Fe^{2+}), monóxido de carbono (CO) y biliverdina, que se convierte rápidamente en bilirrubina. Se han descrito tres isoformas distintas de la HO. La isoforma HO-2 se expresa de manera constitutiva y está presente con niveles elevados en cerebro y testículos. La HO-3 tiene actividad catalítica y actúa como proteína fijadora de hemo. La HO-1 es una PE distribuidas por todas partes, que puede actuar como sistema de defensa frente al estrés oxidativo (Romanque *et al.*, 2005; Conde *et al.*, 2008).

La expresión de la HO-1 se incrementa, considerablemente, en presencia de hipoxia, hiperoxia, endotoxinas bacterianas, radiaciones ionizantes, entre otros, por lo que diferentes autores la consideran la enzima más inducida por

diversos estímulos que cualquier otra descrita hasta el momento, principalmente por estrés oxidativo (González y Hernández, 2013). Se ha manifestado que la HO-1 presenta un efecto hepatoprotector, siendo capaz de proteger al hígado de la lesión de isquemia/reperfusión, de endotoxemia y del daño apoptótico de mediación inmunitaria en ratones (Sánchez *et al.*, 2005). La biliverdina protege del estrés oxidativo actuando como antioxidante en diferentes modelos de lesión hepática (Conde *et al.*, 2008).

Para el día P12, las proteínas totales disminuyeron sin presentar diferencia en su concentración en los tres grupos estudiados. Estos resultados, posiblemente, guardan relación con la madurez del sistema antioxidante a esa edad postnatal. El ligero aumento en la concentración promedio de proteínas totales observado en el grupo hiperoxia-aurina puede deberse a las funciones osmorreguladoras y antioxidantes que cumple la aurina en las membrana celulares, además de regular la traducción de señales debido a su efecto en la fosforilación de proteínas (Cañas, 2002; Rivero *et al.*, 2005).

El análisis histológico del hígado en las ratas del grupo control mostró un tejido bien conservado donde se observaron hepatocitos, algunos de ellos portando gotas lipídicas, células de Kupffer, Ito y ovals con una estructura y ultraestructura característica. Los hepatocitos constituyen cerca del 80% de la población celular del tejido hepático, responsables de purificar la sangre, eliminando los desechos y toxinas, así como almacenar nutrientes saludables para que el cuerpo los utilice cuando sea necesario (Geneser, 2000).

Las células de Kupffer son macrófagos residentes en el hígado, constituyen cerca del 4% de la población celular hepática (Sung *et al.*, 1992). Las células de Ito presentan la capacidad de almacenar lípidos, y constituyen el principal reservorio de vitamina A del organismo. Muestran cambios morfológicos y funcionales muy importantes durante los procesos de fibrogénesis, transformándose en miofibroblastos, y sintetizando importantes cantidades de colágeno en respuesta a estímulos inflamatorios (Geneser, 2000).

Las células ovals son escasas en el hígado normal y se considera que

apenas superan el 1% de las células en el hígado fetal (Torres *et al.*, 2011). Estas células se encuentran normalmente en un estado quiescente; pero durante la regeneración hepática las células ovas localizadas en la región periportal (alrededor de los canales de Hering) invaden el parénquima por completo, diferenciándose hacia hepatocitos y células del ducto biliar e integrándose, finalmente, en la arquitectura hepática (Suárez, 2012; Osorio y Rodríguez, 2014).

En el presente estudio, se evidenciaron daños tanto estructurales como ultraestructurales en los hepatocitos y células de Kupffer de las ratas del grupo hiperoxia.

En los hepatocitos del grupo hiperoxia se observaron alteraciones mitocondriales tanto morfológicas como en la ruptura de su membrana. Yan *et al.* (2010), observaron una disminución en la función mitocondrial al aumentar la tensión oxidante, en hepatocitos de ratas expuestos a condiciones de hiperoxia *in vitro*. Por otra parte, Casals *et al.* (1987), señalan que el exceso de oxígeno puede alterar la composición de lípidos (lipoperoxidación), perturbando las funciones de las membranas, ya sea por alteración de la integridad estructural o del microambiente entre los lípidos y las proteínas de membrana. En el presente estudio, la lipoperoxidación ocasionada por la hiperoxia, pudo haber sido la causa de los cambios morfológicos observados en las mitocondrias de los hepatocitos del grupo hiperoxia. Los hepatocitos tienen una alta tasa metabólica, para lo cual necesitan mucha energía proveniente del ATP. El daño mitocondrial puede traer como consecuencia una disminución en la síntesis de ATP y, por consiguiente, un descenso en la actividad metabólica del hepatocito (Browning y Horton, 2004).

Los daños mitocondriales descritos fueron, posiblemente, los causantes de la gran acumulación de gotas lipídicas observadas en los hepatocitos por la disminución de los mecanismos de beta oxidación (β -oxidación) de ácidos grasos (Cornejo *et al.*, 2014). La β -oxidación es un proceso catabólico de los ácidos grasos en el cual sufren remoción, mediante la oxidación sucesiva de un

par de átomos de carbono en cada ciclo del proceso, hasta que el ácido graso se descompone por completo en forma de moléculas de acetil-CoA, que serán, posteriormente, oxidados en la mitocondrias para generar energía química en forma de ATP (Champe *et al.*, 2006).

Las alteraciones en el patrón de disposición de las cisternas observadas en el retículo endoplasmático rugoso (RER) también pueden ser consecuencia de trastornos influenciados por la lipoperoxidación (Vaquero *et al.*, 2012). La tumefacción de las cisternas es, probablemente, producto del aumento en la síntesis de proteínas como se evidenció en el día P6. La distención de las cisternas ante un agente tóxico puede deberse al almacenamiento, en su lumen, de las proteínas desplegadas desencadenando la respuesta del RER a las proteínas mal plegadas (UPR, unfolded protein response, por sus siglas en Inglés) (Izquierdo y Medina, 2011). El UPR tiene dos objetivos principales, en primer lugar, recuperar el funcionamiento normal de la célula, deteniendo la traducción de proteínas y activando la vía de producción de PE involucradas en el plegamiento de proteínas. Si la célula no consigue este primer objetivo en un cierto lapso de tiempo, la UPR se dirige hacia el segundo objetivo que es la apoptosis (Uguz *et al.*, 2009).

Las células de Kupffer, se observaron activadas en el grupo hiperoxia. Estas células representan la primera línea de defensa de este órgano que recibe sangre arterial y esplánica rica en nutrientes, llevando a cabo un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades hepáticas (López, 2013). Actúan como reguladoras del proceso de apoptosis en otras células que estén sufriendo dicho proceso (Schinoni y Paraná, 2006). Cuando los hepatocitos muestran cambios degenerativos, las células de Kupffer responden inmediatamente (Urtasun y Nieto, 2007). Alhazza y Haffor (2005), al someter palomas jóvenes y viejas a hiperoxia observaron una activación de las células de Kupffer. También se ha sugerido la activación de las células de Kupffer después de un tratamiento agudo con H₂O₂ (Cogger *et al.*, 2001).

Los cambios ultraestructurales hallados en los hepatocitos, de las ratas

de grupo hiperoxia, se han visto en otras circunstancias experimentales, incluyendo isquemia, procesos de regeneración, intoxicación química, o incluso estados de hipoxia (Schaffner y Felig, 1965), por lo tanto, ninguno de ellos puede considerarse específico. Se ha planteado que los diversos cambios ultraestructurales que se producen en el hígado después de la exposición hiperóxica, guardan relación con un proceso de adaptación a la hiperoxia (Casals *et al.*, 1987; Vaquero *et al.*, 2012). Las ERO, conjuntamente con otros mecanismos, provocan lesiones hepatocelulares las cuales se traducen en alteraciones en la funcionalidad del órgano, comprometiendo su viabilidad (Montalvo *et al.*, 2011).

En el grupo hiperoxia-aurina el tejido hepático mostró una estructura, aparentemente, normal en comparación con el grupo hiperoxia, a pesar de la presencia de abundantes gotas lipídicas. A nivel ultraestructural, las mitocondrias de los hepatocitos se mostraron normales, es decir, sin alteraciones morfológicas ni ruptura de su membrana. Las cisternas del RER en su mayoría mostraron una disposición paralela. Además, se pudo apreciar la presencia de células Kupffer tanto inactivas como activas. Probablemente, como diversos autores lo han señalado (Huxtable, 1992; González, 2015; Rojas, 2015; Córdova, 2016), mediante la disminución de la lipoperoxidación por parte de la aurina se obtuvo la citoprotección del tejido hepático.

Hagar (2004), analizó el estrés oxidativo en el hígado de ratas expuestas a ciclosporina A (agente hepatotóxico e inmunosupresor) y tratadas con aurina. Según Hagar, la aurina mejoró la lesión hepática inducida por la ciclosporina A y redujo el estrés oxidativo a través de la inhibición de la lipoperoxidación, aumento de la actividad de la CAT y la reposición de las reservas de GSH, permitiendo la defensa celular correcta contra las ERO. Por otra parte, se ha demostrado que la aurina ejerce un efecto protector contra el estrés oxidativo en la lesión hepática crónica inducida por alcohol (Kerai *et al.*, 1999).

En resumen, el estrés oxidativo generado por la exposición a la hiperoxia es el responsable de alteraciones, tanto a nivel bioquímico en las

concentraciones tioles solubles en ácido y proteínas, como a nivel histológico en el hígado de ratas en desarrollo. Sin embargo, el principal hallazgo en este estudio fue el efecto antioxidante que ejerció la taurina en la reducción de los daños ocasionados por las ERO en el órgano.

CONCLUSIONES

La hiperoxia provocó el agotamiento de los tioles solubles en ácido (TSA) y estimuló el aumento en la síntesis de proteínas totales. También fue la responsable de las alteraciones estructurales y ultraestructurales observadas en las células del hígado de las ratas.

La taurina fue capaz de cumplir su acción antioxidante y citoprotectora demostrado por el aumento de la concentración de TSA y la preservación de la ultraestructura celular del hígado de ratas expuestas a hiperoxia.

En un futuro la taurina podría ser empleada como tratamiento antioxidante en las terapias de oxígeno a las que suelen ser expuestos los prematuros al nacer.

BIBLIOGRAFÍA

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

Albores, M.; Caballero, Y.; González, Y. y Pozas, R. 2006. *Grupos funcionales, nomenclatura y reacciones principales*. Facultad de química, UNAM. Ciudad de México.

Alhazza, I. y Haffor, A. 2005. Effects of hyperoxia and aging, cholesterol levels in pigeon. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(1): 55-59.

Anand, P.; Rajakumar, D.; Jeraud, M.; John, A. y Balasubramanian, T. 2011. Effects of taurine on glutathione peroxidase, glutathione reductase and reduced glutathione levels in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14(3): 219-225.

Aoshiba, K.; Yasui, S.; Nishimura, K. y Nagai, A. 1999. Thiol depletion induces apoptosis in cultured lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 21: 54-64.

Arrieta, J.; Díaz, A.; Ávila, E.; Guinzberg, R. y Piña, E. 2000. Estado oxidativo hepático y comportamiento productivo en pollos de engorda, alimentados con dos fuentes de selenio y niveles altos de vitaminas E y C. *Veterinaria México*, 31(2): 113-119.

Astiz, M. 2009. Efecto de contaminantes ambientales sobre el metabolismo lipídico y el sistema de defensa antioxidante en el tejido de ratas. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata.

Balkan, J.; Dogru-Abbasoglu, S.; Kanbagli, O.; Cevikbas, U.; Aykac-Toker, G. y Uysal, M. 2001. Taurine has a protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. *Human and Experimental Toxicology*, 20: 251-254.

Betancur, Y. 2015. Cuantificación de tioles libres y superóxido dismutasa (SOD) en extractos metanólicos de las plantas pertenecientes a las familias asteraceae, euphorbiaceae y piperaceae. Trabajo de grado. Escuela de Tecnología Química. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Browning, J. y Horton, J. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 114: 147-152.

Cañas, P. 2002. Rol biológico y nutricional de la taurina y sus derivados. *Revista Chilena de Nutrición*, 29(3): 11-22.

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.

Casals, M.; Gasset, M.; Méndez, M.; García, P. y Municio, A. 1987. Lipid alterations in liver and kidney induced by normobaric hyperoxia: correlations with changes in microsomal membrane fluidity. *Biochemical Medicine And Metabolic Biology*. 37: 269-281.

Cetiner, M.; Sener, G.; Özer, A.; Eksioglu-Demiralp, E.; Ercan, F.; Sirvanci, S.; Gedik, N.; Akpulat, S.; Tecimer, T. y Yegen, B. 2005. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209: 39-50.

Champe, P.; Harvey, R. y Ferrier, D. 2006. *Bioquímica*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. México.

Cisneros, C.; Oré, R.; Arnao, I. y Suárez, S. 2011. Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii walp*). *Anales de la Facultad de Medicina*, 72(2): 107-111.

Cogger, V.; Mross, P.; Hosie, M.; Ansselin, A.; McLean, A. y Le-Couteur, D. 2001. The effect of acute oxidative stress on the ultrastructure of the perfused rat liver. *Pharmacology & Toxicology*, 89: 306-311.

Conde, L.; Moshage, H. y Nieto, N. 2008. Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100: 156-163.

Contreras, F. 2005. Valoración de la respuesta neonatal ante el estrés oxidativo. Análisis comparativo entre recién nacidos a término y pretérminos. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Granada.

Córdoba, M. 2010. "Toxicidad del oxígeno". "Fisiologi". <<http://fisiologi.com/paginas/BUCEO/toxicidad2.htm>> (21/07/2014).

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.

Cornejo, R.; Garrido, O.; Sáez, L.; Bustamante, C. y Cartes, G. 2014. Morphometric analysis of alcoholic microvesicular hepatic steatosis in rats. *International Journal of Morphology*, 32(2): 488-492.

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

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

Elejalde, J. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de medicina interna*, 6: 326-335.

Espigares, E. 2005. Asociación entre Hsp70 y estado Viruinmunológico en Pacientes VIH+. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada.

Fazzi, C. y Espigares, E. 2008. Las proteínas de estrés en relación con la salud autopercebida y el nivel de actividad física. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 8: 392-403.

Fernández, J.; Kaplowitz, N.; García-Ruiz, C.; Colell, A.; Miranda, M.; Mai, M.; Ardite, E. y Morales, A. 1997. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *American Journal of Physiology*, 273: G7-G17.

Festy, D. 2007. *Antioxidantes. Guía práctica*. Robinbook. Barcelona.

Forman, H.; Liu, R. y Tian, L. 1997. Glutathione cycling in oxidative stress. *In Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function. Lung Biology in Health and Disease*, 105: 99-112

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

Galicia, M. y Gutiérrez, G. 2014. Papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica. *Revista de gastroenterología de México*. 79(2): 135-144.

García, C. y Fernández, J. 2006. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21: S3-S6.

Gaull, G. 1982. Taurine in the nutrition of the human infant. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 269: 38-40.

Geneser, F. 2000. *Histología*. Tercera edición. Editorial médica panamericana. Madrid.

González, J. y Hernández, H. 2013. Síndrome metabólico, diabetes y estrés oxidativo en la enfermedad de alzheimer y parkinson. Papel potencial del pirofosfato de tiamina. *Revista Electrónica Medicina, Salud y Sociedad*, 3(3): 1-22.

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

Gorman, A.; McGowan, A.; O'Neill, C. y Cotter, T. 1996. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *Journal Neurological Sciences*, 139: 45-52.

Hagar, H. 2004. The protective effect of taurine against cyclosporine A-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Toxicology Letters*, 151: 335-343.

Hall, A. 1999. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *European Journal of Clinical Investigation*, 29: 238-245.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. *Febs Letters*, 188: 170-171.

Hernández, M. y Sastre, A. 1999. *Tratado de Nutrición*. Díaz de Santos.

Hultberg, B.; Andersson, A. y Isaksson, A. 1998. Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions. *Toxicology*, 126: 203-212.

Huxtable, R. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*, 72: 101-163.

Izquierdo, A. y Medina, G. 2011. Papel de la lipotoxicidad en el desarrollo de la lesión renal en el síndrome metabólico y el envejecimiento. *Diálisis y Trasplante*, 3(3): 89-96.

Jiménez, R. 2008. Activación de HSF-1 y expresión de la proteína de shock térmico HSP-70 en la isquemia-reperfusión hepática, luego de un

preacondicionamiento por l-3,3',5-triyodotironina. Trabajo de grado. Universidad de Chile, Santiago de Chile.

Kaeling, G. 2005. ROS: really involved in oxygen sensing. *Cell Metabolism*, 1: 357-365.

Karafakioglu, Y. y Aslan, R. 2010. Taurine prevents nonyphenol-induced oxidative stress in rats. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(1): 37-43.

Kerai, M.; Waterfield, C.; Kenyon, S.; Asker, D. y Timbrell, J. 1999. Reversal of ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation by taurine: a study in rats. *Alcohol & Alcoholism*, 34(4): 529-541.

Koolman, J. y Rohm, K. 2004. *Bioquímica texto y atlas*. Tercera edición. Editorial médica panamericana. Madrid.

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.

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

Liscano, A. 2014. Patología ultraestructural del cerebelo de ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia y tratadas con taurina. Tesis de postgrado. Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Cumaná.

Lopez, R. 2013. Hepatopatología para gastroenterólogos y hepatólogos. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 28(2): 161-168.

Lu, S. 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30: 42-59.

Lu, S.; Kuhlenskamp, J.; García, C. y Kaplowitz, N. 1991. Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 88: 260-269.

Malleske, D.; Rogers, L.; Velluci, S.; Young, T.; Park, M.; Long, D.; Welty, S.; Smith, C. y Nelin, L. 2006. Hyperoxia increases hepatic arginase expression and ornithine production in mice *Toxicology and Applied Pharmacology*, 215: 109-117.

Maltepe, E. y Saugstad, O. 2009. Oxygen in health and disease:

regulation of oxygen homeostasis—clinical implications. *Pediatric Research*, 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.

Marcinkiewicz, J.; Grabowska, A.; Bereta, J. y Stelmaszynska, T. 1995. Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. *Journal of Leukocyte Biology*, 58: 667-674.

Martínez, J.; Torres, P. Y Juárez, M. 2011. El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista de Educación Bioquímica*, 30(2): 56-67.

Militante, J. y Lombardini, J. 2002. Taurine: Evidence of physiological function in the retina. *Nutricional Neuroscience*, 5: 75-90.

Moison, R.; Haasnoot, A.; Van Zoeren-Grobbe, D. y Berger, H. 1997. Red blood cell glutathione and plasma sulfhydryls in chronic lung disease of the newborn. *Acta Paediatrica*, 86: 1363-1369.

Molina, M. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva*, 2: 25-33.

Montalvo, E.; García, M.; Escalante, T.; Peña, J.; Vázquez, H. y Ortega, J. 2011. Caracterización bioquímica y niveles de lipoperoxidación en el preacondicionamiento hepático. *Cirugía y Cirujanos*, 79: 132-140.

Moorthy, B.; Nguyen, U.; Gupta, S.; Stewart, K.; Welty, S. y Smith, C. 1997. Induction and decline of hepatic cytochromes P4501A1 and 1A2 in rats exposed to hyperoxia are not paralleled by changes in glutathione S-Transferase-alpha. *Toxicology Letters*, 90: 67-75.

Nandhini, A.; Thirunavukkarasu, V. y Ravichandran, M. 2005. Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore Medical Journal*, 46(2): 82-87.

Osorio, M. y Rodríguez, T. 2014. Factores que intervienen en la regeneración hepática. *Correo Científico Médico de Holguín*, 18(4): 744-747.

Palma, M. 2008. Análisis de la función y estructura retiniana y estrés

oxidativo en ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia y tratadas con taurina. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Pastore, A.; Piemonte, F.; Locatelli, M.; Lo Russo, A.; Gaita, L.; Tozzi, G. y Federice, G. 2003. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clinical Chemistry*, 47(8): 1467-1469.

Patiño, J. 2006. *Metabolismo, nutrición y shock*. Cuarta edición. Editorial Medica Panamericana. Bogotá.

Ramírez, Y. 2009. Efecto de la taurina sobre la estructura de la corteza cerebelosa en ratas en desarrollo expuestas a hiperoxia. Trabajo de postgrado. Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Cumaná.

Repetto, M. y Repetto, G. 2009. *Toxicología Fundamental*. Cuarta edición. Díaz de Santos.

Rivero, M.; Santamaría, A. y Rodríguez-Palmero, M. 2005. La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles. *Nutrición Hospitalaria*, 20(2): 135-146.

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.; 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, L.; Suárez, S.; Benítez, K.; Boada-Sucre, A.; Ramírez, Y.; Romero, M. y Hernández, G. 2005. Ultraestructura de la retinopatía causada por la hiperoxia en ratas en desarrollo. *Revista de Investigación Clínica*, 57: 794-801.

Rojas, L.; Suárez, S.; Lemus, M.; Benítez, K.; Ramírez, Y.; Mitchell, M. y Boada-Sucre, A. 2004. Estrés oxidativo como posible causante de retinopatía en ratas en desarrollo sometidas a hiperoxia. *Interciencia*, 29: 556-561.

Romanque, P.; Uribe, M. y Videla, L. 2005. Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperfusión hepática y en el preacondicionamiento isquémico. *Revista Médica de Chile*, 133: 469-476.

Ros, E. y Pintó, X. 2003. Homocisteína, ácido fólico y enfermedad cardiovascular. Ediciones Mayo, S.A. Barcelona.

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

Saiz, L.; García, J. y Compaire, C. 1983. *Animales de laboratorio. (Reproducción, manejos y control sanitario)*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid.

Sánchez, C.; Rodeiro, I.; Garrido, G y Delgado, R. 2005. Hemo-oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24(4): 619-626.

Sánchez, R.; Peñaranda, D.; Rivera, M. y Mendivil, E. 2010. Cómo puede ser tóxico el oxígeno en período neonatal. *Programa de educación continua en Pediatría-sociedad colombiana de pediatría*, 9: 35-42.

Sandoval, M. 2002. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP27) en pulmón humano normal y tumoral. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

Schaffner, F. y Felig, P. 1965. Changes in hepatic structure in rats produced by breathing pure oxygen. *The Journal of Cell Biology*, 27: 505-517.

Schinoni, M. y Paraná, R. 2006. Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 36(4): 211-217.

Sedlak, J. y Lindsay, R. 1968. Estimation of total protein bound nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25: 192-205.

Sochor, J.; Nejdil, L.; Ruttkay-Nedeck, B.; Bezdekova, A.; Lukesova, K.; Zitka, O.; Cernei, N.; Mares, P.; Pohanka, M.; Adama, V.; Babula, P.; Beklova, M.; Zeman, L. y Kizek, R. 2014. Investigating the influence of taurine on thiol antioxidant status in Wistar rats with a multi-analytical approach. *Journal of applied biomedicina promueve*, 12: 97-110.

Sokal, F. y Rohlf, J. 1989. *Introducción a la bioestadística*. Editorial Reverté, S. A. Barcelona.

Suárez, A. 2012. Papel de la señalización de HGF-MET sobre la migración e invasión de células ovas. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Sung, J.; Costerton, J. y Shaffer, E. 1992. Defense system in the biliary tract against bacterial infection. *Digestive Diseases and Sciences*, 37: 689-696.

Torres, J.; Castronuovo, C.; Hidalgo, A.; Parada, L. y Lorenti, A. 2011. Aislamiento de células ovales de hígado fetal en condiciones fisiológicas a partir de su nicho natural. *Acta Gastroenterol Latinoam*, 41: 36-46.

Uguz, A.; Naziroglu, M.; Espino, J.; Bejarano, I.; González, D.; Rodríguez, A. y Pariente, J. 2009. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human in myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and 9 activities. *Journal of Membrane Biology*, 232: 15-23.

Urtasun, R. y Nieto, N. 2007. Células estrelladas hepáticas y estrés oxidativo. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 99(4): 223-230.

Vaquero, A.; Agudo, J.; Gil, J.; Diago, M.; San Norberto, E. y Vaquero, C. 2012. Estudio ultraestructural de los efectos de las drogas de adicción a nivel del hígado. Estudio experimental. *Revista Española de Investigaciones Quirúrgicas*, 15(4): 192-196.

Velásquez, P. 2014. Efecto del cadmio en la glicoproteína-p y ensayo de toxicidad mitocondrial en tejidos de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) Y *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920). Trabajo de postgrado. Postgrado de Biología Aplicada. Universidad de Oriente, Cumaná.

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.

Webb, C. y Twedt, D. 2008. Oxidative stress and liver disease. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 38: 125-135.

Wong, Y.; Smith, C.; McMicken, H.; Rogers, L. y Welty, S. 2001. Mitochondrial thiol status in the liver is altered by exposure to hyperoxia. *Toxicology Letters*, 123: 179-193.

Yan, H.; Ramachandran, A.; Bajt, L.; Lemasters, J. y Jaeschke, H. 2010. The oxygen tension modulates acetaminophen-induced mitochondrial oxidant stress and cell injury in cultured hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 117(2): 515-523.

Zirong, X. y Shijun, B. 2007. Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 89-94.

APÉNDICES

Apéndice 1. Análisis de varianza de la concentración de TSA 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
Entre grupos	4 506,66	02	2 253,33	15,19	0.0045
Intra grupos	890,07	06	148,34		
Total corregido	5 396,74	08			

Apéndice 2. Contraste múltiple de rango de la concentración de TSA 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
HIP	3	64,54	X
CON	3	111,32	X
HIP-TAU	3	112,66	X

Contraste	Diferencia
CON –HIP	*46,7833
CON – HIP-TAU	-1,3433
HIP–HIP-TAU	*-48,1267

*Indica una diferencia significativa

Apéndice 3. Análisis de varianza de la concentración de TSA 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
Entre grupos	680,03	02	340,01	1,90	0.2189
Intra grupos	1 251,15	07	178,74		
Total corregido	1 931,18	09			

Apéndice 4. Contraste múltiple de rango de la concentración de TSA 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
CON	4	70,962	X
HIP	3	71,790	X
HIP-TAU	3	89,297	X

Apéndice 4. Continuación.

Contraste	Diferencia
CON – HIP	-0,8275
CON – HIP-TAU	-18,3342
HIP – HIP-TAU	-17,5067

*Indica una diferencia significativa

Apéndice 5. Análisis de varianza de la concentración de proteínas totales 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
Entre grupos	133,912	02	66,9561	7,87	0,0088
Intra grupos	85,061	10	8,5061		
Total corregido	218,973	12			

Apéndice 6. Contraste múltiple de rango de la concentración de proteínas totales 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
CON	4	117,83	X
HIP-TAU	5	124,12	X
HIP	4	125,42	X

Contraste	Diferencia
CON – HIP	*-7,5766
CON – HIP-TAU	*-6,2799
HIP – HIP-TAU	1,2966

*Indica una diferencia significativa

Apéndice 7. Análisis de varianza de la concentración de proteínas totales 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
Entre grupos	42,081	02	21,0405	1,97	0,1903
Intra grupos	106,919	10	10,6919		
Total corregido	149,000	12			

Apéndice 8. Contraste múltiple de rango de la concentración de proteínas totales en el hígado de ratas del día P12, de los grupos control, hiperoxia e hiperoxia-aurina. F: frecuencia, M: media, Gh: grupos homogéneos.

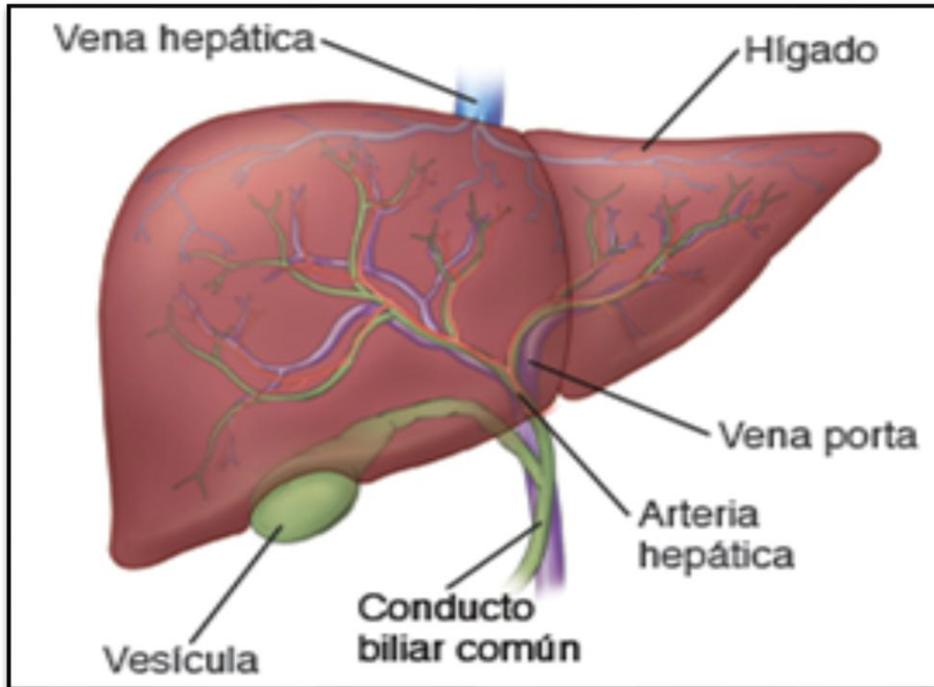
Método: 95,0 porcentaje Duncan

Grupo	F	M	Gh
HIP	4	111,07	X
CON	5	111,80	X
HIP-TAU	4	115,32	X

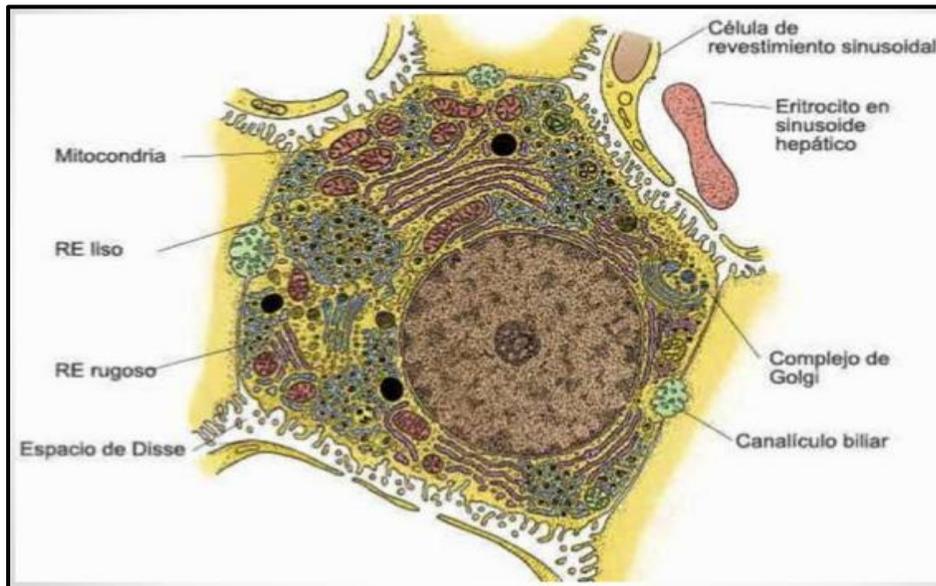
Contraste	Diferencia
CON – HIP	0,7275
CON – HIP-TAU	-3,5200
HIP – HIP-TAU	-4,2475

*Indica una diferencia significativa

ANEXOS



Anexo 1. Dibujo esquemático de las partes del hígado.



Anexo 2. Dibujo esquemático de la estructura de un hepatocito.



Anexo 3. Cambio de aserrín y limpieza de las jaulas.



Anexo 4. Diseño experimental. Incubadoras de los grupos de hiperoxia y normoxia.



Anexo 5. Oxímetro utilizado en el diseño experimental.



Anexo 6. Microscopio Electrónico de Transmisión marca Hitachi H-600, utilizado para observar cotes finos del tejido del hígado.



Anexo 7. Grupo de tesistas del laboratorio de retina del IIBCAUDO “Dra. Susan Tai”.

HOJAS DE METADATOS

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

Título	Análisis ultraestructural y bioquímico del contenido de proteínas y tioles en el hígado de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia y tratadas con taurina
---------------	---

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Br. Ibarreto A, Paola C.	CVLAC	21.380.912
	e-mail	ibarrotoandarcia@gmail.com

Palabras o frases claves:

hiperoxia, hígado, taurina, tioles solubles en ácido, proteínas totales, 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):

Se analizó la ultraestructura y la concentración de tioles solubles en ácido (TSA) y proteínas totales en el hígado de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia y tratadas con taurina. Para esto, cuatro grupos de ratas recién nacidas fueron colocadas en una incubadora y expuestas a $80 \pm 3\%$ de oxígeno desde el primer día de nacidas hasta los días postnatal P6 y P12. A dos grupos se les añadió taurina al 3% en el agua de beber (grupo hiperoxia-aurina) y a los dos grupos restantes solo se le dio agua filtrada de beber (grupo hiperoxia). En otra incubadora, pero en normoxia ($21\% O_2$), se ubicaron cuatro grupos similares identificados como grupos control y control-aurina. La concentración de TSA y proteínas totales se determinó a partir de métodos colorimétricos. Para el análisis histológico, las muestras fueron procesadas con técnicas de microscopia electrónica de transmisión. Bioquímicamente, en el día P6 el grupo hiperoxia mostró una disminución significativa de la concentración de TSA con respecto a los grupos control e hiperoxia-aurina, no obstante en P12 no se observó diferencia entre los grupos comparados. La concentración de proteínas totales en los grupos hiperoxia e hiperoxia-aurina aumentó con respecto al grupo control, sin embargo, en P12 todos los grupos presentaron concentraciones muy similares. En P12 las concentraciones tanto de TSA como de proteínas totales no mostraron diferencias significativas entre los grupos, posiblemente producto de una mayor madurez del animal o al desarrollo de otros mecanismos antioxidantes. Histológicamente, en el grupo hiperoxia se evidenciaron hepatocitos con alteración en las membranas mitocondriales, tumefacción del RER y la presencia de gran cantidad de gotas lipídicas en sus citoplasmas; así mismo, se apreciaron células Kupffer activadas en los sinusoides hepáticos. En el grupo hiperoxia-aurina, la ultraestructura del tejido hepático se observó mejor conservada, a pesar de la moderada cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos. En líneas generales, los resultados demuestran el papel antioxidante y citoprotector que ejerció la taurina en el tejido hepático de las ratas expuestas a hiperoxia.

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
Yoleida, Rodríguez	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.699.860
	e-mail	yoleidarl@hotmail.com
Yanet, Antón	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.439.227
	e-mail	yanton@udo.edu.ve

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2017	01	13
------	----	----

Lenguaje: Español

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-ibarretop.doc	Application/word

Alcance:

Espacial: Internacional

Temporal: Temporal

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

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

CU N° 0975

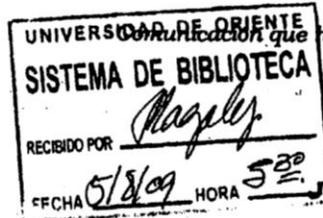
Cumaná, 04 AGO 2009

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.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNVELO
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

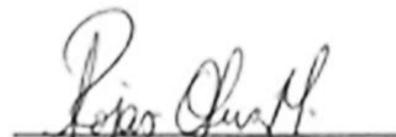
Apartado Correos 094 / Telfa: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

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”.



Licda. Paola Ibarreto
Autor



Dra. Luz Marina Rojas
Asesora