



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**CORRELACIÓN ENTRE ESTRÓGENOS SÉRICOS, ENZIMAS  
ANTIOXIDANTES Y CONDICIÓN CORPORAL EN HEMBRAS CANINAS  
OOFOROSALPINGOHISTERECTOMIZADAS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**PRESENTA**

**LINALOE GUADALUPE MANZANO PECH**

**TUTOR PRINCIPAL**

**SARA DEL CARMEN CABALLERO CHACÓN, FMVZ-UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**ISRAEL PÉREZ TORRES, INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA**

**MARIO PÉREZ MARTÍNEZ, FMVZ-UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO**

**JULIO 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por convertirse en mi segundo hogar.

A la Clínica Veterinaria Meztli por apoyarme, facilitarme y permitirme evaluar a los perros que acudían a consulta para este proyecto.

A la Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón por ser mi asesora de tesis, por siempre confiar en mí, apoyarme, brindarme su amistad, dedicación y motivarme a superarme cada día.

Al Dr. Israel Pérez Torres definitivamente nunca encontraré las palabras para agradecerle lo que ha hecho por mí, gracias por ser una inspiración para seguir en el mundo de la investigación, gracias por su paciencia, apoyo y tiempo. Gracias por las risas y por sus contribuciones, que sin duda alguna me ayudarán a ser mejor persona.

Al MVZ. Adrián Moreno Gómez por estar a mi lado y apoyarme incondicionalmente en esta aventura, gracias por tu paciencia, dedicación y conocimientos, sin ti esto no sería igual.

Al Dr. José Juan Martínez Maya y a la Dra. Inda Marcela gracias por tenerme siempre presente y apoyarme en todo momento, nunca olvidaré lo que han hecho por mí.

A la Lic. Alicia Velasco y a la MC. MVZ Nidia Gualo por su amistad, apoyo y siempre alentarme en cada uno de mis proyectos.

Al Dr. Eulises Díaz Díaz, la Dra. Frida Salmerón Sosa y la Dra. Ana Delia Rodríguez Cortez por su apoyo técnico, los conocimientos proporcionados y las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Al Dr. Israel Pérez Torres, al Dr. Mario Martínez Pérez, al Dr. Carlos Gutiérrez Olvera y al Dr. Roberto Díaz Torres por aceptar ser parte de mi jurado y enriquecer este trabajo con sus consejos.

Al Dr. Carlos Gutiérrez Olvera por brindarme su tiempo y su opinión siempre honesta, gracias por su apoyo y por ser un ejemplo a seguir.

Al MVZ. Roberto Durán Sampallo y a los laboratorios SEVEPAC, por su apoyo técnico, por los conocimientos brindados y por tener la mejor actitud hacia mi proyecto y siempre decir: “todo sea por la investigación”.

A mi amiga la Dra. Claudia Karina Alarcón Colín por siempre aconsejarme en mi vida profesional y personal, por no importar el tiempo y estar presente a cualquier hora del día, gracias por tu amistad sincera.

A la MMVZ. Patricia Alejandra Guerrero Sánchez, por brindarme su amistad desde que empezamos este camino como MVZ, por ser mi traductora en las

clases de nutrición, por brindarme tus conocimientos de una manera amena y sincera y por el perrito súper gordito.

A la MC. MVZ. Laura Piña y la MC. MVZ. Anahí García sin duda alguna la maestría no hubiera sido igual sin ustedes, hicieron mis clases divertidas, fuimos cómplices y espero tener más días y años con ustedes, gracias por aguantar mi sentido del humor y por esos cafés en las mañanas. Nunca cambien, ya tienen un lugar en mi corazón.

## **DEDICATORIAS**

A mi padre el Dr. Fernando César Manzano quién se unió a la fuerza, pero sé que siempre está presente en cada momento de mi vida, sin ti esto no sería posible, siempre fuiste mi ejemplo de superación personal, gracias por hacerme la persona que soy.

A mi mamá María Guadalupe Pech Ek gracias por estar a mi lado y siempre darme la fortaleza que a veces dudo tener, eres muy importante en mi vida, gracias por creer en mí.

A mis hermanos César Isai y César Ibrahim, esta vida sin ustedes no sería lo mismo, gracias por estar a mi lado en los momentos difíciles, y siempre aconsejarme tanto en mi vida personal como profesional.

A mis amigos peludos Wera, Pelusa, Thazmania, Fidencio, Vale, Cera, Jabba, Neki, Reina, Charly, Xolot, Yolot, Peludito, Sr Rodríguez, y Concha gracias por ser parte de mi vida.

Al MVZ. Adrián Moreno por darme un hogar en la Clínica Veterinaria Meztli y apoyarme en mis estudios, sin duda siempre te estaré agradecida (aunque a veces mi carácter diga otra cosa). Gracias por darme la confianza que a veces me falta y por estar siempre motivándome para ver hacia adelante.

Al Dr. Israel Pérez Torres por tener ese entusiasmo y confianza todos los días que contagia a sus alumnos para ser mejores y por ser una de las personas que creyó y cree en mí. Muchas gracias por todo.

**“Do, or do not. There is no try”**

**Maestro Yoda.**

## RESUMEN

**Introducción.** El estrés oxidante (EO) es la consecuencia de la deficiencia de moléculas protectoras naturales y/o de la excesiva exposición a agentes generadores de radicales libre (RL). Los estrógenos (ESTs) tienen propiedades antioxidantes *per se* debido a sus características estructurales, además, interactúan positivamente con las enzimas antioxidantes y el tejido adiposo. Debido a que los estudios que evalúan el estado oxidante-antioxidante después de la realización de la ooforosalingohisterectomía son escasos, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la OSH en el sistema oxidante-antioxidante y cuantificar su influencia en los cambios morfológicos de los adipocitos subcutáneos y condición corporal en hembras caninas. **Material y métodos.** Se utilizaron 12 hembras caninas de entre 1 a 5 años de edad, que se encontraban en condición corporal de 3 de acuerdo al peso y al porcentaje de grasa corporal (%GC). Se realizó la OSH lateral y se tomaron muestras histológicas de tejido adiposo subcutáneo para determinar los cambios morfológicos en diferentes intervalos de tiempo: en condiciones basales, al primer y sexto mes posterior a la OSH. En el suero se determinaron las concentraciones de colesterol (CT), triglicéridos (TG), glucosa, insulina, índice HOMA,  $17 \beta$  estradiol ( $17 \beta$ -E<sub>2</sub>) y testosterona (T); así como la ec-SOD, peroxidasas, GSH, GPx, GST, GR, LPO, FRAP, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y vitamina C. **Resultados.** La prueba de correlación múltiple de Spearman entre el  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> y el sistema antioxidante no fue evidente. Sin embargo, la prueba t de Student mostró que la actividad de las enzimas ec-SOD, peroxidasas, GSH, GPx y la GST presentaron diferencias significativas en condiciones basales en comparación al sexto mes posterior a la OSH ( $p \leq 0.05$ ). La LPO aumentó y la vitamina C disminuyó después de la OSH, reduciendo la capacidad antioxidante. Se observó que la concentración del  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> mostró una tendencia a disminuir seis meses después de la OSH, lo que se reflejó con el aumento del %GC y la hipertrofia del tejido adiposo subcutáneo desde el primer mes acentuándose al sexto mes ( $p=0.001$ ). **Conclusión.** Los resultados obtenidos sugieren que la disminución del  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> como consecuencia de la OSH altera la actividad de las

enzimas antioxidantes en el suero, lo que a su vez aumenta la LPO y disminuye la capacidad antioxidante. Estos cambios se asociaron con la condición corporal, aumento en el peso corporal y con la hipertrofia del tejido adiposo subcutáneo.

**Palabras clave:** Estrés oxidante, sistema oxidante-antioxidante, hembras caninas, ooforosalingohisterectomía,  $17\beta$ -E<sub>2</sub>, adipocito.

## Abstract

**Introduction.** Oxidative stress (EO) is the result of a deficiency of natural protective molecules against free radicals (RL) and/or excessive exposure to them or to their generating agents. Estrogens (ESTs) have antioxidant properties *per se* due to their structural features; moreover, they interact positively with antioxidant enzymes and adipose tissue. Because there are just a few studies that evaluate oxidant-antioxidant status after oophorectomy (OSH) in female dogs, the aim of this study was to determine the effect of OSH on oxidant-antioxidant system and quantified its influence on morphological changes in subcutaneous adipocytes and body condition in female dogs.

**Material and methods.** 12 female dogs between 1 and 5 years of age, classified as body condition 3 according to weight and body fat (%GC). Lateral OSH was performed and histological samples of subcutaneous adipose tissue were used to determine morphological changes of adipocytes under basal conditions, first and sixth month after OSH. Serum concentrations of cholesterol, triglycerides, glucose, insulin, HOMA index, 17  $\beta$ -estradiol (17  $\beta$ -E<sub>2</sub>); antioxidant system as: extracellular superoxide dismutase (ec-SOD), peroxidases, glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO), capacity antioxidant total (TAC), vitamin C and nitrates/nitrites ratio (NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) were determined in basal conditions, one and six months after the surgery. **Results.** Spearman multiple correlation test between 17  $\beta$ -E<sub>2</sub> and antioxidant system was not evident. But paired Student t test showed that the activity of the enzymes ec-SOD, peroxidases, GSH, GPx, and GST were significant ( $p \leq 0.05$ ) 6 months after surgery: LPO was increased and vitamin C decreased ( $p = 0.03$ ) after OSH, reducing the antioxidant capacity. The concentration of estradiol (17  $\beta$ -E<sub>2</sub>) showed a tendency to decrease six months after OSH, it was reflected as an increase on %GC and the hypertrophy of subcutaneous adipose tissue was after OSH from the first month and was further accentuated at six months ( $p = 0.001$ ). **Conclusion.** The results suggest that the decrease of 17  $\beta$ -E<sub>2</sub>, as a consequence of OSH, alters the activity of antioxidant enzymes in serum which, in turn, increase LPO and decrease the antioxidant activity. These changes were



associated with body condition and increase in body weight and hypertrophy of subcutaneous adipose tissue.

**Key words.** Oxidant stress, oxidant-antioxidant system, oophorosalingohysterectomy, female dogs,  $17\beta\text{-E}_2$ , adipocyte.

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>%GC</b>	% de grasa corporal
<b>17 <math>\beta</math>-E<sub>2</sub></b>	17 $\beta$ estradiol
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>Akt</b>	Proteína quinasa B
<b>AMPK 5</b>	Proteína quinasa activada por AMP
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta antioxidante
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>C</b>	Carbono
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CC</b>	Condición corporal
<b>CDNB</b>	1-cloro-2,4 dinitrobenceno
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	Metanol
<b>ClFe<sub>3</sub></b>	Cloruro férrico
<b>CP</b>	Circunferencia pélvica
<b>CREB</b>	Elemento de respuesta del AMPc vinculante
<b>CT</b>	Colesterol
<b>E<sub>1</sub></b>	Estrona
<b>ESTs</b>	Estrógenos
<b>E<sub>3</sub></b>	Estriol
<b>ec-SOD</b>	Superóxido dismutasa extracelular
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EER<math>\alpha</math></b>	Receptor $\alpha$ relacionado con estrógenos
<b>Ellman</b>	5,5´Ditiobis 2-ácido nitrobenzoico
<b>EO</b>	Estrés oxidante
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Cloruro de hierro
<b>FRAP</b>	Capacidad antioxidante total
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>GPER</b>	Receptor de estrógeno acoplado a proteína G
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HO-1</b>	Hemo-oxigenasa 1
<b>HO<sub>2</sub></b>	Radical perhidroxilo
<b>HOMA</b>	Evaluación del modelo homeostático
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormonas
<b>IRS1</b>	Sustrato de receptor de insulina 1
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Amortiguador de fosfatos
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>LPO</b>	Lipoperoxidación
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>NADPH+</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazolio

<b>NF-KB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NRF</b>	Factor respiratorio nuclear
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno molecular
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superóxido
<b>OSH</b>	Ooforosalingohisterectomía
<b>OH·</b>	Hidroxilo
<b>OVH</b>	Ovariohisterectomía
<b>OVX</b>	Ovariectomía
<b>P<sub>4</sub></b>	Progesterona
<b>PPAR <math>\gamma</math></b>	Receptor gamma activado de proliferación del peroxisoma
<b>RC</b>	Rodilla al corvejón
<b>RE</b>	Receptores de estrógenos
<b>Re<math>\alpha</math></b>	Receptores de estrógenos alfa
<b>Re<math>\beta</math></b>	Receptores de estrógenos beta
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>Redox</b>	Oxido-reducción
<b>RL</b>	Radical libre
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>T</b>	Testosterona
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletioletilendiamina
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>Vitamina C</b>	Ácido ascórbico
<b>Vitamina E</b>	Alfa tocoferol
<b>WAT</b>	Tejido adiposo blanco (por sus siglas en inglés)

## INDICE

Abreviaturas	IX
I.    Introducción	1
Estrés oxidante	1
Radicales libres	1
Antioxidantes	2
Superóxido dismutasa	3
Glutación	3
Glutación peroxidasa	3
Vitamina C	4
Estrógenos	4
Participación de los estrógenos en el estrés oxidante	5
Ovariohisterectomía	6
Participación de los estrógenos en el metabolismo energético	7
Estrógenos y tejido adiposo	7
Efecto de la ovariohisterectomía en los marcadores del estrés oxidante en hembras caninas	8
Estrógenos y diferenciación de los adipocitos	10
II.    Justificación	11
III.   Hipótesis	11
IV.   Objetivo general	12
V.    Objetivos específicos	12
VI.   Material y métodos	13
Muestra animal	13
Criterios de inclusión	13
Criterios de exclusión	13

Lugar de muestreo	13
Método de obtención de datos morfométricos, peso y CC	14
Toma y mediciones en muestra sanguínea	15
Citología vaginal exfoliativa	16
Ooforosalingohisterectomía lateral	16
Histología en tejido adiposo	17
Determinación de enzimas antioxidantes en suero	17
Análisis estadístico	21
VII.    Resultados	22
VIII.   Discusión	27
IX.    Conclusión	35
X.     Limitantes del estudio	35
XI.    Referencias	52
XII.   Anexos	62

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Lista de algunos prooxidantes, oxidantes y antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos del organismo	2
<b>Cuadro 2.</b> Efecto de los estrógenos sobre la lipólisis/lipógenesis	9
<b>Cuadro 3.</b> Características generales de los individuos experimentales	36
<b>Cuadro 4.</b> Características bioquímicas en suero	37
<b>Cuadro 5.</b> Correlación entre las concentraciones séricas del $17 \beta$ -E <sub>2</sub> y las variables evaluadas	37

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sitios anatómicos para determinar la morfometría	15
<b>Figura 2.</b> Citología vaginal exfoliativa	38
<b>Figura 3.</b> Número de células adiposas por campo en condiciones basales y seis meses posteriores a la realización de la OSH	39
<b>Figura 4.</b> Área de los adipocitos subcutáneos en condiciones basales y seis meses posteriores a la realización de la OSH	39
<b>Figura 5 A y B.</b> Fotomicrografías representativas del tejido adiposo subcutáneo en condiciones basales y seis meses posteriores a la realización de la OSH	40
<b>Figura 6.</b> Peso (kg) y condición corporal (%) en hembras caninas en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH.	41
<b>Figura 7.</b> Expresión de la SOD en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH	42
<b>Figura 8.</b> Expresión de las peroxidasas en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH	43
<b>Figura 9.</b> GSH en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH	44
<b>Figura 10.</b> Actividad enzimática de la GPx en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH	45
<b>Figura 11.</b> Actividad enzimática de la GST en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH	46
<b>Figura 12.</b> Actividad enzimática de la GR en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH	47
<b>Figura 13.</b> Lipoperoxidación en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH	48
<b>Figura 14.</b> Capacidad antioxidante total en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH	49
<b>Figura 15.</b> Nitritos y nitratos en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH	50
<b>Figura 16.</b> Vitamina C en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH	51

## **ANEXOS**

Hoja de autorización de propietarios	62
Carta de autorización del SICUAE y cambio de título	64
Cuadro de clasificación de tipos de alimentos	66
Cuadro de porcentaje de grasa corporal con relación a la condición corporal	67



# **CORRELACIÓN ENTRE ESTRÓGENOS SÉRICOS, ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y CONDICIÓN CORPORAL EN HEMBRAS CANINAS OOFOROSALPINGOHISTERECTOMIZADAS**

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **Estrés oxidante**

El estrés oxidante (EO) es la consecuencia del desequilibrio entre la producción de radicales libres (RL) y la capacidad antioxidante del organismo. El EO contribuye a desencadenar procesos inflamatorios y disfunción endotelial, este último es importante en enfermedades cardiovasculares (Chihuilaf *et al.* 2002).

Miller *et al.* en 1993, describió al EO como el resultado de la deficiencia de sustancias protectoras naturales o de una excesiva exposición a agentes generadores de RL; es decir, el EO se desencadena cuando los prooxidantes exceden la capacidad de los antioxidantes en el organismo.

El EO está involucrado en la etiopatogenia de diversos trastornos, en procesos como el envejecimiento y el aumento de la apoptosis.

### **Radicales libres**

El RL es una molécula o átomo que contiene un electrón desapareado en su orbital exterior, adquiriendo configuración muy inestable (Maldonado *et al.*, 2010).

Los RL son más reactivos comparados con las moléculas cuyos átomos están ligados a otros por covalencia, cuando los RL han conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesitan, la molécula que lo pierde (oxidación) se convierte en RL por quedar con un electrón desapareado, iniciando una reacción en cadena. Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos tienen capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos (Valko *et al.*, 2007).

Los RL se generan por la reducción secuencial del oxígeno (O<sub>2</sub>), por ejemplo, primero se produce el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), y el radical perhidroxilo (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>), después se genera el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>). La mayoría de estas reacciones son dependientes de la presencia de algunos metales, como el hierro y cobre (González *et al.*, 2000) (Cuadro 1).

### Antioxidantes

Los sistemas de defensa contra los RL que inducen el EO incluyen: mecanismos preventivos, reparadores, defensas físicas y defensas antioxidantes. De estos, el mecanismo de defensa basado en las enzimas antioxidantes incluye a la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT). Los antioxidantes no enzimáticos son el ácido ascórbico (vitamina C), alfa tocoferol (vitamina E), el glutatión (GSH), carotenoides, flavonoides, entre otros (González *et al.*, 2000). (Cuadro 1)

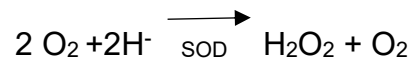
	Nombre	Nomenclatura
<b>Oxidantes</b>	Peroxinitrito	ONOO -
	Radical hidroxilo	OH
	Radical alquilo	R
	Radical peroxilo	ROO
	Radical alcoxilo	RO-
	Hidroperóxidos orgánicos	ROOH
	Oxígeno singlete	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
<b>Prooxidantes</b>	Radical superóxido	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	Peróxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	Óxido nítrico	NO
	Ubisemiquinona	CoQ <sub>10</sub>
<b>Antioxidantes</b>	Superóxido dismutasa	SOD
	Catalasa	CAT
	Glutatión peroxidasa	GPx
<b>Antioxidantes no enzimáticos</b>	Glutatión reducido	GR
	Alfa tocoferol	Vitamina E
	Ácido ascórbico	Vitamina C

Cuadro 1. Lista de algunos prooxidantes, oxidantes y antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos del organismo (Adaptado de Boveris *et al.*, 2008).

## Enzimas antioxidantes

### Superóxido dismutasa

La SOD es una enzima metálica, cuya función es catalizar la reducción del radical libre  $O_2^-$  a oxígeno ( $O_2$ ) y  $H_2O_2$ . La SOD se clasifica de acuerdo a la diferencia que existe en sus cofactores metálicos, dividiéndose en cobre/zinc (Cu/Zn)-SOD, manganeso (Mn)-SOD y hierro (Fe)-SOD (Guan *et al.*, 2017). Como esta enzima requiere de cofactores metálicos se considera una metaloenzima; se conocen al menos tres variaciones de esta enzima ubicadas en el citoplasma (Cu/Zn-SOD), mitocondria (Mn-SOD) y fluidos extracelulares (ec-SOD). Las tres isoformas de SOD catalizan la conversión del radical  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ . La dismutación consiste en una reacción en la que dos moléculas de un sustrato idénticas tienen diferentes destinos, una molécula de  $O_2^-$  se oxida y la otra se reduce (González *et al.*, 2000):



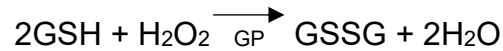
### Glutación

El GSH, tripéptido formado por ácido glutámico, glicina y cisteína es abundante en el citosol, núcleo y mitocondria, es antioxidante soluble en los compartimientos de la célula, protege a la célula del daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Presenta interacción sinérgica con otros antioxidantes como la vitamina C, E y SOD. Asimismo, el GSH actúa atrapando radicales OH y  $O_2^-$ , reactivando enzimas que son inhibidas a concentraciones altas de oxígeno. El GSH es sintetizado en el citosol por la acción secuencial de glutamato-cisteína sintasa y GSH sintetasa, su presencia mitocondrial requiere del transporte a la membrana interna.

### Glutación peroxidasa

Esta enzima utiliza como cofactor al selenio, se ubica en el citoplasma y mitocondrias; su función es catalizar la reacción en la cual el GSH reacciona con peróxidos para convertirlos en agua y alcohol. En este proceso el GSH es

oxidado a disulfuro de glutatión (GSSG), para luego ser reducido a GSH, por la enzima glutatión reductasa (GR) (González *et al.*, 2000).



### **Vitamina C**

La vitamina C (ácido ascórbico) es soluble en agua, elimina los RL de los compartimientos hidrofílicos de la célula, matriz extracelular y del sistema circulatorio; además tiene la capacidad de regenerar a la vitamina E (González *et al.*, 2000).

### **Estrógenos**

Son esteroides derivados químicos del ciclopentanoperhidrofenantreno, formados por tres anillos ciclohexanos (A, B, C) y un anillo ciclopentano (D), tienen 18 átomos de carbono (C). El más abundante en el organismo es el 17 beta estradiol (17  $\beta$ -E<sub>2</sub>), principal producto de secreción del ovario. El 17  $\beta$ -E<sub>2</sub> tiene 3 dobles ligaduras en el anillo fenólico A, un grupo OH en el C3 y otro OH en el C17, en posición  $\beta$  (Márquez *et al.*, 2002).

Al oxidarse el 17  $\beta$ -E<sub>2</sub> incorpora una cetona en el C17, generando estrona (E<sub>1</sub>); mientras que, el estriol (E<sub>3</sub>) se genera por hidratación de los estrógenos (ESTs), ya que posee un grupo OH adicional en C16 (Márquez *et al.*, 2002; Amado *et al.*, 2003).

Las células de la granulosa del ovario son las encargadas de producir los ESTs a partir de los esteroides androstenediona y testosterona (T), los cuales son sus precursores. La reacción es catalizada por la aromatasa empleando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH+) y O<sub>2</sub><sup>-</sup> como cosustratos (Márquez *et al.*, 2002). Se necesita una flavoproteína y la NADPH+ citocromo P450 reductasa. La actividad de la aromatasa es inducida por las gonadotropinas que también inducen la síntesis de otras enzimas que intervienen en el proceso biosintético de los ESTs (Márquez *et al.*, 2002). En el hígado se realiza la conversión 17  $\beta$ -E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>-E<sub>3</sub> y los tres tipos de ESTs se excretan por orina conjugados con ácido glucorónico y sulfato. Al igual que los andrógenos existen

otros órganos que pueden producir 17  $\beta$ -E<sub>2</sub>, como la placenta, adrenales y el tejido adiposo (Márquez *et al.*, 2002; Amado *et al.*, 2003).

### **Participación de los estrógenos en el estrés oxidante**

El 17  $\beta$ -E<sub>2</sub> puede promover y/o evitar la producción de los RL en mitocondrias como mensajeros que transmiten una señal que, a su vez, activan la unión de tres factores de transcripción sensibles a los oxidantes (Borras *et al.*, 2007) las cuales son:

- Proteína activadora 1 (AP-1)
- Elemento de respuesta del AMPc vinculante (CREB)
- Factor respiratorio nuclear (NRF) (Borras *et al.*, 2007)

La producción de RL explica el diferencial de longevidad ligada al sexo, ya que el daño oxidativo del ADN mitocondrial es hasta cuatro veces mayor en machos en comparación con las hembras (Mancini *et al.*, 2013). Los ESTs se unen a sus receptores por medio de la activación de las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-KB), dando como resultado la regulación del sistema de enzimas antioxidantes (Mancini *et al.*, 2013). La actividad antioxidante y de eliminación de los RL por los ESTs es independiente de la unión al receptor y se encuentra asociado también a su estructura química que presenta el grupo OH intacto en el anillo A de la molécula esteroide, otras hormonas sexuales que carecen de este anillo son la progesterona (P<sub>4</sub>) y la T que no presentan efectos antioxidantes (Angoa, 2007). A pesar de los estudios sobre el efecto antioxidante de los ESTs, los mecanismos de acción y las condiciones estructurales que poseen estas hormonas no se entienden completamente. (Angoa., 2007; Ruíz *et al.*, 2000; Cambray., 2013). Por ejemplo, en algunos modelos del sistema nervioso central (SNC) los ESTs pueden elevar los niveles de la GSH en células neuronales y gliales; observando que los efectos de los ESTs no solo se limitan en poseer una actividad antioxidante contra los RL, sino que también pueden mantener el estado de óxido-reducción (redox) en equilibrio en las células (Mancini *et al.*, 2013).

En algunos casos se ha observado reacciones paradójicas en diferentes especies, por ejemplo, en ratas Wistar con ovariectomía (OVx) se ha observado que al administrar ESTs, la catalasa (CAT) y la SOD disminuyen, mientras que en las ovejas con OVx el aporte de ESTs disminuye la SOD, la CAT y el GPx en la porción glandular y aglandular del endometrio (Gómez-Zubeldia *et al.*, 2000).

Asimismo, en el sistema vascular se comprobó que la ausencia de ESTs debida a la OVx en ratas, activa la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), proteína inducible de estrés. Los ESTs tienen actividad vasoprotectora a través de la estimulación no genómica de membrana/mediadores intracelulares y/o la vía genómica clásica y con esto, regulan los sistemas vasoconstrictores y vasodilatadores (Lee *et al.*, 2005).

### **Ovariohisterectomía**

La ovariohisterectomía (OVH) también conocida como ooforosalingohisterectomía (OSH), consiste en la extracción quirúrgica del útero y los ovarios en su totalidad, esto influye en aspectos como la reducción de la longevidad, el cambio en el comportamiento, la inducción de sobrepeso, obesidad y un incremento en la incidencia de enfermedades específicas (Takahiro *et al.*, 2014).

Se ha descrito que la OVH junto con la inactividad, y el aumento espontáneo en la ingesta de alimentos son factores de riesgo para que las hembras caninas presenten sobrepeso u obesidad, es por eso que, en estas mascotas se recomienda la restricción de calorías para evitar el aumento de peso (Laflamme., 2004; Verkest *et al.*, 2011).

Dado que los ESTs inhiben la lipógenesis, las hembras regulan su peso bajo la acción de estos, pero al disminuir su concentración como consecuencia de la OVH se presenta aumento del peso corporal (Kobayashi *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013; Rivas 2013; Manzano 2015; Newell 2017).

## **Participación de los estrógenos en el metabolismo energético**

Los ESTs pueden interactuar con hormonas orexigénicas y anorexigénicas para el control del balance de la energía, así como en la ingesta de alimento y en la distribución de grasa corporal (Ahmadi *et al.* 2017).

La acumulación de grasa visceral se asocia con niveles bajos de ESTs en las hembras, debido a la expresión de los receptores de estrógenos (RE) en el tejido adiposo. Algunos estudios con modelos animales han observado que los ESTs actúan como una hormona anorexigénica aumentando el gasto energético en reposo (Ahmadi *et al.*, 2017). Además, los ESTs intervienen en el aporte del consumo de energía por sus efectos directos sobre el tejido adiposo periférico aumentando el número de RE, la sensibilidad a la leptina y la termogénesis a través del sistema nervioso central, en consecuencia, aumenta la lipólisis en el tejido adiposo blanco (Oppenheimer *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 2008).

### **Estrógenos y tejido adiposo**

Los ESTs ejercen sus efectos en los adipocitos de dos maneras: a) mediante la unión a RE clásicos, que activan los factores de transcripción nuclear que se encuentran distribuidos en todo el tejido adiposo y b) al unirse a los receptores de membrana (Koehler *et al.*, 2005). Los REs pueden dividirse en RE alfa (RE $\alpha$ ) y RE beta (RE $\beta$ ) expresándose en diferentes tejidos (Koehler *et al.*, 2005).

Los ESTs a través de los RE $\alpha$  regulan la antilipogénesis, la sensibilidad a la insulina, la tolerancia a la glucosa, la reducción del peso corporal por la reducción del tejido adiposo blanco (WAT por sus siglas en inglés) mientras que, los ESTs a través de los RE $\beta$  demuestran efectos adversos para el mantenimiento de la glucosa y la homeostasis lipídica (Blüer 2013). Además, los ESTs intervienen en el control lipogénico de los adipocitos en animales de ambos sexos, en las hembras los ESTs regulan el estado metabólico de WAT aunque los mecanismos de acción no se entienden completamente (Foryst *et al.*, 2010; Newell 2017).

En algunos estudios llevados a cabo con roedores la reducción de los ESTs debida a la OVx provoca hiperfagia y aumento de peso corporal. Sin embargo, al realizar el reemplazo en estos, se observa disminución en el tamaño de los adipocitos, inhibición de la lipogénesis en WAT, en el tejido hepático, músculo esquelético y aumenta la lipólisis en el adipocito (D'Eon *et al.*, 2005). Además, algunos estudios mencionan que estos efectos se atribuyen a la expresión de los genes de transcripción que controlan el almacenamiento de lípidos tales como acetil-CoA carboxilasa 1 (Acaca), ácido graso sintasa (Fasn), esterol regulador del elemento vinculante de la proteína 1 (SREBF-1), la supresión de la lipoproteína lipasa (LPL), así como el aumento de la sensibilidad a la lipólisis inducida por catecolaminas en WAT (D'Eon *et al.*, 2005). Otros estudios mencionan el papel de los ESTs como supresores de la transcripción de la LPL, enzima que cataliza la conversión de los triglicéridos (TG) en ácidos grasos libres (AGL) (Urabe *et al.*, 1996). (Ver cuadro 2).

### **Efecto de la ovariectomía en los marcadores del estrés oxidante en hembras caninas**

Un estudio realizado con 18 hembras caninas clínicamente sanas determinó los cambios en los marcadores del estrés oxidante posterior a la realización de la OVH en un lapso de tiempo de 30 días, se tomaron tres muestras sanguíneas, es decir, previo a la operación, al día 14 y finalmente al día 30. En este estudio se determinaron las siguientes enzimas: GSH, GPx, SOD y la LPO. La actividad del GSH y la GPx aumento significativamente al día 14, sin embargo, la actividad de estas enzimas disminuyó al día 30. Mientras que la LPO aumento posterior a la OVH. Los resultados de este estudio sugieren que se produce una pérdida sobre el control de los RL después de la OVH, dado que el EO contribuye a la patogénesis de diversas enfermedades, esto podría sugerir un mayor riesgo a padecer algún trastorno en las hembras caninas OVH (Szczybal *et al.*, 2015).



Esteroides	Efecto	Tipo de respuesta	Machos	Hembras
Estradiol (E <sub>2</sub> )	Lipólisis/ Lipogénesis	Inhibición de lipogénesis (ratones)	+	+
		Incremento de lipólisis (ratones)	-	+
		Disminución del tamaño de los adipocitos (ratones)	?	+
		Supresión de la lipoproteína lipasa (LPL) (humanos, ratones; pre- menopausia)	?	+
		Incremento de la actividad de LPL (humanos post-menopausia)	-	+
		Incremento de la actividad la lipasa sensible a hormonas (HSL) (humanos)	?	+
		Incremento de lipólisis inducida por catecolaminas (humanos, ratones)	-	+
		Incremento de la función del receptor gamma activado de proliferación del peroxisoma (PPAR $\gamma$ ) con la estimulación ER $\beta$ (ratón)	?	+
		Incremento WAT con estimulación de ER $\alpha$ (ratones)	+	+
		Incremento WAT con estimulación de GPER (ratones)	+	+
	Disminución WAT con estimulación del receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) (ratones)	-	+	
	Diferenciación de los adipocitos	Adipogénesis (ratones, solo subcutáneo)	-	+
		Inhibición de la adipogénesis vía GPER	-	-
		Inhibición de mIR-125a, inhibición del receptor $\alpha$ relacionado con E <sub>2</sub> (EER $\alpha$ ), promotores de adipogénesis (cerdo)	?	?
	Sensibilidad a la insulina	La alimentación con alto contenido de grasa disminuye el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) y ER $\alpha$ en WAT visceral (en hembras de ratón)	+	+
		Incremento de captación de glucosa a través de estimulación de ER $\alpha$ y fosforilación de tirosina IRS1 (células 3T3-L1, dependiente de concentración)	-	-
		Activación de AMPK y Akt vía de receptores de estrógenos (células 3T3-L1)	-	-
	Leptina	Correlación positiva con los niveles séricos de E <sub>2</sub> (humanos: mujeres jóvenes>post-menopausia>hombres)	+	+
		No hay efecto sobre la secreción (células 3T3-L1)	-	-
	Adiponectina	Disminución de secreción (células 3T3-L1)	-	-
No hay efecto sobre la secreción de células del síndrome Simpson-Golabi-Behmel (SBGS)		-	-	

**Cuadro 2.** Efecto de los ESTs sobre la lipólisis/lipogénesis (Modificado de Newell 2017).

## **Estrógenos y diferenciación de los adipocitos**

En pre-adipocitos de ratones hembras en respuesta a los ESTs presentan una mayor diferenciación a adipocitos e inducen adipogénesis (diferenciación de los adipocitos) cuando se les compara con los machos. Además, en presencia de ESTs los pre-adipocitos viscerales se diferencian en adipocitos maduros más rápidamente que los pre-adipocitos subcutáneos en ambos sexos (Newell 2017).

En humanos, la ubicación del tejido adiposo tanto en mujeres como en hombres define su función. En mujeres, la acumulación de adiposidad femoral se asocia con hiperplasia adipocitaria (aumento de la adipogénesis), mientras que, en hombres la acumulación de la adiposidad femoral se encuentra asociado con hipertrofia de los adipocitos (aumento en almacenamiento de lípidos o lipogénesis). Estos estudios en particular sostienen la teoría de que el microambiente ESTs en las mujeres estimula la adipogénesis regional, y la disminución de andrógenos en el microambiente masculino estimula la lipogénesis (Newell 2017).

## **II. JUSTIFICACIÓN**

En estudios previos se ha observado que posterior a la realización de la ooforosalingohisterectomía (OSH) se presenta aumento en la lipogénesis y en el EO en hembras caninas. Sin embargo, los estudios sobre la evaluación del estado antioxidante/oxidante relacionado con la ausencia de  $17\beta\text{-E}_2$  en hembras caninas con OSH son limitados. Por lo cual, es necesario profundizar en el estudio de este tema, dado que los efectos posteriores a la OSH pueden ser perjudiciales para la salud general de las hembras caninas.

## **III. HIPOTESIS**

La reducción de las concentraciones séricas del  $17\beta\text{-E}_2$  debida a la OSH después de 6 meses, en las hembras caninas ocasionará cambios en algunas enzimas antioxidantes, en la condición corporal y en la morfología de los adipocitos subcutáneos.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los cambios en las enzimas antioxidantes, en la condición corporal y en la morfología de los adipocitos antes y seis meses después de la OSH en hembras caninas jóvenes. Así como su correlación con las concentraciones séricas de  $17 \beta\text{-E}_2$ .

#### **V. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Cuantificar la condición corporal por medio de morfometría antes y seis meses después de la realización de la OSH.

Cuantificar las concentraciones séricas de las hormonas gonadales:  $17 \beta\text{-E}_2$  y T antes y seis meses después de la OSH.

- Determinar en el suero las siguientes enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidante, antes y seis meses después de la OSH:
  - Peroxidación lipídica
  - Actividad enzimática del GSH, GST, GPx y GR
  - Peroxidasas
  - ec-SOD
  - Capacidad antioxidante total
  - Vitamina C
  - Nitritos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_2^-$ )
  
- Evaluar el tamaño de los adipocitos subcutáneos antes y seis meses después a la realización de la OSH.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Muestra animal**

Los procedimientos realizados con las hembras caninas fueron revisados y aprobados por el SICUAE (Anexo 2).

Se utilizaron doce hembras caninas con las siguientes características:

### **Criterios de inclusión**

- Enteras (con ovarios y útero)
- Mayores a los 12 meses de edad (1 a 5 años)
- Clínicamente sanas
- Condición corporal de tres (CC3)
- Talla indistinta

### **Criterios de exclusión**

- Hembras caninas con acondroplasia
- Hembras caninas que de acuerdo a la Federación Canófila Internacional se encuentren dentro del grupo 10 de los lebreles o mestizos con características similares
- Machos
- Hembras caninas con OSH
- Animales que clínicamente presenten alguna enfermedad.

### **Lugar de muestreo y de realización de la OSH**

- Clínica Veterinaria Meztli (José Luis Gutiérrez No. 40, colonia Ahuizotla, Naucalpan, Estado de México.

## **Lugar donde se realizaron las determinaciones analíticas**

- Instituto Nacional de Cardiología: Ignacio Chávez, Departamento de Patología.

## **Obtención de datos**

El estudio se llevó a cabo inicialmente en perras enteras de entre 1 a 5 años de edad, con autorización de los propietarios (ANEXO 1). Se recabó información de cada individuo, como: edad, raza, tipo de alimentación, peso, condición corporal, circunferencia pelviana (CP), distancia de la rodilla al corvejón (RC) y cantidad de actividad física. Así mismo, se tomó una muestra sanguínea inicial para medir la concentración basal de enzimas antioxidantes y hormonas como insulina, T,  $17\beta\text{-E}_2$ . Antes de la cirugía se determinó la etapa del ciclo estral en el que se encontraba cada hembra canina por medio de citología vaginal exfoliativa y después se realizó el procedimiento de OSH, el primer y sexto mes posterior a este procedimiento se realizó nuevamente la citología vaginal exfoliativa para confirmar la correcta realización del procedimiento y determinar la etapa del ciclo estral. Después de seis meses se repitieron los muestreos de sangre.

## **Método de obtención de datos morfométricos, peso y condición corporal**

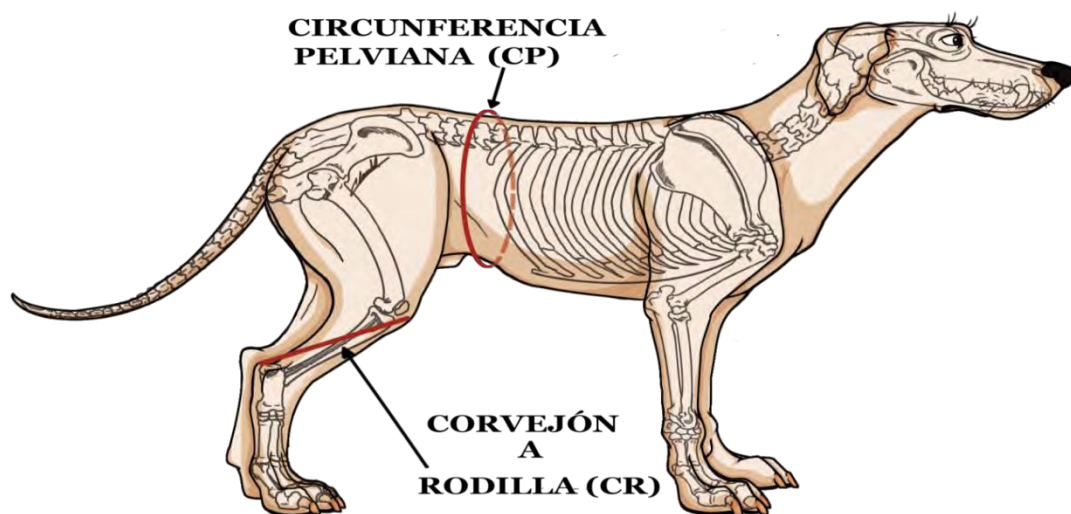
Al momento de la medición, las hembras caninas se colocarán en posición de cuadripedestación con la cabeza dirigida al frente, formando un ángulo recto; posteriormente se procedió a medir con una cinta métrica (cm) la CP y la distancia que existe de la RC sin ejercer ningún tipo de presión sobre el perro.

El peso en kilogramos se obtuvo con una báscula digital (marca: Sohenle™) y la condición corporal se determinó con base al porcentaje de grasa corporal (% GC) resultado de la fórmula de HAND (2000) que a continuación se describe (Mawby *et al.*, 2004; Jeusette *et al.*, 2010; Santarossa *et al.*, 2017) (Anexo 4):

$$\% \text{ GC en hembras} = -1,7(\text{CR}_{(\text{cm})}) + 0,93(\text{CP}_{(\text{cm})}) + 5$$

Dónde:

- ✚ **CR**=Longitud del miembro posterior desde la tuberosidad calcánea hasta la mitad del ligamento patelar (corvejón a rodilla) en cm.
- ✚ **CP**=Circunferencia pelviana en cm



**Figura 1.** Sitios anatómicos para la obtención de datos morfométricos

### Toma y mediciones en la muestra sanguínea

La muestra sanguínea se obtuvo por venopunción de la vena cefálica (previa asepsia) y se colocó en tubos sin anticoagulante, se dejó reposar durante un lapso de 15 minutos y se centrifugó a 3000 rpm; finalmente se recuperó el suero y se congeló a  $-6^{\circ}\text{C}$ . En el suero se determinaron los TG, el CT, la glucosa mediante métodos enzimáticos (marca Pointe Scientific USA) e insulina mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) (marca Millipore USA) y las hormonas sexuales T y  $17\beta\text{-E}_2$  se determinaron por ELISA (marca DRG Diagnostics Germany), siguiendo el método de rutina recomendado por el fabricante.

El índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) se calculó con la siguiente fórmula (Ortemberg *et al.*, 2011; Tropf *et al.*, 2017; Borai *et al.*, 2007):

$$\text{HOMA-IR} = [\text{insulina } (\mu\text{U/ml}) * \text{glucosa (mM)}] / 22.5$$

### **Citología vaginal exfoliativa**

Después de la asepsia, se sujetó la vulva y se introdujo el hisopo estéril en la parte dorsal de la misma hasta llegar a la porción caudal de la vagina, con movimientos circulares suaves del hisopo se procedió a coleccionar la muestra, realizando frotis por rodamiento en el portaobjetos, se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó con Citofix ® (solución fijadora para citología). Las muestras fueron teñidas con la tinción de Wright y se observaron al microscopio con el objetivo de 100x para determinar el tipo de células presentes en la muestra.

### **Ooforosalingohisterectomía lateral**

La incisión inicial se realizó en el flanco derecho debido a que el ligamento del ovario izquierdo es ligeramente más largo y laxo, lo cual permite la extracción de este ovario por el flanco opuesto con facilidad. Los puntos tomados como referencia son el límite de la porción muscular del oblicuo abdominal externo, la proyección dorsal del pezón, el borde de las apófisis transversas de las vértebras lumbares, el borde anterior del pubis y la última costilla.

La incisión de aproximadamente 1-2 cm (dependiendo de la talla de la perra) se hizo sobre la línea que parte del ángulo de la articulación de la última costilla y termina en el borde anterior del pubis.

Posterior a la incisión en la piel, se separaron las fibras musculares y ya en cavidad abdominal, se colocaron los separadores de Farabeuf para visualizar el ovario derecho y el cuerno uterino respectivo que van a ser extraídos junto con su vascularización. Este paquete se pinzó, se ligó y se cortó a nivel de la inserción del ligamento suspensorio del ovario, después se realizó una tracción ligera para extraer el cuerpo del útero el cual se pinzó, ligó y cortó detrás del cuello uterino (para evitar infecciones post quirúrgicas) y finalmente se extrajo el cuerno uterino con su respectivo ovario del lado izquierdo para realizar el procedimiento ya descrito con el ovario derecho.



Se procedió a cerrar el peritoneo con un punto en “U” y se suturó el tejido subcutáneo y piel con puntos simples separados (Forero 2006; Zuñiga 2012; Ferreira et al., 2015).

### **Histología de tejido adiposo**

Después de la OSH lateral y seis meses posteriores a este procedimiento previamente anestesiados (Procin equus: Xilazina 10% a una dosis de 1.1 mg/kg IV [Intravenoso] y Zoletil® 100: Tiletamina/Zolazepam a una dosis de 2 mg/kg IV) se tomó una muestra de aproximadamente 1 cm de tejido adiposo (flanco derecho en la mismo sitio anatómico de la OSH), se suturó el tejido subcutáneo y piel con puntos simples separados (sutura Atramat: Ácido poliglicólico), finalmente se aplicó antibiótico (Espenfort: Penicilina G procaína a una dosis de 20,000 UI/kg IM [Intramuscular]) y analgésico (Angesín: Dipirona sódica a una dosis de 28 mg/kg IM) a las hembras caninas con la finalidad de evitar alguna molestia. La muestra de tejido adiposo se conservó en formalina al 10% en proporción 1:20 con esta muestra se realizaron cortes histológicos y se empleó la tinción tricrómica de Masson, los cortes histológicos fueron analizados con un microscopio de luz marca Olympus BX51 equipado con una cámara digital CoolSNAP-Pro de 9 megapíxeles y se analizaron por densitofotometría con el programa Sigma Scan Pro 5 ®.

### **NOTA**

Debido a que este procedimiento requiere necesariamente el uso de anestesia, los propietarios únicamente accedieron a que se realizaran dos muestreos de tejido adiposo, al inicio del estudio y al final del mismo.

### **Determinación de las enzimas antioxidantes en suero**

#### **SOD extracelular y peroxidasas**

Se realizó la separación de las enzimas ec-SOD y peroxidasas mediante geles nativos de poliacrilamida para evaluar la actividad de las mismas, mediante la técnica descrita por Laemli (1979). El gel concentrador al 4% se preparó con

3.026 ml de agua desionizada y destilada, 1.250 ml de amortiguador pH 6.8, 0.664 ml de solución de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 100 µL de persulfato de amonio y 10 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). El gel resolventor al 8% se elaboró con 4.730 ml de agua desionizada y destilada, 2.500 ml de amortiguador pH 8.9, 2.730 ml de solución de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 100 µL de persulfato de amonio y 10 µL TEMED. Los geles se cargaron con 20 µL de amortiguador de muestra de gel nativo, 10 µL de SOD bovino a una concentración de 1 µg como estándar y 20 µL de suero, mientras que para la actividad de las peroxidasas se cargaron 40 µL de amortiguador de muestra de gel nativo, 35 µL de peroxidasa a una concentración de final de 178.5 µg como estándar y 30 µL de suero. La electroforesis se corrió en un amortiguador de tris-glicina pH 8.3 a 100 voltios.

Al término de la electroforesis y para determinar la actividad de la ec-SOD (Pérez-T.I., *et al.* 2009), el gel se lavó tres veces con agua destilada durante 5 minutos, para después incubarse con 2.45 mM de nitroazul de tetrazolio (NBT) por 20 minutos, se decantó la solución de NBT y se incubó en una solución de EDTA 28 µM, riboflavina 0.028 µM, amortiguador de fosfatos 36 mM pH 7.8 durante 20 minutos, posteriormente fue expuesto a una lámpara de luz UV durante 3 minutos, se realizaron tres lavados y se dejó incubando con agua destilada el gel durante 48 horas.

Para observar la actividad de las peroxidasas el gel se lavó con agua destilada tres veces durante 5 minutos y se reveló de acuerdo a la modificación del método de Abrams y Webster (1990) incubando con una mezcla de 0.003mg/ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina disuelta en una solución de etanol: ácido acético: agua (1:1:1 v/v) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos en la oscuridad. Los geles fueron analizados por densitometría con el analizador de imágenes Kodak Image <sup>®</sup> 3.5 y los cálculos para estimar la actividad enzimática se realizaron de acuerdo a lo descrito por Chen C-N y Pan S-M (1996).

### **Actividad de la glutatión peroxidasa**

La actividad de la enzima GPx se determinó indirectamente por la cantidad de NADPH oxidado, esta reacción requiere de GSH cuya disponibilidad a su vez

depende de la actividad de la GR, la ausencia del NADPH se monitorea mediante el uso de espectrofotometría. Para medir la actividad de la GPX, se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  de suero suspendidos en 2.4 ml de amortiguador de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50 Mm (ph 7.0), adicionado con NADPH 0.2 Mm, GSH 1 mM y GR 1 UI/ml. La mezcla se leyó en un espectrofotómetro (UNICO UV 2100) a 340 nm y se dejó estabilizar durante 2 min a 37°C, después de ese tiempo se adicionó el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se leyó inmediatamente en un intervalo de 8 minutos (Paglia D.E. y Valentine W.N., 1967; Laurence R.A. y Burk R.F., 1976; Flohé L. y Günzler W., 1984).

### **Actividad de la glutatión reductasa**

Para evaluar la actividad de la GR se utilizaron 2400 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 mM con 0.5 mM de EDTA pH 7.4, 300  $\mu\text{L}$  de NADPH 0.1 mM y se le agregaron 100  $\mu\text{L}$  de suero. Se incubó y monitoreo la actividad de la enzima durante 10 minutos a 37 °C y la absorbencia se leyó a 340 nm. La actividad de la GR se expresa en U/min/mg de proteína.

### **Actividad de la glutatión s transferasa**

Para evaluar la actividad de la GST se utilizaron 2400 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1M, pH 6.5) más 300  $\mu\text{L}$  GSH 0.1 mM y 300  $\mu\text{L}$  1-cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB) 0.1 mM posteriormente se le añadieron 100  $\mu\text{L}$  de suero. La muestra se incubó y monitoreó a 340 nm durante 10 minutos a 37 °C. Los valores de la GST se expresan en U/min/mg. Una unidad de actividad de GST se expresa en  $\mu\text{mol}$  de conjugado de GS-DNB formado/min/mg de proteína.

### **Concentración de glutatión**

Para determinar la concentración del GSH, las muestras primero se desproteinizaron, ya que las proteínas intervienen con la cuantificación del GSH. A 100  $\mu\text{L}$  de suero se le añadieron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 M pH 7.35, más 100  $\mu\text{L}$  de tungstato de sodio al 5% y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , se homogenizó en el vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. Después de la centrifugación se traspasó el sobrenadante y se agregaron 700  $\mu\text{L}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y más 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Ellman (5,5´Ditiobis 2-ácido nitrobenzoico) 10M. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos y la absorbencia

se leyó a 412nm. La calibración de la curva fue realizada con GSH de 5 a 25  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína.

### **Evaluación de la capacidad antioxidante del sistema no enzimático**

Consiste en la reacción de los antioxidantes presentes en la muestra y el cloruro de hierro (Fe III) en un medio ácido, formando ion ferroso (Fe II), el cual se une al 2, 4, 6,-Tris2-pyridil-s-triazine para generar un compuesto de color azul. A 50  $\mu\text{L}$  de suero se le agregó 1.5 ml de mezcla de reacción; que consistió en 300 mM de amortiguador de acetatos pH 3.6, 20 mM de hexahidrato de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), 10 Mm de 2,4,6,-Tris2-pyridil-s-triazine disuelto en HCl en una proporción de 10:2:1 v/v respectivamente; se mezcló en el vórtex durante 5 segundos y se incubó a 37 ° C por 15 minutos en la obscuridad, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm. La absorbencia se midió a 593 nm en el espectrofotómetro (UNICO UV 2100). La curva de calibración se obtuvo con trolox a una concentración final en nM (Benzie I.F.F. y Strin J. J., 1996; Benzie I.F.F. y Strin J.J., 1999).

### **Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico**

Esta prueba se basa en la reacción del malondialdehído, producto secundario de la oxidación de los AG de tres o más ligaduras con el ácido tiobarbitúrico en un medio ácido y a alta temperatura, generando un producto de coloración rosa (Gutteridge J.M., 1975). Para esta medición se utilizaron 50  $\mu\text{L}$  de suero al cual se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) con butilhidroxitolueno (BHT) al 4% más 1 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.0, se homogenizó en el vórtex durante 5 segundos, se incubó 30 minutos 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 una hora en baño María a 100 ° C. Después de ese tiempo y para detener la reacción, las muestras se colocaron en hielo y se agregó 1 ml de KCL al 5% por muestra se homogenizó en el vórtex durante 15 segundos después se agregaron 5 ml de n-butanol, se homogenizó en el vórtex durante 30 segundos y se centrifugó a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 2 minutos. Después se extrajo la fase de n-butanol y se midió la absorbencia en el espectrofotómetro

a 532 nm. La curva de calibración se realizó utilizando tetraetoxipropano (Pérez-T.I., *et al.* 2009).

### **Vitamina C**

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de suero y se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 10%, esta mezcla se homogenizó en el vórtex durante un minuto y después se colocó en hielo, este proceso se repitió por un lapso de 5 minutos, posteriormente se centrifugó 5 minutos a 5000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de folly (compuesto por fenol reactivo y agua destilada en proporción 1:1). Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó mediante espectrofotometría 760 nm.

### **ANALISIS ESTADISTICO**

Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó el programa Win Episcopo<sup>®</sup>, con un nivel de confianza de 95% con muestras emparejadas de una vía.

El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el programa Sigma Plot (SigmaPlot versión 12.3, Jandel Corporation). Los datos se presentaron como la media  $\pm$  error estándar. La significancia estadística se determinó con la prueba t de Student, ANOVA de una vía y post hoc de Tukey. Una  $p \leq 0.05$  se consideró como significativa.

Los estudios de correlación múltiple de los datos se realizaron con el programa SPSS Statistics<sup>®</sup> (versión 17.0). Una  $p \leq 0.05$  se consideró como significativa.

## VII. RESULTADOS

### **PORCENTAJE DE GRASA CORPORAL Y CONDICIÓN CORPORAL**

De acuerdo con la edad de los individuos de estudio, estos fueron considerados como jóvenes de 1 a 5 años de edad.

En el cuadro 3, se muestran las características generales de las hembras caninas en donde se tomaron en cuenta la raza, la edad, el alimento y método de alimentación proporcionado, peso, CC y el porcentaje de GC de cada uno de los individuos experimentales en diferentes intervalos de tiempo, teniendo los siguientes resultados:

Los alimentos proporcionados de acuerdo a la calidad nutricional fueron clasificados como alimentos de valor y premium.

El peso en condiciones basales tendió a aumentar seis meses posteriores a la realización de la OSH, así como también el porcentaje de grasa corporal (%GC) y la condición corporal (CC) (Figura 6).

### **ANALITOS Y HORMONAS: COLESTEROL, TRIGLICERIDOS, INSULINA, ÍNDICE HOMA, GLUCOSA, TESTOSTERONA, ESTRADIOL**

En el cuadro 4, se muestran las variables bioquímicas medidas, donde se describe que:

Las variables que no presentaron diferencia significativa en el primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH son: el colesterol (CT), los TG y la glucosa los cuales mostraron tendencia a disminuir.

La determinación de la insulina se utilizó para el índice HOMA, a pesar de que los valores se encuentran en rango antes y seis meses posteriores a la realización de la OSH, se observa un periodo de adaptación el primer mes

posterior a la realización de este procedimiento, ya que el resultado obtenido indica que las hembras caninas presentan RI.

El 17  $\beta$ -E<sub>2</sub> no mostró diferencia significativa, sin embargo, se observó una ligera tendencia a disminuir posterior a la OSH, efecto contrario al que se puede observar con las concentraciones séricas de la T.

### **CORRELACIÓN DEL 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> CON LAS VARIABLES DETERMINADAS**

En el cuadro 5, se muestra la correlación entre el 17  $\beta$ -E<sub>2</sub> y las variables determinadas, donde se describe que:

Las variables que no presentaron correlación con el 17  $\beta$ -E<sub>2</sub> al primer y sexto mes después de la realización de la OSH, con respecto a las condiciones basales son: GSH, GST, GR, GPx, ec-SOD, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, peroxidasas, vitamina C, FRAP, LPO, %GC.

### **CITOLOGÍA VAGINAL EXFOLIATIVA**

En las figuras 2A, B y C, se presentan las fotomicrografías representativas de la citología vaginal exfoliativa realizada en diferentes intervalos de tiempo: basal, primero y sexto mes posterior a la OSH, en donde se muestra el tipo de células características de la etapa del ciclo estral de anestro, con presencia de células parabasales, moco y células adheridas entre sí.

### **CONTEO DE CÉLULAS POR CAMPO Y ÁREA DEL TEJIDO ADIPOSO**

En la figura 3, se presenta el número de células por campo en condiciones basales en donde se observa mayor número de células en comparación con el sexto mes posterior a la OSH (Figura 4) en las que hubo diferencia significativa. (p=0.001). En la figura 4 se observa aumento significativo en el área de los

adipocitos al sexto mes después de la OSH en comparación a las condiciones basales (Figura 3) ( $P=0.001$ ).

En las figuras 5 A y B, se muestran las fotomicrografías representativas del tejido adiposo subcutáneo, la figura 5A corresponde a las condiciones basales, en la que se encuentran células poliédricas, con una gota lipídica que llena todo el citoplasma y desplaza el núcleo hacia la periferia. Se observa mayor número de células por campo en comparación con la figura 5B, que corresponde a la muestra tomada seis meses después de la OSH. Las células están dispuestas en grupos hexagonales irregulares, conectados por uniones de hendiduras en comparación con las condiciones basales y se observa la hipertrofia evidente de los adipocitos.

#### **ACTIVIDAD DE LA SOD extracelular**

En la figura 6, se expone la actividad de la ec-SOD en condiciones basales y del primer mes no presentó diferencia significativa. Sin embargo, al sexto mes posterior a la OSH hubo incremento significativo en comparación a las condiciones basales ( $p=0.001$ ).

#### **ACTIVIDAD DE LAS PEROXIDASAS**

En la figura 7, se observa la actividad de las peroxidasas mostrando diferencia significativa entre las condiciones basales y el sexto mes posterior a la OSH ( $p=0.02$ ). También hay diferencia significativa entre el primer y sexto mes posterior a la OSH ( $p=0.05$ ).

#### **GLUTATIÓN**

En la figura 8, se muestra la concentración del GSH donde se observó diferencia significativa al primer y sexto mes en comparación con las condiciones basales ( $p=0.03$  en ambos casos).



## **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA**

En la figura 9, se puede observar que no hay diferencia significativa entre la condición basal y el primer mes posterior a la OSH. Sin embargo, se observó incremento significativo en el sexto mes en comparación a las condiciones basales ( $p=0.05$ ).

## **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN S TRANSFERASA**

En la figura 10, se indica que no hay diferencia significativa entre la condición basal y el primer mes posterior a la OSH. No obstante, se observó diferencia significativa entre las condiciones basales con el sexto mes y entre el primer y sexto mes posterior a la OSH ( $p=0.05$ ,  $p=0.03$  respectivamente).

## **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA**

En la figura 11, se expone que no hay diferencia significativa entre los grupos del primer y sexto mes con respecto a las condiciones basales. Sin embargo, se observó una tendencia a incrementarse en comparación a las condiciones basales.

## **LIPOPEROXIDACIÓN**

En la figura 12, se muestra diferencia significativa entre las condiciones basales con respecto al primer y sexto mes posterior a la OSH ( $p=0.03$ ,  $p=0.02$  respectivamente).

## **CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL**

En la figura 13, se observa que no hay diferencia significativa entre los grupos del primer y sexto mes con respecto a las condiciones basales. No

obstante, se puede observar una tendencia a reducirse en comparación a las condiciones basales.

## **NITRATOS Y NITRITOS**

En la figura 14, se indica que no hay diferencia significativa entre los grupos del primer y sexto mes con respecto a las condiciones basales. Sin embargo, se observa una tendencia a incrementar en comparación con las condiciones basales.

## **VITAMINA C**

En la figura 15, se muestra diferencia significativa entre las condiciones basales con respecto al primer y sexto mes posterior a la OSH ( $p=0.02$ ,  $p=0.03$  respectivamente).

## VIII. DISCUSIÓN

Los ESTs poseen gran variedad de funciones dentro del organismo en especial en las hembras, entre ellas se encuentran regular el consumo de alimento, el ciclo estral, la distribución corporal de grasa y como molécula tiene función antioxidante e injerencia sobre el sistema antioxidante (Mancinii *et al.*, 2013; Manzano 2015; Newell 2017; Rivas 2013). De tal manera que cuando se realizan procedimientos como la OSH, las hembras muestran reducción en la concentración sérica de hormonas gonadales como los ESTs. Además, se ha demostrado que las hembras caninas con OSH muestran cambios como aumento de peso corporal, % GC, condición corporal, problemas en articulaciones, entre otros. El objetivo de este estudio fue determinar el impacto de la OSH sobre el sistema antioxidante endógeno, la condición corporal y la morfología de los adipocitos subcutáneos previo y seis meses después de la OSH en hembras caninas jóvenes.

En general los resultados del presente estudio muestran que, en hembras caninas a las que se les practicó la OSH, después de uno y seis meses, las concentraciones séricas de los ESTs tienden a disminuir, a incrementar el peso corporal y afectar el sistema antioxidante endógeno. En el estudio de citología vaginal exfoliativa se observó la presencia de células parabasales lo cual demostró que las hembras caninas se encontraban en etapa de anestro durante todo el tiempo que duró el estudio (figura 2A, B y C) (Pérez *et al.*, 2017). Una investigación reciente, llevada a cabo en hembras caninas con OSH parcial con eliminación de un cuerno uterino, reporta que seis meses posteriores a este procedimiento se detectaron niveles de ESTs sin variabilidad a los determinados al inicio, el estudio sugiere un periodo mayor a los seis meses para la determinación de ESTs para observar un cambio drástico en las concentraciones séricas de los mismos, ya que además de lo mencionado anteriormente encontraron que el cuerno y cuerpo uterino no presentaban atrofia total, a pesar del tiempo transcurrido presentaban gran número de células con expresión de receptores para ESTs ( $RE\alpha$ ,  $Re\beta$ ) y esta presencia de ESTs se pudo atribuir a la cantidad del tejido adiposo, ya que estos contienen aromatasa que transforman los andrógenos producidos en la glándula suprarrenal. No obstante,

en algunos casos la falta de cambio sobre las concentraciones séricas de ESTs, también puede ser atribuible a factores externos como el alimento (Schäfer-Somi *et al.*, 2017).

En este estudio solo se observó una tendencia estadística a reducir las concentraciones séricas de ESTs, sin embargo, no fue estadísticamente significativa. Existen trabajos en los que se reporta que en hembras castradas no existe una reducción significativa de ESTs, debida a la ingestión de fitoestrógenos en la dieta, específicamente, Cerundolo *et al.*, en 2004 encontró que la mayoría de los alimentos para mascota utilizan soya o fracciones de soya como ingrediente, el cual es fuente de fitoestrógenos que pueden tener efectos tanto benéficos como nocivos para la salud y si estos se consumen de manera crónica, pueden llegar a tener actividad biológica dentro del organismo. Los fitoestrógenos son estructural y funcionalmente similares al  $17\beta\text{-E}_2$  y tienen la capacidad de unirse a los RE, interactuando más en los  $\text{RE}\alpha$  que en los  $\text{RE}\beta$  y también compiten con el sitio activo donde se sintetizan y metabolizan los ESTs (Cerundolo *et al.*, 2009); además; estas moléculas podrían contribuir a la regulación de la expresión de ciertas enzimas antioxidantes a través de Nrf2. Sin embargo, se requieren más estudios para comprobar realmente su importancia desde el punto de vista fisiopatológico (Siow *et al.*, 2007).

Como se mencionó, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de las hormonas sexuales: T y  $17\beta\text{-E}_2$ , pero si se puede observar reducción paulatina en los niveles séricos de  $17\beta\text{-E}_2$  al comparar las condiciones basales con los seis meses posteriores a la OSH, y este efecto se puede apreciar de manera contraria con la T, quizá con un periodo más amplio de observación esta tendencia pudiera ser más notoria. Varios estudios han demostrado que la T puede estimular la lipogénesis y sus niveles se han asociado con la hipertrofia de los adipocitos (Newell 2017).

Los resultados del presente estudio muestran aumento del peso en las hembras caninas posterior a la OSH relacionado con el %GC que se refleja en las fotomicrografías, es decir, previo a la OSH se observó que en los cortes histológicos había gran número de adipocitos por campo con área celular

pequeña, mientras que, seis meses después de la OSH se observó que los adipocitos presentaban un incremento en el área celular por campo, es decir, el  $17 \beta\text{-E}_2$  regula la distribución y el tamaño de las células del tejido adiposo como ya ha sido descrito por Stubbins *et al.*, en el 2012. Adicionalmente en otro estudio en ratones hembras demostró que uno de los efectos del  $17 \beta\text{-E}_2$  sobre los adipocitos fue evitar la inflamación y por consiguiente disminuir las citoquinas proinflamatorias y reducir el EO (Stubbins *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2017).

Además, mostró que la reducción de la concentración sérica del  $17 \beta\text{-E}_2$  tuvo influencia de manera indirecta sobre el aumento del área de las células del tejido adiposo subcutáneo. Otro estudio en hembras caninas, demostró que el  $17 \beta\text{-E}_2$  puede participar en regular la ingesta de alimentos a través del centro de la saciedad en el hipotálamo inhibiéndolo y esto influye sobre los reguladores hormonales de los alimentos como la ghrelina y leptina (Yanagi *et al.*, 2018). Es decir, la reducción del  $17 \beta\text{-E}_2$  aumenta la probabilidad de presentar sobrepeso u obesidad debida a la sobrealimentación (Martin *et al.*, 2006; Jarero 2007; Mao *et al.*, 2013; Rivas 2013). Además, es bien sabido que la mayoría de los propietarios ofrecen el alimento sin considerar el aporte energético y nutricional proporcionado a sus mascotas, que en muchos casos se encuentra en exceso (Manzano 2015; Mao *et al.*, 2013). Entre algunos de los componentes de los alimentos comerciales para mascota están los lípidos (AG), los cuales son utilizados para mejorar la palatabilidad de los mismos, pero en exceso los AG se acumulan en el tejido adiposo en forma de TG, provocando la hipertrofia del mismo (Gutiérrez y Cosío 2012). La acumulación de grasa visceral se asocia con bajos niveles de  $17 \beta\text{-E}_2$  en las mujeres. En algunos estudios con modelos animales se ha observado que el  $17 \beta\text{-E}_2$  puede actuar como hormona anoréxigenica que aumenta el gasto de energía en reposo (Ahmadi *et al.*, 2017). Por otro lado, el  $17 \beta\text{-E}_2$  participa en el consumo de energía debido a sus efectos directos sobre el tejido adiposo periférico, aumentando el número de sus receptores, la sensibilidad a la leptina y termogénesis a través del sistema nervioso central. En consecuencia, esta hormona aumenta la lipólisis del tejido adiposo blanco (WAT) (Gao y Horvath 2008; Oppenheimer *et al.*, 1991). En suma la reducción del  $17 \beta\text{-E}_2$  debida a la OSH puede causar hiperfagia y aumento de

peso corporal. Más aún, con el reemplazo de esta hormona, se ha visto que el tamaño de los adipocitos disminuye y se inhibe la lipogénesis del WAT en hígado, músculo esquelético y aumenta la lipólisis en los adipocitos (D'eon *et al.*, 2005). Estos cambios son atribuibles a la transcripción y expresión genética de algunas proteínas que controlan el almacenamiento de lípidos tales como la acetil-CoA carboxilasa 1, sintasa de ácidos grasos, el esteroil regulador del elemento de unión de la proteína 1 (Srebf1) y la supresión de la lipoproteína lipasa (LPL). También al posible aumento de la sensibilidad a la lipólisis inducida por catecolaminas en el tejido adiposo (D'eon *et al.*, 2005). Otros estudios mencionan la estimulación de los supresores de transcripción LPL, como uno de los papeles de esta hormona; esta enzima cataliza la conversión de TG en AGL (Urabe *et al.*, 1996). Además, el tejido adiposo hipertrofiado produce gran variedad de moléculas bioactivas entre ellas están: TNF $\alpha$ , IL-6, adiponectina, leptina, entre otros (Baños *et al.*, 2011). Lo que significa que, en condiciones de sobrepeso u obesidad, el tejido adiposo promueve la síntesis de estas citoquinas proinflamatorias, las cuales causan incremento de radicales libres (RL) (Zhou *et al.*, 2012). Asimismo, el aumento en la cantidad de tejido adiposo está relacionado con la presencia de resistencia a la insulina (RI), por lo que se determinó el índice HOMA en el presente estudio (Borai *et al.*, 2007; Ortemberg *et al.*, 2011; Tropf *et al.*, 2017). Los resultados sugieren que puede existir un periodo de RI en el primer mes posterior a la OSH, pero desaparece después de un periodo más prolongado. Esto podría ser un factor de riesgo a largo plazo por estar asociado con enfermedades como diabetes, obesidad, hipertensión, entre otros (Maldonado *et al.*, 2010; Borai *et al.*, 2007). Sin embargo, en este estudio no se mostró una clara tendencia sobre el índice HOMA, probablemente porque el tiempo no fue lo suficientemente largo para que estos cambios ocurran. Las determinaciones después de seis meses serían necesarias para probar esta hipótesis.

Asimismo, se sabe ahora que el  $17\beta$ -E<sub>2</sub> puede regular la vía del factor respiratorio nuclear tipo 2 (Nrf2), factor de transcripción esencial en el mecanismo de defensa antioxidante, participando en la inducción transcripcional de algunos genes y enzimas antioxidantes que actúan de manera sinérgica para

eliminar a los ROS (Zhu *et al.* 2005; Dong *et al.* 2008). Un estudio en ratones demostró que el Nrf2 está implicado en la señalización para la transcripción de enzimas antioxidantes tales como SOD, GST, GPx, GR, entre otras (Dong *et al.* 2008). La primera línea de defensa contra el  $O_2^-$  es la SOD encargada de detoxificar al  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  (Huang *et al.*, 1997). En este estudio los resultados sugieren que la OSH puede aumentar el  $O_2^-$  y favorecer la actividad de la ec-SOD que es una enzima antioxidante presente en los fluidos extracelulares como el suero (Soto *et al.*, 2016; Pérez *et al.*, 2017). La ec-SOD se expresa en vasos sanguíneos en la superficie de las células del músculo liso vascular y en el espacio subendotelial. Esta enzima antioxidante puede proteger a las células de los efectos potencialmente dañinos de los RL. La expresión y la actividad de la ec-SOD puede alterarse en respuesta a una variedad de estímulos incluyendo la hipertensión, diabetes y RL (Pérez *et al.*, 2017). Los presentes resultados muestran que la actividad de la ec-SOD se incrementa significativamente seis meses después de la OSH, esto sugiere que la OSH en hembras caninas puede aumentar la actividad de la ec-SOD reduciendo el  $O_2^-$  pero aumentando el  $H_2O_2$  en suero. El aumento de este RL puede contribuir a la lipoperoxidación (LPO). Se ha reportado que las concentraciones de  $17\beta-E_2$  pueden disminuir los niveles de  $H_2O_2$  a través de las vías de MAPK y NF $\kappa$ B, las cuales modifican la expresión de las isoformas de la SOD (Borrás *et al.*, 2005). Se esperaría que la baja concentración del  $17\beta-E_2$  en el suero disminuyera la expresión de la actividad de la ec-SOD. Sin embargo, se observó incremento en la actividad de esta enzima. La explicación de esta discrepancia podría deberse a: 1) los fitoestrógenos proporcionados por la dieta que podrían favorecer/contribuir a la expresión o a la actividad de esta enzima, 2) la OSH podría favorecer el aumento del  $O_2^-$  el cual es sustrato de la ec-SOD y esto puede aumentar su actividad. En fracciones hepáticas de ratas hembras gonadectomizadas de 24 meses de edad, el tratamiento con  $17\beta-E_2$  normalizó la actividad de la SOD (Kumar *et al.*, 2011). La desintoxicación del  $H_2O_2$  ocurre principalmente a través de las vías catalasa y GPx. Se ha descrito que el 12% de las funciones de la ec-SOD se encuentra relacionada con la actividad de alguna de las isoformas de la GPx (Brandes y Mugge 1997; Lubos *et al.*, 2011). Además, la transcripción de la GPx puede ser

regulada directa o indirectamente por el Nrf2 a través de la acción del  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> (Lubos *et al.*, 2011). Estos resultados también podrían ser vistos como paradójicos ya que se ha reportado que, en el músculo esquelético y el tejido adiposo de los murinos, los genes que codifican para la GPx son sensibles al  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> (Baltgalvis *et al.*, 2010). Otro estudio describió que la actividad de la GPx era significativamente más alta en mujeres premenopáusicas que después de la menopausia (Baltgalvis *et al.*, 2010). La capacidad del  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> para regular la transcripción de la GPx puede contribuir al aumento de la de la expresión y/o actividad de la GPx en las mujeres (Pinto y Bartley 1969). Estos resultados sugieren que los fitoestrógenos proporcionados por la dieta (Redmon *et al.*, 2016), podrían evitar la reducción drástica del  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> sérico, y, por lo tanto, contribuyen a restaurar la actividad de esta enzima. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar este mecanismo. Para que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se reduzca a agua por la GPx, la enzima requiere del GSH como donador de electrones y posteriormente se oxida a GSSG. El GSSG se reduce de nuevo a GSH por medio de la GR dependiendo de NADPH (Olafsdottir y Reed 1988), estos componentes del sistema antioxidante interactúan en un sistema de retroalimentación (Valko *et al.*, 2007) y la concentración del GSH depende del equilibrio entre su consumo y su biosíntesis (Wang *et al.*, 2006; Abdul *et al.* 2010).

Los resultados del presente estudio muestran que la depleción del GSH como consecuencia de la disminución del sistema antioxidante no enzimático, incremento la actividad de la GPx, y tendió a aumentar la actividad de la GR esto sugiere que la posible tendencia del aumento en la actividad de esta enzima es insuficiente para restablecer las concentraciones del GSH que se ve agotada. Además, la actividad de la GR es indispensable para controlar el nivel del GSSG. La generación del GSSG en hembras caninas con OSH, puede limitar la actividad de las enzimas GPx y GST que dependen del GSH. Aunado a lo anterior, los cambios del  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> y T pueden controlar la actividad de la GR. Sin embargo, otra posible explicación sea que la alteración de la síntesis del GSH se deba a la tendencia a disminuir las concentraciones séricas del  $17 \beta$ -E<sub>2</sub>.

En condiciones normales, existe sinergia entre las concentraciones del  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> y el GSH, ya que el GSH protege a la célula del EO (Wang *et al.*, 2006).



Esta relación entre el GSH y el  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> puede atribuirse al Nrf2 que regula la respuesta antioxidante a través de la transcripción de la gama-glutamil cisteína ligasa involucrada en la síntesis del GSH (Wang *et al.*, 2006). Además, otra enzima que participa en la desintoxicación de los RL es la GST que previene los efectos de la LPO. Esta enzima conjuga el GSH con agentes electrofílicos y detoxifica al organismo de ellos (Beutler *et al.*, 1988), se ha descrito que el  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> modula la expresión e inducción de los genes que codifican para la GST. La expresión de la GSTA4 una isoforma de la GST, disminuye en ratones obesos C57BL/6 con RI relacionado con la OVx (Yu *et al.*, 2012). Además, la GST está íntimamente involucrada en la biosíntesis de T, pero el efecto de la concentración de esta hormona en su actividad es desconocido (Hayes *et al.*, 2005). Los resultados del presente estudio sugieren que la OSH reduce la actividad de la GST en hembras caninas que se asoció con una tendencia a disminuir el  $17 \beta$ -E<sub>2</sub> y al aumento de la T. Esto podría alterar la actividad de la GST contribuyendo al aumento de la LPO y a la reducción del FRAP. Los resultados también muestran que las enzimas antioxidantes tienen características adaptativas que alteran su actividad cuando se reduce el  $17 \beta$ -E<sub>2</sub>, esto a su vez puede aumentar la producción de RL (Doshi y Agarwal 2013). Además, los resultados obtenidos un mes posterior a la realización de la OSH, podrían interpretarse como la consecuencia del proceso de estabilización en el organismo.

Otro de los componentes utilizados en los alimentos para mascota y que interviene en el sistema antioxidante es la vitamina C, la cual se considera en el perfil nutricional para proteger los AG que contiene el alimento (Gutiérrez y Cosío 2012). Sin embargo, a pesar de la capacidad de los perros para sintetizar este componente, se puede adquirir por el aporte nutricional, en consecuencia, esta vitamina se encuentra de manera constante en el organismo, los resultados muestran que la concentración de la vitamina C tiende a disminuir después de la OSH, esto podría atribuirse a su relación con el GSH y su participación con el FRAP que disminuyó y que interviene en la regeneración de la forma activa de la vitamina E y al encontrarse los niveles de GSH bajos en consecuencia se observa que la regeneración de la vitamina C disminuyó (Jones *et al.* 2000; Nogueira *et al.* 2004; Masella *et al.*, 2005).

Por otra parte, la lipoperoxidación (LPO) es el resultado de la alteración del sistema oxidante enzimático y no enzimático, es decir, la LPO es marcador del daño generado por los RL que atacan comúnmente a los lípidos insaturados que conforman la membrana celular (Doshi y Agarwal 2013) y se ha demostrado que el  $17\beta\text{-E}_2$  pueden disminuir la LPO, por lo que su reducción genera el efecto contrario sobre la LPO y el FRAP (McMichel *et al.*, 2007). En el presente estudio, los resultados mostraron que la LPO y el FRAP mostraron tendencia a aumentar y disminuir respectivamente al primer y sexto mes posterior a la OSH, debido a los cambios en las concentraciones fisiológicas de  $17\beta\text{-E}_2$  (Telci *et al.*, 2002; Kankofer *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2012). Otro estudio realizado en hembras caninas mostró que posterior a la OVH se presenta el periodo de adaptación y desequilibrio en el sistema antioxidante-oxidante, observando incremento en la SOD, LPO y decremento en el GSH (Szcubial *et al.*, 2015), coincidiendo esto con nuestros resultados. Sin embargo, a pesar de la interacción reflejada entre  $17\beta\text{-E}_2$  con las enzimas antioxidantes, no se encontró diferencia significativa en las pruebas de correlación, esto pudiera atribuirse al tamaño de muestra y al tiempo de duración del estudio por lo que es necesario llevar a cabo más investigación en este interesante tema.

## **IX. Conclusiones**

En resumen, se concluye que la OSH aumenta el peso corporal y la condición corporal aunada a la hipertrofia del tejido adiposo subcutáneo, además altera la actividad del sistema oxidante-antioxidante que a su vez incrementa la lipoperoxidación y disminuye la capacidad antioxidante total.

Específicamente se concluye que:

- 1.- En hembras caninas la disminución del  $17 \beta\text{-E}_2$  debida a la OSH, genera modificaciones y adaptaciones en el sistema antioxidante aumentando la LPO.
- 2.- Factores como el tipo de alimento u órganos secundarios de producción del  $17 \beta\text{-E}_2$ , intervienen en las concentraciones séricas cuantificadas de los mismos.
- 3.- La OSH participa en la generación de hipertrofia en los adipocitos, que se acentúa conforme transcurre el tiempo.
- 4.- En hembras caninas la disminución en la concentración sérica del  $17 \beta\text{-E}_2$  aumenta la actividad de la ec-SOD, la GPX y la GR.
- 5.- La disminución sérica del  $17 \beta\text{-E}_2$  en hembras caninas reduce la actividad de la GST y la concentración del GSH.

### **Limitantes del estudio**

Al realizar el presente estudio con mascotas de alto valor afectivo, se acordó con los propietarios un intervalo de tiempo no mayor a 6 meses y únicamente se autorizaron dos tomas de muestra de tejido adiposo, al inicio y al final del estudio, esto debido al uso necesario de anestesia y por considerarse un método invasivo.

Por otra parte, debido a las limitaciones económicas de los propietarios de los individuos de este estudio, no se pudo proporcionar a todos los animales el mismo tipo de alimento.

## CUADROS Y FIGURAS

Raza	Edad	Alimento	g proporcionados	0 mes			1 mes			6 mes		
				Peso (kg)	%GC	CC	Peso (kg)	%GC	CC	Peso (kg)	%GC	CC
Pug	3	Ganador	140.00	6.40	27.06	4	6.30	27.06	4	7.20	28.31	4
Pug	2	Ganador	160.00	8.00	24.43	3	8.30	25.36	4	10.00	28.63	4
Schnauzer	1	Dog Chow	140.00	7.20	17.31	3	7.60	19.01	3	8.80	25.36	3
Mestizo	4	Nupec	100.00	5.00	18.08	3	5.20	19.62	3	5.60	23.34	3
Mestizo	2	Dog Chow	210.00	12.00	19.33	3	12.50	19.33	3	12.50	22.28	3
Mestizo	2	Óptimo	210.00	13.00	22.44	3	13.10	22.44	3	13.90	23.37	3
Mestizo	3	Óptimo	255.00	16.80	22.12	3	17.50	20.58	3	18.20	19.04	3
Dálmata	5	Dog Chow	325.00	22.00	22.60	3	21.90	23.53	3	20.90	19.97	3
Pitbull	2	Benefult	315.00	21.50	23.69	3	22.40	24.62	3	27.60	28.34	4
Pitbull	5	Dog Chow	360.00	24.80	24.78	3	25.50	30.98	4	28.00	31.45	4
Bóxer	3	Óptimo	410.00	31.60	25.10	3	32.00	30.36	4	39.50	32.38	4
Dogo de Burdeos	4	Campeón	875.00	42.60	25.58	3	50.00	35.97	4	61.50	43.09	5

**Cuadro 3.** Características generales de los individuos experimentales. **Abreviaturas:** %GC =Porcentaje de grasa corporal, CC= Condición corporal.

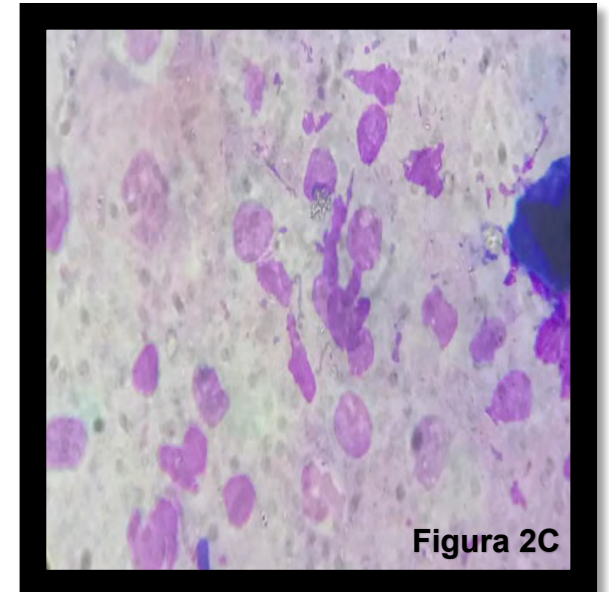
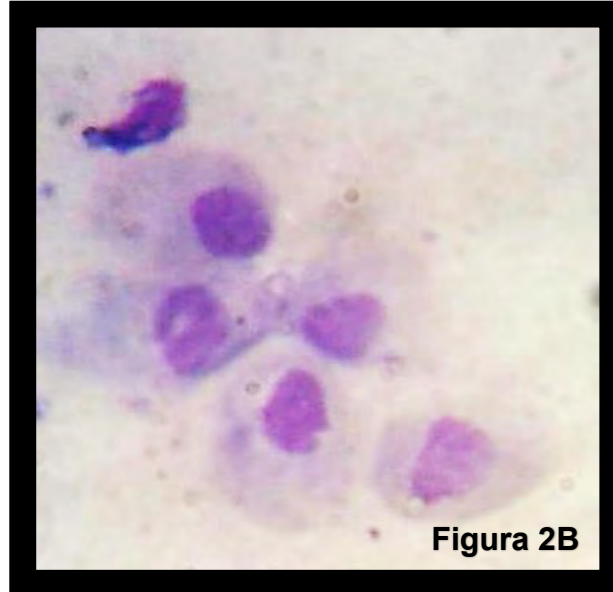
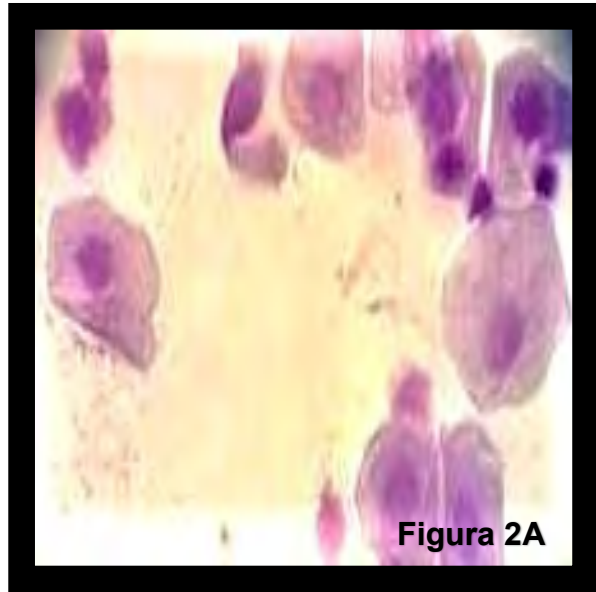
**NOTA:** La fórmula para datos morfométricos son para perros mayores a 7 kg, sin embargo, con fines, de investigación se realizó el ejercicio en perros con un peso inferior al antes mencionado.

Variables	Basal	1 mes	6 mes
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	233.16 ± 35.31	190.25 ± 17.03	186.66 ± 15.57
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	51.16 ± 13.91	61.50 ± 8.40	52.50 ± 6.94
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	94.66 ± 8.87	91.33 ± 2.88	85.16 ± 10.51
<b>Insulina (µU/mL)</b>	6.96 ± 1.89	16.42 ± 2.79	8.05 ± 1.12
<b>Índice HOMA</b>	1.66 ± 0.47	3.83 ± 0.82	1.68 ± 0.31
<b>Estradiol (pg/mL)</b>	69.70 ± 29.87	41.73 ± 2.13	40.78 ± 1.24
<b>Testosterona (ng/mL)</b>	0.44 ± 0.17	0.57 ± 0.21	0.79 ± 0.39

**Cuadro 4.** Características bioquímicas en suero de los individuos experimentales en diferentes intervalos de tiempo. Valores se expresan en la media ± error estándar, (n=12).

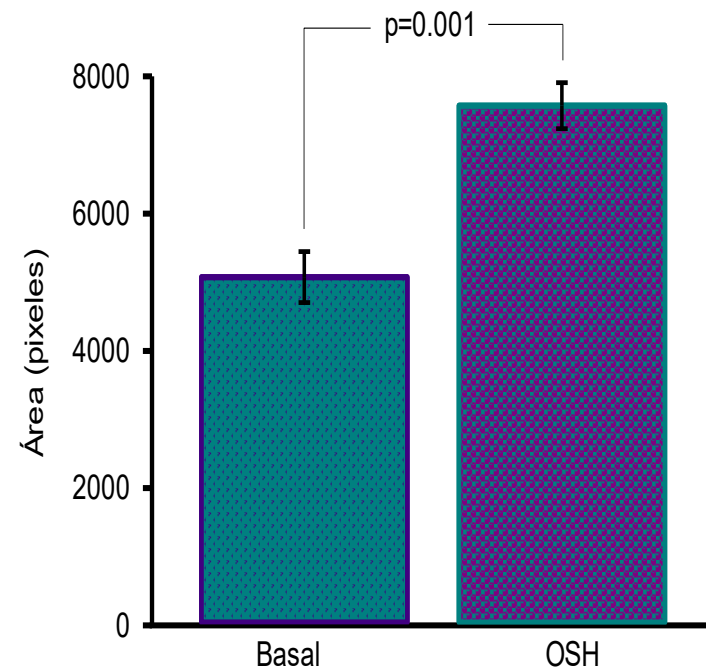
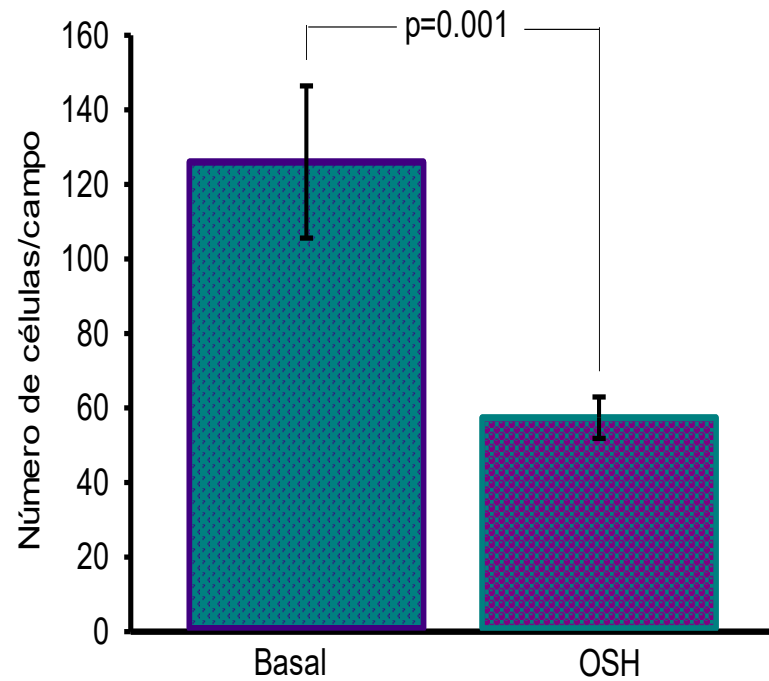
	GST	GR	GPx	GSH	ec-SOD	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Peroxidasas	Vitamina C	FRAP	LPO	%GC
<b>Correlación Pearson</b>	0.20	-0.04	0.11	-0.21	-0.15	-0.00	0.20	-0.18	-0.08	-0.02	0.06
<b>p</b>	0.24	0.79	0.52	0.20	0.36	0.97	0.23	0.29	0.62	0.89	0.69

**Cuadro 5.** Correlación entre las concentraciones séricas del 17 β-E<sub>2</sub> y las variables evaluadas, (n=12). **Abreviaturas:** p=significancia.



**Citología vaginal exfoliativa. Tinción:** Wright 100x. Figura 2A, B y C. Basal, primer y sexto mes respectivamente. Fotomicrografías representativas en diferentes intervalos de tiempo basal, primer y sexto mes posterior a la OSH, en donde se observa la etapa del ciclo estral de anestro, con presencia de células parabasales, moco y células adheridas entre sí.

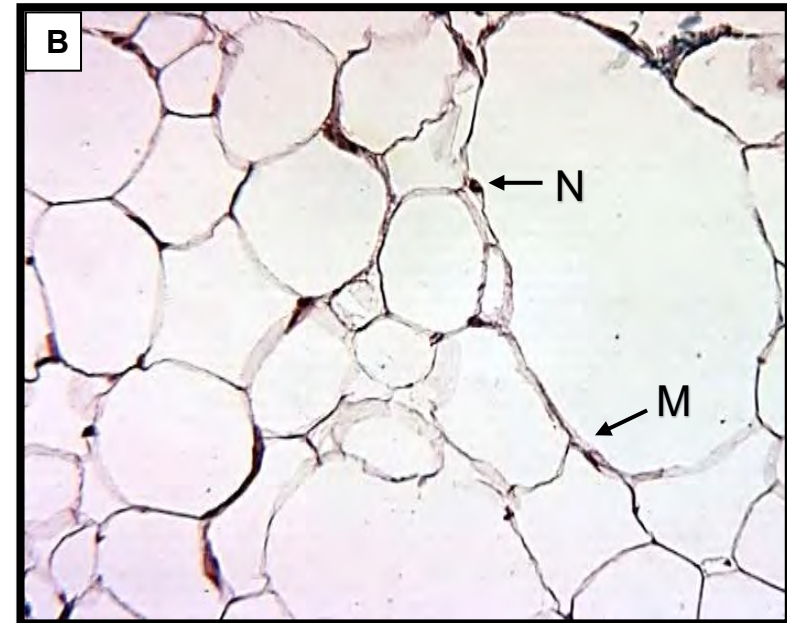
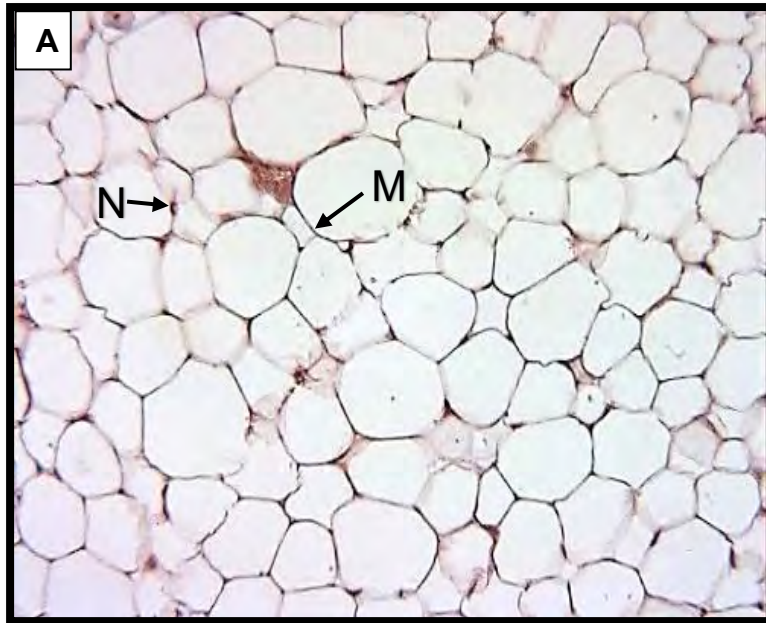
## TEJIDO ADIPOSEO



Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).

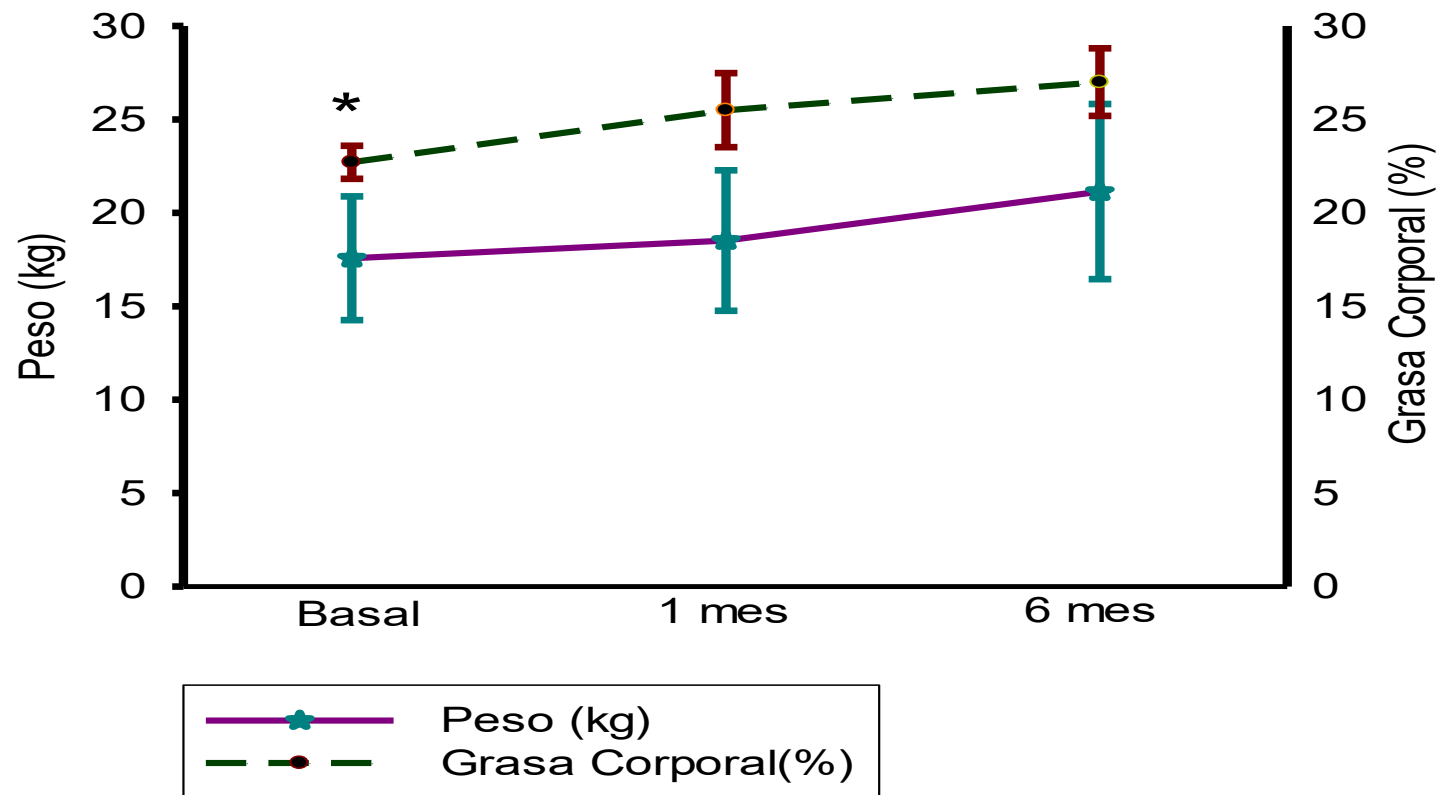
**Figura 3.** Número de células por campo en condiciones basales y seis meses posteriores a la realización de la OSH.

**Figura 4.** Área de los adipocitos entre las condiciones basales y seis meses posteriores a la realización de la OSH.



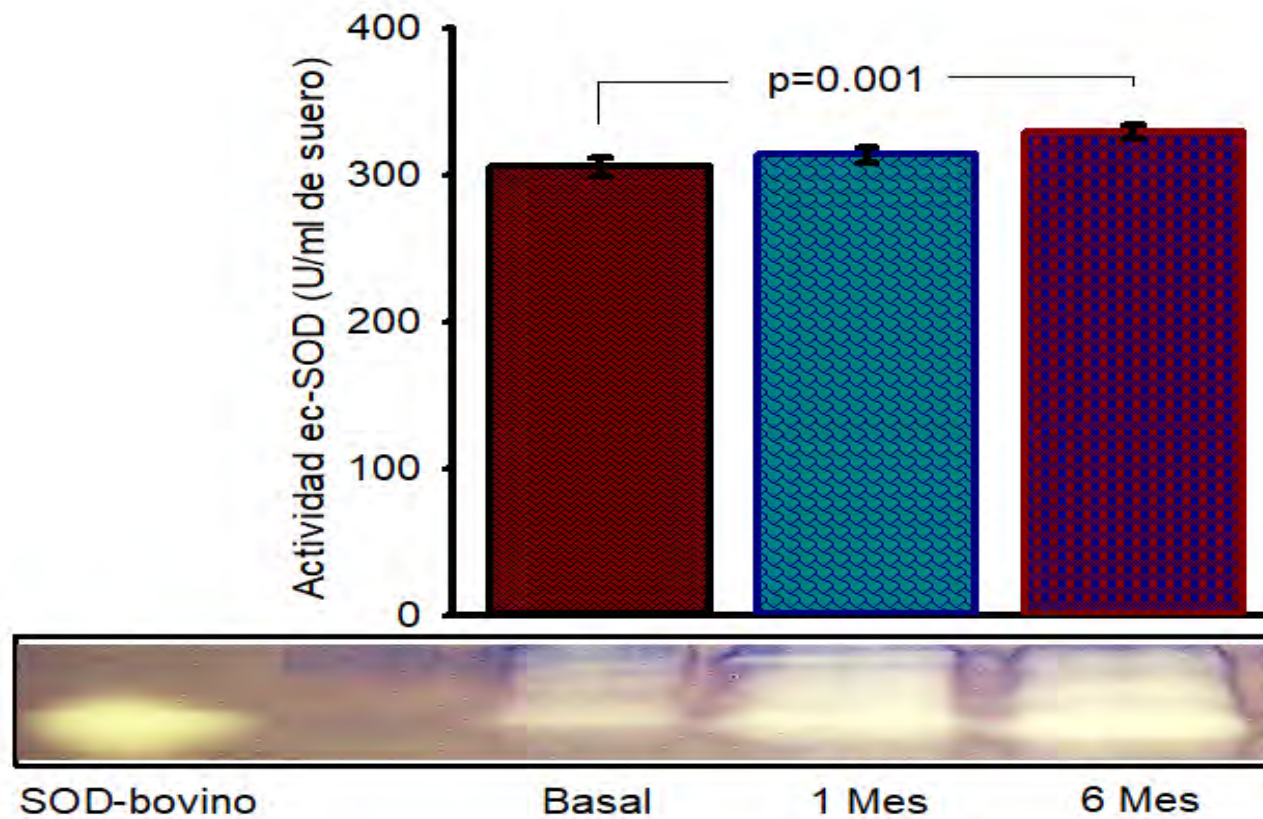
**Técnica:** Tricrómica de Masson a 40x. **Figura 5A y B.** Fotomicrográficas representativas del tejido adiposo subcutáneo en condiciones basales y seis meses posteriores a la realización de la OSH. **Abreviaturas:** N=Núcleo M=Membrana



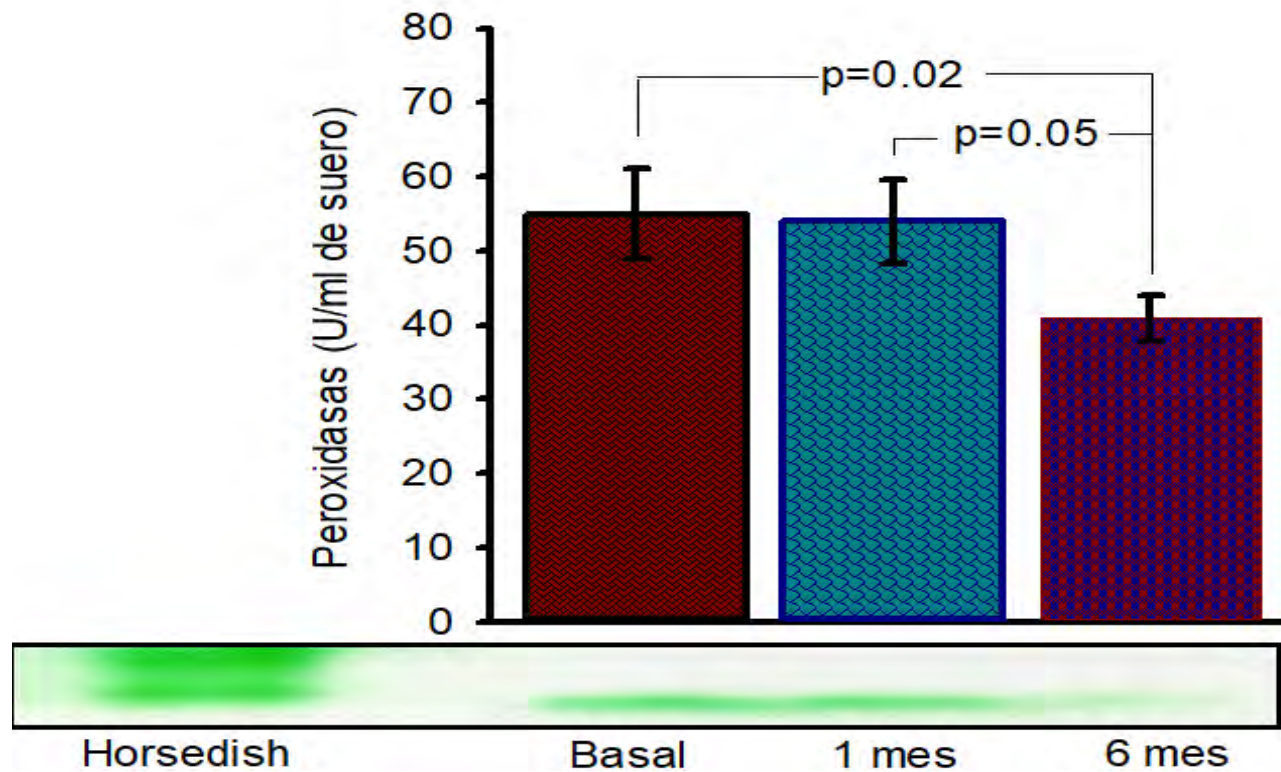


\*p=0.01

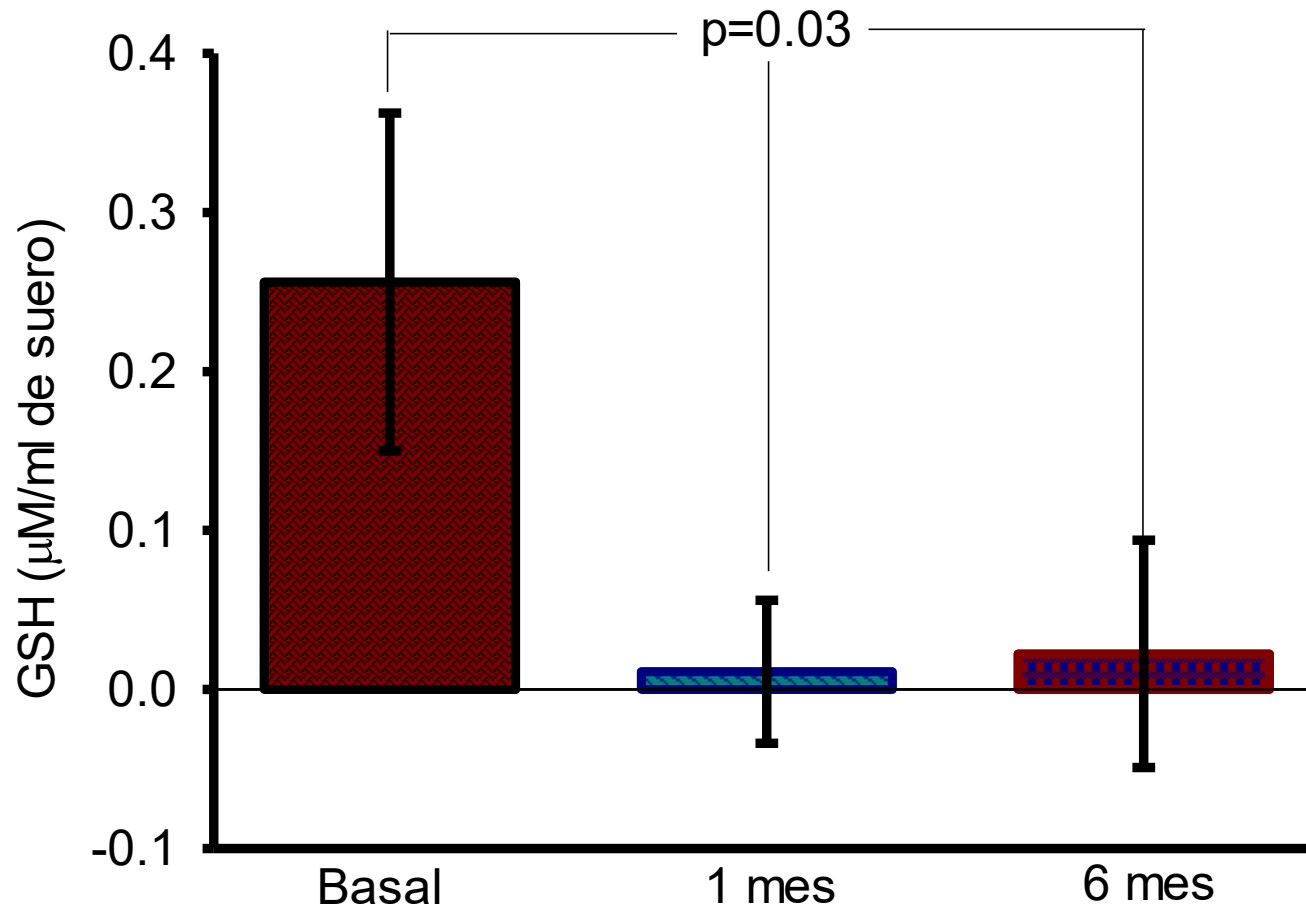
**Figura 6.** Relación entre peso (kg) y grasa corporal (%) en hembras caninas en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media ± error estándar; (n=12).



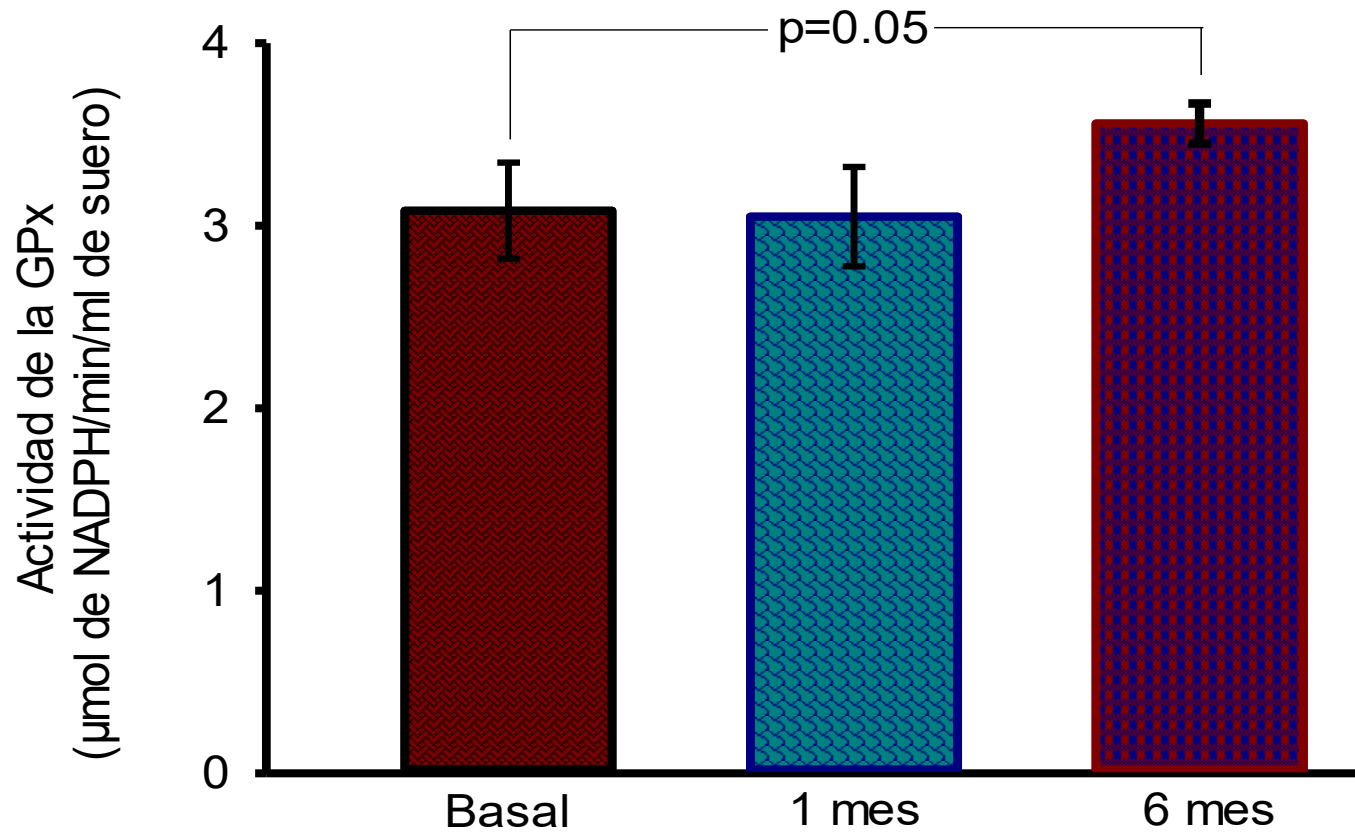
**Figura 7.** Concentración sérica de la ec-SOD en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).



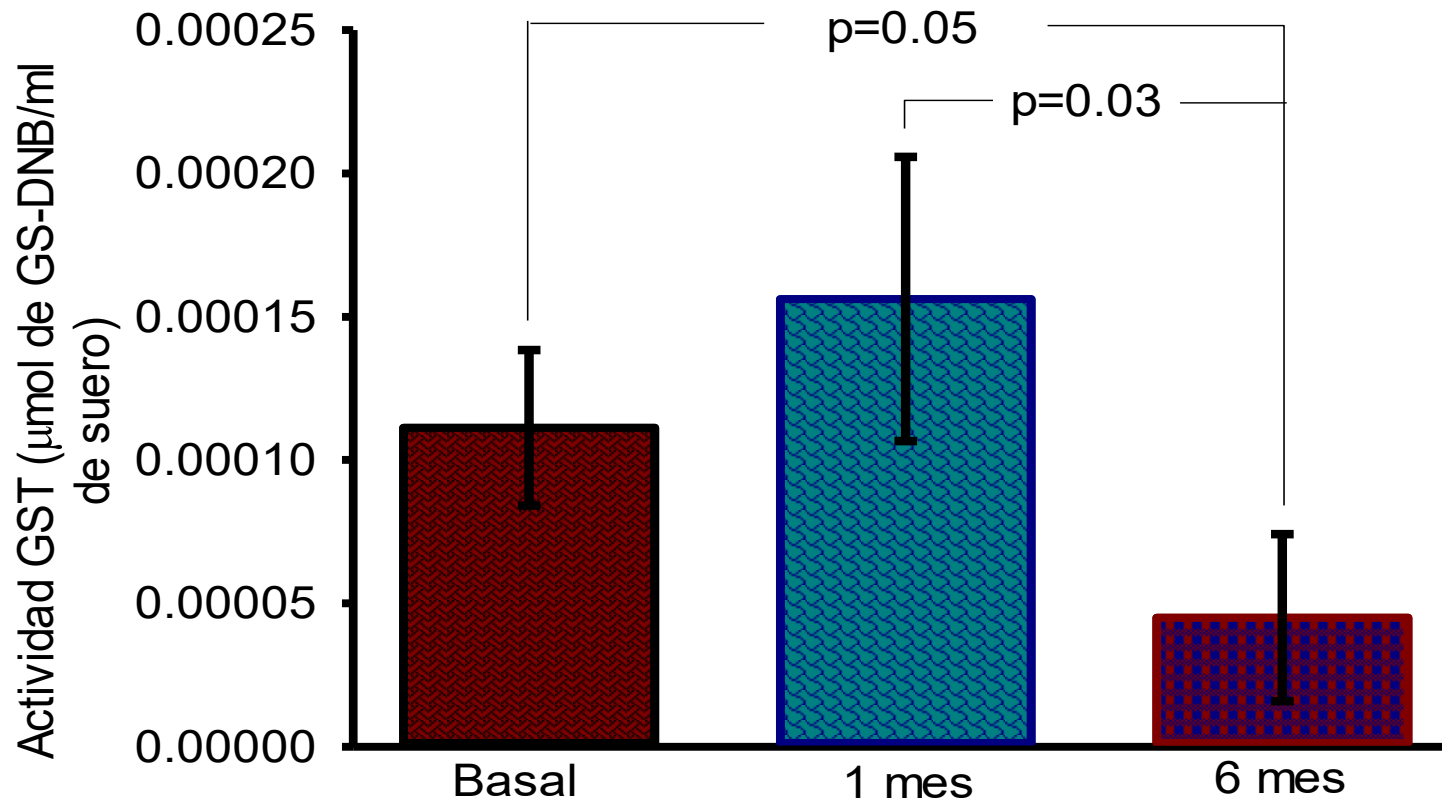
**Figura 8.** Concentración sérica de las peroxidasas en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).



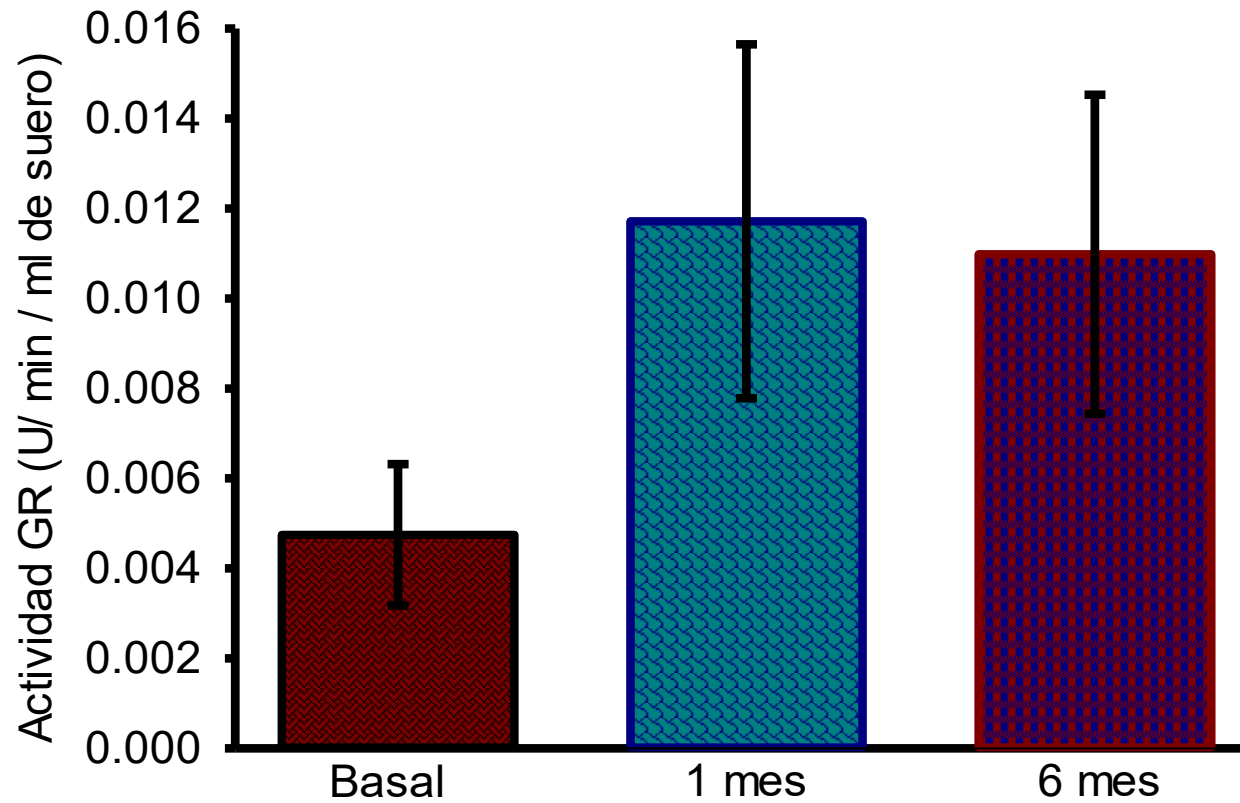
**Figura 9.** Concentración sérica de GSH en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).



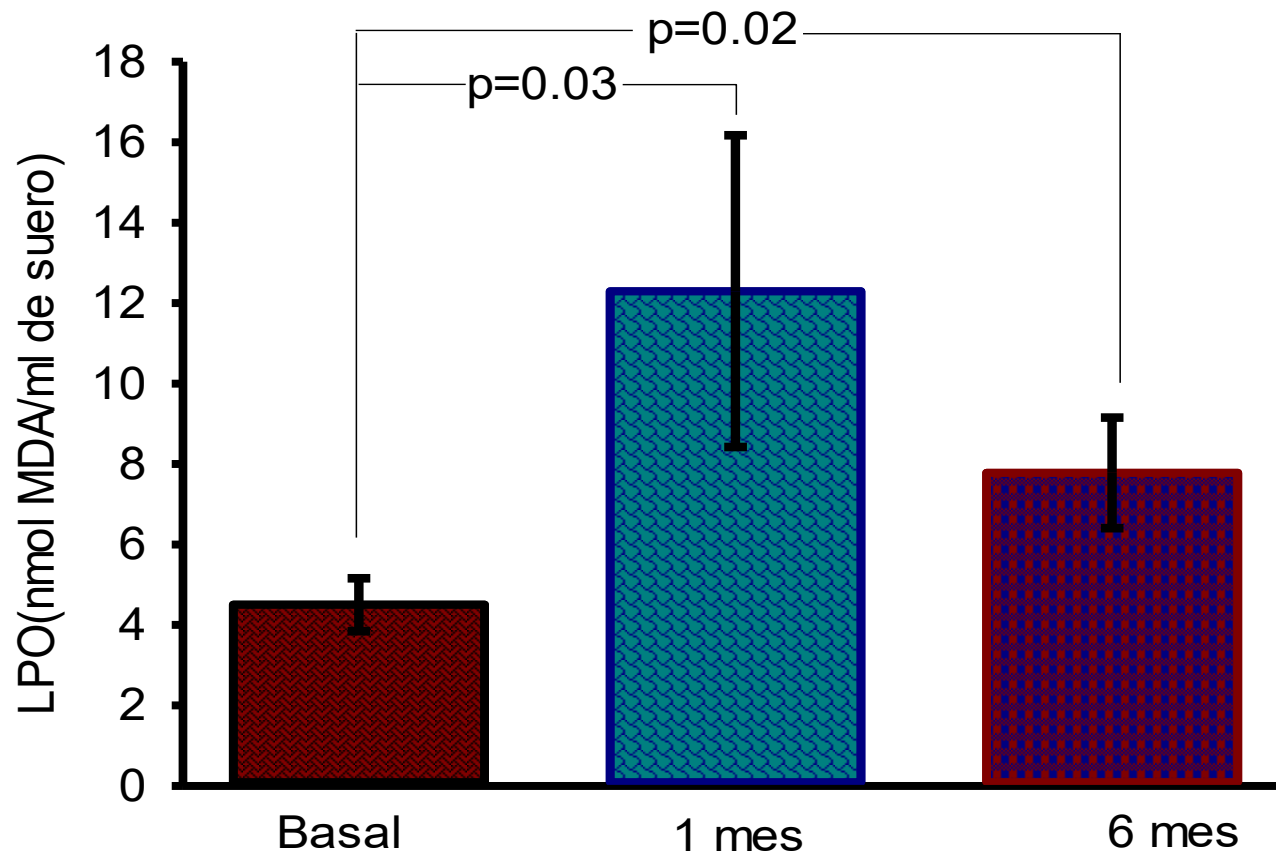
**Figura 10.** Actividad enzimática de la GPx en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).



**Figura 11.** Actividad enzimática de la GST en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).

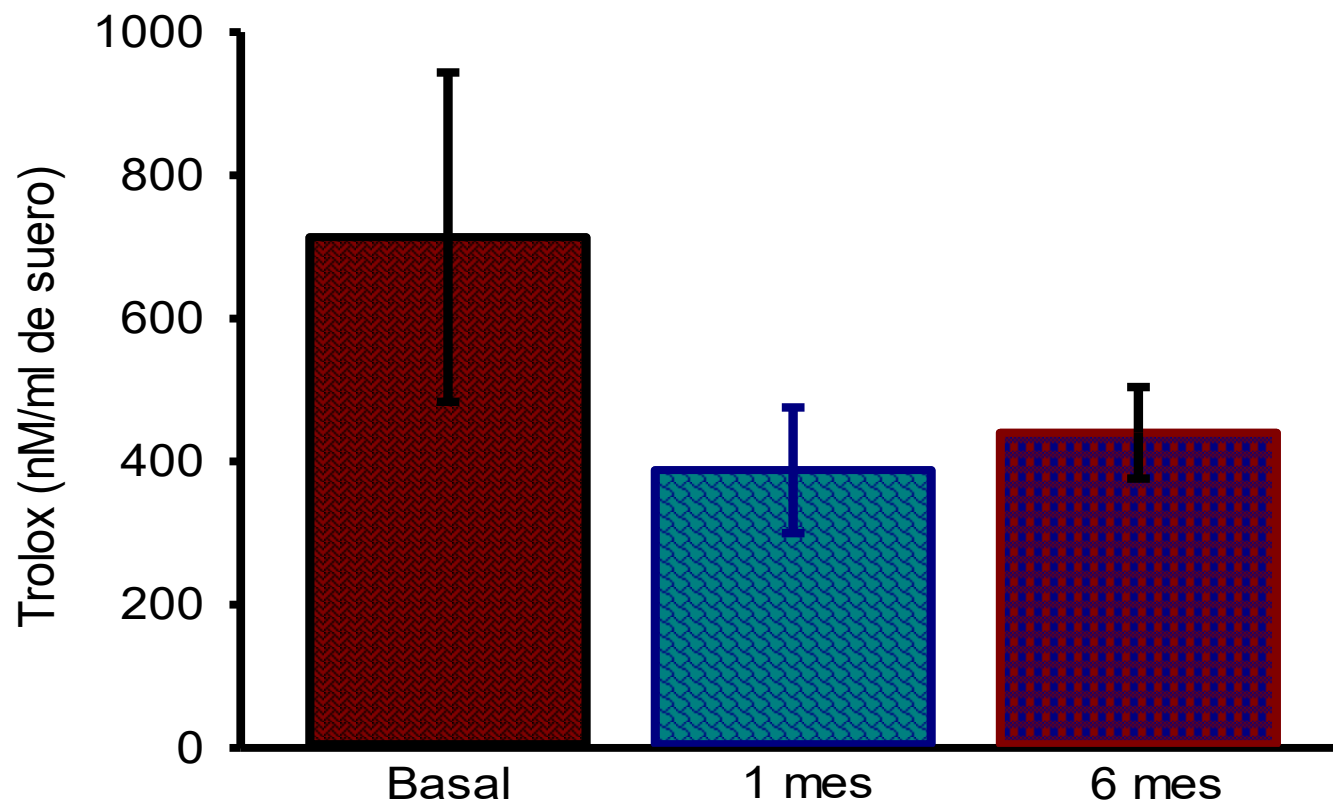


**Figura 12.** Actividad enzimática de la GR en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).

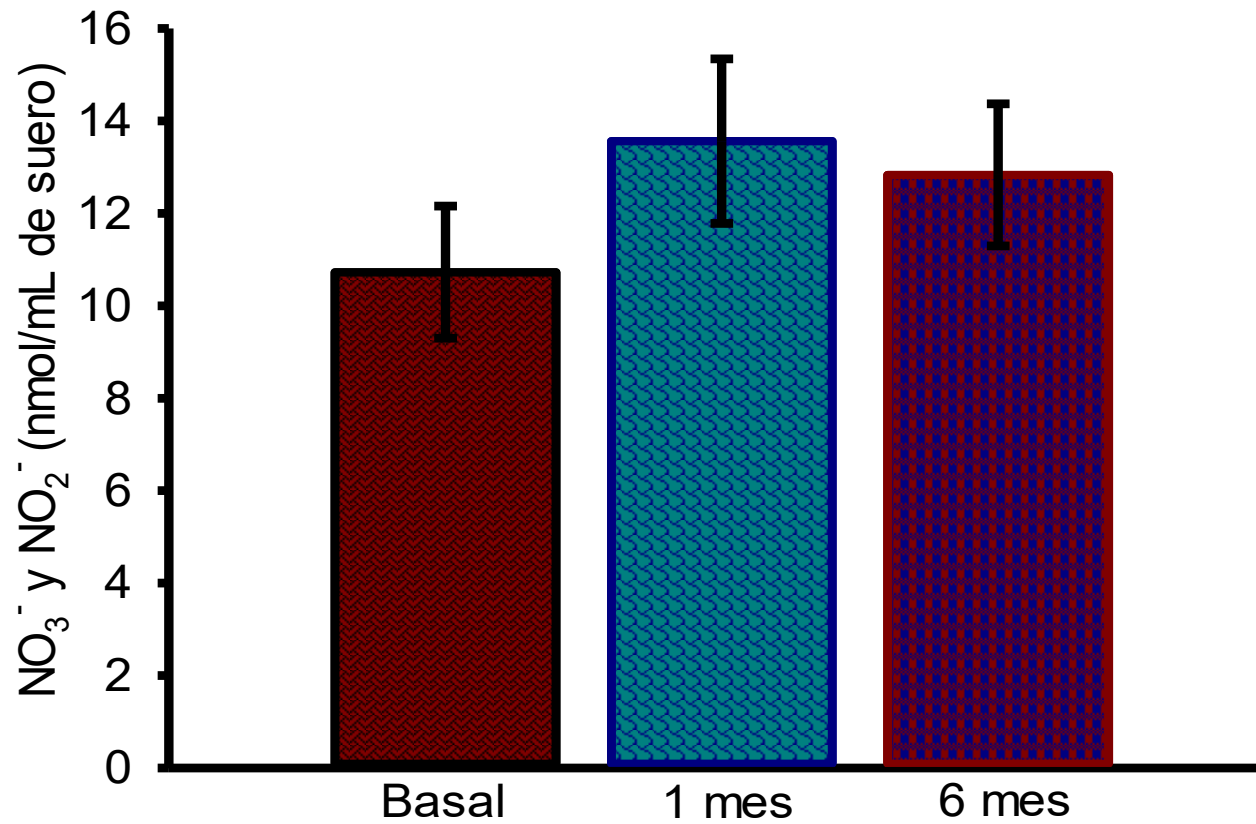


**Figura 13.** Concentración sérica de LPO en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).

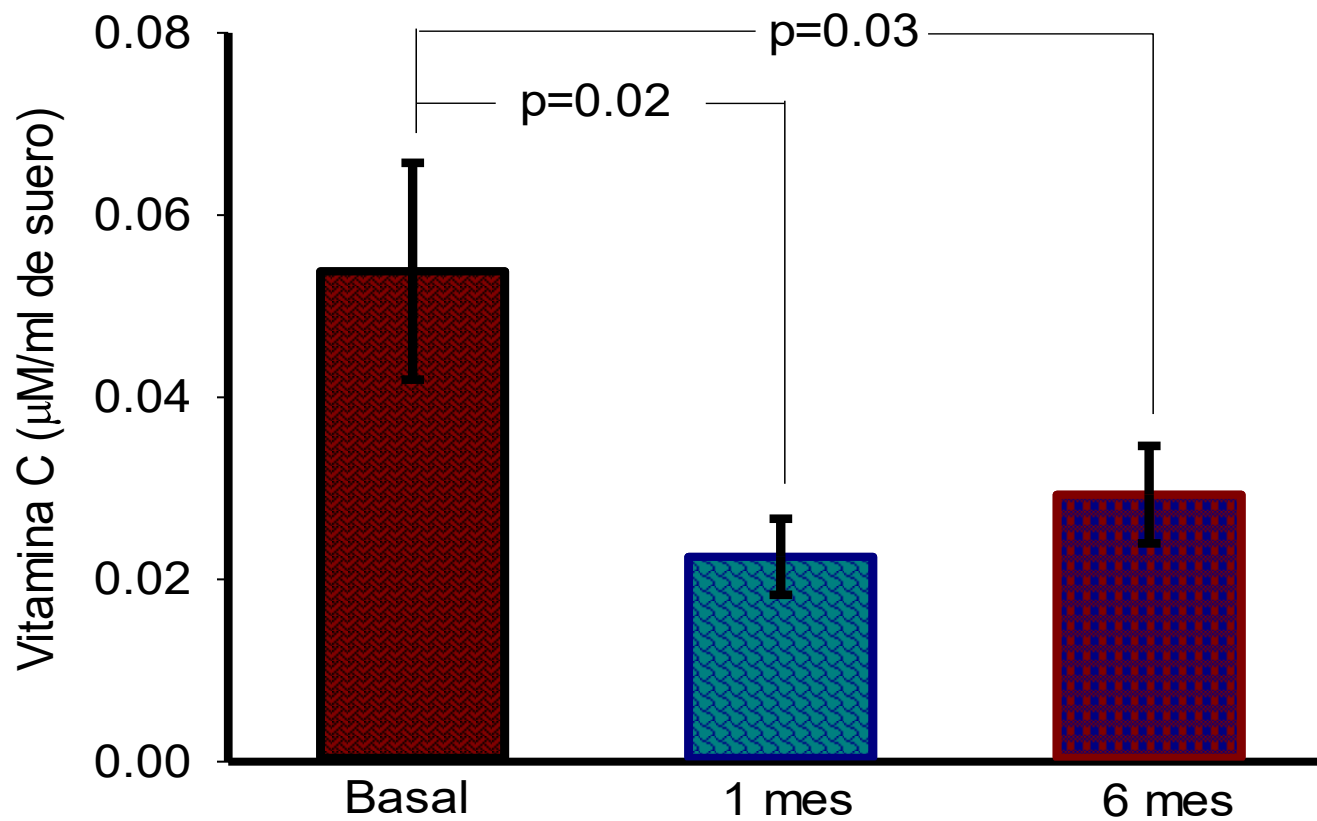




**Figura 14.** Actividad FRAP en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).



**Figura 15.** Concentración sérica de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).



**Figura 16.** Concentración sérica de Vitamina C en condiciones basales, primer y sexto mes posterior a la realización de la OSH. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=12).

## X. REFERENCIAS

Abdul O., Shamma G. and Zillo B. Serum  $\gamma$ -glutamyltransferase as oxidative stress marker in pre-and postmenopausal Iraqi women. *Oman Medical Journal*. 2010; 25:286-288.

Abrams J. and Webster D. Purification, partial characterization and posible role of catalase in the bacterium *Vitreoscilla*. *Archives Biochemistry Biophysics*. 1990; 279:54-59.

Ahmadi S., Eshraghian M., Hedayati M. and Pishva H. Relationship between estrogen and body composition, energy, and endocrine factors in obese women with normal and low REE. *Steroids*. 2017; 1-19.

Amado J. y Flórez J. Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. 1<sup>ra</sup> edición farmacología humana. 2003; 867-888.

Angoa M. Tesis de doctorado: Efecto antioxidante de los estrógenos sobre las alteraciones del sistema dopaminérgico mesoestrial causadas por exposición a ozono. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2007.

Baltgalvis K., Greising S., Warren G. and Lowe D. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *Plos one*. 2010; 5.

Baños G., Guarner V. and Pérez I. Sex steroid hormones, cardiovascular diseases and the metabolic síndrome. *Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. 2011; 3:137–146.

Benzie I. and Strin J. The ferricreducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239:70-76.

Benzie I. and Strin J. Ferric reducing /antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of fluids and modified versión for simultaneous

measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods enzymology*. 1999; 299:15-27.

Beutler E., Dunning D., Dabe I. and Forman L. Erythrocyte glutathione S- transferase deficiency and hemolytic anemia. *Blood*. 1988; 72:73-77.

Blüher M. Importance of estrogen receptors in adipose tissue function. *Molecular Metabolism*. 2013; 2:130–132.

Borai A., Callum L. and Gordon A. The biochemical assesment of insulin resistance. *The Association for Clinical Biochemistry*. 2007; 44:324-342.

Borrás C., Gambini J., Gómez C., Sastre J., Pallardó F., Mann G. and Viña J. 17beta- oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging cell*. 2005; 3:113-118.

Borras C., Gambini J. and Vina J. Mitochondrial oxidant generation is involvend in determining why females live longer than males. *Frontiers in bioscience*. 2007; 12:1008-1013.

Brandes R. and Mugge A. Gender differences in the generation of superoxide anions in the rat aorta. *Life Sciences*. 1997; 60:391-396.

Boveris A. Repetto M. y Valdéz L. Determinación del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas. 1<sup>ra</sup> edición manual moderno. 2008; 319-327.

Cambray R. Tesis de maestría: Efecto antioxidante del 17  $\beta$ -estradiol en el adipocito, en un modelo murino con síndrome metabólico. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2013.

Cerundolo R., Court M., Hao Q. and Kathryn E. Identification and concentration of soy phytoestrogens in commercial dogs food. *American Journal Veterinary Research*. 2004; 5:592-596.

Cerundolo R., Michel K., Reisner I., Phillips L., Goldschmidt M., Court M., Shrestha B., Hao Q., Refsal K., Oliver J., Biourge V. and Shofer F. Evaluation of the effects of

dietary soy phytoestrogens on canine health, steroidogenesis, thyroid function, behavior and skin and coat quality in a prospective controlled randomized trial. *American Journal Veterinary Research*. 2009; 70:353-360.

Chen C. and Pan S. Assay of superoxide dismutase activity by combining electrophoresis and densitometry. *Botanical Bulletin-Academia Sinica*. 1996; 37:107-111.

Chihuailaf R., Contreras P. y Wittwer F. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en la salud animal. *Veterinaria México*. 2002; 3:265-280.

D'eon T., Souza S., Aronovitz M., Obin M., Fried S. and Greenberg A. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning: evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280:35983–35991.

Dong J., Kathleen K. and Shao-yu C. Nrf2- Mediated Transcriptional Induction of antioxidant response in mouse Embryos Exposed to Ethanol *in vivo*: Implications for the Prevention of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Antioxidant & Redox signaling*. 2008; 10:2023:2033.

Doshi S. and Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause. *Journal of mid-life health*. 2013; 4:140-146.

Ferreira A., Silva W., Souza M., Ziemer L., Martins E., Guimaraes J. and Costa J. Comparison between the right lateral and ventral median approach in a bitch undergoing ovariosalpinghysterectomy. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2015; 67:984-992.

Flohé L. and Günzler W. Assays of glutathione peroxidase. *Methods enzymology*. 1984; 105:114-121.

Forero G. Ovariohisterectomía (OVH), técnica lateral. *Revista electrónica de veterinaria*. 2006; 6:1-7.

Foryst-Ludwig A. and Kintscher U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2010; 122:74–81.

Gao Q. and Horvath T. Cross-talk between strogen and leptinsignaling in the hypothalamus. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008; 5:E817-E826.

Gómez-Zubeldia M., Hernández R., Viguera J., Arbues J., Aparicio A. and Millán J. Effect of bilateral ovariectomy and ovarian steroid hormones on the antioxidant systems and plasma malondialdehyde levels in Wistar rats. *Endocrine research*. 2000; 26:97-107.

González M., Betancourt M. y Ortiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. 2000; 25:3-9.

Guan T., Song J., Wang Y., Guo L., Yuan L., Zhao Y., Gao Y., Lin L., Wang Y. and Wey J. Expression and characterization of recombinant bifunctional enzymes with glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017; 110:188-195.

Gutiérrez C. y Cosío K. Manual de nutrición y alimentación de perros y gatos. 1ra edición Ceamevet. 2012; 14-59.

Gutteridge J. The use of standards for malonyldialdehyde. *Analytical Biochemistry*. 1975; 69:518-526.

Hand M., Thatcher C., Remillard R. Nutrición clínica en pequeños animales. Un proceso repetitivo. 4ª Ed. Buenos Aires: Intermédica. 2000; 11-17.

Hayes J., Flanagan J. and Jowsey I. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005; 45:51-88.

Huang T., Yasunami M., Carlson E., Guillespie A., Reaume A., Hoffman E., Chan P., Scott R. and Epstein C. Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide

dismutase-deficient fetal fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997; 2:424-432.

Jarero J. Grelina, un péptido modulador del metabolismo energético. *Endocrinología y Nutrición*. 2007; 15:138-148.

Jeusette I., Greco D., Aquino F., Detilleux J., Peterson M., Romano V. and Torre C. Effect of breed on body composition and comparison between various methods to estimate body composition in dogs. *Research in Veterinary Science*. 2010; 88:227-232.

Jones D., Carlson J., Mody V., Cai J. and Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free radical Biology & Medicine*. 2000; 28:625-635.

Kankofer M., Radzki R., Bienko M. and Albera E. Anti-oxidative/oxidative status of rat liver after ovariectomy. *Journal Veterinary Medicine*. 2007; 54:225-229.

Kobayashi T., Koie H., Kusumi A., Kitagawa M., Kanayama K. and Otsuji K. Comparative investigation of body composition in male dogs using CT and body fat analysis software. *Internal Medicine*. 2013; 76:439-446.

Koehler K., Helguero L., Haldosén L-A., Warner M. and Gustafsson J-Å. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrine Reviews*. 2005; 26:465–478.

Kumar R., Kale R. and Baquer N. Estradiol modulates membrane-linked ATPases, antioxidant enzymes, membrane fluidity, lipid peroxidation, and lipofuscin in aged rat liver. *Journal of Aging Research*. 2011; 2011:8.

Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1979; 227:680-685.

Laflamme D. Nutrition for Aging Cats and Dogs and the importance of Body Condition. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*. 2004; 35:713-742.



Laurence R. and Burk R. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*. 1976; 71: 952.

Lee M., Cheng P. and Hong S. Oxidative stress induces vascular heme oxygenase-1 expression in ovariectomized rats. *Free radical biology and medicine*. 2005; 39:108-117.

Lubos E., Loscalzo J. and Handy D. Glutathione peroxidase in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2011; 7:1957-1997.

Maldonado S., Jiménez E., Guapillo M., Ceballos G. y Méndez E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. 2010; 2:32-39.

Mancini A., Raimondo S., Persano M., Segni C., Cammarano M., Gadotti G., Silvestrini A., Pontecorvi A. and Meucci E. Estrogens as antioxidant modulators in human fertility. *International journal of endocrinology*. 2013; 2013:1-6.

Manzano L. Tesis de licenciatura: Determinación del porcentaje de grasa corporal (GC%) y su relación con la gonadectomía, el tipo de alimentación y actividad física en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) evaluados en Distrito Federal y área Metropolitana. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2015.

Mao J., Xia Z., Chen J. and Yu J. Prevalence and risk factors for canine obesity surveyed in veterinary practices in Beijing, China. *Preventive Veterinary Medicine*. 2013; XXX:1-5.

Márquez D. C. Receptor de estrógeno: bases moleculares aplicadas a medicina. Universidad Central de Venezuela. 2002; 10:1-8.

Martin L., Siliart B., Dumon J. and Nguyen P. Hormonal disturbances associated with obesity in dogs. *Journal of animal Physiology and Animal Nutrition*. 2006; 90:355-360.

Marsella R., Di-Benedetto R., Vari R., Filesi C. and Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2005; 16:577-586.

Mawby D., Bartges J., D'Avignon A., Laflamme D., Moyers T. and Cottrell T. Comparison of various methods for estimating body fat in dogs. *Journal of the America Animal Hospital Association*. 2004; 40:109-114.

McMichael A. Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *Timely Topics in Nutrition*. 2007; 5:714-720.

Miller J., Brzezinska B. and Madsen F. Oxidative stress, antioxidants, and animal fuction. *Journal Dairy Science*. 1993; 9:2812-2823.

Newell A. The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte function. *Reproduction*. 2017; 153:133-149.

Nogueira C., Zeni G. and Rocha J. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and farmacology. *Chemical Reviews*. 2004; 104:6255-6285.

Olafsdottir K. and Reed D. Retention of oxidized glutathione by isolated rat liver mitochondria during hydroperoxide treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*. 1988; 964:377-382.

Ortemberg L., Castillo V., Duchene A. y Cabrera M. Esteatosis y cirrosis hepáticas asociadas a resistencia insulínica en un Bull terrier. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 2011; 9:1-7.

Oppenheimer J., Schwartz H., Lane J. and Thompson M. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogénesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 1:125.

Paglia D. and Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*. 1967; 70:158-169.

Pérez I., Roque P., El Hafidi M., Díaz-Díaz E. and Baños G. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radical Research*. 2009; 43:761-771.

Pérez I., Guarner V., Zúñiga A., Velázquez R., Cabrera A., Uribe S. and Pavón N. Effect of cross-sex hormonal replacement on antioxidant enzymes in rat retroperitoneal fat adipocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017; 10:1-12.

Pinto R. and Bartley W. The nature of the sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male and female rat liver. *The Biochemical Journal*. 1969; 115:449-456.

Redmon J., Shrestha B., Cerundolo R. and Court M. Soy isoflavone metabolism in cats compared with other species: urinary metabolite concentrations and glucuronidation by liver microsomes. *Xenobiotica*. 2016; 46:406-415.

Rivas V. Tesis de licenciatura: Comparación de dos métodos de evaluación corporal para el diagnóstico de obesidad en perros y gatos. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2013.

Ruíz M., Martín C., Martínez R., Navarro R., Lacort M. and Miller N. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chemistry and physics of lipids*. 2000; 105:179-188.

Santarossa A., Parr J. and Verbrugghe A. The importance of assessing body composition of dogs and cats and methods available for use in clinical practice. *Timely Topics in Nutrition*. 2017; 251:521-529.

Schäfer S., Deichsel K., Beceriklisoy H., Korkmaz D., Walter I. and Aslan S. Morphological, histological and molecular investigations on canine uterine tissue after ovariectomy. *Theriogenology*. 2017; 102:80-86.

Siow R., Li F., Rowlands D., Winter P. and Mann G. Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. *Free radical biology & medicine*. 2007; 7:909-925.

Soto M., Zuñiga A., Guarner V., Duran E. and Pérez I. Infusion of *Hibiscus sabdariffa* L. Modulates Oxidative Stress in Patients with Marfan Syndrome. *Mediators of Inflammation*. 2016; 2016:8625203.

Stubbins R., Najjar K., Holcomb V., Hong J. and Núñez N. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2012; 1:58–66.

Szczubial M., Kankofer M., Bochniarz M. and Dabrowski. Effects of ovariectomy on oxidative stress markers in female dogs. *Reproduction in domestic animals*. 2015; 50:393-399.

Takahiro S., Ida T., Nakamura Y., Shiimura Y., Kangawa K. and Kojima M. Physiological roles of ghrelin on obesity. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2014; 8:405-413.

Telci A., Cakatay U., Akhan S., Bilgin M. and Turfanda A., Sivas A. Postmenopausal hormone replacement therapy use decreases oxidative protein damage. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2002; 54:88-93.

Tropf M., Nelson O., Lee P. and Weng H. Cardiac and Metabolic Variables in Obese dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2017; 31:1000-1007.

Urabe M., Yamamoto T., Kashiwagi T., Okubo T., Tsuchiya H., Iwasa K., Kikuchi N., Yokota K., Hosokawa K. and Honjo H. Effect of estrogen replacement therapy on hepatic triglyceride lipase, lipoprotein liase and lipids including

apolipoprotein e in climacteric and elderly women. *Endocrine Journal*. 1996; 43:737–742.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M., Mazur M. and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39:44-84.

Verkest K., Rose F., Fleeman L., Rand J., Morton J., Richards A., Ishioka K. and Whitehead J. Adiposity and adiponectin in dogs: investigation of causes of discrepant results between two studies. *Domestic Animal Endocrinology*. 2011: 41:35-41.

Wang X., Dykens J., Perez E., Liu R., Yang S., Covey D. and Simpkins J. Neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol and nonfeminizing estrogens against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Molecular Pharmacology*. 2006; 1:395-404.

Yanagi S., Sato T., Kangawa K. and Nakazato M. The homeostatic force of ghrelin. *Cell Metabolism*. 2018; 27:1-19.

Yu J., Zhao Y., Li B., Sun L. and Huo H. 17  $\beta$ -estradiol regulates the expression of antioxidant enzymes in myocardial cells by increasing Nrf2 translocation. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2012; 26:264-269.

Zhou J. and Qin G. Adipocyte dysfunction and hypertension. *American Journal of Cardiovascular Disease*. 2012; 2:143–149.

Zhu H., Itoh K., Yamamoto M., Zweier J. and Li Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *Federation of European Biochemical Societies*. 2005; 579:3029-2036.

Zuñiga D. Tesis de pregrado: Técnicas de ovariectomía en la especie canina ("*Canis lupus familiaris*"). Universidad de Cuenca, Ecuador. 2012.

## **ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO PARA EL USO DE ANIMALES EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio le solicitamos de la manera más cordial de su autorización para que su perra participe en el proyecto de tesis de **Maestría en Ciencias** que lleva por título:

### ***“CORRELACIÓN ENTRE ESTRÓGENOS SÉRICOS, ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y CONDICIÓN CORPORAL EN HEMBRAS CANINAS OOFOROSALPINGOHISTERECTOMIZADAS”***

Durante el proyecto se realizarán las siguientes actividades:

- Recabar datos generales de la mascota
- Toma de valores morfométricos
- Toma de muestra de tejido adiposo de 1 cm durante de la ooforosalingohisterectomía (OSH) (solicitada por los propietarios) y seis meses después de este procedimiento.
- Se realizarán análisis de laboratorio (toma de muestras sanguíneas) antes de la OSH y seis meses después de dicho procedimiento, con el fin de observar el estado general de salud de su mascota y la determinación de analitos sanguíneos.

Las pruebas serán realizadas por personal capacitado, brindando siempre el mejor manejo y paciencia que cada mascota requiera

En compensación por la participación en el presente trabajo, los estudios que se realicen no tendrán costo alguno y los resultados de los análisis de laboratorio serán compartidos con usted(es), con la finalidad de que formen parte de su expediente clínico.

Este proyecto se realizará en colaboración con el Departamento de Fisiología y Farmacología Veterinaria de la FMVZ-UNAM, por la MVZ Linaloe Guadalupe Manzano Pech, bajo la asesoría de la Dra. Sara Del Carmen Caballero Chacón y las determinaciones químicas en colaboración con el Instituto de Cardiología con el Dr. Israel Pérez.

En caso de que el propietario tenga dudas sobre algún apartado de las pruebas que se llevarán a cabo, tendrá derecho a pedir mayor información con el

médico veterinario que realizará dicho procedimiento, así como de leer el protocolo del proyecto.

**Autorización del propietario**

Yo \_\_\_\_\_ estoy consciente de los procedimientos que se realizarán con \_\_\_\_\_ de la raza y con \_\_\_\_\_ años de edad, por lo que doy mi autorización para trabajar con mi mascota, comprometiéndome con el proyecto siendo consciente de la duración del mismo y con los médicos veterinarios.

---

FIRMA DEL PROPIETARIO

Tel:

Correo electrónico:

Dirección

## ANEXO 2. Carta de aprobación del SICUAE



**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias  
de la Producción y de la Salud Animal**  
*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*  
*Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán*  
*Instituto de Investigaciones Biomédicas*

**SICUAE - SUBCOMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE  
ANIMALES EXPERIMENTALES**

**Protocolo Número:** MC-2017/2-13

**Título del Proyecto:** "Evaluación de los niveles de estrógenos como colaboradores en la producción de antioxidantes en perras de talla mediana gonadectomizadas y enteras de la Ciudad de México."

**Investigador Responsable:** Sara del Carmen Caballero Chacón

**Tesista:** Linaloe Guadalupe Manzano Pech

Después de haber revisado el proyecto de investigación, el SICUAE consideró que reúne los requisitos que marcan las normas para el cuidado y uso de animales en experimentación, por lo cual, no tiene objeción en que se realicen los procedimientos planteados tal y como fueron descritos en el protocolo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria D.F. a 16 de enero del 2018

**EL COORDINADOR**

  
**DR. JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA**

- 
- Unidad de Posgrado, Edificio B, Primer Piso, B107. Circuito del Posgrado. Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán, CDMX, C.P. 04510. Tels.: 01 (55) 5623-7005 y 01 (55) 5623-0222 ext.: #80023, #80005, #80024.
  - Edificio 4 Posgrado, Planta alta. Fac de Med Vet y Zoot. Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, Del Coyoacán, CDMX, C.P. 04510.





**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias  
de la Producción y de la Salud Animal**

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Instituto de Investigaciones Biomédicas*

Ref.: 2018.02.IV.3.6  
Of. No. JJMM/CA/146/2018  
Asunto: Respuesta del CA

**Manzano Pech Linaloe Guadalupe**  
**Estudiante del Programa**  
**P r e s e n t**

Por medio de la presente, me permito informarle que su solicitud de cambio de título de tesis el registrado es: **“Evaluación de los niveles de estrógeno como colaboradores en la producción de antioxidantes en perras de talla mediana gonadectomizadas y enteras en la Ciudad de México”** por el de **“Correlación entre estrógenos séricos, enzimas antioxidantes y condición corporal en hembras caninas ooforosalpingohistectomizadas”**, fue discutida durante la Segunda Sesión Ordinaria del Comité Académico, el cual acordó **aprobar**.

Sin más por el momento, me despido de usted y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**

**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”**

**Cd. Universitaria, Cd. Mx., 1 de marzo de 2018.**

**El Coordinador del Programa**

**Dr. José Juan Martínez Maya**

JJMM\*IMFO\*smegp

- Unidad de Posgrado, Edificio B, Primer Piso, B107. Circuito del Posgrado. Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán, CDMX, C.P. 04510.  
Tels.: 01 (55) 5623-7005 y 01 (55) 5623-0222 ext.: #80023, #80005, #80024.
- Edificio 4 Posgrado, Planta alta. Fac de Med Vet y Zoot. Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, Del Coyoacán, CDMX, C.P. 04510.

**ANEXO 3. Cuadro de clasificación de tipos de alimentos (Gutiérrez y Cosío 2012).**

Número de clasificación	Tipo de alimento
1	Caseros
2	Valor
3	Premium
4	Prescripción

**Alimentos caseros:** Alimentos elaborados por los propietarios de los perros, los cuales carecen de fundamento nutricional, por lo que no existe un balance en el contenido de sus ingredientes.

**Valor:** Alimentos que, debido a la publicidad, se distinguen fácilmente; se pueden adquirir en tiendas de autoservicio a nivel nacional y estatal. Los ingredientes de este tipo de alimentos son variables, incluso dentro del mismo lote de alimentos.

**Premium:** Alimentos cuya formulación puede variar, pero la calidad permanece igual, se pueden adquirir en tiendas comerciales de prestigio. Estos alimentos tienen divisiones de acuerdo con la etapa y estilo de vida.

**Prescripción:** Alimentos que se proporcionan para tratar algunas patologías, se distribuyen exclusivamente en clínicas veterinarias y en la etiqueta se debe señalar que se requiere la supervisión del médico veterinario.

**ANEXO 4. Cuadro de porcentaje de Grasa Corporal con relación a la condición corporal (Gutiérrez y Cosío 2012).**

	<b>Peso relativo</b>				
	0.8 u 80%	0.9 u 90%	1.0 u 100%	1.1 u 110%	1.2 u 120%
<b>Peso ideal (kg)</b>	<b>Peso actual (kg)</b>				
<b>1</b>	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2
<b>2</b>	1.6	1.8	2.0	2.2	2.4
<b>3</b>	2.4	2.7	3.0	3.3	3.6
<b>4</b>	3.2	3.6	4.0	4.4	4.8
<b>5</b>	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
<b>10</b>	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
<b>15</b>	12.0	13.5	15.0	16.5	18.0
<b>20</b>	16.0	18.0	20.0	22.0	24.0
<b>25</b>	20.0	22.5	25.0	27.5	30.0
<b>30</b>	24.0	27.0	30.0	33.0	36.0
<b>Previa condición corporal</b>					
	1	2	3	4	5
<b>Previó porcentaje de grasa corporal</b>					
	<5%	5-15%	16-25%	26-35%	>35%