



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

EFFECTO ANTIOXIDANTE DEL 17 β -ESTRADIOL EN EL ADIPOCITO, EN UN MODELO MURINO CON SÍNDROME METABÓLICO

T E S I S

Que para optar por el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Lic. Nut. REBECA CAMBRAY GUERRA

TUTOR:

DR. Israel Pérez Torres

Instituto Nacional de Cardiología - Ignacio Chávez

COMITÉ TUTOR:

DR. Antonio Díaz Cruz

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

DRA. Teresa Fortoul van der Goes

Facultad de Medicina, UNAM

MÉXICO D.F.

Diciembre 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A DIOS

El alfa y omega, el principio y el fin, príncipe de paz...

Todo lo puedo en ti que me fortaleces.

Agradecimientos...

A mi tutor por el proyecto realizado, rigor, enseñanzas, correcciones y dedicación durante la realización de mis estudios. A mi comité tutor por sus precisas observaciones, gentileza, rudeza y acompañamiento.

A cada uno de mis profesores de maestría, sin duda, han contribuido en mi formación profesional y humana.

A mis papás Rosa y Antonio, piezas irremplazables en mi vida; por sus exigencias, cuidado, amor...

Antonio y Nancy, mis admirables hermanos y maravillosos amigos.

A mis pequeñitos Ale, Raquel, Sami e Isaac, por añadirle aún más alegría a mi vida. Bárbara y Samuel por ser parte de mi familia.

A mi familia, por el apoyo y cariño siempre constante.

A mis amig@s, por cada uno de los momentos grandiosos y memorables compartidos.

A la gloriosa UNAM, institución en donde me forme académicamente y conocí a grandes personas. Al apoyo CONACYT.

RESUMEN

Introducción. El síndrome metabólico (SM) y la obesidad son un problema de salud pública del siglo XXI. El SM es la asociación de 3 o más de los siguientes componentes: hipertensión, diabetes, resistencia a la insulina, dislipidemia, obesidad, inflamación y estrés oxidante (EOx). El dimorfismo sexual está implicado en la manifestación del SM, observándose incremento del SM y obesidad post-menopausia, además del aumento del EOx debido a la pérdida de la síntesis endógena de estrógenos, particularmente el 17 β -estradiol (E₂) que posee propiedades AOx. **Objetivo.** Evaluar el efecto antioxidante del E₂ en el adipocito de un modelo en rata wistar hembra con SM. **Material y método.** Se utilizaron ratas Wistar hembras con peso inicial de 100 \pm 10 g subdivididos en 4 grupos: Gpo. Control (C), Gpo. SM, Gpo. SM Ovariectomizado (Ovx) y Gpo. SM Ovx + E₂. El SM se indujo administrando sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 24 semanas. Antes del sacrificio de los animales se registró el peso y presión arterial sistólica (PAS), después del sacrificio se disecó, peso la grasa intra-abdominal y se aislaron los adipocitos. En el suero se determinaron las concentraciones de colesterol, triglicéridos (TG), glucosa, insulina, HOMA, leptina y E₂. En el adipocito se determinó el índice de lipoperoxidación, capacidad AOx no enzimática y la actividad de las enzimas SOD Cu-Zn y Mn, CAT y GPx. **Resultados.** La actividad de las enzimas SOD Cu-Zn, Mn, CAT y GPx no presentó diferencia significativa en el grupo C vs. SM, pero en el grupo SM Ovx la actividad de estas enzimas disminuyó significativamente vs. SM y SM Ovx+E₂. La lipoperoxidación aumentó y la capacidad AOx no enzimática disminuyó significativamente en SM Ovx, vs. SM y SM Ovx+E₂. **Conclusión.** Los resultados sugieren que la eliminación del E₂ por la ovariectomía, disminuye la actividad de las enzimas AOx en el tejido adiposo intra-abdominal de ratas hembras con SM, además incrementa la lipoperoxidación y disminuye la capacidad AOx no enzimática.

Palabras clave: Síndrome metabólico, estrés oxidante, 17 β -estradiol, adipocito.

CONTENIDO

RESUMEN

1. MARCO TEÓRICO

1.1 SÍNDROME METABÓLICO y OBESIDAD.....1

EPIDEMIOLOGIA

ETIOLOGIA

1.2 TEJIDO ADIPOSO.....4

COMPOSICIÓN

HIPERTROFIA E HIPERPLASIA

FISIOLOGÍA DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

1.3 OBESIDAD y ESTRÉS OXIDANTE.....7

MECANISMOS DE ESTRÉS OXIDANTE EN LA OBESIDAD

1.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE.....10

1.5 17 β -ESTRADIOL.....12

PROPIEDADES QUÍMICAS

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS

ANTECEDENTES PROTECTORES DEL 17 β -ESTRADIOL

2. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES EN EL MODELO SM.....17

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....17

4. MATERIAL y MÉTODOS.....18

5. RESULTADOS.....24

Peso corporal y peso grasa

Presión arterial sistólica

Colesterol, glucosa y triglicéridos

Insulina

Índice HOMA

Leptina

Estradiol

Índice de lipoperoxidación

Capacidad AOx total

Actividad de la SOD Cu-Zn

Actividad de la SOD Mn

Actividad de la CAT

Actividad de la GPx

6. DISCUSIÓN.....28

7. CONCLUSIÓN.....38

8. CUADROS y FIGURAS

CUADRO 8.1. EFECTO DEL E₂ EN EL MODELO CON SM EN DIVERSOS PARÁMETROS

FIGURA 8.1. EFECTO DEL E₂ SOBRE EL ÍNDICE DE LIPOPEROXIDACIÓN EN EL ADIPOCITO DE RATA HEMBRA CON SM

FIGURA 8.2. EFECTO DEL E₂ SOBRE LA ACTIVIDAD NO ENZIMÁTICA EN EL ADIPOCITO DE RATA HEMBRA CON SM

FIGURA 8.3. EFECTO DEL E₂ SOBRE LA ACTIVIDAD DE SOD Mn y Cu-Zn EN EL ADIPOCITO DE RATA HEMBRA CON SM

FIGURA 8.4. EFECTO DEL E₂ SOBRE LA ACTIVIDAD DE CATALASA EN EL ADIPOCITO DE RATA HEMBRA CON SM

FIGURA 8.5. EFECTO DEL E₂ SOBRE LA ACTIVIDAD DE GPx EN EL ADIPOCITO DE RATA HEMBRA CON SM

9. REFERENCIAS

ÍNDICE de ACRÓNIMOS y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGL	Ácidos grasos libres
AOx	Antioxidante
CAT	Catalasa
C	Control
E ₂	17β-estradiol
eNOS	Sintasa del óxido nítrico
EOx	Estrés oxidante
EROs	Especies reactivas a oxígeno
FNT-α	Factor de necrosis tumoral alfa
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
GSSG	Glutation oxidado
GPx	Glutation peroxidasa
GSH	Glutation reducido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance
IL	Interleucina
kcal	Caloría
LPL	Lipoproteína lipasa
LSH	Lipasa sensible a hormonas
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NO	Óxido nítrico
Nrf-2	Nuclear factor E2- related factor 2
OH	Hidroxilo
O ₂ ⁻	Superóxido

Ovx	Ovariectomía
PAS	Presión arterial sistólica
RL	Radical libre
RE	Receptores a estrógeno
SM	Síndrome metabólico
SOD	Superóxido dismutasa
SOD Cu-Zn	Superóxido dismutasa Cobre-Zinc
SOD Mn	Superóxido dismutasa Manganeseo
TBARs	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TG	Triglicéridos
TLR	Receptores Toll-like

1. MARCO TEÓRICO

1.1 SÍNDROME METABÓLICO y OBESIDAD

El Síndrome metabólico (SM) se define como el conjunto de alteraciones metabólicas (Anagnostis, 2012), que incluyen los siguientes criterios diagnósticos: hipertensión, diabetes, resistencia a la insulina, dislipidemia y obesidad (Pérez y Baños, 2011), la inflamación sistémica, también es considerada por algunos autores como un criterio diagnóstico (Alemany, 2012). La definición más aceptada incluye tres o más de los criterios diagnósticos anteriormente referidos; algunas de las definiciones utilizadas parten de parámetros establecidos por el Panel de Tratamiento para el Adulto III (ATP-III), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federación Internacional de la Diabetes (IDF), el parámetro más constante presente en el SM como criterio diagnóstico es la obesidad (García y cols., 2008). Cabe mencionar que la prevalencia del SM varía en función de la población estudiada, determinada por la edad, género, raza, así como la definición que se utilice (Anagnostis, 2012).

La importancia de este síndrome radica en su elevada y creciente prevalencia en los países desarrollados, convirtiéndose en uno de los problemas de salud pública del siglo XXI. El SM no se trata de una enfermedad sino de una asociación de problemas de salud que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo, causados por la combinación de factores genéticos y ambientales asociados al estilo de vida (Sarmiento y cols., 2008).

El dimorfismo sexual está claramente implicado en la manifestación del SM (Pérez y Baños, 2011) y tiende a aparecer más a menudo en los hombres adultos que en mujeres pre-menopáusicas, contrario a esto, diversas investigaciones describen que hay incremento del SM, en mujeres post-menopáusicas en comparación con hombres de la misma edad (Regitz y cols., 2007; Hong y cols., 2009; Gustafsson y cols., 2011). Adicionalmente se asocia el incremento del estrés oxidante (EOx) después de la menopausia; debido a la pérdida de la síntesis endógena de estrógenos (E₂) (Crist y cols., 2009).

La obesidad como uno de los componentes del SM, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-008-SSA3-2010, para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad) se define como una enfermedad caracterizada por el exceso de tejido adiposo en el organismo (NOM-008-SSA3-2010). La OMS define al sobrepeso y la obesidad como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2012).

EPIDEMIOLOGÍA

En la actualidad, la obesidad se considera un problema de salud pública, debido a su magnitud y trascendencia. El sobrepeso y la obesidad son el quinto factor de riesgo de defunción en el mundo. Cada año fallecen 2,8 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso o la obesidad. Además, el 44% de los casos de diabetes, el 23% de los casos de cardiopatías isquémicas y entre el 7% y el 41% de algunos cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad. Si bien el sobrepeso y la obesidad tiempo atrás eran considerados un problema propio de los países de ingresos altos, actualmente ambos trastornos están aumentando en los países de ingresos medianos y bajos, en particular en los entornos urbanos (OMS, 2012).

Desde 1980, la obesidad se ha incrementado en el mundo. En el 2008, 1400 millones de adultos (de 20 y más años) tenían sobrepeso, dentro de este grupo, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesos. Actualmente en el plano mundial, el sobrepeso y la obesidad están relacionados con un mayor número de defunciones que la insuficiencia ponderal (desnutrición). El 65% de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad cobran más vidas que la insuficiencia ponderal (estos países incluyen a todos los de ingresos altos y la mayoría de los de ingresos medianos). No es raro encontrar la desnutrición y la obesidad coexistiendo en un mismo país, una misma comunidad y un mismo hogar (OMS, 2012).

Añadido a lo anterior, la prevalencia de la obesidad en adultos varía de 10% a 25% en países de Europa Occidental y de 20% a 25% en América

Latina. Estos porcentajes se elevan al 40% para las mujeres de Europa del este y en países del Mediterráneo, así como para las mujeres Afroamericanas. Los indios americanos y las poblaciones de América Latina y de ciertas islas del Pacífico (melanesios, micronesios, y polinesios) tienen las prevalencias más altas. En América Latina, los datos de las encuestas realizadas en Brasil, México y algunos países del Caribe muestran que la obesidad es un problema de salud pública cada vez más grave, sobre todo entre mujeres (Rojas y cols., 2012).

En México, estudios recientes demuestran que la incidencia y prevalencia del sobrepeso y la obesidad, han aumentado de manera progresiva durante los últimos seis decenios y de modo alarmante en los últimos 20 años, hasta alcanzar cifras de 10 a 20% en la infancia, 30 a 40% en la adolescencia y 60 a 70% en los adultos (NOM-008-SSA3-2010).

Los datos de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC) de 1993 revelaron una prevalencia de obesidad del 21,5%, la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA) indicaron que el 24% de los adultos sufrían de obesidad, finalmente los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT) revelaron que el 30% de los adultos de ambos sexos eran obesos (Rojas y cols., 2012).

ETIOLOGÍA

La acumulación anormal o excesiva de grasa que se almacena en el tejido adiposo es el resultado del desequilibrio crónico entre la ingesta y el gasto energético. No existe una razón única que explique la epidemia de la obesidad, dado que es compleja y está influenciada por los hábitos de alimentación, etapa de desarrollo, edad, actividad física y genes (Singla y cols., 2010; Xie y cols., 2012). Sin embargo la causa más común de la obesidad, que afecta a la población en general, es el resultado de un balance energético positivo.

1.2 TEJIDO ADIPOSO

Anteriormente, el concepto tradicional del tejido adiposo se refería a un órgano con pocas funciones metabólicas, considerándolo solo como reservorio pasivo del exceso de energía; sin embargo, a partir de 1987 y con las investigaciones realizadas a través del tiempo, este concepto cambio, y actualmente se considera un órgano complejo, esencial y metabólicamente activo (Kershaw y Flier, 2004).

El tejido adiposo blanco provee una reserva de combustible a largo plazo en los mamíferos, representando la principal reserva de energía y se distribuye en múltiples depósitos corporales, tanto interna como subcutáneamente (Pérez, 2007).

COMPOSICIÓN

El tejido adiposo está constituido por adipocitos maduros y la fracción estroma vascular integrada por pre-adipocitos, células sanguíneas, células endoteliales, macrófagos y fibroblastos, que pueden contribuir a la función del tejido adiposo (Moreno y Martínez, 2002; Hocking y cols., 2010; Mirza, 2011; Suganami y cols., 2012). El exceso de energía es almacenado en depósitos intracelulares de triglicéridos (TG) en el adipocito. El adipocito desarrolla hipertrofia e hiperplasia y si este proceso es prolongado se desarrolla la obesidad (Emanuela y cols., 2012; de Ferranti y Mozzaffarian, 2008).

Los adipocitos están adaptados para almacenar y liberar TG, reunidos en una gota citoplasmática única, el núcleo del adipocito queda ubicado en la periferia. El tamaño del adipocito varía entre 10 a 100 μm de acuerdo con el estado nutricional, los adipocitos pueden modificar su diámetro y consecuentemente su volumen, según almacenen más o menos TG. Estos cambios son posibles debido a la elasticidad de la membrana plasmática, que le permite aumentar notablemente su volumen antes de alcanzar el "tamaño crítico", a partir del cual se pone en marcha el mecanismo de división adipocitaria. Cada adipocito subcutáneo almacena hasta 1.2 μg de TG, aunque

en los individuos de peso normal su contenido es de 0.4 a 0.6 μg por célula. En los sujetos delgados el tejido adiposo contiene 18% de agua, 80% de TG y 2% de proteínas, mientras que en los obesos el contenido graso aumenta y disminuye proporcionalmente el contenido acuoso (Leibel y cols., 1990).

HIPERTROFIA e HIPERPLASIA

El tejido adiposo puede responder con rapidez y de forma dinámica, al exceso de nutrientes mediante la hipertrofia e hiperplasia. La obesidad hipertrófica, se caracteriza por gran cantidad de TG en los adipocitos sin aumento en el número de células (Emanuela y cols., 2012; de Ferranti y Mozaffarian, 2008; Marcano y cols., 2006).

La obesidad hiperplásica corresponde a una forma clínica de larga duración en la que el número de adipocitos es mayor, así como la cantidad de TG que contienen (Emanuela y cols., 2012). La cantidad de células grasas aumentan rápidamente durante la infancia mayor y la pubertad, pero pueden incrementar durante la vida adulta; este aumento puede llegar a ser de 3 a 5 veces más de lo normal cuando existe obesidad en la niñez o en la adolescencia. El aumento en el número total de células grasas se presenta usualmente en individuos que superan el 75% de su peso deseable. El tamaño de los adipocitos puede reducirse después de la restricción calórica, pero no hay evidencias de que puedan existir pérdidas completas de adipocitos formados (Marcano y cols., 2006).

FISIOLOGÍA DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El tejido adiposo blanco realiza tres funciones principales: estructural (como aislante térmico y protector de órganos), metabólica (lipogénesis y lipólisis) y secretora (responde y secreta hormonas, además de otras sustancias) (Pérez, 2007; Marcano y cols., 2006).

Las funciones metabólicas del tejido adiposo blanco son dos: lipogénesis definida como la síntesis de ácidos grasos y subsecuente síntesis de TG y

lipólisis definida como la hidrólisis de TG (Zechner y cols., 2012; Kersten, 2001).

El tejido adiposo también secreta una variedad de moléculas biológicamente activas las adipocinas y adipocitocinas (Singla y cols., 2010; Recanses y cols., 2004; Rocha y Folco, 2011; Moreno y cols., 2010; Stradecki y Jaworski, 2011; Tang y cols., 2012; Singla y cols., 2010). La leptina es una de estas adipocinas, es un péptido anorexigénico que regula el apetito provee una poderosa señal catabólica cerebral que inhibe la ingesta calórica e incrementa el gasto de energía. Los receptores a la leptina no solo se expresan en el sistema nervioso central también en los tejidos periféricos, actúa través de sus receptores Ob-Rb, proporcionando una señal en el hipotálamo (Coelho y cols., 2013).

1.3 OBESIDAD y ESTRÉS OXIDANTE

Diversos estudios han sugerido que la obesidad está asociada con el incremento del estrés oxidante (EOx), definido como el desequilibrio entre la generación de radicales libres (RL) y la defensa del sistema antioxidante (AOx), favoreciendo el incremento de los RL (Yu, 1994). Los RL son átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos ya que tienden a aceptar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una de ellas cede electrones libres (proceso denominado oxidación) y otra necesariamente los recibe (proceso denominado reducción) (Halliwell, 1987).

La biogénesis de los RL acontece y es inherente a la naturaleza aeróbica de los seres vivos, los RL pueden actuar sobre cualquier molécula. Especialmente sensibles a sus efectos resultan los ácidos nucleicos, las proteínas y los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana celular. La interacción de los RL con estas moléculas producirá en ellas una modificación estructural, que se traducirá en alteración funcional (Paredes y Roca, 2002).

Los posibles mecanismos relacionados con el EOx presentes en la obesidad dependen del incremento del consumo de oxígeno y la subsecuente producción de RL (Vincent y cols., 2001; Vincent y Taylor, 2006; Brown y cols., 2009). El tejido adiposo que se encuentra en exceso, es fuente de citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y el FNT- α , por lo que la obesidad es considerada un estado de inflamación crónico. Estas citocinas son un potente estímulo para la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por los macrófagos y monocitos (Higdon y Frei, 2003), cabe mencionar que las ERO pueden ser o no radicales libres y son más reactivas que el oxígeno molecular debido a que contienen oxígeno. Existen diferentes mecanismos por los que la obesidad produce EOx (Fernández y cols., 2011).

MECANISMOS DE ESTRÉS OXIDANTE EN LA OBESIDAD

Ácidos grasos libres. Se sabe que el aumento de la ingesta calórica desborda la capacidad de almacenamiento de los adipocitos, conduciendo a un aumento de ácidos grasos libres (AGL) circulantes y la subsiguiente deposición ectópica de lípidos en prácticamente todos los tejidos como el músculo y el hígado con amplias consecuencias fisiológicas. Los depósitos de lípidos en los islotes pancreáticos se han implicado en la patogénesis de la diabetes, mientras que los depósitos de lípidos en las células subendoteliales contribuye a la hipertensión (O'Rourke, 2009; Tripathi y Pandey, 2012).

Inflamación. Uno de los descubrimientos más importantes en el campo de las enfermedades metabólicas en la última década, es la relación entre la obesidad y la inflamación sistémica crónica de bajo grado, efecto que promueve el aumento del EOX. La relación obesidad e inflamación se deriva de la sobreexpresión de las citocinas proinflamatorias. Los mecanismos principales que se asocian con inflamación sistémica crónica de bajo grado durante la obesidad son: 1. Los adipocitos y la fracción de estroma vascular sintetizan citocinas, 2. Infiltración de macrófagos en el tejido adiposo (Emanuela y cols., 2012), 3. El exceso de lípidos que contribuye a la inflamación sistémica en la obesidad. Los lípidos tienen un papel importante en la activación directa del sistema inmune innato, a través de la activación de la vía de los receptores Toll-like (TLR). Los TLR-2 y TLR-4 se expresan en una amplia gama de células, incluyendo a los macrófagos y adipocitos, estos se unen a los AGL, activan a NF- κ B y regulan el incremento de la expresión de citocinas inflamatorias (O' Rourke, 2009; Rubio y cols., 2013).

Daño celular. La acumulación excesiva de grasa puede causar daño celular; el cual incrementa la generación de citocinas, que promueven la generación de EROs en los tejidos, incrementando la tasa de lipoperoxidación (Fernández y cols., 2011).

Estrés del retículo endoplásmico. El estrés del retículo endoplásmico en el tejido adiposo puede ser debido a la sobrecarga de nutrientes, junto con mayor

demanda de la síntesis de proteínas para su metabolismo (Tripathi y Pandey, 2012).

Estrés de la mitocondria. En estados de adiposidad, el procesamiento del exceso de AGL por la mitocondria produce liberación de EROs. El exceso de EROs puede generar disfunción mitocondrial en hígado y músculo esquelético (de Ferranti y Mozzafarian, 2008).

Tipo de dieta. Otro posible mecanismo de la formación de EROs durante la obesidad es a través de la dieta. El consumo de dietas altas en grasa o carbohidratos puede alterar el metabolismo del oxígeno. Los depósitos de grasa son vulnerables a sufrir reacciones de oxidación (Fernández y cols; 2011).

1.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE

Un antioxidante (AOx) es una estructura molecular capaz de prevenir y/o evitar la oxidación de otra molécula, bien por interacción y estabilización de especies reactivas, bien por la transformación de éstas a configuraciones más estables y de reactividad reducida (Sáez, 2005).

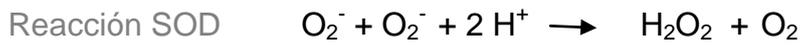
Debido al efecto potencial que las especies reactivas y los RL tienen sobre los lípidos, proteínas y ADN, no es sorprendente que una red de mecanismos de defensa AOx esté presente en el organismo. En general, los AOx son a menudo agentes reductores, que existen tanto intracelularmente como extracelularmente y tienen la capacidad de reaccionar con los RL y especies reactivas, minimizando sus acciones y retrasar o prevenir el EOx (Gomes y cols., 2012).

De hecho, se ha sugerido al EOx crónico como la causa o la consecuencia de muchas enfermedades humanas agudas y crónicas, por ejemplo; la obesidad, enfermedades cardiovasculares, cáncer, lesión pulmonar aguda y esclerosis múltiple. Esta comprensión ilustra la importancia del sistema de defensa AOx en el mantenimiento de la fisiología celular normal. Las células de los mamíferos están equipadas con mecanismos de defensa AOx enzimático entre algunas están la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y el sistema no enzimático como la vitamina A, C, E, glutatión, 17β -estradiol entre otros (Gomes y cols., 2012; HO y cols., 1998).

En esta sección únicamente se describirán algunas de las enzimas pertenecientes al sistema AOx enzimático.

SUPEROXIDO DISMUTASA

La superoxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido (O_2^-), en otra especie reactiva, que es el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el cual es posteriormente transformado en H_2O por otras enzimas (Konisberg, 2008).



Existen 3 isoformas de la SOD presentes en las células de los mamíferos: SOD cobre-zinc (Cu-Zn), Manganeseo (Mn) y extracelular (Ec) (Konisberg, 2008; HO y cols., 1998).

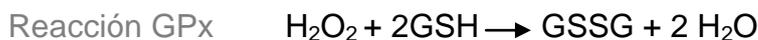
CATALASA

La catalasa (CAT) descompone al H_2O_2 directamente en O_2 y H_2O . Para ello, emplea dos moléculas iguales de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como oxidante (Konisberg, 2008; Wang y cols., 2006)



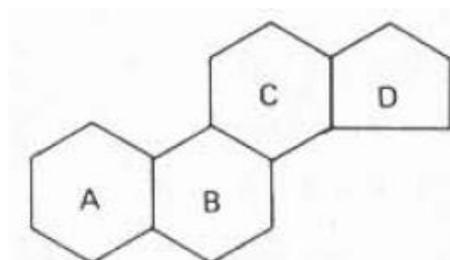
GLUTATIÓN PEROXIDASA

La glutatión peroxidasa (GPx) es el nombre genérico para una familia de múltiples isoenzimas que se caracterizan por su triada catalítica compuesta de selenocisteína, glutamina y triptófano. Cada una de ellas contiene un átomo de selenio (Se) en su sitio activo, en forma de selenocisteína. Esta enzima requiere del tripéptido, llamado glutatión reducido (GSH), para reducir al H_2O_2 en H_2O . El glutatión (GSH) es el donador de equivalentes reductores en dicha reacción; de esta manera, la reducción del H_2O_2 a H_2O y la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), ocurren simultáneamente (Konisberg, 2008).



1.5 17 β -ESTRADIOL

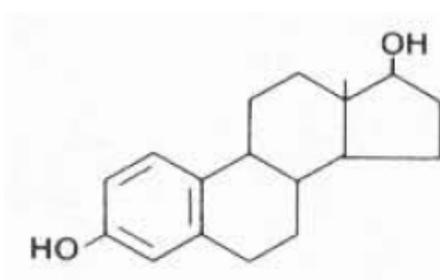
Los estrógenos son moléculas pertenecientes a la familia de las hormonas esteroideas, su precursor es el colesterol. La estructura común de los esteroides es el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno de 17 carbonos, cuyos 4 anillos se nombran de la A a la D. Todas las hormonas esteroideas de mamíferos se forman a partir del colesterol vía la pregnenolona a través de una serie de reacciones que ocurren ya sea en la mitocondria o en el retículo endoplásmico de las células de la glándula suprarrenal (Murray, 2004).



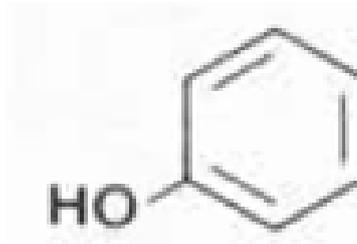
Núcleo del Ciclopentanoperhidrofenantreno (Murray, 2004)

PROPIEDADES QUÍMICAS

El 17 β -estradiol, es un estrógeno de origen ovárico, esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β -hidroxilo en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógeno (Wawrzak y cols., 1988).



Estructura del 17 β -estradiol (Murray, 2004)



Anillo Fenólico A (Murray, 2004)

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS

Los estrógenos además de ejercer efecto en los órganos reproductivos, también interactúan con órganos no reproductivos como el cerebro, sistema cardiovascular, hígado, piel, colon, sistema inmune, tejido adiposo, hueso y musculo esquelético (Meyer y cols., 2011; Wend y cols., 2012).

Existen dos receptores a estrógeno (RE), el receptor a estrógeno alfa (RE- α) y el receptor beta (RE- β). Ambos receptores se expresan en la mayoría de los tejidos, aunque por lo general en niveles más bajos que los encontrados en los tejidos reproductivos. El tejido adiposo subcutáneo e intra-abdominal expresan ambos RE- α y RE- β , predominantemente expresado el RE- α en el tejido adiposo intra-abdominal (Wend y cols., 2012).

Efectos genómicos

El modelo clásico o “genómico” de acción de RE sugiere que el receptor es activado al unir el ligando, en este caso el E₂, y actúa como un factor transcripcional al unirse al ADN estimulando la transcripción de ciertos genes, de ahí el nombre de receptores nucleares, ya que ejercen su acción a nivel del núcleo (Deroo y Korach, 2006; Evans, 1988; Beato y cols., 1996).

Este mecanismo de acción requiere la activación del receptor al unir su hormona específica después de haber atravesado la membrana, en

consecuencia, el proceso de transcripción es activado al formarse el complejo hormona-receptor (Deroo y Korach, 2006).

Efectos no genómicos

El modelo de acción “no genómico” es mediado por receptores de membrana celular RE- α o RE- β y median respuestas indirectas a través de cascadas de señalización. Es un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su efecto primario (Deroo y Korach, 2006; Falkenstein, 2000).

ANTECEDENTES PROTECTORES DEL 17 β -ESTRADIOL

Parte de la protección de las hormonas sexuales femeninas, se atribuye a las bien demostradas propiedades antioxidantes de los estrógenos, tanto in vivo al observarse que los estrógenos disminuyen la aparición de enfermedades cardiovasculares en mujeres post-menopáusicas (Lobo, 1990); como in vitro al demostrarse que los estrógenos disminuyen el índice de lipoperoxidación en microsomas de hígado de rata (Lacort y cols., 1995; Ruiz y cols., 1993). Además está bien establecido que los hombres desarrollan enfermedades cardiovasculares a más temprana edad en comparación con las mujeres pre-menopáusicas, lo que sugiere que las mujeres poseen una protección dada por las propiedades AOX de los estrógenos, por lo tanto se consideran cardioprotectores (Guarner y cols., 2011).

Adicionalmente, investigaciones han demostrado que la actividad de la GPx en hígado de rata hembra fue 60% más elevada en comparación con las ratas macho y hembra ovariectomizadas (Pinto y Bartley, 1969). Deroo y cols, (1994) demostraron que el E₂ puede regular la expresión de las tioredoxinas en el útero de ratones hembra mediado por RE- α .

Otro mecanismo de acción independiente a la activación de los RE fue demostrado por Behl y cols (1997) postularon que la actividad AOX del E₂ en

células neuronales es dependiente de la presencia del grupo hidroxilo (OH) en la posición del carbono 3 del anillo fenólico A de la molécula, sin embargo este mecanismo también había sido demostrado con anterioridad por Jellinck y Bradlow (1990), quienes postularon que el E₂ podía inhibir las cascadas oxidantes al donar el radical hidrogeno del anillo fenólico A (Wang y cols., 2006).

Otra de las propiedades AOx de los estrógenos, es la acción que ejerce sobre los niveles de glutatión (GSH) celular, importante AOx celular, se ha demostrado la protección en células neurales contra el estrés oxidante, a través de la actividad sinérgica entre los estrógenos y el GSH (Wang y cols., 2006).

Perez y cols (2009) demostraron que en el homogeneizado de riñón de ratas hembra que desarrollaron SM, la actividad de las enzimas AOx CAT y SOD estaba significativamente incrementada en el grupo SM en comparación con el grupo SM intactas. Los autores concluyeron que las ratas hembras están protegidas particularmente por efecto del estrógeno contra los efectos pro-oxidantes en el sistema renal inducido por el alto consumo de sacarosa en la dieta, pero este efecto protector disminuyó después de la ovx.

Por otra parte, la inflamación sistémica crónica de bajo grado es un proceso característico de la obesidad. En relación a esto, se ha demostrado en estudios epidemiológicos que las mujeres pre-menopáusicas son menos propensas a desarrollar inflamación en comparación con los hombres de la misma edad, esto sugiere que el estrógeno protege contra la inflamación.

Otros estudios muestran que las mujeres post-menopáusicas tienen mayor propensión a desarrollar adiposidad abdominal, asociado al aumento en los niveles sistémicos de citocinas inflamatorias, lo que indica que el estrógeno puede modular la adiposidad corporal y la inflamación sistémica (Stubbins y cols., 2012).

Stubbins y cols (2012) recientemente demostraron que en adipocitos de ratones hembra no ovx, ovx con reemplazo de E₂ y machos, sometidos a una

dieta alta en grasa durante 10 semanas, los estrógenos protegieron a las hembras de la inflamación y el estrés oxidante en el adipocito.

2. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES DEL MODELO SM

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo en rata con SM, una variante del modelo descrito por Reaven (Reaven y Ho, 1991), este modelo consiste en administrar a los animales 30% de sacarosa en al agua de bebida durante 24 semanas, los animales desarrollan: hipertensión, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, nefropatía y acumulación de tejido graso intra-abdominal (Baños y cols., 1997). Este cuadro patológico se observa frecuentemente en la clínica.

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

Se ha descrito en la literatura que el exceso de tejido adiposo genera estrés oxidante y que el 17β -estradiol posee características antioxidantes; sin embargo, dado que las investigaciones respecto a su capacidad antioxidante en el adipocito son escasas; propusimos investigar el efecto antioxidante de esta hormona en el adipocito de un modelo en rata hembra con SM.

HIPÓTESIS

El 17β -estradiol posee propiedades antioxidantes, que modularán el efecto oxidante del SM en el adipocito.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antioxidante del 17β -estradiol en el adipocito de un modelo en rata hembra con SM.

Objetivos Particulares

- Determinar el índice de lipoperoxidación en el adipocito
- Determinar la capacidad antioxidante no enzimática en el adipocito
- Determinar la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx en el adipocito

4. MATERIAL y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar hembras con un peso inicial de 100 ± 10 g. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas a temperatura controlada y tuvieron libre acceso al agua y alimento. El proyecto experimental fue realizado en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICH), aprobado por el comité del SICUAE de la FMVZ-UNAM, además se respetó lo establecido por la guía de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y para la eliminación de los residuos biológicos (NOM-087-ECOL-1995).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Cuatro grupos con 10 animales cada uno:

Grupo. Control (C)

Grupo. SM (Síndrome Metabólico)

Grupo. SM Ovx (Ovariectomizado)

Grupo. SM Ovx + E₂

TRATAMIENTO DIETETICO

Durante 24 semanas, el grupo C recibió agua y alimento comercial para roedores, los grupos SM recibieron el mismo alimento sólido pero se añadió 30% de sacarosa comercial en el agua de bebida.

TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

La ovariectomía se realizó bajo anestesia general (pentobarbital sódico, 63 mg/Kg de peso corporal, i.p.), se realizó una incisión longitudinal en el área abdominal y pélvica de la parte dorsal. Se separó la piel y el músculo y se realizaron dos incisiones en el músculo esquelético, una a cada lado de la primera incisión, se exteriorizaron los ovarios, se ligaron los cuernos uterinos,

se hizo un corte por encima de la ligadura y se retiraron los ovarios. Después de la extirpación se procedió a suturar los cortes (Pérez y cols., 2008).

REEMPLAZO HORMONAL

El E₂ soluble en agua marca SIGMA, se inyectó por vía intramuscular, a dosis de 270 microgramos/Kg de peso cada semana. El reemplazo hormonal se administró a partir de los 40 días de edad y hasta una semana antes del sacrificio (Torres y cols., 2007).

MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

Al final del tratamiento se les midió la presión arterial sistólica (PAS) con un pletismógrafo, consiste en un sistema que utiliza un sensor que se coloca en la cola del animal, conectado a un transductor de presión, envía las señales a la computadora equipada con un programa para la captura y procesamiento de datos con el programa SIEVART 1.1 (Pérez y cols., 2009).

SACRIFICIO

Antes de sacrificar a los animales se pesaron y se mantuvieron en ayuno de 12 h. El sacrificio de las ratas fue previa dislocación y posterior decapitación (Rijn y cols., 2011); después se realizó un corte longitudinal en la zona abdominal (Pérez y cols., 2009), se localizó, se disecó y se pesó el total del tejido adiposo intra-abdominal.

EXTRACCIÓN DE ADIPOCITOS

El método de extracción de adipocitos se realizó en base al método descrito por Rodbell con algunas modificaciones (Rodbell, 1964).

A 4 g de muestra de tejido adiposo, se agregaron 12.5 mg de colagenasa II disuelta en 10 ml de amortiguador de Krebs que contenía MgSO₄ 1.2 mM, KCl 4.7 mM, Ca₂Cl 2.5 mM, NaCl 24 mM, NaHCO₃ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2mM y albúmina al 2% a pH 7.35, posteriormente se procedió a cortar la grasa

mecánicamente con tijeras y se colocó en termoagitación suave a 37°C durante 90 min, después se filtró y centrifugó durante 1 min a 211 g se recuperó la capa densa superficial, se lavó con 10 ml de amortiguador de Krebs s/ albúmina y se centrifugó durante 1 min a 211 g este proceso se realizó 2 veces más y posteriormente, se agregó 900 µl de amortiguador de sacarosa que contenía (EDTA 1 mM, TRIS 10 mM y sacarosa 250 mM) y 100 µl de inhibidor de proteasa (1 mM PMSF, 2 mM pepstatina A, 2 mM leupeptina y 0.1% aprotinina), se agitó en vortex, se politronó, se centrifugó 150 g durante 5 min se recupero el sobrenadante y se congelo la muestra -30°C.

La concentración de proteína en el homogeneizado de adipocitos se determino por el método descrito por Bradford (Bradford, 1976).

ÍNDICE DE LIPOPEROXIDACIÓN

En el homogeneizado de los adipocitos, se midieron los índices de lipoperoxidación, un marcador de daño causado por los RL a los lípidos insaturados de la membrana celular, con el método convencional de TBARs (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) por sus siglas en ingles. El ensayo TBARs se fundamenta en la reacción del malondialdehído (MDA) con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico en un medio ácido y a una temperatura aprox de 100°C, formando un complejo colorido. A 100 µg de proteína; se le agregaron 50 µl de metanol con BHT al 4% y 1ml de amortiguador de fosfatos a pH 7.4, se mezcló vigorosamente en vortex por 5 seg, se incubó 30 min en baño maría a 37°C. Al final de la incubación, se agregaron 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8 M y se incubó 1 hora en baño maría a 100°C después de este tiempo y para detener la reacción, las muestras se colocaron en hielo y se agregó 1ml de KCl al 5% por muestra más 5 ml de n-butanol, se mezcló vigorosamente con vortex durante 30 seg y centrifugó a 376 g a temperatura ambiente durante 5 min. Después de la centrifugación se extrajo la fase de n-butanol y se midió la absorbencia a 532 nm. La curva de calibración se realizó utilizando tetraetoxipropano (Sigma) (Pérez y cols., 2009).

DETECCIÓN DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES CAT y SOD de Mn y Cu-Zn EN GELES NATIVOS DE POLIACRILAMIDA

La detección de las enzimas antioxidantes se realizó mediante geles nativos de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se corrieron de manera similar a la descrita por Laemmli (1970). El gel concentrador al 4% contenía 2.28 ml de agua desionizada y destilada, 1 ml de amortiguador pH 6.7, 0.66 ml de solución de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 0.010% de persulfato de amonio y 0.01% de TEMED. El gel resolvente al 8% tenía 2.43 ml de agua desionizada y destilada, 1.50 ml de amortiguador pH 8.9, 1.98 ml de solución de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 0.005% de persulfato de amonio y 0.02% de TEMED. La electroforesis se corrió en un amortiguador de tris-glicina pH 8.3 a 15-25 mA. Los geles se cargaron con 100 ng de CAT y 100 ng de SOD de bovino de hígado (Sigma) como estándar y 100 µg de proteína por muestra.

Al término de la electroforesis y para determinar la actividad de la CAT el gel se lavó con agua destilada por 10 min tres veces. Se incubó con H₂O₂ por 10 min, después se incubó con una mezcla al 1% de K₃ Fe(CN)₆ y 1% FeCl₃·6H₂O por 10 min en la oscuridad y se lavó con agua destilada; para determinar la actividad de la SOD, el gel se lavó con 2.45 mM de NBT (Sigma) por 20 min y se incubó en una solución que contenía EDTA 28 mM, riboflavina 0.028 mM, en amortiguador de fosfatos 36 mM pH 7.8, durante 15 minutos, posteriormente se expuso a una lámpara de UV durante 10 minutos y se lavó en agua destilada. Los geles de CAT y SOD se analizaron por densitometría con el programa Kodak versión (Image 3.5).

ACTIVIDAD DE LA GLUTATION PEROXIDASA

A 100 µg de proteína del homogeneizado de adipocitos se agregaron, en 1.6 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 que contenía N₃Na 6.5 mg, EDTA 1 mM, NADPH 0.2 mM, Glutación reducido 1 mM y Glutación reductasa 1 U/L, se incubó a 37 °C por 5 min. y se midió la absorbencia inicial a 340 nm inmediatamente se agregó 0.017 mM de H₂O₂ e incubó a 37 °C por 5 min y se midió la absorbencia final a 340 nm.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

En el homogeneizado de los adipocitos, se midió la capacidad antioxidante por el método de FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) por sus siglas en inglés, el ensayo FRAP se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico Fe^{3+} a ion ferroso Fe^{2+} . En presencia de TPTZ (2, 4, 6 – tripyridyl-s-triazine), la reducción se encuentra acompañada de la formación del complejo de color de Fe^{2+} . A 100 μg de proteína del homogeneizado se agregó 1.5 ml de la siguiente mezcla reacción: amortiguador de acetato 300 mM a pH 3.6, TPTZ 10 mM disuelto en HCL 40 mM y finalmente se añadió FeCl_3 a 20 mM, la mezcla reacción se hizo a una relación 10:1:1 respectivamente. La curva de calibración se realizó agregando 1.5 ml de la mezcla reacción y 50 μl de la dilución trolox (6-hydroxy-2-5-7-8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid) a distintas concentraciones 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.025 (mM). La solución madre 1.6 mM se disolvió en 200 μl de metanol y 100 μl de metanol el resto de las concentraciones, las diluciones se hicieron 1:1 a partir de la solución madre y se midió a 593 nm de absorbencia en frío y en ausencia de luz.

MEDICIONES EN SUERO

Las mediciones del colesterol, TG, glucosa, insulina, leptina y estradiol, se realizaron en el suero de todos los grupos al final del período experimental, en el INCMNSZ (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran) utilizando kits comerciales (Pointe Scientific Inc. Canton, Michigan, USA).

El índice HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance) por sus siglas en inglés, se emplea para medir la resistencia a la insulina, relacionando las concentraciones de glucosa e insulina plasmática. El cálculo se realizó aplicando la fórmula (Matthews y cols., 1985):

$$(\text{Insulina } \mu\text{UI/ml} * \text{Glucosa mmol/L}) / 22.5$$

Los valores de referencia para el índice HOMA son:

< 2.5	Normal
< 2.5 – 3	Riesgo (deterioro de la sensibilidad a insulina en los tejidos)
< 3	Resistencia a la insulina

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico y las figuras se realizaron con el programa Sigma Plot (SigmaPlot versión 11, Jandel Corporation, 1986-2010). Los datos se presentaron como la media \pm error estándar, la significancia estadística se determinó por el análisis de varianza de una vía y por la prueba de t student y una $p < 0.05$ se tomó como significativa.

5. RESULTADOS

PESO CORPORAL

El peso corporal en el grupo C (272.5 ± 6.2 g) fue significativamente menor ($p < 0.001$) en comparación con el grupo SM (305.4 ± 2.0 g). Sin embargo, el peso en el grupo SM fue significativamente menor ($p < 0.001$) al compararse con el grupo SM Ovx (377.4 ± 2.6 g), sin encontrar diferencia significativa al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx+E₂ (296.2 ± 3.2 g). (CUADRO 8.1)

PESO DE LA GRASA INTRA-ABDOMINAL

El peso de la grasa en el grupo C (4.8 ± 0.5 g) fue significativamente menor ($p < 0.01$) en comparación con el grupo SM (7.1 ± 0.4 g). Al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx (13.3 ± 0.7 g) se observó aumento significativo ($p < 0.001$) en el grupo SM Ovx, sin observarse diferencia significativa al comparar el grupo SM con el SM Ovx+ E₂ (6.0 ± 0.1 g). (CUADRO 8.1)

PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

En los resultados se observó que la PAS en el grupo C (116.6 ± 2.6 mm Hg) no presentó diferencia significativa al compararse con el grupo SM (125.3 ± 3.1 mm Hg). Al comparar la PAS del grupo SM con el grupo SM Ovx (146.1 ± 2.2 mmHg) se observó aumento significativo ($p < 0.001$) en el grupo SM Ovx, pero al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx+ E₂ (124.5 ± 1.8 mm Hg) no se observó diferencia significativa. (CUADRO 8.1)

COLESTEROL, GLUCOSA y TRIGLICÉRIDOS

El colesterol y la glucosa no presentaron diferencia significativa en ninguno de los grupos. Sin embargo los triglicéridos en el grupo C (57.2 ± 5.8 mg/dl) fue significativamente menor ($p < 0.001$) en comparación con el grupo SM (96.2 ± 10.0 mg/dl). Al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx ($105.5 \pm$

5.9 mg/dl) y SM Ovx+E₂ (108.7 ± 9.1 mg/dl) no hubo diferencia significativa. (CUADRO 8.1)

INSULINA

La insulina en el grupo C (2.7 ± 0.7 µUI/mL) fue significativamente menor (p<0.001) en comparación con el grupo SM (7.6 ± 0.9 µUI/mL). Al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx (11.6 ± 1.5 µUI/mL) se observó aumento significativo (p< 0.01) en el grupo SM Ovx, pero al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx+E₂ (6.1 ± 1.2 µUI/mL) no hubo diferencia significativa. (CUADRO 8.1)

ÍNDICE HOMA

El grupo C (0.5 ± 0.1) fue significativamente menor (p< 0.01) en comparación con el grupo SM (2.5 ± 0.4). Al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx (3.9 ± 0.6) se observó aumento significativo (p< 0.01) en el grupo SM Ovx, sin embargo no hay diferencia significativa al comparar el grupo SM con el SM Ovx+E₂ (1.8 ± 0.3). (CUADRO 8.1)

LEPTINA

Los valores de la leptina sérica en el grupo C (3.2 ± 0.5 ng/ml) no presentaron diferencia significativa en comparación con el SM (2.8 ± 0.4 ng/ml). Al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx (1.3 ± 0.1 ng/ml) se observó diferencia significativamente menor (p<0.01) en el grupo SM Ovx, sin embargo no hubo diferencia significativa al comparar el grupos SM con el SM Ovx+E₂ (2.1 ± 0.2 ng/ml). (CUADRO 8.1)

17β-ESTRADIOL

El E₂ en el grupo C (24.8 ± 3.2 pg/ml) no presentó diferencia significativa al compararse con el grupo SM (29.1 ± 5.8 pg/ml). Al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx (9.2 ± 1.1 pg /ml) fue significativamente menor (p< 0.01)

en el grupo SM Ovx. Al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx+E₂ (26.8 ± 3.6 pg/ml) no se observó diferencia significativa (CUADRO 8.1).

ÍNDICE DE LIPOPEROXIDACIÓN

La lipoperoxidación en el grupo C no presentó diferencia significativa en comparación con el grupo SM, pero el grupo SM Ovx hubo diferencia significativamente mayor (p=0.001) al comparar con el grupo SM y SM Ovx+E₂. (FIGURA 8.1 los resultados se expresan en nmol de MDA/mg de proteína).

CAPACIDAD AOx TOTAL

La capacidad AOx total en el grupo C no presentó diferencia significativa al compararse con el grupo SM, sin embargo se observó diferencia significativa menor en el grupo SM Ovx (p=0.01) al comparar con el grupo SM y SM Ovx+E₂. (FIGURA 8.2 los resultados se expresan en nmol de trolox / mg / proteína).

ACTIVIDAD de la SOD Cu-Zn

La actividad de la SOD Cu-Zn, en el grupo C no presentó diferencia significativa en comparación con el grupo SM, pero el grupo SM Ovx si presentó diferencia significativamente menor (p=0.03) al comparar con el grupo SM y SM Ovx+E₂. (FIGURA 8.3 los resultados se expresan en U/mg⁻¹)

ACTIVIDAD de la SOD Mn

La actividad de SOD Mn en el grupo C no presentó diferencia significativa en comparación con el grupo SM. Al comparar el grupo SM Ovx se observó disminución significativa (p=0.05) en comparación con el grupo SM y el grupo SM Ovx E₂. (FIGURA 8.3 los resultados se expresan en U/mg⁻¹)

ACTIVIDAD de la CAT

La actividad de la CAT, en el grupo C no presentó diferencia significativa al compararse con el grupo SM. En el grupo SM Ovx se observó diferencia

significativamente menor ($p=0.01$) al comparar con el grupo SM y el SM Ovx E_2 . (FIGURA 8.4 los resultados se expresan en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \times \text{mg}^{-1}$)

ACTIVIDAD de la GPx

La actividad de GPx en el grupo C no presentó diferencia significativa en comparación con el grupo SM. Sin embargo al comparar el grupo SM Ovx hubo diferencia significativamente menor ($p=0.04$) con el grupo SM. (FIGURA 8.5 los resultados se expresan en $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ NADPH oxidado)

6. DISCUSIÓN

La obesidad en el SM es consecuencia del balance energético positivo que resulta de la interacción entre varios factores, incluyendo la alimentación, disminución de la actividad física (sedentarismo y estilo de vida); así como factores genéticos, ambientales, culturales y económicos. Otros factores etiológicos que están asociados con la obesidad son algunas aberraciones cromosómicas, patologías hormonales, lesiones hipotalámicas o tumores, y algunos fármacos. Suficiente es la literatura que demuestra que en un estado patológico tal como el SM y la obesidad, existe incremento de la capacidad oxidante asociado a la disminución de la capacidad antioxidante creando desequilibrio que resulta en estrés oxidante sistémico (Savini y cols., 2013; Vávrová y cols., 2013; Hutcheson y Rocic, 2012). Añadido a lo anterior, la disminución de la síntesis endógena de estrógenos se asocia con la aparición o desarrollo del SM, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue conocer si el E_2 puede modular el estrés oxidante en el adipocito de un modelo en rata hembra con SM.

El peso corporal en los grupos SM fue mayor que en el grupo C, sin embargo, el grupo que presentó mayor aumento de peso fue el grupo SM Ovx, estos resultados son similares con los obtenidos en un estudio realizado por Stubbins y cols (2012), en el que demostraron que después de 10 semanas del consumo de una dieta alta en grasa los ratones macho tuvieron significativamente mayor peso corporal que los ratones hembra intactas; las hembras ovx imitaron a los ratones macho respecto a los cambios en el peso corporal, pero cuando se suplementaron con E_2 , los cambios en el peso corporal fueron mínimos y similares a las hembras no ovx.

Rogers y cols (2009) realizaron un estudio en un modelo murino sometidos a ovx, observaron hipertrofia adipocitaria y disminución del gasto energético, pero al reemplazar con E_2 los ratones ovx estuvieron protegidos de la hipertrofia en el adipocito. Sin embargo Davis y cols, mencionan que los estrógenos también regulan la ingesta de energía; esta regulación es dada por

acciones directas a través de los RE- α o por acción indirecta al disminuir los péptidos orexigénicos por lo tanto, la ausencia de los E₂ promueve la hiperfagia sin embargo, otras investigaciones muestran que la ovx no necesariamente se acompaña del aumento en la ingesta de alimentos (Brown y cols., 2010).

Los estrógenos como lo describe Cooke y Naaz (2004) pueden directamente inhibir la deposición del tejido adiposo disminuyendo la lipogénesis, esta acción sucede principalmente al disminuir la actividad del mRNA y la expresión de la lipoproteína lipasa (LPL), enzima que regula el almacenamiento de los TG en el adipocito. La ovx aumenta la LPL y la deposición de lípidos en el adipocito, por lo tanto la administración de dosis fisiológicas de estrógenos revierte esta deposición. Nuestros resultados muestran que el grupo SM Ovx presentó aumento del peso corporal y tejido adiposo intra-abdominal en comparación con el grupo SM y SM Ovx+E₂. Si bien los estrógenos también pueden afectar la lipólisis induciendo a la enzima lipasa sensible a hormonas (LSH) e incrementar la oxidación de los ácidos grasos, disminuyendo la probabilidad de que exista lipotoxicidad, se ha demostrado que los estrógenos incrementan la expresión de genes involucrados en la oxidación de los ácidos grasos (Stubbins y cols., 2012).

Los estrógenos son importantes reguladores de la deposición del tejido adiposo en humanos, roedores y otras especies (Cooke y Naaz, 2004), respecto a la grasa intra-abdominal, se observó que el grupo SM Ovx presentó mayor cantidad en comparación con los grupos SM y SM Ovx+E₂. En mujeres pre-menopáusicas, el tejido graso es localizado principalmente en depósitos subcutáneos, mientras que los hombres tienden a acumular más grasa en depósitos viscerales, independiente a la edad. Después de la pérdida de la síntesis endógena de estrógenos por la menopausia, se presenta redistribución hacia la adiposidad visceral, lo cual es sensible a la terapia con estrógenos (Meyer y cols., 2011).

El aumento del tejido graso intra-abdominal en el grupo SM Ovx, probablemente se debe a que en ausencia del E₂ el efecto sobre sus

receptores está inhibido, es importante mencionar, que el tejido adiposo subcutáneo e intra-abdominal expresan ambos receptores el RE- α y el RE- β , pero la expresión del RE- α es predominante en este último, de hecho de acuerdo con lo descrito por Meyer y cols (2011) los ratones hembras y machos que carecen de RE- α desarrollan obesidad central, efecto que se refleja en el incremento del tamaño y número de adipocitos.

La acumulación de tejido adiposo intra-abdominal, se considera factor de riesgo para el desarrollo del SM (Brown y cols., 2010), debido que es más expandible que el tejido adiposo subcutáneo, es metabólicamente activo y drena sustancias directamente al portal de la circulación, como citocinas inflamatorias y AGL que se asocia a resistencia a la insulina, hipertensión y riesgo cardiometabólico (Fox y cols., 2007; Hocking y cols., 2010; O'Rourke, 2009; Stubbins y cols., 2012).

En nuestros resultados la presión arterial sistólica, del grupo SM Ovx aumentó significativamente respecto a todos los grupos. Estos resultados coinciden con investigaciones básicas (Baños y cols., 1997) y clínicas, en las que se describe que la presión arterial es más elevada en hombres normotensos en comparación con mujeres de la misma edad y la prevalencia de la hipertensión en hombres también es mayor que en las mujeres premenopáusicas (Guarner y cols., 2011).

Añadido a lo anterior, se sabe que el óxido nítrico (NO) factor derivado del endotelio actúa como vasodilatador, por lo tanto modula la presión arterial (Pérez y cols., 2009), en la literatura se ha descrito que la producción del NO está preservada en hembras que en machos, en parte por el efecto de la acción de los estrógenos (Guarner y cols., 2011), esta información coincide con nuestros resultados el grupo C, SM y SM Ovx+ E₂ presentan disminución de la PAS en comparación con el SM Ovx. Otro estudio demostró, que el reemplazo con E₂ en ratas hembras con SM Ovx, incremento la actividad de la sintasa del óxido nítrico (eNOS), la vasodilatación dependiente del endotelio y disminución de la presión arterial (Pérez y cols 2007); además está descrito que los

estrógenos reducen la expresión de la endotelina, péptido derivado del revestimiento interno de los vasos sanguíneos e induce vasoconstricción, por lo tanto esta vasoprotección podría perderse en mujeres post-menopáusicas (Guarner y cols., 2011).

Dietas altas en carbohidratos, tales como fructosa, sacarosa o ambas, pueden inducir hipertrigliceridemia y reducción de las reservas antioxidantes (Pérez y cols., 2009). Los resultados muestran que los TG están aumentados en los grupos que desarrollaron SM y disminuidos en el grupo C; estos resultados son similares con los obtenidos por Pettersson y cols, donde indujeron SM a ratas hembras administrando una dieta alta en grasa en proporción del 60% de las kcal totales durante un período de 14 semanas y encontraron aumento significativo de TG en comparación con su C (Pettersson y cols., 2012). La evidencia sugiere que las mujeres post-menopáusicas presentan hipertrofia en el adipocito y que la actividad lipolítica es alta, lo cual puede explicar porque las mujeres post-menopáusicas presentan elevados niveles sistémicos de AGL (D'Eon y cols., 2005), también está descrito que los estrógenos pueden incrementar la oxidación de los ácidos grasos, por lo que disminuyen la probabilidad de lipotoxicidad (Campbell y cols., 2003). En otro estudio Pérez y cols (2012) demostraron en ratas con SM, que la hipertrigliceridemia sérica resultado de la ingesta del alto contenido de carbohidratos en la dieta, se asoció con hiperinsulinemia, aumento de la PAS y resistencia a la insulina.

Por otra parte, las alteraciones en el metabolismo de los lípidos y la distribución de la grasa corporal aunado a la deficiencia de estrógenos se han postulado como factores causales que contribuyen al aumento de la prevalencia de la resistencia a la insulina en mujeres post-menopáusicas en comparación con las pre-menopáusicas (Abbas y Elsamanoudy, 2011). La disminución de hormonas ováricas asociada a la menopausia u ovariectomía se relaciona con menor captación de glucosa mediada por la insulina. Los resultados muestran que los niveles de insulina en suero estuvieron incrementados en los grupos que desarrollaron SM en comparación con el

grupo C, pero el grupo SM Ovx presentó los valores más altos, por lo tanto, se deduce que el estrógeno tiene efecto protector ante el desarrollo de la hiperinsulinemia. El grupo SM Ovx fue el que presentó mayor índice de resistencia a la insulina en comparación con los grupos que desarrollaron SM. En un estudio Saglam y cols (2002) demostraron que la terapia de reemplazo hormonal incrementó la acción periférica de la insulina en mujeres postmenopáusicas y en otro estudio realizado por Abbas y Elsamanoudy (2011) determinaron los efectos de los estrógenos sobre la resistencia a la insulina y observaron que la administración del estrógeno en ratas ovx disminuyó significativamente la glucosa e insulina en plasma y el índice HOMA al compararlos con sus controles.

Se ha descrito que la insulina requiere la unión a sus receptores de la membrana celular para llevar a cabo sus acciones; por consiguiente, la estructura e integridad funcional de la membrana influyen en las propiedades del receptor de la célula. Las propiedades de la membrana celular especialmente su fluidez, dependen de la constitución de los ácidos grasos. El contenido de ácidos grasos saturados hará que sea más rígida, conduciendo a la disminución en la cantidad de receptores a la insulina, que podría causar resistencia e hiperinsulinemia (Pérez y cols., 2013).

Además, se sabe que elevadas concentraciones de H_2O_2 (100 μ M) disminuyen la afinidad del receptor a la insulina (Droge, 2002), nuestros resultados muestran que el grupo SM Ovx presento mayor índice de lipoperoxidación en comparación con el resto de los grupos experimentales, sugiriendo que la eliminación del E_2 por la Ovx incrementa las EROs que oxidan los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana celular, favoreciendo resistencia a la insulina (Abbas y Elsamanoudy, 2011).

Otro de los factores que promueven la resistencia a la insulina son los AGL inducción de la respuesta inflamatoria vía TLR-4. Stubbins y cols (2012) demostraron, que los ratones hembras Ovx sometidas a dietas elevadas en grasa, presentaron aumento de AGL y resistencia a la insulina. Se ha descrito

que los estrógenos pueden mejorar la sensibilidad a la insulina al disminuir la inflamación del tejido adiposo, además Brown y cols (2010) demostraron en estudios in vitro que el E₂ a través de los RE- α pueden disminuir el número de citocinas pro-inflamatorias. Las propiedades antiinflamatorias del E₂ pueden ser parcialmente explicadas por la habilidad de los RE al actuar como represores transcripcionales inhibiendo la actividad de NF- κ B (Abbas y Elsamanoudy, 2011).

Por otra parte, se ha descrito que la leptina adipocina sintetizada por el tejido adiposo (Coelho y cols., 2013), es proporcional a la grasa intra-abdominal (Chu y cols., 1999; Brown y cols; 2010), en nuestros resultados se observa que el grupo SM Ovx presentó significativamente niveles disminuidos de leptina al compararlo con el resto de los grupos que desarrollaron SM. Diversas investigaciones han demostrado que la leptina está aumentada en las mujeres en comparación con los hombres de la misma edad, en parte como resultado de la inhibición de los andrógenos y la estimulación de los estrógenos (Coelho y cols., 2013). La acción de la leptina es mediada a través del receptor específico Ob-Rb localizado principalmente en el hipotálamo, los estrógenos pueden ser moduladores de las acciones catabólicas de la leptina en el cerebro; altos niveles de estrógenos han sido asociados con el aumento de la sensibilidad a la leptina. La ovx reduce la sensibilidad a la leptina cuando se compara con la hembra intacta y esto puede ser restaurado al reemplazar con E₂ (Brown y cols., 2010).

Un estudio realizado por Alonso y cols (2006), confirmaron que el E₂ está directamente vinculado con la regulación específica de la expresión del receptor a la leptina Ob-Rb en el tejido adiposo y en el músculo esquelético. Este mismo grupo en otro estudio observó, que ratas Ovx presentaron significativamente menor expresión de mRNA que codifica para la leptina en el tejido adiposo en comparación con las ratas tratadas con E₂, lo que sugiere que el E₂ puede tener acción directa sobre el gen de la leptina en el adipocito (Alonso y cols., 2006).

Observaciones acerca de las diferencias de la reserva antioxidante asociada al género incluyen estudios en humanos y en especies animales. Los resultados de diversas investigaciones indican que las diferencias entre sexos son evidentes, con tendencia en las hembras a presentar mayor potencial antioxidante (Baños y cols, 2005). Se sabe que la actividad de las enzimas AOX SOD, CAT y GPx desempeña un papel importante en la obesidad asociado al SM. En nuestros resultados la actividad de la isoforma SOD Cu-Zn no presentó diferencia significativa al comparar el grupo C con el SM pero se encontró actividad significativamente disminuida en el grupo SM Ovx al compararlo con el grupo SM. Referente a la actividad de la isoforma SOD Mn, los resultados mostraron la misma tendencia que la isoforma Cu-Zn. Nuestros resultados coinciden con un estudio realizado por Kumar y cols (2011), en el que evaluaron el efecto antioxidante del E₂ en fracciones de hígado de ratas hembras de 3, 12 y 24 meses de edad, demostrando que con el envejecimiento aunado a la menopausia, había disminución de la actividad de la SOD comparado con el grupo C de 3 meses, observándose incremento en la actividad al reemplazar con estrógenos en los grupos de 12 y 24 meses, sin encontrar diferencias significativas entre estos dos grupos.

Otro estudio en homogeneizado de riñón de ratas con SM, donde evaluaron la actividad de las enzimas SOD Cu-Zn y Mn y el efecto modulador de los estrógenos, demostró que las hembras C y SM tenían mayor actividad en comparación con los machos y hembras ovx, pero el tratamiento con E₂ las normaliza (Pérez y cols; 2009). Así mismo Baños y cols, demostraron en el modelo SM, incremento significativo del estrés oxidante y disminución de la SOD en el corazón de las ratas macho al comparar con ratas hembras, también Busserolles y cols (2002) demostraron que la actividad de la SOD estaba disminuida en el corazón de ratas macho al compararse con las hembras, el tratamiento consistió en administrar sacarosa durante un período corto de 2 semanas.

Se ha demostrado que la fructosa o sacarosa pueden inactivar la CAT in vitro (Zhao W y cols; 2000); sin embargo los resultados muestran que la

actividad de la CAT en el homogeneizado de adipocitos no presento diferencia significativa al comparar el grupo C con el SM, pero hubo diferencia significativa al comparar el grupo SM con el grupo SM Ovx. Nuestros resultados son similares con los obtenidos por un grupo de investigadores, en el que observaron disminución significativa en la actividad de la CAT en el grupo de hembras SM Ovx al compararse con el grupo intacto SM y el grupo SM Ovx+E₂ en homogeneizado de riñón de ratas con SM. Por lo tanto nuestros resultados sugieren que los estrógenos pueden incrementar la actividad de la CAT (Pérez y cols., 2009). Pajovic y Saicic (2008) mencionan que en el cerebro de ratones hembra y macho, las hembras presentan menor oxidación y mayor actividad de la CAT.

En relación a la actividad de la GPx, nuestros resultados muestran que el grupo C no presentó diferencia significativa al compararlo con el grupo SM, pero si hubo disminución significativa en la actividad del grupo SM Ovx al compararlo con el grupo SM. Baltgalvis y cols (2010) demostraron que en el músculo esquelético de ratones, la expresión de los genes que codifican para GPx 3 es altamente sensible al E₂ y la regulación de la expresión es mediada por el RE- α . En concordancia con lo anterior otro estudio demostró que la actividad de la GPx estaba significativamente aumentada en mujeres premenopáusicas y disminuida en mujeres post-menopáusicas (Signorelli y cols., 2006). Así mismo otro estudio demostró que no hay diferencia significativa en la actividad de GPx en el cerebro de ratones hembra y macho, mientras que en el hígado la actividad de esta enzima era significativamente más elevada en hembras que en machos (Pajovic y Saicic, 2008).

Los resultados referentes a la actividad de las enzimas pueden explicarse a que los estrógenos poseen efecto antioxidante directo o indirecto uniendo sitios del ADN en la región promotora de los genes blanco. Se ha demostrado que los estrógenos pueden regular la vía del Nrf-2, factor de transcripción nuclear que controla la expresión e inducción coordinada de una batería de genes que codifican para las enzimas AOx de la fase II (CAT, GPx, SOD, entre otras). Apoyando lo anterior, Yu y cols, (2012) demostraron en

estudios in vitro, que el estrés oxidante inducido en células del miocardio, fue disminuido por el pre-tratamiento con estrógenos al promover la translocación nuclear de Nrf-2.

Por otra parte, la capacidad antioxidante total no enzimática en el homogeneizado de adipocitos, en el grupo C no presentó diferencia significativa en comparación con el grupo SM, pero si hubo diferencia significativa en el grupo SM Ovx al disminuir la capacidad antioxidante total. Asimismo, otro estudio donde determinaron la protección del E₂ sobre el estrés oxidante en el adipocito en un modelo murino sometido a dieta alta en grasa, los resultados mostraron que los ratones macho y hembra ovx tuvieron incremento significativo en (γ H2AX), biomarcador para estrés oxidante en el núcleo del adipocito en comparación con las hembras intactas y ovx con reemplazo de E₂. Los investigadores concluyen que el E₂ puede proteger del estrés oxidante en el tejido adiposo (Stubbins y cols 2012).

En consistencia con estudios previos encontramos que el E₂ disminuye la lipoperoxidación, en nuestros resultados no se hallaron diferencias significativas en el grupo C al compararse con el grupo SM, pero si entre el grupo SM Ovx, en comparación con los grupos SM y SM Ovx+E₂, los cuales presentaron valores similares de lipoperoxidación. Además, Taskiran y Evren (2012) demostraron que la lipoperoxidación inducida por el H₂O₂ en cultivos celulares de tejido adiposo fue atenuada por el pre-tratamiento con E₂, observándose el efecto antioxidante a 10 nM.

Signorelli y cols (2006) demostraron que el daño por estrés oxidante, medido por las concentraciones de 4-hidroxynenal (4-HNE), producto de desecho de la oxidación de los lípidos, se encontró significativamente aumentado en mujeres post-menopáusicas en comparación con las mujeres pre-menopáusicas, lo que sugiere que los estrógenos pueden proteger del daño inducido por lipoperoxidación.

El efecto de los estrógenos al disminuir el índice de lipoperoxidación puede explicarse dado que está descrito que el anillo fenólico A del E₂ es una

estructura clave en la protección antioxidante (Wang y cols., 2006; Richardson y cols., 2012). Wang y cols (2006) propusieron que la membrana celular es el blanco del efecto antioxidante de los estrógenos. Las acciones AOx de los estrógenos sobre la membrana celular es independiente a los RE y la estructura del anillo fenólico A podría desempeñar una importante función en este efecto. Para corroborar las propiedades AOx de los estrógenos, este mismo grupo examinó la acción de los estrógenos sobre los niveles del GSH celular y demostraron la interacción sinérgica entre los estrógenos y el GSH en la protección neuronal contra el EOx en células neuronales.

7. CONCLUSION

En base a los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que:

1. El 17β -estradiol protege a la rata hembra con SM, del aumento del peso corporal, acumulación de grasa intra-abdominal e hipertensión arterial sistólica.
2. Mejora la sensibilidad a la insulina disminuyendo la resistencia a la insulina y la sensibilidad a la leptina.
3. El EOx se incrementa en el adipocito de la rata hembra ovariectomizada con SM.
4. El 17β -estradiol en el adipocito de la rata hembra con SM:
 - Protege a la membrana celular del daño por lipoperoxidación.
 - Incrementa la actividad del sistema antioxidante no enzimático.
 - Incrementa la actividad de las enzimas SOD Mn y Cu-Zn, CAT y GPx.
5. El aumento del SM, la obesidad y el EOx presente en la rata hembra ovariectomizada; puede atenuarse con la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos. Sin embargo, aún es necesario realizar más estudios sobre la capacidad AOx del 17β -estradiol.

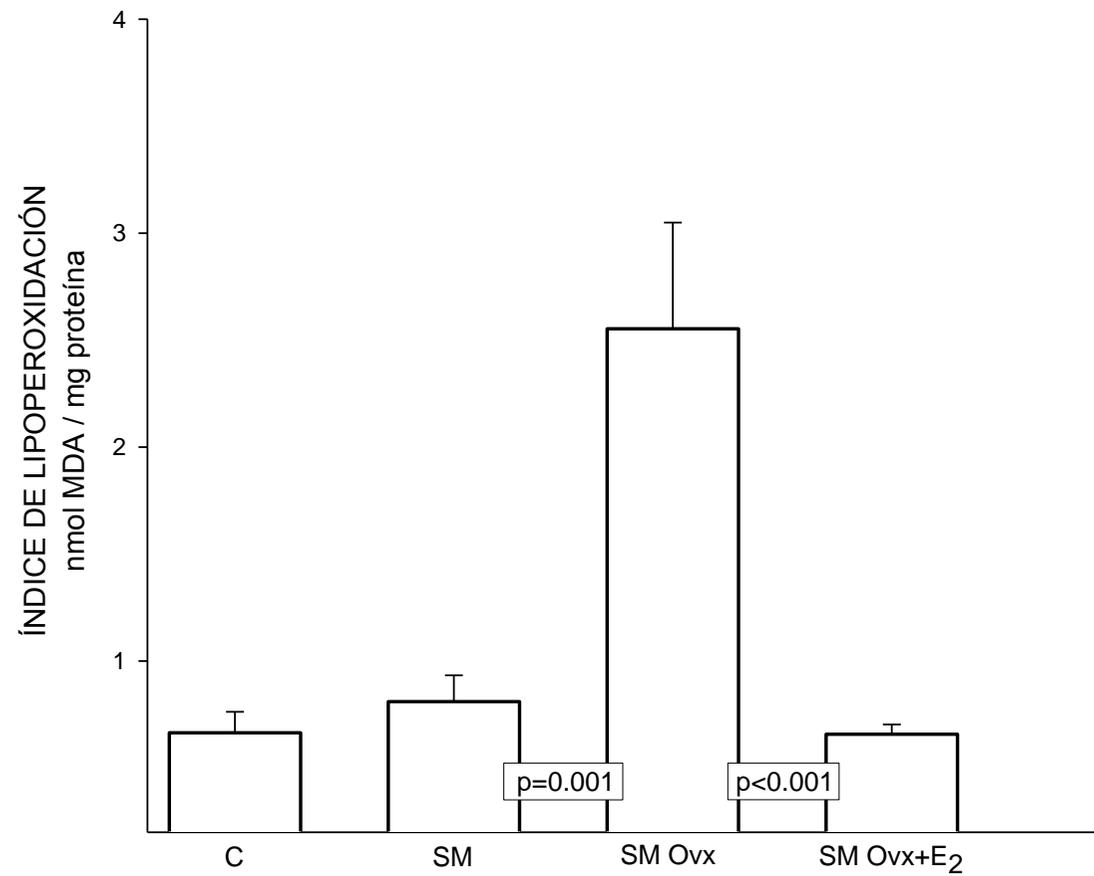
8. CUADROS y FIGURAS

CUADRO 8.1. EFECTO DEL E₂ EN EL MODELO CON SM SOBRE DIVERSOS PARÁMETROS.

PARÁMETRO	C	SM	SM Ovx	SM Ovx + E ₂
PESO CORPORAL (g)	272.5 ± 6.2	305.4 ± 2.0**	377.4 ± 2.6**	296.2 ± 3.2
GRASA INTRA-ABDOMINAL (g)	4.8 ± 0.5	7.1 ± 0.4*	13.3 ± 0.7 **	6.0 ± 0.1
PAS (mm/Hg)	116.6 ± 2.6	125.3 ± 3.1	146.1 ± 2.2**	124.5 ± 1.8
COLESTEROL (mg/dl ⁻¹)	68.2 ± 3.3	69.2 ± 5.0	69.7 ± 2.8	70.0 ± 3.6
TRIGLICERIDOS (mg/dl ⁻¹)	57.2 ± 5.8	96.2 ± 10.0**	105.5 ± 5.9	108.7 ± 9.1
GLUCOSA (mmol/dl ⁻¹)	6.4 ± 0.2	6.1 ± 0.3	7.7 ± 0.4	6.1 ± 0.2
INSULINA (μ UI/mL ⁻¹)	2.7 ± 0.7	7.6 ± 0.9**	11.6 ± 1.5*	6.1 ± 1.2
HOMA	0.5 ± 0.1	2.5 ± 0.4*	3.9 ± 0.6*	1.8 ± 0.3
LEPTINA (ng/ml)	3.2 ± 0.5	2.8 ± 0.4	1.3 ± 0.1*	2.1 ± 0.2
ESTRADIOL (pg/ml)	24.8 ± 3.2	29.1 ± 5.8	9.2 ± 1.1 *	26.8 ± 3.6

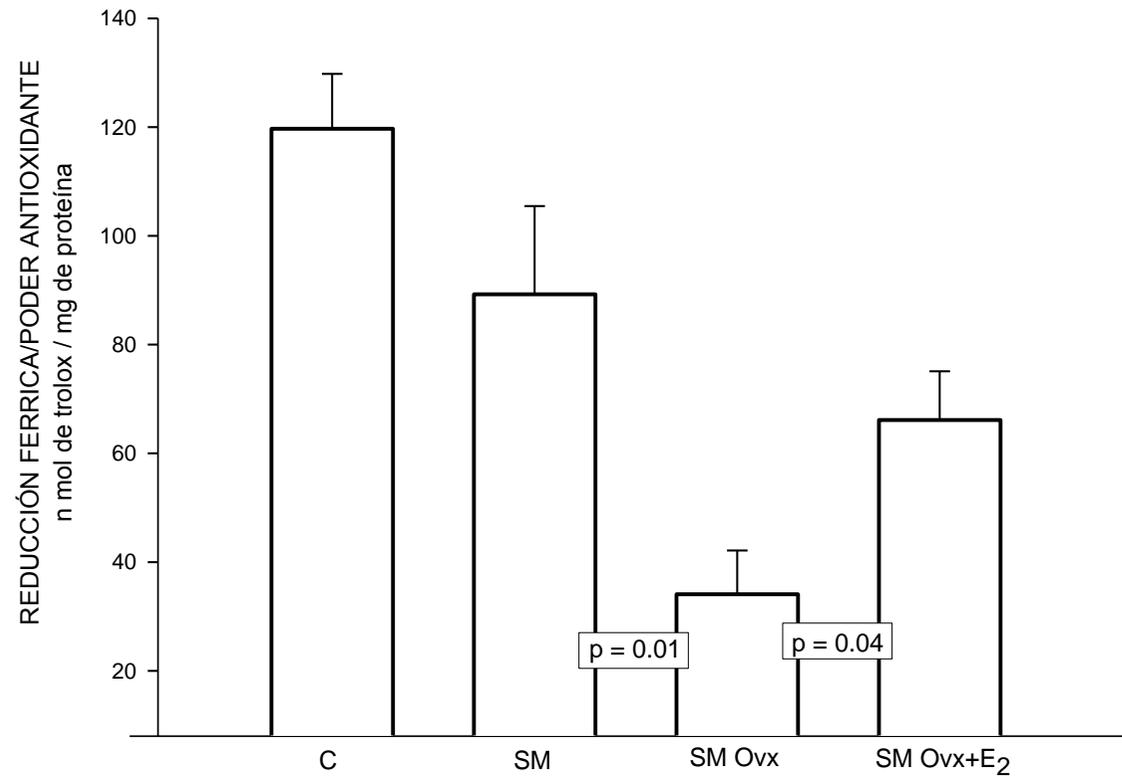
Los resultados se expresan en media ± error estándar; n=8 en cada grupo. C vs. SM. SM vs. SM Ovx: *P< 0.01 **P< 0.001.

FIGURA 8.1. EFECTO DEL E₂ SOBRE EL ÍNDICE DE LIPOPEROXIDACIÓN EN EL ADIPOCITO DE RATA HEMBRA CON SM



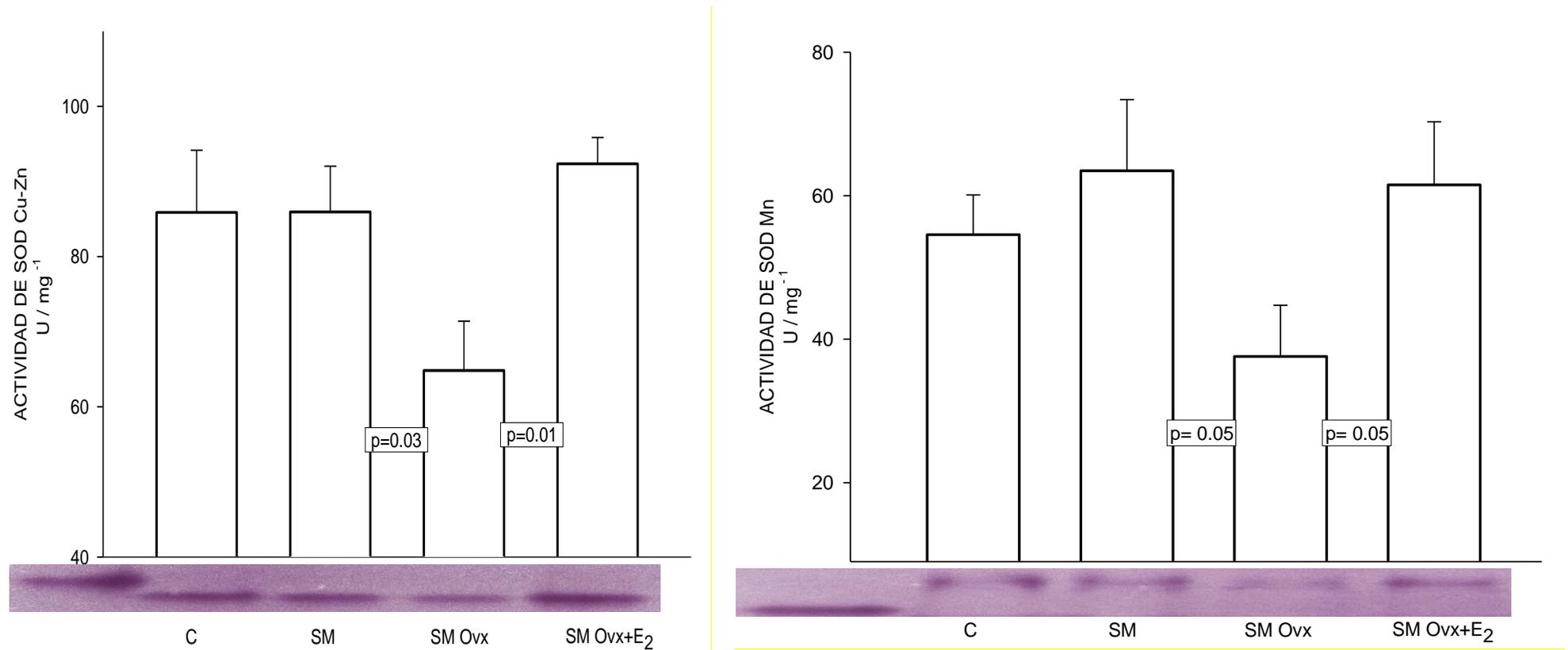
Significancia de la comparación del grupo C vs. SM (sin diferencia significativa). SM vs. SM Ovx.
Los resultados se expresan en media ± error estándar; n=8 en cada grupo.

FIGURA 8.2. EFECTO DEL E₂ SOBRE LA ACTIVIDAD NO ENZIMÁTICA EN EL ADIPOCITO DE RATA HEMBRA CON SM



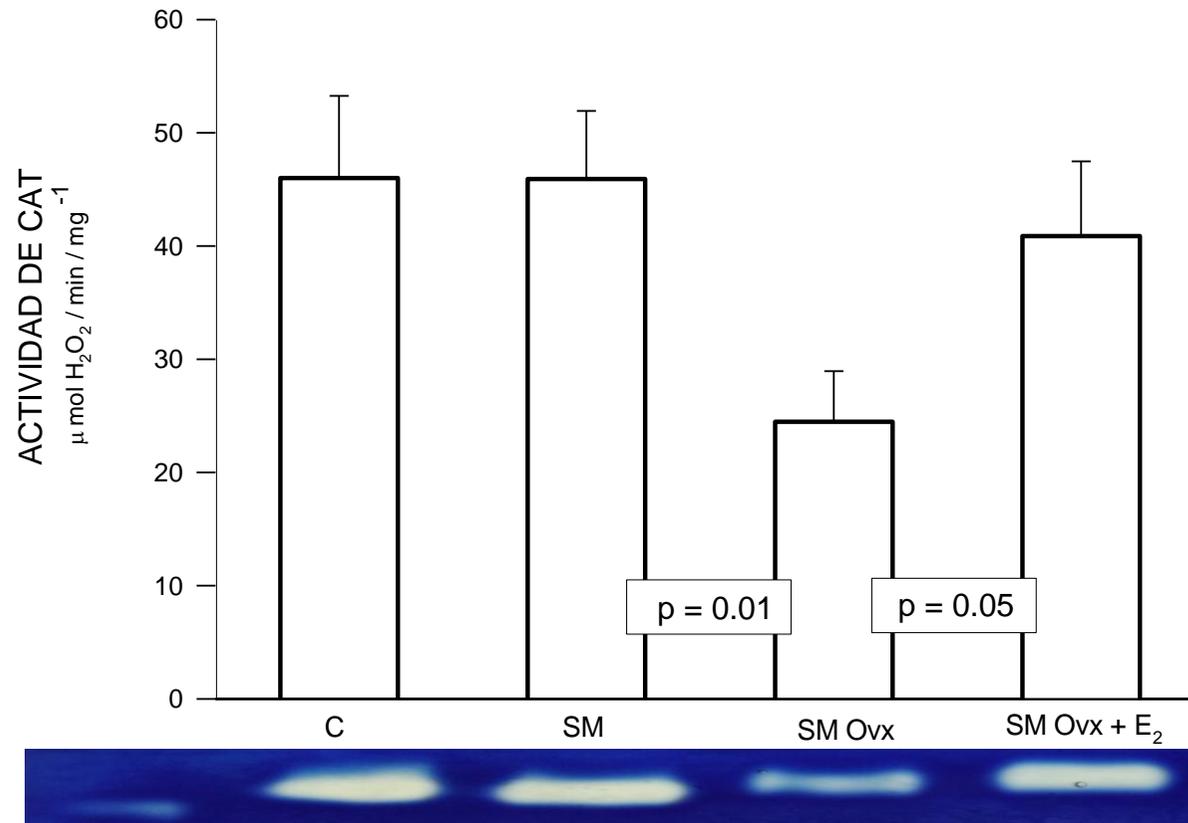
Significancia de la comparación del grupo C vs. SM (sin diferencia significativa). SM vs. SM Ovx.
Los resultados se expresan en media ± error estándar; n=8 en cada grupo.

FIGURA 8.3. EFECTO DEL E₂ SOBRE LA ACTIVIDAD DE SOD Mn y Cu-Zn EN EL ADIPOCITO DE RATA HEMBRA CON SM



Significancia de la comparación del grupo C vs. SM (sin diferencia significativa). SM vs. SM Ovx.
Los resultados se expresan en media ± error estándar; n=8 en cada grupo.

FIGURA 8.4. EFECTO DEL E₂ SOBRE LA ACTIVIDAD DE CATALASA EN EL ADIPOCITO DE RATA HEMBRA CON SM



Significancia de la comparación del grupo C vs. SM (sin diferencia significativa). SM vs. SM Ovx.
Los resultados se expresan en media ± error estándar; n=8 en cada grupo.

9. REFERENCIAS

- Abbas AM, Elsamanoudy AZ. 2011. Effects of 17 β -estradiol and antioxidant administration on oxidative stress and insulin resistance in ovariectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol* 89(7):497-504.
- Alemanly M. 2012. Do the interactions between glucocorticoids and sex hormones regulate the development of the metabolic syndrome?. *Front Endocrinol* 3(27):1-13.
- Alonso A, Fernández R, Moreno M, Ordóñez P, Díaz F, González C. 2007. Leptin and its receptor are controlled by 17 beta-estradiol in peripheral tissues of ovariectomized rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 232(4):542-9.
- Anagnostis P. 2012. Metabolic syndrome in the Mediterranean region: Current status. *Indian J Endocrinol Metab* 16(1):72-80.
- Ayres S, Abplanalp W, Liu JH, Subbiah MT. 1998. Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17beta on lipid peroxidation and DNA damage. *Am J Physiol* 274:E1002-1008.
- Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, Lowe DA. 2010. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS ONE* 5(4):1-11.
- Baños G, Carvajal K, Cardoso G, Zamora J, Franco M. 1997. Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens* 10(4):379-88.
- Baños G, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Zamora J, Pérez I, Pavón N, Pedraza-Chaverrí J. 2005. Antioxidant enzymes in hypertensive and hypertriglyceridemic rats: effect of gender. *Clin Exp Hypertens* 27(1):45-57.
- Beato M, Chavez S, Truss M. 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61(4):240-51.
- Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens structure activity relationship. *Mol Pharmacol* 51:535-547.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7(72):248-54.

- Brown LA, Kerr CJ, Whiting P, Finer N, McEneny J, Ashton T. 2009. Oxidant stress in healthy normal-weight, overweight, and obese individuals. *Obesity* 17(3):460–466.
- Brown LM, Gent L, Davis K, Clegg DJ. 2010. Metabolic impact of sex hormones on obesity. *Brain Res* 2(1350):77-85.
- Busserolles J, Mazur A, Gueux E, Rock E, Rayssiguier Y. 2002. Metabolic syndrome in the rat: females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet. *Exp Biol Med* 227(9):837-42.
- Campbell SE, Mehan KA, Tunstall RJ, Febbraio MA, Cameron-Smith D. 2003. 17 β -estradiol upregulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and lipid oxidative genes in skeletal muscle. *J Mol Endocrinol* 31(1):37-45.
- Chu SC, Chou YC, Liu JY, Chen CH, Shyu JC, Chou FP. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci* 64:2299-2306.
- Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. 2013. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci* 9(2):191-200.
- Cooke PS, Naaz A. 2004. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med* 229(11):1127-35.
- Crist BL, Alekel DL, Ritland LM, Hanson LN, Genschel U, Reddy MB. 2009. Association of oxidative stress, iron, and centralized fat mass in healthy postmenopausal women. *Journal of Women's Health* 18(6):795-801.
- Davis SR, Castelo-Branco C, Chedraui P, Lumsden MA, Nappi RE, Shah D, Villaseca P. 2012. Understanding weight gain at menopause. *Climacteric* 15(5):419-29.
- D' Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. 2005. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem* 280(43):35983-91.
- Deroo BJ, Hewitt SC, Peddada SD, Korach KS. 2004. Estradiol regulates the thioredoxin antioxidant system in the mouse uterus. *Endocrinology* 145(12):5485-92.

Deroo BJ, Korach KS. 2006. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116(3):561-569.

de Ferranti S, Mozaffarian D. 2008. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 54(6):945-55.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. 2002. *Physiol Rev* 82(1):47-95.

Emanuela F, Grazia M, Marco de R, Maria Paola L, Giorgio F and Marco B. 2012. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *J Nutr Metab* 2012:1-7.

Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854):889-95.

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52(4):513-56.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. 2011. Inflammation, oxidative stress and obesity. *Int J Mol Sci* 12:3117-3132.

Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB, O'Donnell CJ. 2007. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham heart study. *Circulation* 116(1):39-48.

García GE, De la Llata-Romero M, Kaufer-Horwitz M, Tusié-Luna MT, Calzada-León R, Vázquez-Velázquez V, Barquera-Cervera S, Caballero-Romo Ade J, Orozco L, Velásquez-Fernández D, Rosas-Peralta M, Barriguete-Meléndez A, Zacarías-Castillo R, Sotelo-Morales J; Grupo académico para el estudio, la prevención y el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico de la Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud, Hospitales Federales de Referencia y Hospitales de Alta Especialidad. 2008. Obesity and the metabolic syndrome as a public health problem: a reflection. *Salud Pública Mex* 50(6):530-47.

Guarner Lans V, Rubio Ruiz ME, Pérez Torres I, Baños de MacCarthy G. 2011. Relation of aging and sex hormones to metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Exp Gerontol* 46(7):517-23.

Gustafsson PE, Persson M, Hammarström A. 2011. Life course origins of the metabolic syndrome in middle-aged women and men: the role of socioeconomic status and metabolic risk factors in adolescence and early adulthood. *Ann Epidemiol* 21(2):103-10.

Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR. 2012. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev* 2012:1-12.

Halliwell B. 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1(5):358–364.

Higdon JV, Frei B. 2003. Obesity and oxidative stress. A direct link to CVD?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:365-367.

Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, Cao J. 1998. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect* 106(5):1219-28.

Hocking SL, Wu LE, Guilhaus M, Chisholm DJ, James DE. 2010. Intrinsic depot-specific differences in the secretome of adipose tissue, preadipocytes, and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells. *Diabetes* 59(12):3008-16.

Hong J, Stubbins RE, Smith RR, Harvey AE, Núñez NP. 2009. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutr J* 8(11):1-5.

Hutcheson R, Rocic P. 2012. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. *Exp Diabetes Res* 2012:1-13.

Jellinck PH, Bradlow HL. 1990. Peroxidase-catalyzed displacement of tritium from regiospecifically labeled estradiol and 2-hydroxyestradiol. *J Steroid Biochem* 35(6):705-10.

Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89(6):2548–2556.

Kersten S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2(4):282-6.

Kumar P, Kale RK, Baquer NZ. 2011. Estradiol modulates membrane-linked ATP ases, antioxidant enzymes, membrane fluidity, lipid peroxidation, and lipofuscin in aged rat liver. *J Aging Res* 2011:1-8.

Konisberg FM. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ed El Manual Moderno.

Lacort M, Leal AM, Liza M, Martín C, Martínez R, Ruiz-Larrea MB. 1995. Protective damage in vitro. *Lipids* 30(2):141-146.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.

Leibel R, Rosenbaum M, Edens N, Hirsch J. 1990. In vitro vs in vivo measures of lipolysis and reesterification in human adipose tissue. *Progress in obesity research* 237-242.

Lobo RA. 1990. Cardiovascular implications of estrogen replacement therapy. *Obstet Gynecol* 75:185-255.

Marcano Y, Torcat J, Ayala L, Verdi B, Lairer C, Maldonado M, de Vegas J. Funciones endocrinas del tejido adiposo. 2006. *Rev Venez Endocrinol Metab* 4(1):15-21.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419.

Meyer MR, Clegg DJ, Prossnitz ER, Barton M. 2011. Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. *Acta Physiol* 203(1):259-69.

Mirza MS. 2011. Obesity, visceral fat, and NAFLD: querying the role of adipokines in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *ISRN Gastroenterol* 2011:1-11.

Moreno MJ, Martínez JA. 2002. El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *Anales Sis San Navarra* 25:29S-39S.

Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Ortega F, Gómez-Ambrosi J, Ricart W, Frühbeck G, Fernández-Real JM. 2010. Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutr Metab* 9(7):1-7.

Murray KR, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 2004. Bioquímica de Harper. 16a. ed. Ed El Manual Moderno.

O'Rourke R. 2009. Inflammation in obesity-related disease. *Surgery* 145(3):255–259.

Pajović SB, Saicić ZS. 2008. Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. *Physiol Res* 57(6):801-11.

Paredes Salido F, Roca Fernández J. 2002. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm* 21(7):96-100.

Pérez-Torres I, El Hafidi M, Infante O, Baños G. 2008. Effects of sex hormone levels on aortic vascular reactivity and variables associated with the metabolic syndrome in sucrose-fed female rats. *Can J Physiol Pharmacol* 86:25-35.

Pérez-Torres I, Roque P, El Hafidi M, Diaz-Diaz E, Baños G. 2009. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radic Res* 43(8):761-71.

Pérez I, Baños G. 2011. Sex Hormones Receptors in Metabolic Syndrome Chapter III. *Sex Hormones: Development, Regulation and Disorders*. Nova Science Publishers.

Pérez M. 2007. El adipocito como órgano endocrino, implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Rev Med* 15:225-242.

Pérez TI, Zúñiga Muñoz A, Beltrán-Rodríguez U, Díaz-Díaz E, Martínez-Memije R, Guarner Lans V. 2013. Modification of the liver fatty acids by *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus (Malvaceae) infusion, its possible effect on vascular reactivity in a metabolic syndrome model. *Clin Exp Hypertens*. (en prensa)

Pettersson US, Waldén TB, Carlsson PO, Jansson L, Phillipson M. 2012. Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PLoS One* 7(9):1-10.

Pinto RE, Bartley W. 1969. The nature of the sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male and female rat liver. *Biochem J* 115(3):449–456.

Reaven GM, Ho H. 1991. Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens* 4:610-614.

Recasens M, Ricart W, Fernández-Real JM. 2004. Obesity and inflammation. *Rev Med Univ Navarra* 48(2):49-54.

Regitz ZV, Lehmkuhl E, Mahmoodzadeh S. 2007. Gender aspects of the role of the metabolic syndrome as a risk factor for cardiovascular disease. *Gend Med* 4:S162-77.

Richardson TE, Yu AE, Wen Y, Yang SH, Simpkins JW. 2012. Estrogen prevents oxidative damage to the mitochondria in friedreich's ataxia skin fibroblasts. *PLoS ONE* 7(4):1-9.

Rijn CMv, Krijnen H, Menting-Hermeling S, Coenen AML. 2011. Decapitation in Rats: Latency to Unconsciousness and the 'Wave of Death'. *PLoS ONE* 6(1):1-6.

Rocha VZ, Folco EJ. 2011. Inflammatory concepts of obesity. *Int J Inflamm* 2011:1-14.

Rogers NH, Perfield JW, Strissel KJ, Obin MS, and Greenberg AS. 2009. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology* 150(5):2161-8.

Rodbell Martin. 1964. Metabolism of isolated fat cells. *J Biol Chem* 239:375-380.

Rogers NH, Perfield JW, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. 2009. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology* 150(5):2161-8.

Rojas Martínez R, Aguilar Salinas CA, Jiménez Corona A, Gómez Pérez FJ, Barquera S and Lazcano Ponce E. 2012. Prevalence of obesity and metabolic syndrome components in Mexican adults without type 2 diabetes or hypertension. *Salud Publica Mex* 54(1):7-12.

Rubio Ruíz ME, Vázquez Meza H, Guarner Lans V. 2013. El síndrome metabólico como proceso metabólico en: *Anestesia cardiovascular*. 4a ed. Ed Alfil 157–167.

Ruiz Larrea MB, Garrido MJ, Lacort M. 1993. Estradiol-induced effects on glutathione metabolism in rat hepatocytes. *J Biochem* 113(5):563-567.

Sáez GT. 2005. Biopatología de los radicales libres. Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías. Ed Real academia de farmacia de Madrid 201-224.

Saglam K, Polat Z, Yilmaz MI, Gulec M, Akinci SB. 2002. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on insulin resistance. *Endocrine* 18(3):211-4.

Sarmiento Méndez LM, Roca-Cusachs Coll A, Arroyo Díaz JA, Benet Gustà MT, Solé Villa MJ, Franco Peral M. 2008. Comparison of the definitions of the metabolic syndrome according to ATP III and IDF. *Rev Clin Esp* 208(7):333-8.

Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. 2013. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci* 14(5):10497-538.

Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S, Pino LD, Costa MP, Marchese G, Celotta G, Cassibba N, Pennisi G, Caschetto S. 2006. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas* 53(1):77-82.

Singla P, Bardoloi A, Parkash A. 2010. Metabolic effects of obesity: a review. *World J Diabetes* 1(3):76-88.

Suganami T, Tanaka M, Ogawa Y. 2012. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. *Endocr J* 59(10):849-57.

Stradecki HM, Jaworski DM. 2011. Hyperphagia and leptin resistance in tissue inhibitor of metalloproteinase-2 deficient mice. *J Neuroendocrinol* 23(3):269-81.

Stubbins RE, Najjar K, Holcomb VB, Hong J, Núñez NP. 2012. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 14(1):58-66.

Tang J, Yan H, Zhuang S. 2012. Inflammation and oxidative stress in obesity-related glomerulopathy. *Int J Nephrol* 2012:1-11.

Taskiran D, Evren V. 2012. Estradiol protects adipose tissue-derived stem cells against H₂O₂ induced toxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 26(8):301-7.

Torres IP, El Hafidi M, Zamora-González J, Infante O, Chavira R, Baños G. 2007. Modulation of aortic vascular reactivity by sex hormones in a male rat model of metabolic syndrome. *Life Sci* 80(23):2170-80.

Tripathi YB, Pandey V. 2012. Obesity and endoplasmic reticulum (ER) stresses. *Frontiers in immunology* 3(240):1-9.

Vincent HK, Powers SK, Dirks AJ, Scarpace PJ. 2001. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders* 25(3):378–388.

Vincent HK, Taylor AG. 2006. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *International Journal of Obesity* 30(3):400–418.

Vávrová L, Kodydková J, Zeman M, Dušejovská M, Macášek J, Staňková B, Tvrzická E, Zák A. 2013. Altered activities of antioxidant enzymes in patients with metabolic syndrome. *Obes Facts* 6(1):39-47.

Wang X, Dykens J, Perez E, Liu R, Yang S, Covey D, Simpkins J. 2006. Neuroprotective effects of 17 β -estradiol and nonfeminizing estrogens against H₂O₂ toxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Mol Pharmacol* 70(1):395-404.

Wawrzak Z, Duax WL, Strong PD, Weisz J. 1998. Steroid structure and function. Molecular conformation of 4-hydroxyestradiol and its relation to other catechol estrogens. *J Steroid Biochem* 29(4):387-92.

Wend K, Wend P, Krum SA. 2012. Tissue-specific effects of loss of estrogen during menopause and aging. *Front Endocrinol* 8:3-19.

Xie B, Waters MJ, Schirra HJ. 2012. Investigating potential mechanisms of obesity by metabolomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012:1-10.

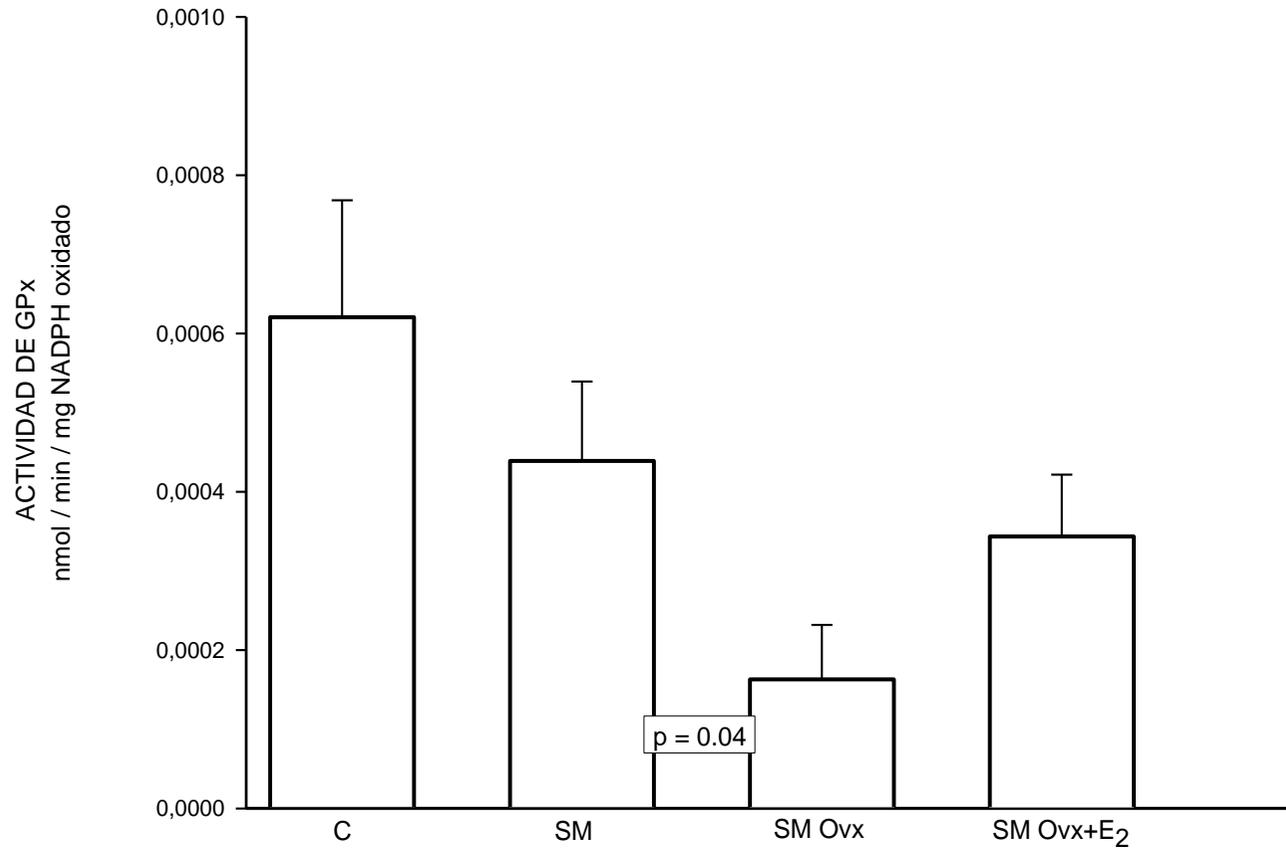
Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74(1):139-62.

Yu J, Zhao Y, Li B, Sun L, Huo H. 2012. 17 β -estradiol regulates the expression of antioxidant enzymes in myocardial cells by increasing Nrf2 translocation. *J Biochem Mol Toxicol* 26(7):264-9.

Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, Madeo F. 2012. Fat signals lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* 15(3):279-91.

Zhao W, Devamanoharan PS, Varma SD. 2000. Fructose induced deactivation of antioxidant enzymes: preventive effect of pyruvate. *Free Radic Res* 33(1):23-30.

FIGURA 8.5. EFECTO DEL E₂ SOBRE LA ACTIVIDAD DE GPx EN EL ADIPOCITO DE RATA HEMBRA CON SM



Significancia de la comparación del grupo C vs SM (sin diferencia significativa). SM vs SM Ovx.
Los resultados se expresan en media ± error estándar; n=8 en cada grupo.