



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

EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Phyllanthus niruri* SOBRE NIVELES DE
GLUTATIÓN, METALOTIONEÍNAS Y PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO
RENAL DE RATAS DIABÉTICAS
(Modalidad: Tesis de Grado)

ALEXANDER JOSÉ ORTIZ BLANCO

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

CUMANÁ, 2012

EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Phyllanthus niruri* SOBRE NIVELES DE
GLUTATIÓN, METALOTIONEÍNAS Y PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO
RENAL DE RATAS DIABÉTICAS
(Modalidad: Tesis de Grado)

APROBADO POR

Dra. Mairin Lemus
Asesor

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Animales	7
Inducción de la diabetes.....	7
Determinación de los niveles de glucosa.....	7
Diseño experimental	8
Material vegetal	9
Preparación del extracto acuoso	9
Muestras biológicas	10
Extracción y cuantificación de metalotioneínas (MT).....	10
Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH).....	11
Determinación de los niveles de proteínas totales.....	11
Análisis estadístico	12
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA	26
APÉNDICES	1
HOJAS DE METADATOS.....	5

DEDICATORIA

Con todo el amor dedico esta tesis a Dios mi Eterno Padre y compañero de logros y desaciertos, de tristezas y alegrías, fuente de toda sabiduría y sobre todo de fortaleza, sin la cual no pudiese tener esta satisfacción por segunda vez.

Con gran cariño a mis padres, quienes vieron plasmados sus sueños en mí al poder lograr las metas propuestas y que se esforzaron al máximo para darme lo espiritual y lo material para así alcanzar su más grande anhelo. A ti papá que ya no estás físicamente quiero que sepas que lo logre otra vez viejo, no me detuvo nada, siempre seguí tus principios y para ti mamá que se que aunque no siempre junto a mi rogaste a nuestro Padre Celestial para que lograra esta meta, este triunfo es tuyo.

A mi esposa Niurvis compañera de logros y quien está conmigo en las buenas y malas y a mi hija Janell, que llegó como una bendición a mi vida llenándola de color y matices que nunca pensé poder vivir....mil gracias por estar conmigo.

A mis hermanos, para que les aclare que cuando se quiere se puede y que no hay obstáculos que no se puedan superar, que cuando hay ganas de superación no importa ser de condición humilde, vivir en el campo, y no poseer grandes recursos, lo más importante es tener fe en Dios y en nosotros mismos y eso basta para lograr grandes cosas en la vida.

Esta segunda carrera la anoto a una página más en mi vida, a todos les digo SI PUDE!!!!

AGRADECIMIENTO

A la Doctora Mairin Lemus quien con su apoyo, asesoramiento y paciencia hizo posible la realización de esta tesis.

A la Licenciada Ahieska Liscano por su colaboración y buena disposición, ayuda que fue indispensable para lograr el inicio, desarrollo y finalización de este trabajo.

A mis compañeras de proyecto: Azurima, Elimar y Mary Carmen, quienes brindaron su paciencia y comprensión durante la realización del trabajo de investigación.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Representación del diseño experimental de evaluación del efecto del extracto acuoso de <i>Phyllanthus niruri</i> , sobre el tejido renal de ratas con diabetes y controles durante dos meses en los tiempos 15, 45 y 60 días.....	8
--	---

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Concentración de glutatión reducido (nmol.mg proteínas⁻¹) en tejido renal de ratas con diabetes tratadas con extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. 15 días, KW 17,46, p<0,05; 45 días KW 7,34, p> 0,05; 60 días KW 13,36, p<0,05. Abreviaciones KW: análisis de Kruskall-Wallis, NA: normal con agua, NE: normal con extracto, DA: diabetes con agua, DE: diabetes con extracto, DI: diabetes con insulina..... 14
- Figura 2. Concentración de metalotioneínas (ng.mg proteínas⁻¹) en tejido renal de ratas con diabetes tratadas con extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. 15 días, KW 15,96, p<0,05; 45 días KW 3,74, p>0,05; 60 días KW 13,90, p< 0,05. Abreviaciones KW: análisis de Kruskall-Wallis, NA: normal con agua, NE: normal con extracto, DA: diabetes con agua, DE: diabetes con extracto, DI: diabetes con insulina..... 16
- Figura 3. Contenido de proteínas totales (mg proteínas.g⁻¹) en tejido renal de ratas con diabetes tratadas con extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. 15 días, KW 11,41, p<0,05; 45 días KW 9,18, p>0,05; 60 días KW 11,40, p<0,05. Abreviaciones KW: análisis de Kruskall-Wallis, NA: normal con agua, NE: normal con extracto, DA: diabetes con agua, DE: diabetes con extracto, DI: diabetes con insulina..... 18

RESUMEN

En la diabetes, una de las complicaciones más severas producto de la hiperglicemia y del desbalance del estado redox lo representa la nefropatía diabética. *Phyllanthus niruri*, o flor escondida, ha sido utilizada ampliamente en el tratamiento de la diabetes, así como de otras afecciones; por esto se planteó como objetivo evaluar los efectos del extracto acuoso de *P. niruri* sobre la defensa antioxidante en el tejido renal de ratas diabéticas. Se utilizó un total de 90 ratas machos de seis semanas de edad, de la especie *Rattus norvegicus* (cepa Sprague-Dawley) formándose 5 grupos experimentales: dos controles, uno con agua y otro con el extracto acuoso de la planta (200 mg.kg⁻¹ de peso corporal) y tres diabéticos, en los que a uno solo se le dio agua. Otro fue tratado con el extracto de la planta y el último, tratado con insulina como control hipoglicémico. El bioensayo duró dos meses, dividido en tres subperíodos (15, 45 y 60 días). La diabetes fue inducida con una dosis única de aloxan (100 mg.kg⁻¹ de peso corporal). Las concentraciones de metalotioneína (MT), glutatión reducido (GSH) y proteínas totales fueron determinadas por métodos espectrofotométricos. Los resultados demostraron diferencias significativas en los niveles de GSH (KW: 17,46, p<0,05; KW: 13,36, p<0,05) entre los grupos experimentales a los 15 y 60 días de exposición, respectivamente. Durante los primeros 15 días, los organismos diabéticos (diabéticos tratados con el extracto DE y diabéticos tratados con insulina DI, presentaron niveles estadísticamente superiores de GSH a los controles y diabéticos con agua. Al final del experimento, a los 60 días, todos los grupos presentaron niveles de GSH superiores al control. La MT también estuvo significativamente elevada en los organismos diabéticos a los 15 días, pero el suministro del extracto de la planta y la insulina normalizan las concentraciones a valores normales, condición que se mantiene hasta los 60 días, a excepción del normal con extracto (NE) y DI. La condición diabética causó alteraciones en los niveles proteicos a corto plazo, particularmente se vieron incrementadas en los grupos experimentales en relación al control. Al final del experimento, se pudo demostrar que la condición diabética cursa con concentraciones mayores de MT y GSH. A corto plazo, durante los primeros 15 días, se produce un desbalance de estas moléculas, que al final tienden a normalizarse. Los resultados obtenidos sugieren que el extracto acuoso de *P. niruri* tiende a normalizar los niveles de estos dos parámetros alterados durante la condición diabética, lo que representa una buena alternativa como tratamiento para las afecciones y complicaciones en el tejido renal que se desarrollan en la diabetes; sin embargo, en este estudio no se evaluaron otros efectos del extracto.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome endocrino metabólico donde se altera el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, bien por falta de secreción de insulina o disminución de la sensibilidad tisular a esta hormona. Existen dos grandes tipos de diabetes mellitus: la diabetes mellitus tipo 1 (DM1), también denominada diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), debida a una falta de secreción de insulina. La lesión de las células beta del páncreas, o las enfermedades que alteran la producción de insulina, pueden ocasionar una diabetes de tipo I. Las infecciones víricas y los trastornos autoinmunitarios pueden contribuir a destruir las células beta de muchos enfermos con DM1. La herencia, también, juega un papel primordial que establece la vulnerabilidad de estas células a su destrucción (Guyton y Hall, 2001).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2), también denominada diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), se produce por una sensibilidad muy mermada de los tejidos efectores a las acciones metabólicas de la insulina, estado conocido como resistencia a la insulina. Este síndrome, al igual que la DM1, se acompaña de numerosas alteraciones metabólicas, pero los cetoácidos no suelen elevarse. La DM2 es mucho más común que la de tipo 1, y supone del 80% al 90% de todos los casos de diabetes (Guyton y Hall, 2001).

En la diabetes, la glucosa no puede penetrar en las células del cuerpo y utilizarse eficazmente; la autooxidación de la misma conduce a la producción de alfacetoaldehidos desencadenando un desbalance entre la elaboración de especies reactivas de oxígeno (ROS), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y la capacidad de defensa antioxidante del cuerpo, también se plantea que el descontrol de la glicemia conduce al incremento de la velocidad de los procesos de glicosilación y oxidación de lípidos y proteínas de membrana, lo que provoca cambios conformacionales de estas macromoléculas y por lo tanto el deterioro de sus funciones; de igual manera se ha determinado la activación de la vía de los polioles, la vía de las hexosaminas, la

proteína quinasa c y la interacción de los productos finales de glicación avanzada (PFGA); relacionándose estos procesos con el estrés oxidativo (Clapés *et al.*, 2001, Hernández *et al.*, 2011) ocasionando, a su vez, degeneración de las paredes celulares y de los vasos sanguíneos, daños en la retina, deterioro renal, aterosclerosis, afecciones en el sistema nervioso central e incluso múltiples alteraciones reproductivas (Halliwell *et al.*, 1992; Gülçin *et al.*, 2002).

El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) y radicales libres (RL), que provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. Éste daño se relaciona con el envejecimiento y con más de 100 padecimientos. El daño celular que producen las ER y los RL ocurre en los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena (Ramos *et al.*, 2006). Las proteínas sufren el daño oxidativo por el ataque de radicales libres. La interacción de las ROS con las proteínas da lugar a una oxidación de los restos laterales de aminoácidos, lo cual puede traducirse en una pérdida o modificación de la función biológica que desempeñan (González, 2001).

Los RL contienen un electrón (e^-) no apareado, ésta característica los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas, lo que, a su vez, las convierte en moléculas muy reactivas, capaces de provocar una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde células hasta tejidos. Las ER incluyen a las de oxígeno (ROS), hierro (RIS), cobre (RCS), así como a las de nitrógeno (RNS). Éstas especies se forman como productos del metabolismo de los RL y, aunque no todas son de esta clase, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en RL, lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células (Ramos *et al.*, 2006).

Dentro de los principales ROS destacan el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$), el oxígeno singlete (1O_2) y el ácido hipocloroso ($OHCl$). Existen sistemas antioxidantes endógenos y exógenos, que limitan la actividad y la producción de los ROS y mantienen el sistema bajo control. Los sistemas antioxidantes endógenos más importantes son las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, entre otros. Como antioxidantes exógenos se pueden señalar: las vitaminas A, C y E y algunos metales como el cobre y el selenio, este último al actuar como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa (Rodríguez *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1996).

Una de las complicaciones más graves de la DM es la nefropatía diabética (ND). Ésta afección se caracteriza por las anomalías en la dinámica sanguínea que se lleva a cabo en los glomérulos del riñón. Todas las células que conforman la estructura renal tanto a nivel vascular como a nivel glomerular o tubular, son capaces de producir y liberar ROS ante determinados estímulos del tipo de fármacos, hipertensión arterial aguda, radiación o presión de oxígeno elevada, condición que puede provocar un desequilibrio entre las ROS y los sistemas antioxidantes, lo cual se traduce en alteraciones funcionales y estructurales a cualquier nivel (González, 2001).

El glutatión (GSH) es un tripéptido (glutamina-cisteína-glicina), ubicuo en los sistemas celulares, que contiene una única cisteína que sufre oxidación y reducción en respuesta a oxidantes o reductores del entorno. Está presente en concentración del rango milimol por litro en todas las células con crecimiento aeróbico y con ello, es el antioxidante basado en tioles más abundante, por tanto, juega un papel importante en mantener el estado redox celular (Seis, 1999).

La síntesis de GSH ocurre en dos etapas y depende de la disponibilidad de sustratos y de los mecanismos regulatorios (a nivel de la enzima gamma-glutamil cisteinil sintetasa), éste se encuentra dentro de las células, principalmente en las mitocondrias, retículo endoplásmico y núcleo y es aquí, donde se observa un aumento de

su concentración en la apoptosis o muerte celular programada. Además, las concentraciones de GSH pueden verse afectadas por el incremento del estrés oxidativo, así como por la edad, y el organismo tiende a compensarlo con el incremento de la síntesis enzimática, pero aún así no es capaz de barrer la totalidad de ROS producidas (Meister, 1995; Raguso *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 1999).

Además de los sistemas antioxidantes de origen endógeno, se ha descrito una serie de proteínas a las cuales se les ha atribuido tal propiedad, dentro de las cuales se encuentran las metalotioneínas (MT); éstas se hallan en todos los organismos vivos, constituyen una superfamilia de proteínas intracelulares capaces de unir metales de transición y metales pesados, son proteínas de baja masa molar, menores a $7\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ y compuestas por 61 a 68 aminoácidos (Scott, 2007).

Se ha planteado que las MT pueden tener un papel importante en los procesos de detoxificación de metales pesados, regulación del metabolismo del zinc (Zn) y el cobre (Cu), estabilización de membranas celulares, activación de apoenzimas, captura y eliminación de radicales libres, así como en la modulación de la expresión de algunos genes. Las MT han mostrado *in vitro* ser sumamente eficientes en la captura e inactivación de radicales hidroxilo (Brambila *et al.*, 1999).

Son escasos los trabajos científicos que han asociado a las MT en pacientes diabéticos, sin embargo, debido a su activa participación como barredor de RL y considerando que el estrés oxidativo es uno de los principales causantes de las alteraciones y daños tisulares ocurridos en los pacientes hiperglicémicos, las MT deben jugar un papel clave en ésta patología, tal como lo han planteado Xiaokun *et al.* (2007).

Las plantas medicinales se han convertido en una alternativa válida para mejorar la calidad de vida de quienes padecen de diabetes, resultando de particular interés aquellas que exhiben tanto propiedades hipoglicemiantes como antioxidantes. *P. niruri* pertenece a la familia Euphorbiaceae y es ampliamente usada en la medicina tradicional

como diurético para lograr la expulsión de cálculos renales o biliares, molestias de la vejiga, retención urinaria, diabetes, afecciones del hígado, entre otras. Es conocida comúnmente como flor escondida, riñoncillo, quebrapedra, erva-pombinha, bahupatra, bhuiamla, bhuy amalaki, niruri y *stone breaker* (Melillo, 1999).

Hasta ahora, se ha llevado a cabo una serie de investigaciones con el objetivo de determinar y verificar la acción antioxidante e hipoglicemiante de esta planta en busca de un tratamiento alternativo para los enfermos de diabetes. Estudiando el papel protector de *P. niruri* y el estrés oxidativo en los hepatocitos de ratas diabéticas, se determinó una disminución significativa de las actividades de antioxidantes enzimáticos, tales como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) del hígado de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ) en comparación con las ratas normales. Así mismo, se concluyó que *P. niruri* exhibe actividades hipoglicémicas fuertes, demostrándose así que el extracto acuoso de *P. niruri* tiene actividad antioxidante, reduciendo el estrés oxidativo y enfermedades relacionadas con RL, incluyendo la diabetes (Nwanjo *et al.*, 2007).

De igual manera se ha demostrado que, el extracto de *P. niruri* en una dosis de 100 mg.kg⁻¹ del peso corporal es más eficaz para suprimir el daño oxidativo que el extracto de *P. niruri* en una dosis de 50 mg. kg⁻¹ y que la acción hepatoprotectora de *P. niruri* contra daño inducido por nimesulide en el hígado de ratones albinos suizos, pudiera ser debido a las características antioxidantes de los componentes activos presentes en el extracto acuoso de la hierba. Es probable que el ingrediente activo sea eficaz en una concentración muy baja y puede ser una herramienta terapéutica atractiva en el futuro (Chatterjee y Sil, 2006, 2007).

Numerosos grupos de investigación demuestran, de forma contundente, el valor de las plantas del género *Phyllanthus* en el control de 3 patógenos que representan actualmente graves problemas de salud a nivel mundial: el virus de la hepatitis B, los virus del herpes simple y los virus de inmunodeficiencia humana. Los extractos de

especies de *Phyllanthus* han demostrado ser verdaderos «cocteles naturales», pues, contienen múltiples principios activos que inhiben diferentes moléculas virales en diferentes momentos del ciclo replicativo, lo que hace prácticamente imposible el desarrollo de resistencia a los antirretrovirales sintéticos. Así mismo, se ha planteado que queda mucho por hacer y deben realizarse estudios más detallados en lo concerniente a la estabilidad de los productos, la formulación, determinación de las mejores vías de presentación, la biodisponibilidad y la farmacocinética *in vivo*. Sin embargo, ya se comienza a considerar la medicina natural y tradicional, no como la alternativa más barata y únicamente asequible a los pobres, sino como una verdadera promesa en la manera de abordar el tratamiento de las enfermedades (Álvarez y Del Barrio, 2008).

Si bien se han realizado numerosos estudios sobre la diabetes en Venezuela, son pocos los relacionados con la planta *P. niruri* y su efecto antioxidante e hipoglicemiante, razón por la cual se hace relevante la realización de este trabajo que evaluará el efecto del extracto acuoso de *P. niruri* sobre los niveles de glutatión, metalotioneínas y proteínas totales en tejido de riñón de ratas diabéticas.

METODOLOGÍA

Animales

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizaron 90 ratas machos de seis semanas de edad de la especie *Rattus norvegicus* (cepa Sprague–Dawley), las cuales fueron proporcionadas por el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Éstas se mantuvieron por una semana en condiciones de laboratorio, para que se adaptaran al entorno.

Inducción de la diabetes

Después del período de aclimatación y con siete semanas de edad, se les administró a 54 animales, mediante inyección intraperitoneal, una dosis de aloxan de 100 mg.kg^{-1} de peso corporal (60 mg.ml^{-1} en buffer citrato-fosfato $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 4,5), para inducir la diabetes. El aloxan es un componente tóxico selectivo de las células beta pancreáticas que las destruye, induciendo un estado diabético insulino dependiente (Miranda *et al.*, 2004; Elsner *et al.*, 2006). De acuerdo a Öztürk *et al.* (1996) la dosis utilizada en esta investigación los animales desarrollan la mayoría de las complicaciones asociadas a la diabetes como son las cardiomiopatías, las neuropatías, las disfunciones arteriales coronarias, las alteraciones hepáticas y renales, entre otras.

Determinación de los niveles de glucosa

Las ratas controles también se inyectaron con la misma cantidad de la solución buffer. La verificación de la enfermedad se hizo mediante la observación de los síntomas característicos como lo son: poliuria, polidipsia y polifagia, y por la medición de los niveles de glucosa en sangre a las 48 h después de la inducción, usando un glucómetro Prestige IQ; la muestra sanguínea se obtuvo por una punción en la cola utilizando

lancetas. Se consideraron diabéticas las ratas cuyos niveles de glicemia eran iguales o superiores a 200 mg.dl⁻¹ (Murillo *et al.*, 2006).

Diseño experimental

La distribución de las ratas para la experimentación se hizo de la siguiente manera: se formaron 5 grupos, cada uno conformado por 6 ratas, identificados como: control normal agua (NA), control normal extracto (NE), diabéticas agua (DA diabéticas extracto (DE) y diabéticas insulina (DI) (Tabla 1). Cada día se verificó el consumo de alimento y líquido, por un periodo de dos meses, cuyo tiempo estuvo dividido en subperiodos de 15, 45 y 60 días, para garantizar que los cambios metabólicos en los organismos estudiados fuesen significativos en cuanto a daños citopáticos y bioquímicos en el tejido renal. El control del efecto hipoglicemiante del extracto se estudió en un grupo experimental diabético, el cual fue tratado con insulina Humulin^R (60/30), de acción prolongada, y se aplicó interdiariamente, en dosis de 2 unidades/kg de peso corporal de las ratas. Confirmada la hiperglicemia, se procedió a la administración del extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*, colocando los animales en jaulas de acero inoxidable, con acceso libre a una dieta, que consistió en ratarina y agua en todo momento. Las ratas se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, a 25 ± 2°C, y condiciones normales de iluminación (12 horas de luz/12 horas de oscuridad) (Singh *et al.*, 2007).

Tabla 1. Representación del diseño experimental de evaluación del efecto del extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*, sobre el tejido renal de ratas con diabetes y controles durante dos meses en los tiempos 15, 45 y 60 días.

Subperíodos	Condiciones Experimentales				
	Controles		Diabéticas		
	Agua	Extracto Acuoso	Agua	Extracto Acuoso	Insulina
	n	n	n	n	n
15 Días	6	6	6	6	6
45 Días	6	6	6	6	6
60 Días	6	6	6	6	6

n= número de organismos

El extracto acuoso de *P. niruri* se suministró a una dosis de 200 mg.kg⁻¹ de peso corporal, diluidos en el agua de consumo diario, durante un período de 60 días; el empleo de esta dosis, según algunos investigadores, presenta gran actividad hipoglicemiante (Hnatyszyn *et al.*, 2002; Mazunder *et al.*, 2005).

Material vegetal

La recolección de las plantas de la especie *P. niruri* perteneciente a la familia Euphorbiaceae, para la elaboración del extracto acuoso, se llevó a cabo en el periodo comprendido desde febrero hasta abril de 2007, en los alrededores de la ciudad de Cumaná. Además, se tomaron en cuenta épocas vegetativas y reproductivas diferentes, con el objeto de evitar variaciones estacionales, fenológicas y ecológicas, controlando que no tuviesen la presencia de agentes infectantes como bacterias, hongos, insectos o parásitos. La correcta identificación taxonómica de las plantas recolectadas se realizó por comparación directa con ejemplares almacenados en el Herbario “Isidro Ramón Bermúdez Romero” (HIRBR), Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

Con el fin de evitar que se presentaran cambios químicos en la planta, el material vegetal recolectado se desecó al aire libre, pero a la sombra. Seguidamente, se trasladó a un lugar igualmente sombreado y bien ventilado, evitando la superposición. Se removió constantemente, para no permitir fermentaciones enzimáticas que alteraran la química de los ejemplares a estudiar y luego con la ayuda de un molino eléctrico, se procedió a pulverizar las muestras de plantas para obtener el extracto crudo.

Preparación del extracto acuoso

Realizada la pulverización de las plantas desecadas, se pesaron 50 g de este material y se agregaron en un litro de agua hirviendo dejándolo reposar por 20 min a temperatura ambiente para permitir una buena extracción. Posteriormente, se filtró el extracto usando papel Whatman N°1 (Hnatyszyn *et al.*, 2002).

Para efectos de obtener la concentración final del extracto acuoso de la planta, se tomó 1 ml de la muestra y se evaporó completamente en una coccinilla y se pesó el residuo sólido. El extracto se congeló hasta el momento de su uso (Nwanjo *et al.*, 2007).

Muestras biológicas

Tras el sacrificio de las ratas por sobredosis de éter dietílico, se disectaron los animales con un bisturí, para extraer los riñones, los cuales fueron usados para la determinación de las biomoléculas GSH, las MT y el contenido de proteínas totales (Beutler *et al.*, 1963; Bradford, 1976; Viarengo *et al.*, 1997; Hnatyszyn, *et al.* 2002; Mazunder, *et al.* 2005). Todas las muestras se tomaron para el tiempo indicado en el diseño experimental.

Extracción y cuantificación de metalotioneínas (MT)

Para evaluar el contenido de metalotioneínas, se empleó el método propuesto por Viarengo *et al.* (1997). Se disectó en frío 1 g del tejido renal y se homogenizó en frío con 3 ml de buffer tris-HCl 20 mmol.l⁻¹ y 0,5 mol.kg⁻¹ de sacarosa (pH 8,6), que contenía 0,006 mol.kg⁻¹ de leupeptina, 0,5 mmol.l⁻¹ PMSF (fenil-metil-sulfoxido) y β-mercaptoetanol (0,01%). El homogenizado se centrifugó a 3 000 g durante 20 minutos a 4°C, en una centrífuga refrigerada, y al sobrenadante resultante se le agregó 1,05 ml de etanol frío (-20°C) y 80 µl de cloroformo, luego fue centrifugado a 6 000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante colectado se combinó con 1 mg de ARN y 40 µl de HCl al 37% y 3 volúmenes de etanol frío (87%) y fue mantenido a -20°C por una hora; luego se centrifugó a 6 000 g por 10 minutos y secado bajo una atmósfera de nitrógeno.

El pellet obtenido fue resuspendido en 150 µl de NaCl 0,25 mol.kg⁻¹ y 150 µl de una mezcla de HCl 1 mol.kg⁻¹ y 4 mmol.l⁻¹ de ácido etilendiamino-tetracetato (EDTA). Seguidamente, se le agregaron 4,2 ml de NaCl 2 mol.kg⁻¹ que contenía 0,43 mmol l⁻¹ de

5,5'- dithiobis 2-ácido nitrobenzoico (DTNB) buferizado con Na-fosfato 0,2 mol.kg⁻¹, pH 8. Finalmente, la muestra se centrifugó a 3 000 g por 5 minutos, se leyó la absorbancia del sobrenadante a 412 nm y la concentración de MT se estimó utilizando una curva de calibración para GSH. Estableciendo la siguiente relación equimolar (asumiendo que la tionina enlazadora de Cd, Zn de hígado de conejo tienen un contenido de cisteína de 18 Cys.mol⁻¹ MT). 1 µl SH = 1 µl GSH = 0,055 µl MT (Ellman, 1959).

Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH)

La determinación de la concentración de GSH se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de Beutler, para la cual se prepararon 2 soluciones: una precipitante que estuvo formada por 1,67 g de ácido metafosfórico glacial (mezcla de PO₃²⁻ y Na₂PO₃); 0,2 g de EDTA y 30 g de NaCl en 100 ml de agua destilada) y el reactivo DTNB al 0,4% en buffer fosfato, pH 7,5. Se mezclaron 0,2 ml de homogenizado de tejido renal con 1,8 ml de agua destilada; se adicionaron 3 ml de solución precipitante, se dejó en reposo por un tiempo de 5 minutos y se filtró. Posteriormente, a 2 ml del filtrado se le añadieron 8 ml de buffer fosfato y 1 ml del reactivo DTNB, y se midieron inmediatamente en el espectrofotómetro. Se preparó un blanco de reactivo con 8 ml de buffer fosfato, 2 ml de la solución precipitante diluida (2 a 3 partes de agua destilada) y 1 ml del reactivo DTNB. La densidad óptica fue medida a 412 nm en un espectrofotómetro. La estandarización del método se realizó con GSH, Sigma (Beutler *et al.*, 1963).

Determinación de los niveles de proteínas totales

Para realizar este procedimiento, se aplicó la técnica de Bradford, la cual consistió en el siguiente procedimiento: 30 µl de homogenizado de tejido renal se mezclaron con 1 ml de reactivo de Bradford, se dejó reposar por 10 minutos e inmediatamente se midieron las concentraciones de proteínas totales en un espectrofotómetro a 595 nm. La estandarización del método se llevó a cabo mediante un factor de calibración empleando un estándar de albumina suero bovino (BSA) 30 mg dl⁻¹ (Bradford, 1976).

Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico, de los resultados arrojados por ésta investigación, se empleó el método de Kruskal Wallis, con un nivel de confianza del 95% para demostrar las diferencias significativas entre las medianas de acuerdo a las condiciones experimentales, y una prueba *a posteriori* de rangos múltiples para determinar el comportamiento y diferencias entre las condiciones experimentales, mediante la comparación múltiple de medias. Los datos fueron expresados por medio de gráficos en cajas y bigotes, utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.0.

RESULTADOS

En los primeros 15 días del bioensayo, se observó que en la concentración de glutatión reducido (GSH) del tejido renal, existen diferencias significativas (KW 17,46; $p < 0,05$), formándose tres grupos; habiendo diferencias entre el grupo control (NA) ($1,35 \pm 0,12$ nmol de GSH.mg proteínas⁻¹) y los diabéticos tratados con el extracto e insulina (DE $2,33 \pm 0,66$ y DI $2,55 \pm 0,86$ nmol de GSH.mg proteínas⁻¹), presentando estos últimos la mayor concentración de GSH. A los 45 días del ensayo no se encontraron diferencias significativas entre las condiciones experimentales (KW 7,34; $p > 0,05$), con una concentración promedio de $1,65 \pm 0,29$ nmol de GSH.mg proteínas⁻¹. Al final del experimento se encontraron diferencias estadísticamente significativas, estableciéndose entre el grupo NA ($1,26 \pm 0,10$ nmol de GSH.mg proteínas⁻¹) con el resto de las condiciones experimentales; entre los grupos diabéticos no tratados (DA: $1,83 \pm 0,34$ nmol de GSH.mg proteínas⁻¹) y tratados con el extracto y la insulina (DE: $1,77 \pm 0,09$ y DI: $1,78 \pm 0,45$ nmol de GSH.mg proteínas⁻¹) y entre la condición experimental normal con extracto (NE $2,61 \pm 0,24$ nmol de GSH.mg proteínas⁻¹) con el resto de los grupos (figura 1 y apéndice 1).

En la figura 2 y apéndice 2, que muestra la concentración de metalotioneína (MT), se puede observar que al inicio del experimento se encontraron diferencias estadísticamente significativas (15 días. KW 1,96; $p < 0,05$) entre las medianas de los grupos experimentales. Se formaron tres grupos existiendo diferencias entre el grupo control y los diabéticos tratados, tanto con el extracto de la planta, como con insulina presentando las menores concentraciones de MT (NA: $1,27 \pm 0,39$; DE: $1,33 \pm 0,41$ y DI: $1,05 \pm 0,14$ ng de MT.mg proteínas⁻¹, respectivamente), entre los organismos diabéticos sin tratamiento ($1,94 \pm 0,37$ ng de MT.mg proteínas⁻¹) y el resto de las condiciones experimentales, y por último, diferencias entre el NE ($2,62 \pm 0,17$ ng MT.mg proteínas⁻¹) y el resto de los grupos.

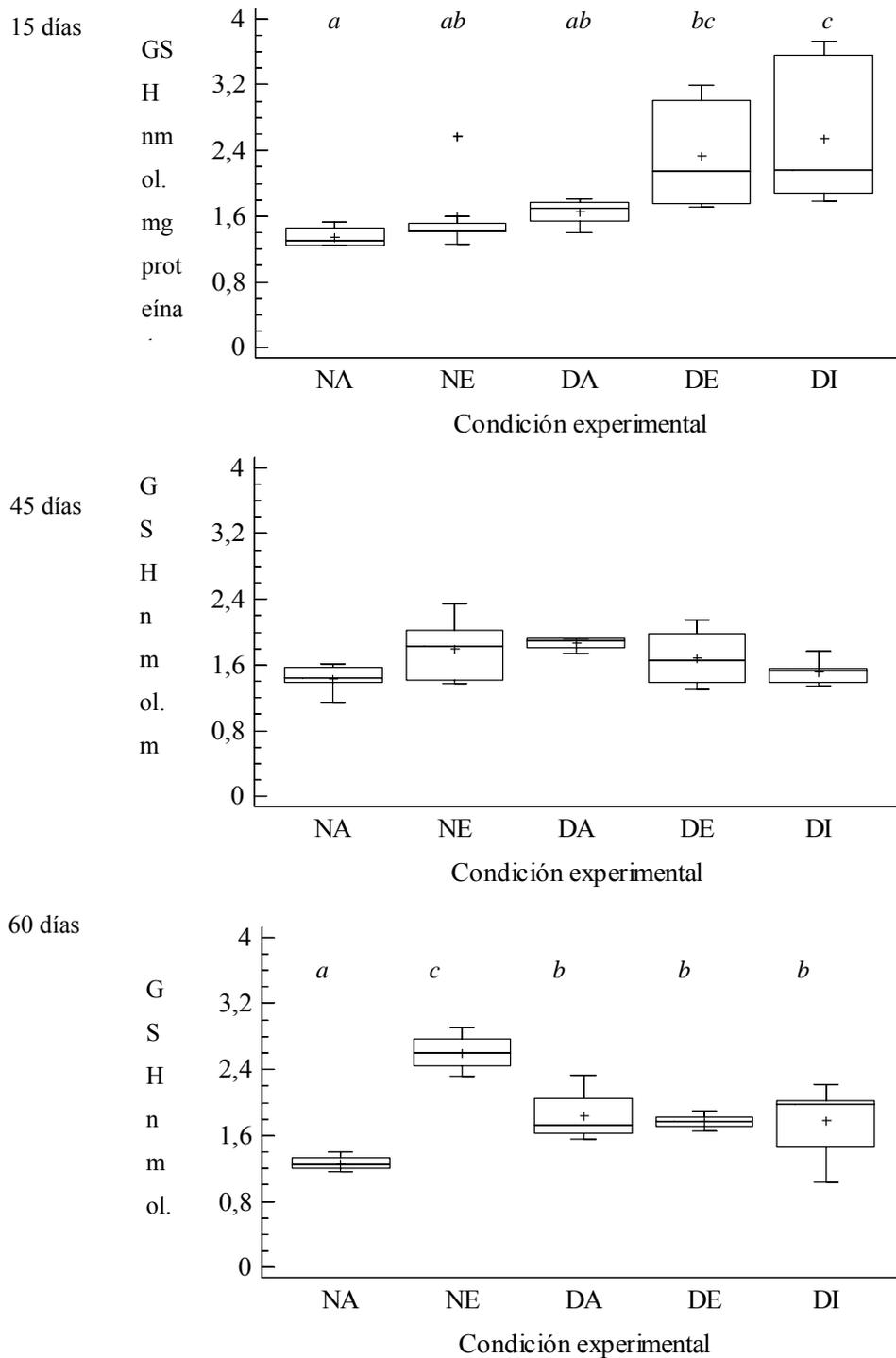


Figura 1. Concentración de glutatión reducido (nmol.mg proteínas⁻¹) en tejido renal de ratas con diabetes tratadas con extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. 15 días, KW 17,46, p<0,05; 45 días KW 7,34, p> 0,05; 60 días KW 13,36, p<0,05. Abreviaciones KW: análisis de Kruskal-

Wallis, NA: normal con agua, NE: normal con extracto, DA: diabetes con agua, DE: diabetes con extracto, DI: diabetes con insulina.

A los 45 días del ensayo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, manteniendo concentraciones promedio similares. Sin embargo, al final del experimento (60 días) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, formándose cuatro grupos. El grupo normal (NA: $1,56 \pm 0,38$ ng de MT.mg proteínas⁻¹) presentó diferencias con los grupos normales tratados con el extracto, los diabéticos sin tratamiento y con los tratados con insulina (NE: $2,67 \pm 0,38$; DA: $2,42 \pm 0,44$ y DI: $3,11 \pm 0,53$ ng de MT.mg proteínas⁻¹, respectivamente), encontrándose estos últimos con las concentraciones más elevadas de MT; finalmente, el grupo diabético tratado con el extracto de la planta (DE: $1,95 \pm 0,59$ ng de MT.mg proteínas⁻¹) presenta diferencias estadísticamente significativas con los grupos normales tratados con el extracto y el diabético tratado con insulina.

En relación al contenido de proteínas totales del tejido renal se puede observar que sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas a los 15 y 60 días de ensayo (KW 11,41; $p < 0,05$ y KW 11,40; $p < 0,05$, respectivamente) (figura 3 apéndice 3), formándose en ambos, dos grupos producto de la prueba *a posteriori*. A los 15 días las diferencias se encontraron entre el grupo control (NA: $86,43 \pm 0,93$ mg proteínas.g⁻¹) y el resto de las condiciones experimentales (NE: $90,65 \pm 4,53$; DA: $91,88 \pm 1,51$; DE: $90,52 \pm 1,52$ y DI: $90,63 \pm 1,71$ mg proteínas.g⁻¹); a los 60 días se encontraron diferencias significativas entre los grupos normal y diabético tratados con el extracto acuoso de la planta (NE: $87,73 \pm 5,92$; DE: $83,71 \pm 2,29$ mg proteínas.g⁻¹) y el resto de los grupos experimentales (NA: $81,13 \pm 0,93$; DA: $79,75 \pm 1,53$; y DI: $82,55 \pm 5,16$ mg proteínas.g⁻¹), teniendo estos últimos el menor contenido de proteínas; sin embargo, a los 45 días del experimento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (KW 9,18; $p > 0,05$), manteniendo un contenido de proteínas totales promedio en $85,74 \pm 5,21$ mg proteínas.g⁻¹.

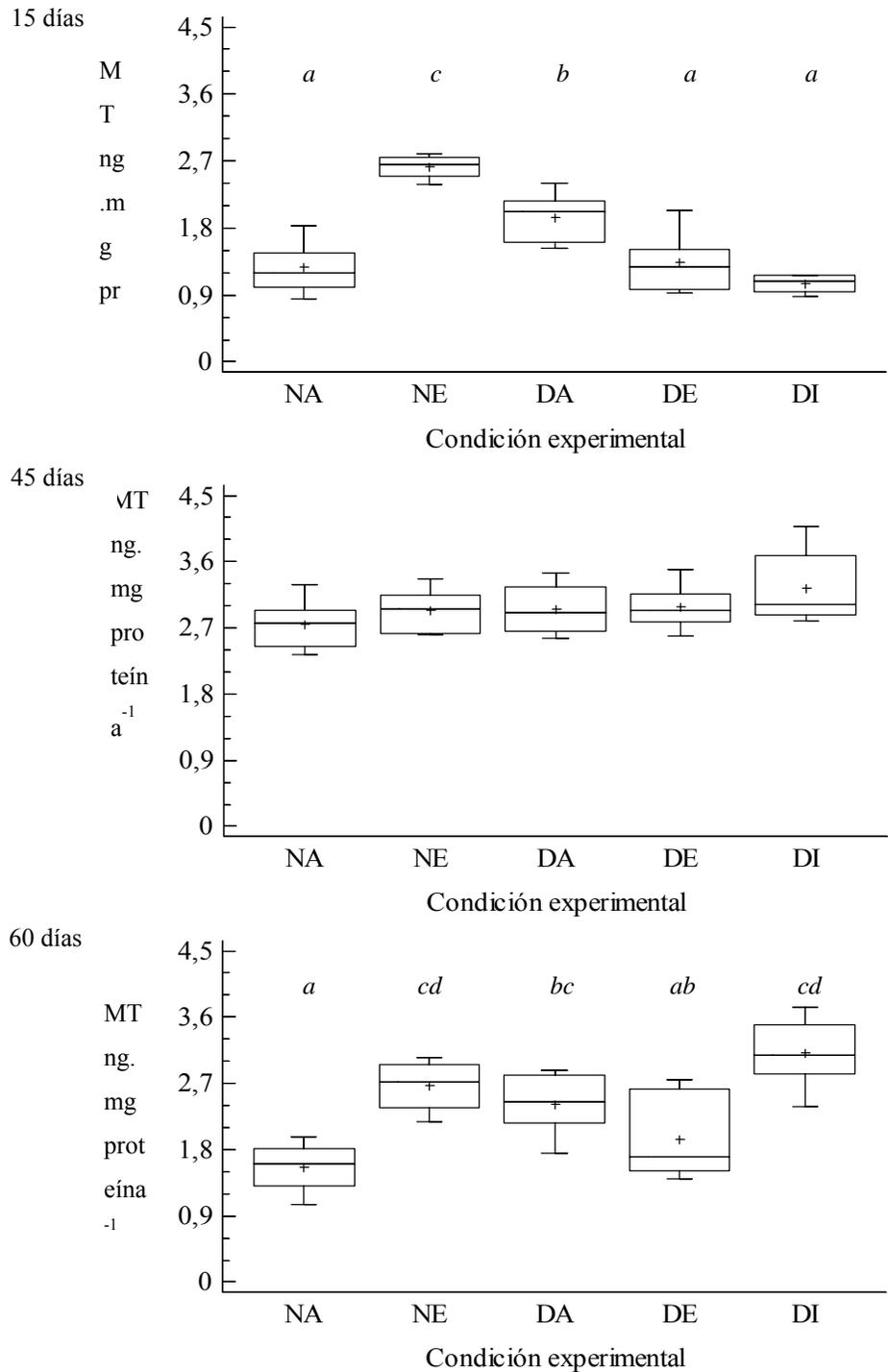


Figura 2. Concentración de metalotioneínas (ng.mg proteínas⁻¹) en tejido renal de ratas con diabetes tratadas con extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. 15 días, KW 15,96, p<0,05; 45 días KW 3,74, p>0,05; 60 días KW 13,90, p< 0,05. Abreviaciones KW: análisis de Kruskal-Wallis,

NA: normal con agua, NE: normal con extracto, DA: diabetes con agua, DE: diabetes con extracto, DI:
diabetes con insulina.

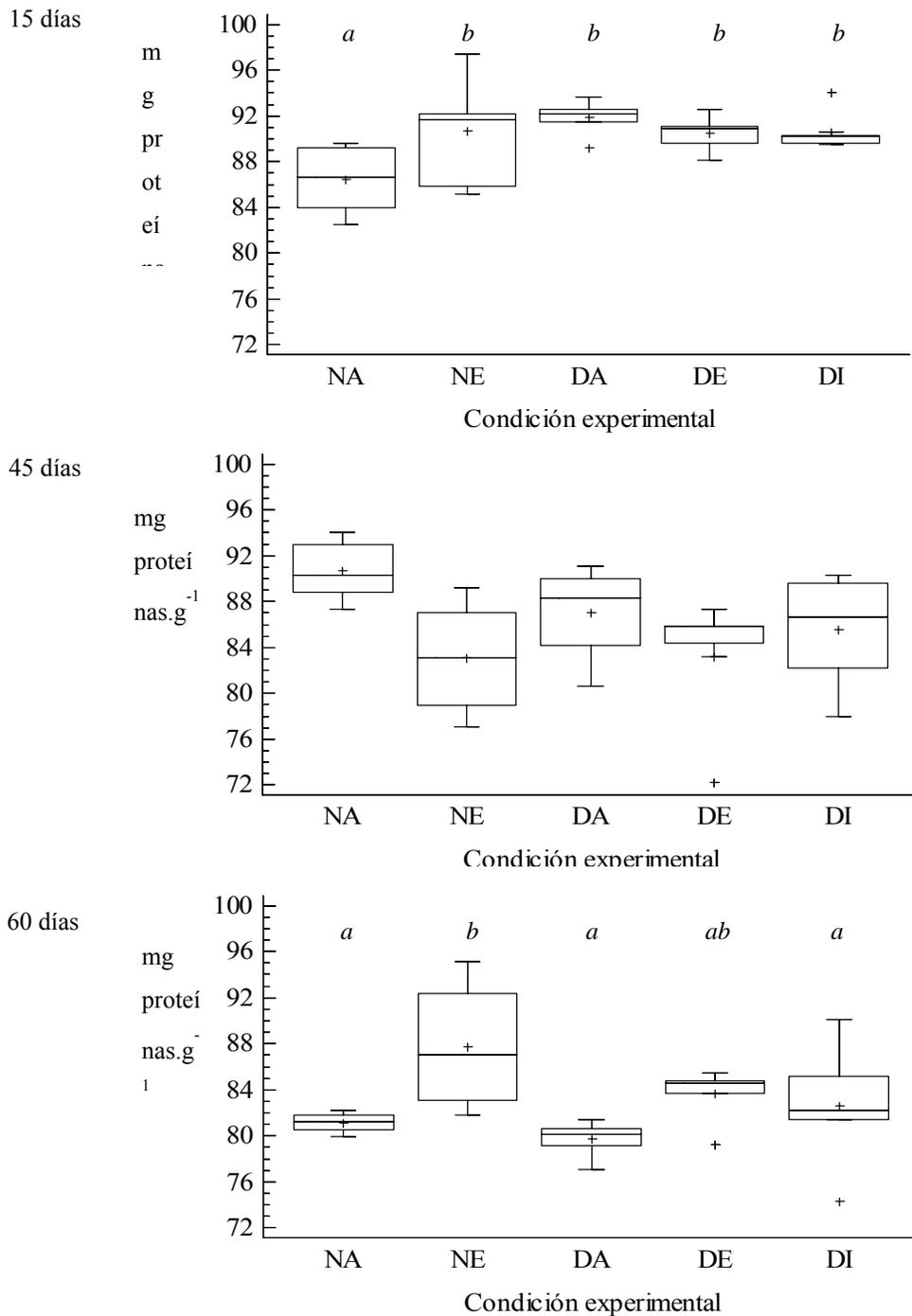


Figura 3. Contenido de proteínas totales (mg proteínas.g⁻¹) en tejido renal de ratas con diabetes tratadas con extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. 15 días, KW 11,41, p<0,05; 45 días KW 9,18, p>0,05; 60 días KW 11,40, p<0,05. Abreviaciones KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal con agua, NE: normal con extracto, DA: diabetes con agua, DE: diabetes con extracto, DI: diabetes con insulina.

DISCUSIÓN

Las complicaciones de la diabetes mellitus, indistintamente del tipo que se padezca, traen como consecuencia una serie de patologías micro y macrovasculares en la que muchos investigadores han podido demostrar, tanto en pacientes diabéticos, como en animales experimentales que éstas son consecuencia de la hiperglicemia, de la perturbación humoral que integran la progresión natural de la diabetes, y el colapso de los mecanismos de defensa antioxidante por el desmesurado incremento del estrés oxidativo (Rocca y Plá, 1963; Rodríguez y Massera, 1963; Miranda *et al.*, 2004; Rosado-Pérez y Mendoza-Núñez, 2007; Dabla, 2010). Sin embargo, hay que enfatizar el papel fundamental que estos sistemas antioxidantes cumplen durante las primeras etapas de la enfermedad preservando el funcionamiento y composición de los órganos vitales del individuo (Song *et al.*, 2005; Rondón, 2010). De allí, la búsqueda de las propiedades hipoglicémicas y antioxidantes a partir de extracto de plantas del género *Phyllanthus* (Hnatyszyn *et al.*, 2002; Mazunder *et al.*, 2005; Harish y Shivanandappa, 2006; Nwanjo *et al.*, 2007; James *et al.*, 2009; Sarkar *et al.*, 2009).

En el presente trabajo, se puso en evidencia una vez más el papel fundamental de los mecanismos antioxidantes de los organismos, como lo demuestran las diferencias significativas de las concentraciones de GSH y MT entre los organismos diabéticos y los controles, manteniéndose los grupos NA y NE en menores concentraciones; observándose claramente un incremento de las concentraciones de éstos parámetros en el tiempo, como mecanismo compensatorio al incremento de la glicemia y el estrés oxidativo propio de la condición diabética inducida por aloxan. Además, en este mismo estudio no se observaron diferencias significativas entre grupos al final del ensayo en cuanto al contenido de proteínas totales dejando en claro que las alteraciones por glicosilación de proteínas están siendo reparadas eficientemente y no se están comprometiendo las proteínas tisulares del riñón en la patología diabética, que en otros

tejidos se ha demostrado alteraciones proteicas asociadas a la enfermedad (Liscano, 2008; Bueno, 2009; Rondón, 2010).

Las mayores variaciones de GSH ocurren a los 15 y 60 días de la condición diabética. En el primer caso, los organismos diabéticos presentan concentraciones de GSH significativamente superiores a los controles y se incrementan aun más cuando éstos organismos son tratados con el extracto de *P. niruri* y la insulina, posiblemente asociado a una estimulación en la síntesis de este tripéptido relacionado a mecanismos de adaptación para lograr llegar a valores similares al control a los 45 días; no obstante ligeramente superiores. Estos valores se incrementan para las tres condiciones diabéticas por encima del control a los 60 días, señalando su participación en las alteraciones oxidativas causadas por la patología (Bueno, 2009).

Conociendo que el GSH mantiene el balance redox en la célula y participa en múltiples funciones en el organismo, tales como: protección ante el estrés oxidativo, nitrosativo y de los reactivos electrofílicos, actúa como coenzima, participa en procesos de detoxificación, controla la permeabilidad de membrana y el transporte de aminoácidos, interviene en el proceso de síntesis de proteínas, ADN y ARN, así como regula la formación y el mantenimiento de la forma activa de las enzimas, todas estas propiedades caracterizan al GSH como el principal agente antioxidante (Keys y Zimmerman, 1999; Seis, 1999 (citados por Rojas *et al.*, 2004); Mazunder *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006). Esta molécula está sujeta a un constante recambio en el organismo y es el riñón uno de los principales órganos encargados de su homeostasis, así como el tercero con mayor concentración después del cristalino y el hígado; por tanto, la captación de cada órgano o tejido va a depender de la actividad de la enzima gamma glutamil transpeptidasa (GGT) (Deneke y Fanburg, 1989; Martínez *et al.*, 2006).

Los altos contenidos de GSH en el riñón, cumplieron su función protectora en los organismos diabéticos tratados y no tratados por el extracto acuoso de *P. niruri* durante este ensayo ya que incrementó significativamente su concentración estableciendo su función barredora de radicales libres, concordando estos resultados con los obtenidos

por Bueno (2009), que al determinar el potencial antioxidante en el tejido renal de ratas diabéticas tratadas y no tratadas con extracto acuoso de *P. niruri*, observó que éstos no disminuyeron a 60 días de ensayo y con los de Ueno *et al.* (2002) quienes trataron ratas diabéticas con GSH, preservando así las funciones renales y neuronales. Sin embargo, otros estudios han reportado la disminución de las concentraciones de GSH y del potencial antioxidante en tejidos como corazón, hígado, riñón, retina y cerebro de ratas diabéticas por el incremento de la hiperglicemia (Pari y Latha, 2004; Mazunder *et al.*, 2005; Liscano, 2008; Perdomo, 2009; Rondón, 2010).

En respuesta al estrés oxidativo producido por la diabetes, el riñón activa mecanismos compensatorios para protegerse de los daños ocasionados por las ROS, como son el de la inducción de proteínas de *shock* térmico y las MT, siendo estas últimas inducidas por otros estrés oxidativos (Kang, 1999; Maret, 2000; Onody *et al.*, 2003; Kang, 2006). Una de las funciones fisiológicas que se le han atribuido a las MT es el de potente antioxidante y que, una vez más, se demuestra su acción en los resultados obtenidos en este trabajo en tejido renal de ratas diabéticas, ya que se encontraron incrementadas en ejemplares sin tratamiento. Sin embargo, cuando las mismas son tratadas con el extracto de *P. niruri* e insulina se determinó que el primero tiende a normalizar los valores de ésta proteína hacia valores similares al grupo control, a diferencia de la insulina que durante la condición diabética a 60 días presentó una concentración significativamente más elevada que el control. Estos datos se relacionan con los obtenidos por Liscano (2008) y Rondón (2010), quienes encontraron un incremento de las concentraciones de MT cardíacas y retinianas en ratas diabéticas tratadas con insulina, con 45 días con la patología.

Por el contrario, los resultados señalados anteriormente, no se corresponden a lo planteado por Palomero *et al.* (2001), quien menciona que las enzimas antioxidantes tienden a aumentar con la edad, en procura de compensar la disminución de GSH hepático y se ven comprometidos para la detoxificación de las ROS generados, pues existe una pérdida de efectividad de las enzimas. Frente a una deficiencia de GSH, se

observa un aumento de ROS, con el consecuente daño mitocondrial y celular particularmente en el tejido hepático.

Es bien conocida la relación existente entre las moléculas de GSH y las metaloproteínas MT, ya que ambas están compuestas aproximadamente por un tercio de cisteína y son capaces de interactuar entre sí, siendo los disulfidos de glutatión capaces de liberar zinc de las MT, preservando las concentraciones intracelulares de este metal (Susanto *et al.*, 1998; Maret, 2000; Kang, 2006) ; resultando interesante el hecho de que, ambos parámetros en este estudio se incrementaron proporcionalmente al pasar el tiempo del bioensayo, sin verse afectados por las condiciones oxidantes propias de la diabetes o por la edad de los animales, y aunado a esto, las concentraciones de GSH no fueron controlados ni por la insulina ni el extracto de la planta, pero el mismo si logró controlar las concentraciones de MT, explicándose esto posiblemente, a las altas concentraciones de GSH en el tejido renal y/o al incremento del potencial antioxidante (Bueno, 2009); ya que estos parámetros se vieron afectados bajo condiciones diabéticas y en el tiempo en tejidos cardíacos, retinianos, hepáticos y cerebrales de ratas (Mazunder, 2005; Liscano, 2008; Perdomo, 2009).

La hiperglicemia constituye la principal manifestación de la diabetes mellitus, y está implicada en la aparición de las complicaciones que se presentan asociadas con la enfermedad. Estas complicaciones se relacionan con el desarrollo acelerado de aterosclerosis, que tiene una aparición prematura afectando a la vasculatura de manera más extensa en los pacientes diabéticos que en los individuos no diabéticos (Laakso y Lehto, 1997; Clapés *et al.*, 2001).

Las proteínas constituyen uno de los componentes celulares vulnerables al daño oxidativo por glicoxidación, como es el caso de la enzima superóxido dismutasa, entre otras o en las lipoproteínas LDL; éstas al ser modificadas (oxidadas) se convierten en excelentes substratos para la degradación por sistemas proteolíticos (Pacifci y Davies, 1991; Blakytyn y Harding, 1992; Actis y Rebolledo, 2000). Sin embargo, gracias a la eficiente respuesta del GSH reducido y de la MT en los organismos diabéticos, no se

encontraron alteraciones en las mismas, protegiendo del estrés inducido por la peroxidación lipídica, LDL oxidados y enfatizándose aún más la importancia del sistema antioxidante para prevenir el desarrollo de la aterosclerosis, actuando en diferentes niveles al evitar las alteraciones oxidativas y limitar la respuesta celular apoptótica a la lipoproteína oxidada (Martínez *et al.* 2006; Bueno, 2009). Así mismo, cabe destacar que sólo del 20 al 40% de los pacientes con diabetes, van a desarrollar la etapa final de daños renales como la nefropatía diabética, aunque hoy en día la sensibilidad de los pacientes por desarrollarla no está muy clara, pero se les ha atribuido cierta predisposición genética (Kovács, 2009). Estos resultados también podrían dar respuesta a la tasa de incidencia de la nefropatía diabética.

El extracto acuoso de *P. niruri* ejerció función aparente como refuerzo de la capacidad antioxidante, al regular las concentraciones de MT e incrementar las de GSH en el tejido renal de ratas diabéticas tratadas con el mismo, corroborando, una vez más, su efecto antioxidante coadyuvado por su mecanismo de acción hipoglicémico, ya que se le han reportado componentes como alcaloides, flavonoides, entre otros, que tienen dicho efecto (Mazunder *et al.*, 2005; Negri, 2005). Además, en un estudio reciente por Sarkar *et al.* (2009) demostraron la presencia de una proteína de 35 kDa en el extracto de la planta con altas propiedades antioxidantes; lo que hace comparable estos resultados a los reportados por otros autores para el extracto de *P. niruri*, al incrementar las concentraciones de GSH y potencial antioxidante, así como disminuir la producción de radicales libres en tejidos hepáticos, renales, retinianos y cardíacos (Mazunder *et al.*, 2005; Liscano, 2008; Perdomo, 2009; Rondón, 2010).

Los ajustes más relevantes se observaron durante los primeros 15 días de exposición, cuando los organismos tratados con el extracto y la insulina incrementan significativamente los niveles de GSH, con una concomitante caída de los niveles de MT en relación a las ratas diabéticas no tratadas, logrando alcanzar niveles normales a los 45 días, lo que pudiera plantear la relación entre ambas moléculas, ya señalado anteriormente por Susanto *et al.* (1998), Maret (2000) y Kang (2006). Durante los 60

días del bioensayo, las ratas diabéticas siguen manteniendo niveles altos de ambas moléculas. De lo anteriormente, se desprende que el tratamiento con la planta *P. niruri* en ratas diabéticas parece ser una alternativa, particularmente en lo relacionado con los niveles normales de metalotioninas, pues, la insulina mantiene elevados niveles de estas proteínas en las ratas tratadas con este hipoglicemiante.

La Asamblea General de las Naciones Unidas (ONU) 2006, aprobó una resolución histórica que reconoce como amenaza global a la epidemia de la diabetes. Por primera vez, los gobiernos reconocieron que una enfermedad no infecciosa impone una amenaza tan seria para la salud del mundo como las enfermedades infecciosas tales como VIH/SIDA, la tuberculosis y malaria. Los datos presentados muestran la seriedad del alcance de la epidemia y subrayan la necesidad de tomar una acción urgente. De igual manera plantearon que en el año 2025 habrá más de 380 millones de personas con diabetes si no se llegan a tomar las medidas correctas.

En relación a lo antes planteado este trabajo de investigación es de gran relevancia y pretende sentar un precedente junto con los trabajos que lo anteceden y los que se puedan realizar en el futuro, en cuanto a la búsqueda de alternativas junto a la medicina tradicional que ayuden a reducir los estragos que causan las complicaciones en el paciente diabético, mediante el uso de extractos de plantas que presenten efectos tanto hipoglicemiante como antioxidantes.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo demuestran que la condición diabética cursa con un aumento de los niveles de glutatión reducido y metalotioneínas en el tejido renal.

El contenido de proteínas totales en el riñón no fue afectado por la condición diabética, ni por el tratamiento de esta patología con el extracto de la planta y la insulina.

El extracto acuoso de *Phyllanthus niruri* presentó un efecto similar al causado por la insulina sobre las concentraciones de GSH y MT, inclusive fue más efectivo en la regulación de MTs a los 60 días.

BIBLIOGRAFÍA

Actis, S. y Rebolledo, O. 2000. La glicación y glicoxidación de las lipoproteínas, su importancia en la diabetes mellitus. *Medicina*, 60: 645-656.

Álvarez, Á. y Del Barrio, G. 2008. Propiedades antivirales de plantas del género *Phyllanthus*. *Revista Cubana de Farmacia*, 42(1): 1-10.

Beutler, E.; Duron O. y Mykus, B. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal Laboratory Clinical Medicals*, 61: 882-888.

Blakytny, R. y Harding, J. 1992. Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase. *Biochemical Journal*, 288: 303-307.

Bradford, M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Brambila, E., Muñoz, S., Albores, A. y Waalkes, M. 1999. Early effects of surgery on zinc and metallothionein levels in female rats. *Biological Trace Element Research*, 70: 173-182.

Bueno, E. 2009. Efecto del extracto acuoso de la planta *Phyllanthus niruri*, sobre la peroxidación lipídica, catalasa y potencial antioxidante en el tejido renal de ratas diabéticas. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Chatterjee, M. y Sil, P. 2006. Hepatoprotective effect of aqueous extract of *Phyllanthus niruri* on nimesulide-induced oxidative stress in vivo. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 43(5): 299-305.

Chatterjee, M. y Sil, P. 2007. Protective role of *Phyllanthus Niruri* against nimesulide induced hepatic damage. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22(1): 109-116.

Cho, S.; Hazama, M.; Urata, Y.; Goto, S.; Horiuchi, S. y Sumikawa, K. 1999. Protective role of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Free Radical Biological Medicine*, 26 (5-6): 589-602.

- Clapés, S.; Torres, O.; Companioni, M.; Villarino, U.; Broche, F. y Céspedes, E. 2001. Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 20(2): 93-98.
- Dabla, P. 2010. Renal function in diabetic nephropathy. *World Journal of Diabetes*, 1(2): 45-56.
- Deneke, S. y Fanburg, B. 1989. Regulation of cellular glutathione. *American Journal of Physiology*, 25: 163-173.
- Ellman, G. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77.
- Elsner, M.; Gurgul, E. y Lenzen, S. 2006. Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin – producing cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 41: 825-834.
- González, B. 2001. “Progresión de la insuficiencia renal crónica y estrés oxidativo”. “2do Congreso Internacional de Nefrología por Internet”. <http://www.uninet.edu/cin2001/html/conf/basilica.html> (28/03/ 2008).
- Gülçin, I.; Büyükokuroğlu, M.; Oktay, M. y Küfrevioğlu, Ö. 2002. On the in vitro antioxidant properties of melatonin. *Journal Pineal Researches*, 33: 167.
- Guyton, A. y Hall, J. 2001. *Tratado de Fisiología Médica*. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Décima Edición, España.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. y Cross C. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?. *Journal Laboratory Clinical Medicals*, 119: 598.
- Harish, R. y Shivanandappa, T. 2006. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chemistry*, 95: 180-185.
- Hernández, J.; Licea, M.; Hernández, P.; Abraham, E. y Yanes, M. 2001. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 58: 9-10.

- Hnatyszyn, O.; Miño, J.; Ferraro, G. y Acevedo, C. 2002. The hypoglycemic effect of *Phyllanthus niruri sellowianus* fractions in streptozotocin – induced diabetic mice. *Phytomedicine*, 9(6): 556-559.
- James, D.; Owolabi, O.; Elebo, N.; Hassan, S. y Odemene, L. 2009. Glucose tolerance test and some biochemical effects of *Phyllanthus amarus* aqueous extracts on normoglycemic albino rats. *African Journal of Biotechnology*, 8(8): 1637-1642.
- Kang, Y. 1999. The antioxidant function of metallothionein in the heart. *Experimental Biology and Medicine*, 222: 263-273.
- Kang, Y. 2006. Metallothionein redox cycle and function. *Experimental Biology and Medicine*, 231: 1459-1467.
- Kovács, G. 2009. Diabetic nephropathy. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry*, 20: 40-52.
- Laakso, M. y Lehto, S. 1997. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Revision*, 5: 294-315.
- Liscano, A. 2008. Efecto del extracto acuoso de *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) sobre la retina de ratas diabéticas. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Maret, W. 2000. Zinc and health: current status and future directions. *American Society for Nutritional Science*, 130: 1455-1458.
- Martínez, M.; Barrado, D.; Zubillaga, M.; Hager, A.; De Paoli, T. y Boccio, J. 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión: utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 40(1): 45-51.
- Mazunder, U.; Gupta, M. y Rajeshwar, Y. 2005. Antihyperglycemic effect and antioxidant potential of *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) in streptozotocin induced diabetic rats. *Europe Bulletin Drug Research*, 13: 1-9.
- Meister, A. 1995. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271: 35-42.

Melillo, P. 1999. Agrotecnología para el cultivo de Quebra-pedra o erva-pombinha. *Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas*, 22: 334-340.

Miranda, M.; Muriach, M.; Johnsen, S.; Bosch-Morell, F.; Araiz, J.; Romá, J. y Romero, F. 2004. Estrés oxidativo en un modelo de retinopatía diabética experimental: tratamiento con antioxidantes. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología*, 79: 289-294.

Murillo, E.; Tique, M.; Ospina, L. y Lombo, O. 2006. Evaluación preliminar de la actividad hipoglicemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante in vitro de extractos de *Bauhinia kalbreyeri harms*. *Revista Colombiana de ciencias químicas farmacéuticas*, 35(1): 64-80.

Negri, G. 2005. Diabetes melito: plantas e principios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41: 121-142.

Nwanjo, H.; Oze, G.; Okafor, M.; Nwosu, D.; y Nwankpa, P. 2007. Protective role of *Phyllanthus niruri* extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of diabetic rats. *African Journal of Biotechnology*, 6(15): 1744-1749.

Onody, A.; Zvara, A.; Hackler J. y Vigh, L. 2003. Effect of classic preconditioning on the gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 536: 35-40.

Öztürk Y, Altan V.M. y Yildizoglu-Ari N. 1996. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle function. *Pharmacology Reviews*, 48: 69-112.

Pacifici, R. y Davies, K. 1991. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37: 166-180.

Palomero J, Galán A, Muñoz M, Tuñón M, González Gallego J, Jiménez R. 2001. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidants enzymes. *Free Radical Biological Medicine*, 30(8): 836-845.

Pari, L. y Latha, M. 2004. Protective role of *Scoparia dulcis* plant extract on brain antioxidant status and lipidperoxidation in STZ diabetic male wistar rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 4: 16-23.

Perdomo, A. 2009. Efectos del extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*, sobre la peroxidación lipídica, la catalasa y el potencial antioxidante en el tejido cardíaco de ratas diabéticas. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Raguso, C.; Ajami, A.; Gleason, R. y Young, V. 1997. Effect of cystine intake on methionine kinetics and oxidation determined with oral tracers of methionine and cysteine in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66(2): 283-292.

Ramos, M.; Batista, C.; Gómez, B. y Zamora, A. 2006. "Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes". *Medigraphic Artemisa en línea*, VIII(1): 7-15.

Rocca, F. y Plá, J. 1963. Historia de la diabetes Capítulo I. En: *Diabetes Mellitus: bases fisiológicas y fisiopatológicas para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la diabetes*. Rocca, F. y Plá, J. (eds). Edita el Departamento de Publicaciones del Sindicato Médico del Uruguay. Uruguay.

Rodríguez, P.; Duque I., Arribas I., Pérez de L., López O. y Rodríguez P. 1995. Papel de los radicales libres en la fisiopatología renal. *Nefrología*, XV(S 1): 49-54.

Rodríguez, P.; Lucio, J.; Ruíz, P.; López, O.; Iglesias, M.; Ruiz, G.; Torrecilla, G. y Rodríguez, P. 1996. Radicales libres y daño glomerular. *Nefrología*, XVI(S 3): 29-34.

Rodríguez, R. y Massera, M. 1963. Complicaciones oculares Capítulo XV. En: *Diabetes Mellitus: bases fisiológicas y fisiopatológicas para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la diabetes*. Rocca, F. y Plá, J. (eds). Edita el Departamento de Publicaciones del Sindicato Médico del Uruguay. Uruguay.

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.

Rondón, M. 2010. Efectos del extracto acuoso de *Phyllanthus niruri* sobre los niveles de metalotioneínas, glutatión y proteínas en el tejido cardíaco de ratas diabéticas. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Rosado-Pérez, J y Mendoza-Núñez, V. 2007. Mini-revisión: inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*, 32: 58-69.

Sarkar, M.; Kinter, M.; Mazunder, B. y Sil, P. 2009. Purification and characterization of a novel antioxidant protein molecule from *Phyllanthus niruri*. *Food Chemistry*, 114(4): 1405-1412.

Scott E. 2007. Las metalotioneínas y el estrés quirúrgico. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(2): 67-72.

Seis, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, 27: 916-921.

Singh, M.; Balamurugan, M.; Gupta, A.; Yadav, S.; Sharma, A.; Acharya, A. y Yamasamy, M. 2007. Antidiabetic activity of glibenclamide loaded liposomes in alloxan induced diabetic rats. *Articles Pharmaceutica*, 48(1): 31-36.

Song, Y.; Wang, J.; Li, Y.; Du, Y.; Arteel, G.; Saari, J.; Kang, Y. y Cai, L. 2005. Cardiac metallothionein synthesis in streptozotocin-induced diabetic mice, and its protection against diabetes-induced cardiac injury. *American Journal of Pathology*, 167(1): 17-26.

Susanto, I.; Wright, S.; Lawson, R.; Williams, C. y Deneke, S. 1998. Metallothionein, glutathione, and cystine transport in pulmonary artery endothelial cells and NIH/3T3 cells. *American Journal of Physiology*, 274: L296-L300.

Ueno, Y.; Kizaki, M.; Nakagiri, R.; Kamiya, T.; Sumi, H. y Osawa, T. 2002. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *The Journal of Nutrition*, 132: 897-900.

Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F.; Fabbri, R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44: 69-84.

Xiaokun, A.; Lu, C.; Wenke, F. 2007. Diabetes and metallothionein. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 7(7): 761-768.

APÉNDICES

Apéndice 1. Resumen estadístico de la concentración de glutatión reducido en tejido renal de ratas con diabetes tratadas con extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: \bar{X} :media, X: mediana, D.E.: desv. estándar, CMR: contraste de rango múltiple, KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal con agua, NE: normal con extracto, DA: diabetes con agua, DE: diabetes con extracto, DI: diabetes con insulina.

15 días

Condic. Experm	F	\bar{X}	X	D.E.	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	6	1,35	1,31	0,12	17,46	*	a
NE	6	1,60	1,42	0,48			ab
DA	4	1,65	1,70	0,18			ab
DE	6	2,33	2,14	0,66			bc
DI	6	2,55	2,16	0,86			c
Total	28	1,91	1,72	0,71			

p-valor= 0,002

45 días

Condic. Experm	F	\bar{X}	X	D.E.	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	6	1,43	1,45	0,17	7,34	NS	
NE	6	1,80	1,82	0,39			
DA	4	1,86	1,90	0,08			
DE	6	1,69	1,65	0,33			
DI	5	1,52	1,53	0,17			
Total	27	1,65	1,61	0,29			

p-valor= 0,12

60 días

Condic. Experm	F	\bar{X}	X	D.E.	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	4	1,26	1,24	0,10	13,36	*	a
NE	4	2,61	2,60	0,24			c
DA	4	1,83	1,72	0,34			b
DE	4	1,77	1,76	0,09			b
DI	6	1,78	1,98	0,45			b
Total	22	1,84	1,76	0,50			

p-valor= 0,010

Apéndice 2. Resumen estadístico de la concentración de metalotioneína en tejido renal de ratas con diabetes tratadas con extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: \bar{X} :media, X: mediana, D.E.: desv. estándar, CMR: contraste de rango múltiple, KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal con agua, NE: normal con extracto, DA: diabetes con agua, DE: diabetes con extracto, DI: diabetes con insulina.

15 días

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	5	1,27	1,19	0,39	15,96	*	a
NE	4	2,62	2,65	0,17			c
DA	5	1,94	2,02	0,37			b
DE	6	1,33	1,28	0,41			a
DI	4	1,05	1,08	0,14			a
Total	24	1,62	1,50	0,63			

p-valor= 0,003

45 días

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	6	2,75	2,76	0,35	3,80	NS	
NE	6	2,94	2,96	0,30			
DA	4	2,96	2,92	0,39			
DE	6	2,98	2,94	0,31			
DI	6	3,25	3,03	0,52			
Total	28	2,98	2,93	0,39			

p-valor= 0,43

60 días

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	4	1,56	1,61	0,38	13,90	*	a
NE	4	2,67	2,72	0,38			cd
DA	6	2,42	2,46	0,44			bc
DE	6	1,95	1,70	0,59			ab
DI	5	3,11	3,09	0,53			dc
Total	25	2,35	2,39	0,69			

p-valor= 0,01

Apéndice 3. Resumen estadístico del contenido de Proteínas Totales en tejido renal de ratas con diabetes tratadas con extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: \bar{X} :media, X: mediana, D.E.: desv. estándar, CMR: contraste de rango múltiple, KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal con agua, NE: normal con extracto, DA: diabetes con agua, DE: diabetes con extracto, DI: diabetes con insulina.

15 días

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	6	86,43	86,62	2,94	11,41	*	a
NE	6	90,65	91,64	4,53			b
DA	6	91,88	92,19	1,51			b
DE	6	90,52	90,89	1,52			b
DI	6	90,63	90,15	1,71			b
Total	30	90,02	90,34	3,15			

p-valor= 0,02

45 días

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	5	90,71	90,34	2,78	9,18	NS	
NE	6	83,06	83,09	4,74			
DA	4	87,07	88,29	4,51			
DE	5	83,15	85,87	6,17			
DI	6	85,54	86,62	4,81			
Total	26	85,74	87,18	5,21			

p-valor= 0,06

60 días

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	4	81,13	81,23	0,93	11,40	*	a
NE	4	87,73	86,99	5,92			b
DA	6	79,75	80,11	1,53			a
DE	6	83,71	84,57	2,29			ab
DI	6	82,55	82,16	5,16			a
Total	26	82,75	81,78	4,23			

p-valor= 0,02

HOJAS DE METADATOS

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

Título	EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Phyllanthus niruri</i> SOBRE NIVELES DE GLUTATIÓN, METALOTIONEÍNAS Y PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO RENAL DE RATAS DIABÉTICAS
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Ortiz Blanco, Alexander José	CVLAC	8983247
	e-mail	alexanderortiz@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Diabetes, estrés oxidativo, sistemas antioxidantes, radicales libres, *Phyllanthus niruri*.

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

RESUMEN

En la diabetes, una de las complicaciones más severas producto de la hiperglicemia y del desbalance del estado redox lo representa la nefropatía diabética. *Phyllanthus niruri*, o flor escondida, ha sido utilizada ampliamente en el tratamiento de la diabetes, así como de otras afecciones; por esto se planteó como objetivo evaluar los efectos del extracto acuoso de *P. niruri* sobre la defensa antioxidante en el tejido renal de ratas diabéticas. Se utilizó un total de 90 ratas machos de seis semanas de edad, de la especie *Rattus norvegicus* (cepa Sprague-Dawley) formándose 5 grupos experimentales: dos controles, uno con agua y otro con el extracto acuoso de la planta (200 mg.kg⁻¹ de peso corporal) y tres diabéticos, en los que a uno solo se le dio agua. Otro fue tratado con el extracto de la planta y el último, tratado con insulina como control hipoglicémico. El bioensayo duró dos meses, dividido en tres subperíodos (15, 45 y 60 días). La diabetes fue inducida con una dosis única de aloxan (100 mg.kg⁻¹ de peso corporal). Las concentraciones de metalotioneína (MT), glutatión reducido (GSH) y proteínas totales fueron determinadas por métodos espectrofotométricos. Los resultados demostraron diferencias significativas en los niveles de GSH (KW: 17,46, p<0,05; KW: 13,36, p<0,05) entre los grupos experimentales a los 15 y 60 días de exposición, respectivamente. Durante los primeros 15 días, los organismos diabéticos (diabéticos tratados con el extracto DE y diabéticos tratados con insulina DI, presentaron niveles estadísticamente superiores de GSH a los controles y diabéticos con agua. Al final del experimento, a los 60 días, todos los grupos presentaron niveles de GSH superiores al control. La MT también estuvo significativamente elevada en los organismos diabéticos a los 15 días, pero el suministro del extracto de la planta y la insulina normalizan las concentraciones a valores normales, condición que se mantiene hasta los 60 días, a excepción del normal con extracto (NE) y DI. La condición diabética causó alteraciones en los niveles proteicos a corto plazo, particularmente se vieron incrementadas en los grupos experimentales en relación al control. Al final del experimento, se pudo demostrar que la condición diabética cursa con concentraciones mayores de MT y GSH. A corto plazo, durante los primeros 15 días, se produce un desbalance de estas moléculas, que al final tienden a normalizarse. Los resultados obtenidos sugieren que el extracto acuoso de *P. niruri* tiende a normalizar los niveles de estos dos parámetros alterados durante la condición diabética, lo que representa una buena alternativa como tratamiento para las afecciones y complicaciones en el tejido renal que se desarrollan en la diabetes; sin embargo, en este estudio no se evaluaron otros efectos del extracto.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Lemus Mairin	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	6429405
	e-mail	mlemus88@gmail.com
	e-mail	
Herrera Hernando	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5872352
	e-mail	hherrreramata@yahoo.es
	e-mail	
Nusetti Sonia	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	11380086
	e-mail	snusetti@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2012	07	06

Lenguaje: SPA

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

Archivo(s):

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

Alcance:

Espacial: Nacional
Temporal: Temporal

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio: Ciencias de la Salud (Bioanálisis)

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

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

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

Estimado Profesor Martínez:

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

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



Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNTELE
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.

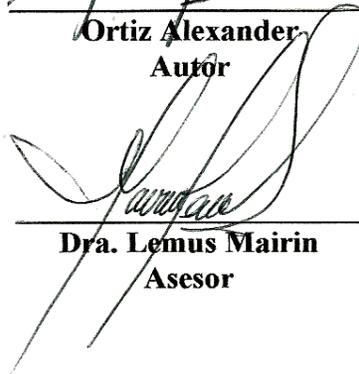
JABC/YGC/maruja

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”.



Ortiz Alexander
Autor



Dra. Lemus Mairin
Asesor