



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

“Efecto a corto plazo de la Tibolona sobre el estrés oxidante y el metabolismo en suero de ratas ovariectomizadas alimentadas con dieta alta en fructosa y grasa”

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

M en C F. Norma Angélica Estrada Cruz

Directores

Dr. Julio César Almanza Pérez

Dr. Christian Humberto Guerra Araiza

Asesora

Dra. Leticia Manuel Apolinar

Julio de 2019.

Comité Tutorial

Co-directores

Dr. Julio César Almanza Pérez

Profesor- Investigador, Titular C

Laboratorio de Farmacología

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

jcap@xanum.uam.mx

Dr. Christian Humberto Guerra Araiza

Investigador Titular B

Unidad de Investigación Médica en Farmacología

Hospital de Especialidades

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

christiang Guerra2001@gmail.com

Asesora

Dra. Leticia Manuel Apolinar

Investigador Titular A

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endócrinas

Hospital de Especialidades

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

letymanu@yahoo.com.mx

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 401729.

Esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endócrinas en el Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional SXXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, en colaboración con el laboratorio de Farmacología de la División en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de los Doctores: Christian Guerra, Julio C. Almanza y Leticia Manuel. Este trabajo de investigación fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro 401729, por la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, con número de registro R-2018-785-016, y por el Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de México con el número de folio 18BTD0042. Durante los estudios de Doctorado recibí una beca por parte del CONACyT y de la Coordinación de Investigación del IMSS matrícula No.99096806.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Efecto a corto plazo de la tibolona sobre estrés oxidante y metabolismo en suero de ratas ovariectomizadas alimentadas con dieta alta en fructosa y grasa”

Que presentó

M en C F Norma Angélica Estrada Cruz

El día 5 de julio de 2019.

Dra. Sandra Orozco Suárez

Presidente

Investigador Titular A. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS.

sorozco5@hotmail.com

Dra. Ma. de los Ángeles Fortis Barrera

Secretario

Profesor- Investigador, Titular C. Laboratorio de Farmacología DCS. CBS. UAM- Iztapalapa.

fortis11_10@yahoo.com.mx

Dra. Leticia Manuel Apolinar

Vocal 1

Investigador Titular A. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endócrinas. Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS.

letymanu@yahoo.com.mx

Dr. Rodolfo Pinto Almazán

Vocal 2

Investigador en Ciencias Médicas C. Laboratorio de Biología Molecular en Enfermedades Metabólicas y Neurodegenerativas. Unidad de Investigación del HRAEI.

pinto.rodolfo@gmail.com

DEDICATORIAS

A Dios.

Por todo lo maravilloso que me ha dado en la vida.

A mis padres Ramos y Cris.

Por estar siempre conmigo, por enseñarme a crecer y a que si caigo debo levantarme, por apoyarme y guiarme, por ser las bases que me ayudaron a llegar hasta aquí. Por qué a pesar de todo son los mejores padres que Dios me pudo dar. Los amo, papis!

A mis hermanos Jorge Adrián y Omar

Por ser mis mejores amigos y confidentes, por estar siempre para mí, por cuidarme, respetarme y por permitirme ser su guía. Ustedes son los que me impulsan a ser mejor cada día, por que son el mejor regalo que me han hecho mis padres. Los amo "chipalis"!

A mí querida bolita (Melanie Valentina)

Por ser la niña de mis ojos y otro pequeño motor que mueve mi vida. Mi querida sobrinita, tú eres una alegría para mi corazón. Te amo, mi niña bonita!

A mi cuñada Estela.

Por su cariño y apoyo que me brinda cuando lo necesito.

A sobrina Anita y a su pequeño bebé.

Por brindarme su confianza, por permitirme ser parte de sus vidas, y darme una de las más grandes y valiosas lecciones de vida.

A mi corazón de melón

Por compartir un pedacito de tu vida conmigo, por hacerme siempre sonreír, por ser ese apoyo incondicional, con el que sé, que siempre contaré. "Porque siempre que daban las cuatro de la tarde, yo desde las tres comenzaba a ser feliz". "Simplemente por que si tuviera que volver a comenzar mi vida, intentaría encontrarte mucho antes". Te amo mil!!

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores

Al Dr. Guerra y al Dr. Almaza por todo el apoyo brindado para la culminación de este proyecto, por guiarme, por transmitirme sus sabios conocimientos y por estar siempre cuando lo he necesitado. Ustedes son un verdadero ejemplo a seguir.

A la Dra. Lety Manuel

Por el apoyo incondicional que siempre me ha brindado, por guiarme y dedicarme su tiempo, mucho antes de sumarse a la aventura de este proyecto.

A la Dra. Fortis

Por compartirme sus conocimientos y por brindarme su amistad, por escuchar mis miles de historias de vida y siempre tener un consejo acertado para mí, mil gracias Dra.

A la Dra. Orozco

Por siempre ayudarme y transmitirme su pasión por las neurociencias. Algún día me gustaría ser como ud. Soy su fiel admiradora.

Al Dr. Pinto

Gran Bro, simplemente gracias por siempre apoyarme, eres un ejemplo de hermano (académico) mayor y de personas triunfadoras.

A mis amigos de la UIMF, CMN-SXXI, IMSS

Edith, Vere, Yessi, Dulce, Karla, Iván, Mike, por siempre hacer más amena mi estancia en el laboratorio, por todos los momentos compartidos, muchas gracias por su confianza y amistad!

A mis amigos del Laboratorio de Farmacología de la UAM-I

Hilda, Frida, Taly, Mimi, Sele, Naye, Martha, Ara, Iván, al Dr. Blancas y por supuesto al Dr. Alarcón, por la confianza y amistad brindada, con la que seguro podré contar siempre.

A mis amigos del Bioterio de Cardiología del CMN-SXXI, IMSS

Dra. Inés, Dr. Medardo, Dr. Daniel, Dr. César, por adoptarme en su área de trabajo, de verdad que son unas excelentes personas.

Sin duda gracias a todos y cada uno de ustedes y a los que seguro faltó mencionar, no duden que siempre podrán contar conmigo. Por que siempre ocuparan un lugar especial en mi corazón.

Índice

	Pág.
Abreviaturas	14
Resumen	18
Abstract	20
1. Hormonas esteroídes	22
1.1 Clasificación y mecanismo de acción de hormonas esteroides	24
1.2 Estrógenos	25
1.3 Participacion de los Estrógenos en el metabolismo	27
1.4 Deficiencia estrogénica	29
1.5 Deficiencia estrogénica y cambios metabólicos	30
1.6 Deficiencia estrogénica y el estrés oxidante	31
2. Terapia de Reemplazo Hormonal (TRH)	34
2.1 Medicamentos hormonales utilizados como TRH	35
2.2 Riesgos y beneficios del uso de la TRH	37
2.3 Tibolona (TB)	38
2.3.1 Propiedades químicas de la TB	39
2.3.2 Mecanismo de acción de la TB	39
2.3.3 Absorción, biotransformación y excreción de la TB	41
2.3.4 Relación de la TB con alteraciones metabólicas	42
2.3.5 Relacion de la TB con el estrés oxidante	44

3. Enfermedades metabólicas y el síndrome metabólico en México	44
3.1 Tratamiento de síndrome metabólico durante la menopausia	49
4. Dietas hipercalóricas como modelos en los trastornos metabólicos	52
4.1 Dieta alta en grasa	53
4.1.2 Dieta alta en fructosa	53
4.1.3 Dieta combinada (fructosa-grasa)	55
4.1.4 Dieta aterogénica	57
4.1.5 Dieta que induce lipogénesis hepática sin obesidad	57
4.1.6 Dieta que inhibe la oxidación de ácidos grasos	58
5. Estrés Oxidante	58
5.1. Peroxidación lipídica	59
5.2. Antioxidantes	61
5.2.1 Antioxidantes exógenos	61
5.2.2 Antioxidantes endógenos	63
5.2.3 Antioxidantes endógenos de tipo enzimático	63
5.2.4 Antioxidantes endógenos de tipo no enzimático	67
5.2.5 Estrógenos como antioxidantes	70
5.3. Estrés oxidante en los trastornos metabólicos y la deficiencia estrógenica	71
6. JUSTIFICACIÓN	76
7. HIPÓTESIS	77
8. OBJETIVO GENERAL	78
9. OBJETIVOS ESPECIFICOS	79
10. MATERIAL Y MÉTODOS	80
10.1 Animales	80

10.2	Procedimientos quirúrgicos	80
10.3	Dietas	80
10.4	Tratamiento	81
10.5.	Diseño experimental	81
10.5.1	Determinación del peso corporal	82
10.5.2	Determinación de consumo de alimento	82
10.5.3	Determinación de consumo de fructosa al 20%	82
10.5.4	Determinación de ingesta calórica	82
10.5.5	Determinación de colesterol y triglicéridos en suero	82
10.5.6	Determinación de glucosa y sensibilidad a la insulina	83
10.5.7	Actividad específica de la SOD	83
10.5.8	Actividad específica de GPx y GR	84
10.5.9	Relación GSH/GSSG	84
10.5.10	Derminacion de AGES	85
10.5.11	Determinacion de MDA	85
10.5.12	Análisis Estadístico	86
11.	RESULTADOS	87
12.	DISCUSIÓN	121
13.	CONCLUSIONES	131
14.	PERSPECTIVAS	132
15.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
16.	ANEXOS (PUBLICACIONES)	163

Índice de Tablas y Figuras

Tabla /Figura	Descripción	Página
Tabla 1.	Componentes del síndrome metabólico considerando su definición.	46
Tabla 2.	Efecto de la TB sobre la diferencia de peso (ΔWg)	90
Figura 1.	Principales hormonas esteroides.	22
Figura 2.	Mecanismo de acción de las hormonas esteroides.	25
Figura 3.	Estructura química del estradiol, estrona y estriol.	26
Figura 4.	Participación de los estrógenos en órganos y sistemas	28
Figura 5.	Etapas del climaterio	30
Figura 6.	Estructura química de la Tibolona	38
Figura 7.	Estructura química del noretinodrel y de la noretisterona	39
Figura 8.	Conversión metabólica de la Tibolona	41
Figura 9.	Riesgo de desarrollar SM por envejecimiento (menopausia).	48
Figura 10	Desarrollo proyectado de la población mundial femenina en las próximas 4 décadas.	50
Figura 11.	Proceso de Lipoperoxidación	60
Figura 12.	Estructura química de las distintas formas de glutatión.	69
Figura 13.	Función antioxidante de GSH	69
Figura 14.	Diseño experimental	86

Índice de Gráficas

Gráfica	Descripción	Página
Gráfica 1	Efecto de TB sobre el peso corporal inducidos por HFFD y OVX.	89
Gráfica 2	Efecto de la TB sobre el consumo de alimento inducido por HFFD y OVX.	92
Gráfica 3	Efecto de la TB sobre el consumo de fructosa al 20% inducido por HFFD y OVX.	94
Gráfica 4	Efecto de la TB sobre la ingesta calórica inducidos por HFFD y OVX.	96
Gráfica 5	Efecto de la TB sobre la concentración de triglicéridos inducidos por la OVX y la HFFD en suero.	98
Gráfica 6	Efecto de la TB sobre la concentración de colesterol inducido por la OVX y la HFFD en suero.	100
Gráfica 7	Efecto de la TB sobre la concentración de glucosa inducido por la OVX y la HFFD en suero.	102
Gráfica 8	Efecto de la TB sobre la sensibilidad a la insulina inducida por la OVX y la HFFD en suero.	105
Gráfica 9	Efecto de la TB sobre la concentración de AGE's inducido por la OVX y la HFFD en suero.	107
Gráfica 10	Efecto de la TB sobre la actividad de la SOD inducido por la OVX y la HFFD en suero.	108

Gráfica 11	Efecto de la TB sobre la actividad de la GPx inducido por la OVX y la HFFD en suero.	110
Gráfica 12	Efecto de la TB sobre la actividad de la GSr inducido por la OVX y la HFFD en suero.	112
Gráfica 13	Efecto de la TB sobre la concentración de GSH inducido por la OVX y la HFFD en suero.	114
Gráfica 14	Efecto de la TB sobre la concentración de GSSG inducido por la OVX y la HFFD en suero.	116
Gráfica 15	Efecto de la TB sobre el ratio GHS/GSSG inducido por la OVX y la HFFD en suero.	118
Gráfica 16	Efecto de la TB sobre la concentración de MDA inducido por la OVX y la HFFD en suero.	120

Abreviaturas

3α-OH TB	3 α -hidroxi-Tibolona
3β-OH TB	3 β -hidroxi-Tibolona
AAEC	Asociación Americana de Endocrinología Clínica
AGE's	Productos de Glicación Avanzada
ATP III	Tercer panel de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol
CAT	Catalasa
CMLV	Musculo liso vascular
COL	Colesterol
DE	Dieta Estándar
DEND	Deficiencia de Estrógenos Endógenos
DHAP	dihidroxiacetona-fosfato
DNA	Acido Desoxirribonucleico
DT	Dieta
DTHC	Dieta hipercalórica
DTII	Diabetes Mellitus Tipo II
DTNB	ácido 2-nitrobenzoico
DTPA	Dietilenti amino penta acético
E₂	Estradiol
EA	Enfermedad de Alzheimer

ECV	Enfermedad cardiovascular
EE	Error Estándar
EO	Estrés Oxidante
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Ets	Estrógenos
FID	Federación Internacional de Diabetes
FS	Fructosa
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
G3PDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GPx	Glutación peroxidasa
GRs	Glutación Reductasa
GSH	Glutación Reducido
GSSG	Glutación Oxidado
H₂O₂	Peróxido de Hidrogeno
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HFFD	Hiper-caloric Fructose and Fat Diet
HPA	Hipertensión Arterial
HTA	Hipertensión arterial
INT	Animales Intactos
Kcal	Kilocalorías
Kg	Kilogramo

LDL	Lipoproteína de baja densidad
L-OOH	Liporeroxido
LPO	Peróxido Lipídico
MDA	Malondialdehído
MDA	Malondialdehido
Mg	Miligramos
Mm	Mili molar
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
Nm	Nanómetros
O₂	Oxígeno diatómico
O₂•	Anión superóxido
OH	Ión Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVX	Ovariectomía
P₄	Progesterona
PA	Presión Arterial
PUFAs	Ácidos grasos Poliinsaturados
RA	Receptor Andrógeno
RE	Receptor Estrógeno
RE-A	Receptor Estrógeno alfa
RE-B	Receptor Estrógeno beta

RL	Radicales Libres
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Ácido Ribonucleico (mensajero)
ROOH	Peróxidos orgánicos
SERM	Moduladores Selectivos del Receptor a Estrógenos
SERMs	Moduladores selectivos del receptor a Estrógeno
SM	Síndrome Metabólico
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
SRAA	Sistema Renina Angiotensina
STEAR	Regulador Tejido Selectivo de la actividad estrogénica tisular
TB	Tibolona
TG	Triglicéridos
TRH	Terapia de Reemplazo Hormonal
UAF	Unidades Arbitrarias de Fluorescencia
$\Delta 4$ -TB	$\Delta 4$ isómero de Tibolona
μL	micro litros

RESUMEN

Durante la etapa de deficiencia de estrógenos endógenos, el metabolismo de la mujer cambia significativamente y los mecanismos que regulan el estrés oxidativo no son la excepción. El estrés oxidante es asociado en parte con el aumento de radicales libres y modificaciones en la actividad de las enzimas antioxidantes, por otro lado, en la mujer, la pérdida de producción de estrógenos endógenos esta relacionada con la existencia de un alto grado de estrés oxidante.

La Tibolona es un esteroide sintético, utilizado para el tratamiento de los síntomas de la menopausia. Sin embargo, el efecto agudo de la terapia hormonal de tibolona con los marcadores de estrés oxidante asociados con las primeras etapas de la deficiencia de estrógenos se desconoce. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la administración aguda de tibolona en parametros metabólicos, así como en marcadores de estrés oxidante en ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta alta en fructosa y grasa. Para lo cual, utilizamos ratas alimentadas con una dieta estándar o una dieta alta en fructosa (20%) y grasa (10%). Se administró tibolona en una dosis de 1mg/kg al día, y/o su vehículo según fuera el caso, durante siete días. Se midió el peso corporal, colesterol, triglicéridos, glucosa, AGEs, sensibilidad a la insulina y marcadores de estrés oxidante (MDA), los cuales se cuantificaron en el suero de cada grupo experimental. Se observó que después de siete días de dieta alta en fructosa y grasa, y de tratamiento de tibolona en los animales ovariectomizados, disminuyó el peso corporal, la concentración de triglicéridos, colesterol y glucosa respectivamente, al igual que los AGEs. Sin embargo, no se

observaron cambios en la relación Glutación Reducido/Glutación Oxidado, ni en la actividad enzimática de la superóxido dismutasa. Mientras que la actividad de glutación peroxidasa y glutación reductasa fueron disminuidas; de igual manera se observó una disminución en los niveles de MDA, un marcador de lipoperoxidacion.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento a corto plazo con tibolona disminuye las alteraciones en los parámetros metabólicos y en los niveles de malondialdehido, así como en productos finales de glicación avanzada, alteraciones que son características en los primeros estadios de la deficiencia de estrógenos.

Palabras clave: *Terapia hormonal, deficiencia de estrógenos, metabolismo, colesterol, triglicéridos, glucosa, malondialdehido, productos de glicacion avanzada.*

ABSTRACT

During the stage of endogenous deficiency, the metabolism of women and the mechanisms that regulate oxidative stress are not the exception. Oxidative stress is associated with a part with the increase of free radicals and with modifications both in the activity of antioxidant enzymes and on the other side of the decrease in estrogen levels, the situation of an imbalance in the cellular redox state.

Tibolone is a synthetic steroid, used to treat the symptoms of menopause. However, the acute effect of tibolone hormone therapy with oxidative stress markers associated with the early stages of estrogen deficiency is unknown. The objective of this study was to evaluate the acute administration of tibolone in metabolic parameters, as well as oxidative stress markers in ovariectomized rats fed a diet high in fructose and fat. For which, we use rats fed a standard diet or a diet high in fructose (20%) and fat (10%). Tibolone was administered at a dose of 1mg / kg per day, and / or its vehicle as the case may be, for seven days. Body weight, cholesterol, triglycerides, glucose, insulin sensitivity and oxidant stress markers were measured, which were quantified in the serum of each experimental group. It was observed that after seven days of a diet high in fructose and fat, and treatment of tibolone in the ovariectomized animals, the body weight, and the concentration of triglycerides, cholesterol and glucose respectively decreased, as did the advanced glycation end products. However, no changes were observed in the ratio of Reduced Glutathione / Oxidated Glutathione, or in the enzymatic activity of superoxide dismutase. While the activity of glutathione

peroxidase and glutathione reductase were decreased; similarly, a decrease in the levels of malondialdehyde, a lipoperoxidation marker, was observed.

The results obtained indicate that the short term treatment with tibolone decreases the alterations in the metabolic parameters and in the levels of malondialdehyde, as well as in the final products of advanced glycation, alterations that are characteristic in the first stages of estrogen deficiency.

Key words: Hormone therapy, estrogen deficiency, metabolism, cholesterol, triglycerides, glucose, malondialdehyde, advanced glycation products.

1. HORMONAS ESTEROÍDES

Las hormonas esteroides son lípidos no saponificables hidrofóbicos, solubles en disolventes orgánicos y cuya estructura consiste en un núcleo tetracíclico al cual se le denomina ciclo pentanoperhidrofenantreno debido a que presenta tres anillos de seis átomos de carbono (perhidrofenantreno) y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclo pentano) (Knobil y Neill, 1994).

Las hormonas esteroides regulan múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre los que destacan la homeostasis hidroelectrolítica, las respuestas al estrés y la función reproductiva; además de regular distintas conductas. Todas las hormonas esteroides, con excepción del ácido retinoico, se derivan del colesterol, a partir del cual se forma la pregnanolona el principal intermediario para la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroides. Los esteroides con 21 átomos de carbono se dividen en pregnanos, glucocorticoides y mineralocorticoides, mientras que los de 19 y 18 átomos se denominan androstanos y estranos, respectivamente (*Figura 1*)

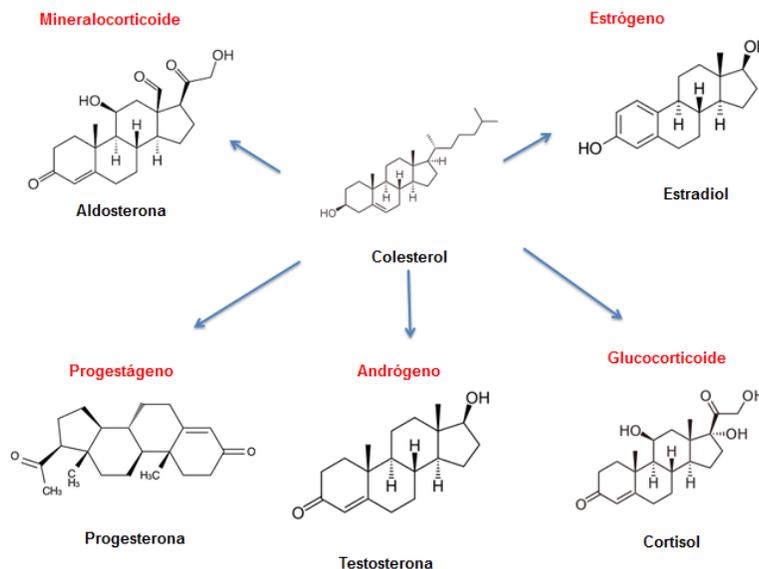


Figura. 1. Principales hormonas esteroides.

La corteza adrenal es la principal responsable de la producción de los glucocorticoides que regulan el metabolismo de carbohidratos y las respuestas al estrés, y de los mineralocorticoides, que regulan los niveles de sodio (Na^+) y potasio (K^+). La progesterona (P_4) y el estradiol (E_2) son producidos principalmente en el ovario, mientras que los andrógenos en su mayoría son sintetizados por los testículos. Estas hormonas regulan principalmente las funciones reproductivas de los mamíferos por lo que son conocidas como hormonas sexuales (González-Arenas *et al.*, 2001). Las hormonas esteroides tienen una velocidad de recambio elevada y no se almacenan; una vez que son secretadas pasan al torrente sanguíneo donde pueden circular libres o unidas a proteínas plasmáticas, tales como albúmina (cuando el enlace es inespecífico y poco afín) o a las globulinas (cuando el enlace es de gran especificidad y de mayor afinidad). Los efectos de las hormonas esteroides ocurren a corto, mediano y largo plazo debido a que éstas tienen diversos mecanismos de acción (Camacho-Arroyo *et al.*, 2002).

Las hormonas esteroides ejercen sus efectos a través de mecanismos genómicos y no genómicos. Los mecanismos genómicos involucra la unión de la hormona esteroide con su receptor intracelular específico para regular la transcripción de genes específicos. El mecanismo no genómico involucra la acción de las hormonas esteroides sobre las bicapas fosfolípídicas de la membrana celular, sistemas de segundos mensajeros, su interacción con receptores membranales específicos e interacción con receptores a neurotransmisores como el de GABA (El ácido γ -aminobutírico) (Prieto *et al.*, 2003).

1.1 CLASIFICACION Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

La especificidad de la acción estrogénica, depende de la presencia de receptores intracelulares. La existencia de estos receptores citosólicos para estrógenos se ha encontrado en células del útero, vagina, glándulas mamarias, trompas, hipotálamo, hipófisis, suprarrenales, testículo, riñón, y otros órganos y sistemas. Dada su liposolubilidad, los estrógenos atraviesan fácilmente la membrana celular, y se ligan al receptor citosólico, formando el complejo esteroide receptor (Kuiper *et al.*, 1997). El cambio conformacional, permite o facilita el ingreso del complejo, al compartimiento nuclear. Una vez en el núcleo, el estrógeno, se unen a la cromatina nuclear, gracias a la presencia en esta estructura nuclear de un sitio "aceptor", que reconoce el complejo esteroide - receptor, uniéndolos con gran afinidad (Prieto *et al.*, 2003). Es una proteína fijadora de DNA homóloga, con receptores para hormonas esteroideas y tiroideas. La presencia de este complejo en el núcleo, estimula así la actividad de RNA polimerasas entre otras, con la consiguiente transcripción del DNA. Los RNAm producidos, pasan al citoplasma, donde su traducción origina la síntesis de proteínas estructurales, enzimáticas, o de secreción, que caracterizan al tejido en cuestión, y que en definitiva representan el efecto fisiofarmacológico (*Figura 2*) (Schwartz *et al.*, 2002)

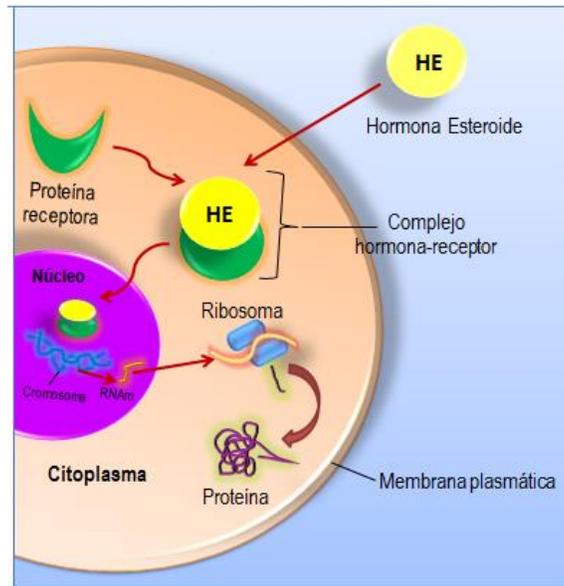


Figura 2. Mecanismo de acción de hormonas esteroides

1.2 ESTRÓGENOS

Los estrógenos (Est) son derivados químicos del ciclopentanoperhidrofenantreno, esteroides formados por tres anillos ciclohexanos (A,B,C) y un anillo de ciclo pentano (D) (Figura 3A). De los Est naturales, el más potente es el 17 beta estradiol, que es a su vez el principal producto de la secreción endócrina del ovario. El estradiol tiene 3 dobles ligaduras en el anillo A, un OH en C3, y otro OH en C 17, en posición beta (Amado *et al.*, 2006)

La estrona, es un producto de oxidación del estradiol, incorporando una función cetona en C 17. El estriol, es una consecuencia de la hidratación del estradiol, ya que posee un OH adicional en C 16. El anillo fenólico A, aromático con un OH en C3, es la estructura fundamental ya que es el lugar de fijación específica de alta afinidad por los receptores estrogénicos (Figura 3B).

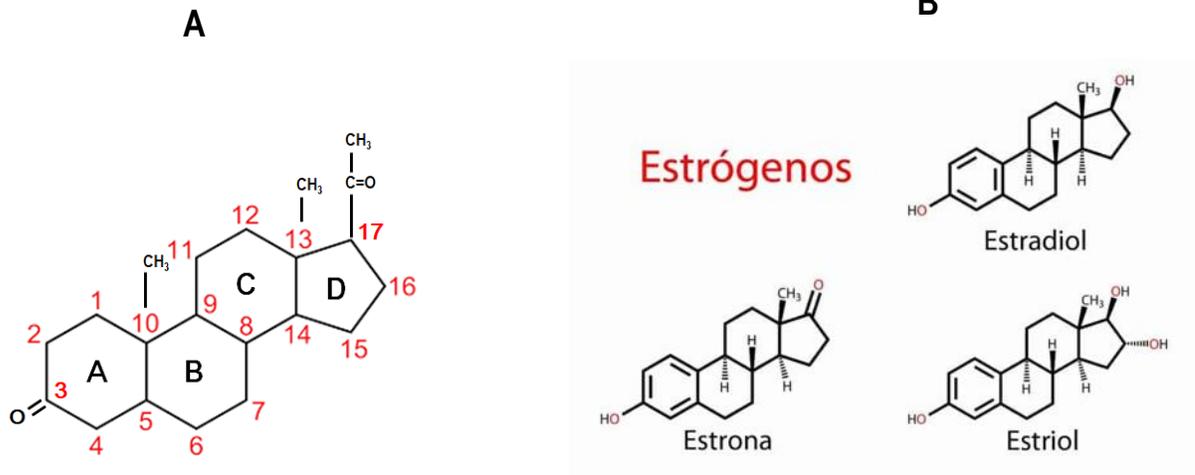


Figura 3. Estructura química básica de hormonas esteroides (A). Estructura química del estradiol, estrona y estriol (B).

El estradiol es sintetizado por las células de la granulosa ovárica a partir de la androstenediona y la testosterona, precursores ováricos del estradiol. La reacción es catalizada por un complejo de monooxigenasas (aromatasa) que emplea la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y O_2 como co-sustratos. También es esencial una flavoproteína y la NADPH citocromo P450 reductasa. La actividad de la aromatasa es inducida por las gonadotrofinas que también inducen la síntesis de otras enzimas que intervienen en el proceso biosintético. En el hígado se realiza una interconversión estradiol-estrona-estriol y los 3 Est se excretan por la orina conjugados con ácido glucurónico y sulfato (Falkenstein *et al.*, 2000).

Existen numerosos agentes que son derivados esteroides semi sintéticos o sintéticos, que poseen acción estrogénica, alguno de los cuales son importantes agentes en terapéutica. El etinilestradiol por ejemplo, de gran potencia estrogénica (solo 20 mg es una dosis terapéutica suficiente en terapia sustitutiva, en la menopausia), posee un grupo etinilo en el C17, que impide su inactivación por el hígado (Schilling *et al.*, 2008).

1.2.1 PARTICIPACION DE LOS ESTRÓGENOS EN EL METABOLISMO

Los Est ejercen una gran diversidad de acciones sobre diversos tejidos del organismo (*Figura 4*). A partir de la pubertad estimulan el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios femeninos induciendo el crecimiento mamario, la distribución característica de la grasa corporal predominantemente alrededor de muslos y caderas y el desarrollo de genitales internos y externos. Sobre el sistema vascular, los Est son capaces de modular o alterar los flujos iónicos, los receptores y la capacidad de proliferación de las células del músculo liso vascular, y también modulan la liberación de factores vasoactivos derivados del endotelio. Así, los Est incrementan la eficacia de los mecanismos vasodilatadores dependientes de óxido nítrico (NO) y prostaciclina, disminuyen la actividad de los sistemas vasoconstrictores, como prostaglandinas, SRAA sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), actúan sobre canales iónicos de potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}) presentes en las células del músculo liso vascular (CMLV), induciendo

hiperpolarización y reduciendo su contracción, regulan el crecimiento y proliferación de las CLMV, así como la producción de colágeno. Estos efectos están mediados a través de los receptores de Est (RE), que se expresan tanto en las células endoteliales como en las CMLV y actúan mediante mecanismos genómicos como no genómicos inmediatos. Los Est sobre el perfil lipídico, ya que estas hormonas educen los niveles plasmáticos de lipoproteína de baja densidad (LDL) e incrementan las lipoproteínas de alta densidad (HDL). También inducen una disminución de la lipoproteína (a) (Tresguerres *et al.*, 2005).

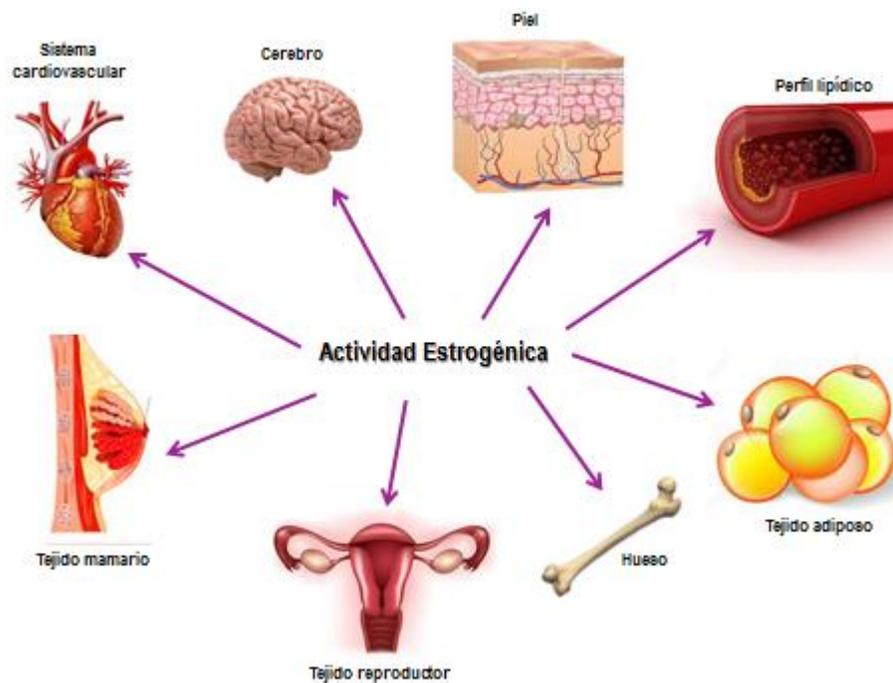


Figura 4. Participación de los estrógenos en órganos y sistemas

1.2.3 DEFICIENCIA ESTROGÉNICA

El climaterio es una etapa transitoria en la vida de la mujer que consiste en el cese de su actividad reproductiva debido al agotamiento de su reserva ovárica y los cambios hormonales que esto supone. Por tanto, se trata de un periodo de transición de la edad adulta a la vejez, en el cual se diferencian varias fases en función de los síntomas menopáusicos que vayan apareciendo (Zilberman *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2010).

La premenopausia es la etapa anterior a la menopausia, que se caracteriza por la presencia de ciclos menstruales irregulares y el inicio de los molestos síntomas vasomotores (sofocos, sudoraciones e insomnio (Pavón de Paz *et al.*, 2006).

La menopausia se define por el cese de los periodos menstruales (amenorrea de 6-12 meses) que sucede por atresia de los folículos ováricos y su capacidad de producir Est ante el estímulo de las hormonas folículo-estimulante y luteinizante. A los signos y síntomas que se presentan en esta transición se les denomina síndrome climatérico. En concreto, la menopausia tiene lugar a los 50 años aproximadamente. Unos años antes de que esto suceda y hasta un año después, existe una fase del climaterio que se conoce como perimenopausia.

Por último, la fase postmenopáusica es la más larga del climaterio y llega hasta la senilidad (Torres-Jiménez *et al.* 2018) (*Figura 5*).

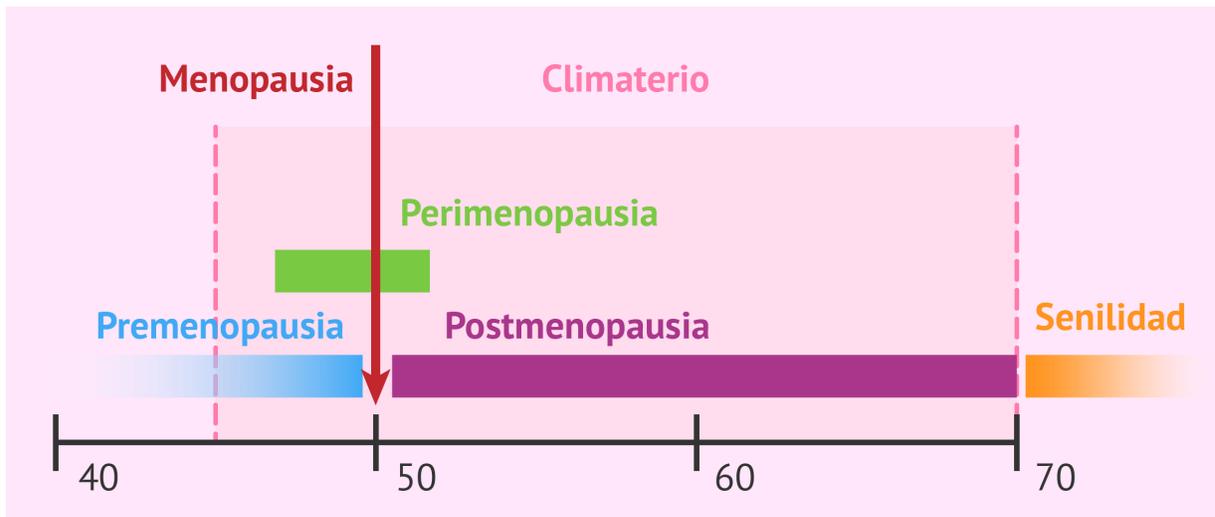


Figura 5. Etapas del Climaterio

1.2.4 DEFICIENCIA ESTROGENICA Y CAMBIOS METABÓLICOS

En la postmenopausia, la disminución de estas hormonas provoca cambios físicos y metabólicos que producen alteraciones en el peso corporal, el tono simpático y la función vascular, que ocasionan un incremento en la incidencia de hipertensión, diabetes, dislipidemias y síndrome metabólico (SM). Estos cambios interactúan entre sí y aumentan aún más el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) (Rosano *et al.*, 2009; Bechlioulis *et al.*, 2010; Taddei *et al.*, 2010; Ratiani *et al.*, 2011). Además, se han descrito otra serie de factores contribuyentes, como son: un deficiente aporte dietético de calcio y posibles trastornos psicológicos asociados (Barrera & Ozorio 2006; Heredia-Hernández *et al.*, 2007). En la postmenopausia fuente de estrógenos

es extragonadal, fundamentalmente a nivel del tejido adiposo, donde la enzima aromatasa convierte los andrógenos secretados por la glándula adrenal en Est.

Reportes indican que el mayor aumento del peso ocurre durante los primeros años después de la menopausia (Ortmann *et al.*, 2012). El incremento de peso está reacionado con los niveles de estrógenos y es independiente de otros factores, como el color de la piel o el tabaquismo (Freeman *et al.*, 2010), pero lo más significativo es la modificación que experimenta la distribución del tejido adiposo lo que conduce a obesidad, la cual pasa de ginecoide a androide, e incrementa el riesgo cardiovascular (Ignacio *et al.*, 2009; Teede *et al.*, 2010; Hart-Unger *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2011). El cambio en el perfil lipídico que se observa en la posmenopausia se caracteriza por el aumento de triacilglicéridos, del colesterol unido a LDL y Lp (a), y por HDL. Esta modificación del perfil lipídico se relaciona con mayor riesgo de ECV (Villasmil *et al.*, 2007; Padró *et al.*, 2011; Escalante-Gómez *et al.*, 2011).

1.2.5 DEFICIENCIA DE ESTROGENICA Y EL ESTRÉS OXIDANTE

Como bien se mencionó anteriormente el climaterio es la etapa de la mujer cuando pasa del estado de reproducción a la de no reproducción, ocurriendo la menopausia. Es una etapa inmersa en el proceso de envejecimiento. El envejecimiento es difícil de definir, porque no es solamente el paso del tiempo, sino que es un proceso biológico complejo que ocurre a nivel celular, tisular y orgánico. Se conoce que el

envejecimiento biológico está ligado a procesos de oxidación molecular originados por la producción de radicales libres. Dentro de la etapa climatérica también se observan cambios en el comportamiento oxidativo de la persona, los cuales podrían estar en relación directa con algunos trastornos de la menopausia (Escalante-Gómez *et al.*, 2009).

En los últimos años se han realizado estudios que ligan esta disminución en los niveles de Est, los cuales están vinculados a la sintomatología de diversos padecimientos como enfermedad cardiovascular, hipertensión, osteoporosis, cáncer, neurodegeneración y SM, donde se ha visto que tanto la disminución de Est como al desbalance del estado redox normal se asocian a cambios en el comportamiento del estrés oxidante de la mujer, sin embargo, el panorama aún no está claro (Pachaco *et al.*, 2010). En estudios con animales se han evidenciado estos cambios; mostraron una disminución de la Superóxido Dismutasa extracelular (ecSOD) y la Superóxido Dismutasa mitocondrial (MnSOD), y un aumento de producción de radicales libres en ratas, asociado a niveles decrecientes de Est, luego de ser ooforectomizadas (Strehlow *et al.*, 2003). Mientras que otro estudio evidenció un incremento en la actividad de NADPH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato) oxidasa (el cual cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O₂ en la cadena respiratoria) y en la producción de la SOD en ratas, luego de ser ooforectomizadas (Wassmann *et al.*, 2005).

Signorelli en el 2006, logró demostrar que en la mujer postmenopausica comparadas con la “fértil” los niveles de estrés oxidante se encuentran aumentados, efecto que

puede ser representado debido a los altos niveles plasmáticos de 4-hidroxy-nonenal (4-HNE) y malonaldehído (MDA) (ambos productos de la oxidación de los lípidos). Algo importante de destacar del estudio, es que se efectuó un análisis de características de las poblaciones, y se descartó la edad como factor causal del incremento de estrés oxidativo (Signorelli *et al.*, 2006).

Utilizando los niveles de hidropéroxido lipídico (LPO), como indicador de producción de radicales libres y de daño oxidativo de los lípidos de la membrana, Bednarek en el 2004 demostró que había un mayor nivel de lesión o estrés oxidante en mujeres postmenopáusicas comparadas con mujeres premenopáusicas (Bednarek *et al.*, 2004).

Según los estudios anteriores, pareciera que la menopausia se asocia con niveles aumentados de estrés oxidante y niveles disminuidos de antioxidantes enzimáticos (Escalante-Gómez *et al.*, 2009). Aun no se sabe claramente cuáles son los mecanismos fisiológicos de estos cambios, pero algunos autores los han asociado con el incremento de enfermedades en el periodo postmenopáusico. Se conoce que la acumulación de radicales libres en nuestro cuerpo produce alteraciones de la función celular que pueden causar diferentes tipos de trastornos incluidos los metabólicos (Vibha *et al.*, 2016).

La prevención y el apoyo de la sintomatología del climaterio y menopausia harán que la mujer se sienta mejor, se mantenga incorporada en la familia y la sociedad, y disminuir los costos sociales y asistenciales atribuibles a la población envejecida, es

aquí donde en la actualidad ha retomado importancia en cuanto a la administración de terapias complementarias que puedan mejorar los padecimientos que se presentan por la deficiencia estrogénica, tal es el caso de la terapia o tratamiento de reemplazo hormonal (TRH) (González-Concepción *et al.*, 2013).

2. TERAPIA DE REPLAZO HORMONAL

El TRH es una intervención farmacológica cuyo objetivo es evitar o atenuar las consecuencias de los cambios hormonales que ocurren en las mujeres a partir de la menopausia; se considera el estándar de oro para el tratamiento de los síntomas menopáusicos y la osteoporosis (Mosca *et al.*, 2001; Enriori *et al.*, 2002).

La TRH es eficaz si cuando se inicia durante los primeros cinco años posteriores a la menopausia (The Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society, 2012). A mediados de 1970, las mujeres posmenopáusicas que usaron Est sólo tenían mayor riesgo de cáncer de endometrio; la adición de progesterona proporcionó protección y se convirtió en el tratamiento no sólo de síntomas menopáusicos, sino protección a largo plazo contra osteoporosis y fracturas relacionadas, enfermedades cardiovasculares (ECV), incluso enfermedad de Alzheimer; pero en 2002, la Iniciativa de Salud de la Mujer, o Women's Health Initiative (WHI), informó que aumentaba el riesgo de enfermedad cerebrovascular, enfermedades cardiovasculares y cáncer de mama. El uso de hormonas bioidénticas

o naturales es una alternativa, se utilizan para aquellas mujeres que no toleran la TRH estándar (Panay *et al.*, 20013).

2.1. MEDICAMENTOS HORMONALES UTILIZADOS COMO TERAPIA DE REMPLAZO HORMONAL

Los distintos esquemas de TRH incluyen: Ets diario, cíclico o secuencial, donde en el régimen se añade un progestágeno durante 10-14 días cada cuatro semanas, régimen continuo combinado con estrógeno y progestágeno diario.

Los Est más comunes son los Est conjugados equinos (EEC) o sintéticos, el 17 beta (17 β) estradiol micronizado y el etinilestradiol. Los progestágenos son acetato de medroxiprogesterona (MPA) y acetato de noretisterona.

La dosis varía, pero la más frecuente combina Est y progestina diarios (0.625 mg de EEC con 2.5mg de MPA, respectivamente) en mujeres con útero; también a dosis bajas con 1.5 mg de MPA con 0.45 mg o 0.3 mg de ECE. Los Est solo se administran en mujeres con histerectomía (Hansen *et al.*, 2012). La terapia con testosterona se administra en mujeres posmenopáusicas (Wetherby *et al.*, 2011). La testosterona mantiene la masa ósea y muscular, la administración con implantes de testosterona, metiltestosterona oral o testosterona transdérmica, proporcionan 300 mg de testosterona por día, mejora la función sexual y en mujeres con menopausia quirúrgica se utiliza la vía oral o transdérmica con estrógenos (Panay *et al.*, 2013). La aplicación vaginal de testosterona, 300 mg por día, alivia la dispareunia en mujeres con cáncer de mama (CM) sin elevar sus niveles (Rossouw *et al.*, 2013). Los efectos

virilizantes incluyen desarrollo de acné, hirsutismo, voz más grave y alopecia que son dosis-dependientes y poco comunes si se evitan niveles suprafisiológicos y son contraindicaciones relativas para su uso (Hansen *et al.*, 2012).

Por otro lado, se encuentran los “moduladores selectivos del receptor de estrógenos”, que producen un efecto estrogénico únicamente sobre ciertas células. Por ello se le conoce internacionalmente como SERM, de las siglas en inglés “Specific Estrogen-Receptor Modulator” como es el raloxifeno que se utiliza particularmente para evitar tanto osteoporosis como cáncer de mama (Martino *et al.*, 2005). Otros fármacos que muestran una acción distinta de acuerdo con los diferentes tejidos sobre los que actúa, debido a que se establece un metabolismo específico propio de cada tejido, ya que induce una actividad enzimática característica que determina cuál metabolito va a estimular al receptor celular (Modeska *et al.*, 2005). Por esta actividad farmacológica se conoce como STEAR del inglés “Selective Tissue Estrogenic Activity Regulator”. Pueden ser naturales como los fitoestrógenos y sintéticos derivados de: 1. trifeniletilén como el tamoxifén, idoxifene, droloxifene, toremifene y clomifene; 2. benzotiofenos como el raloxifeno y 3. benzopiranos, dehidronaftalenos y terahidronaftalenos (Zárate *et al.*, 2004)

2.2 RIESGOS Y BENEFICIOS DEL USO DE LA TERAPIA DE REPLAZO HORMONAL

La terapia con Est (TE) o terapia con Est y progestágenos (TEP) reducen el riesgo de fracturas osteoporóticas durante la menopausia, pero incrementan el riesgo de tromboembolia, EVC, colecistopatías e incontinencia urinaria. La TE disminuye el riesgo de CM, y la TEP incrementa el riesgo de demencia y CM; no se recomienda TRH durante la menopausia para prevenir enfermedades crónicas. Las indicaciones actuales incluyen el uso a corto plazo para síntomas vasomotores, atrofia genital y prevención de la osteoporosis (Panay *et al.*, 2013), pero es necesario entender el riesgo de cáncer y la tasa de mortalidad implicadas con la administración de la TRH.

Como ya se ha mencionado la THR es capaz de revertir casi todas las consecuencias del hipoestrogenismo posmenopáusico, sin embargo, el número de mujeres que la emplea y, sobre todo, mantiene adhesión al tratamiento es mínimo, si se toman en cuenta sus beneficios. Esta discrepancia se podría explicar, entre otras razones, por el posible incremento de cuadros oncológicos que induce la THR convencional. Este hecho motivó a realizar investigaciones que guiaran al desarrollo de nuevos agentes farmacológicos diseñados para reunir objetivos terapéuticos específicos basados en la biología hormonal de órganos relevantes y que sean capaces de lograr los beneficios de los estrógenos al mostrar una acción distinta de acuerdo con los diferentes tejidos sobre los que actúa, debido a que se establece un metabolismo específico propio de cada tejido sin presentar sus efectos indeseables, es así como surge la Tibolona (Mirkin *et al.*, 2005).

2.3. TIBOLONA

La Tiboloba (TB) [(7 α , 17 α)-17-hydroxy-7-methyl-19-norpregn-5(10)-en-20-yn-3-one] (OrgOD14, Livial[®], Organon Nederland BV, Oss, The Netherlands). La TB es un medicamento de TRH, que corresponde a la familia de los STEAR. La acción selectiva de la TB sobre determinados tejidos se presenta debido a la combinación de la activación del receptor ER α y la metabolización de los esteroides (Escalante-Gómez *et al*, 2009), permite la prevención de la osteoporosis y el tratamiento de síntomas climaterios, sin provocar efectos adversos en en tejido endometrial y la mamario (Henriques *et al*, 2010; Biglia *et al.*, 2010) (Figura 6).

La TB por sí misma no tiene ninguna actividad biológica, por lo que sus efectos son el resultado de la acción de sus metabolitos en los diferentes tejidos. Los metabolitos de TB corresponden a 3 α -hydroxytibolona (3 α OH-TB) y 3 β -hydroxytibolona (3 β -OH-TB), que se acoplan al receptor alfa estrogénico (ER α) y en Δ 4 - isómero (Δ 4 -TB), con propiedades progestágenas y androgenas (compuestos que también se encuentran inactivos en una forma sulfatada) (Reed *et al*, 2004).

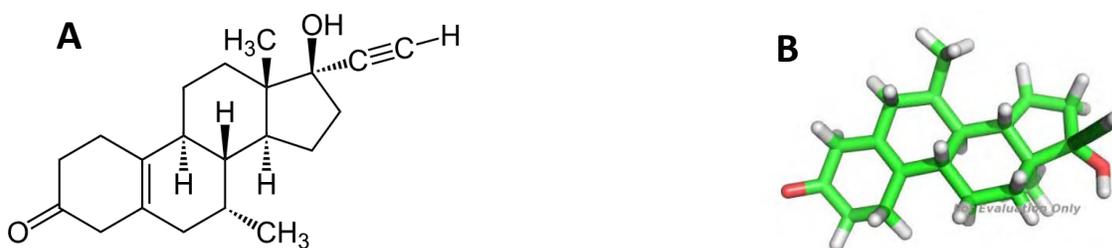


Figura 6. Estructura química (A) y molecular (B) de la Tibolona. Los anillos de carbono se encuentra de color verde, oxígeno unido al anillo de color rojo e hidrogeno (Blanco).

2.3.1 PROPIEDADES QUÍMICAS DE LA TIBOLONA.

La TB es un esteroide estructuralmente relacionado con derivados de la 19-nortestosterona como el noretinodrel y la noretisterona (Figura 7) que tiene afinidad por los receptores a estrógenos (RE), a los receptores de andrógenos (RA) y a los receptores a progesterona (RP), y por ello presenta triple actividad hormonal (Blom *et al.*, 2001). Es diferente a los moduladores selectivos del receptor a estrógenos, SERMs con una configuración 3-ceto- Δ^5 -10 con dos sustituyentes, un grupo α metilo en la posición 7, así como un 17α -etilo (Reed y Kloosterboer, 2004).

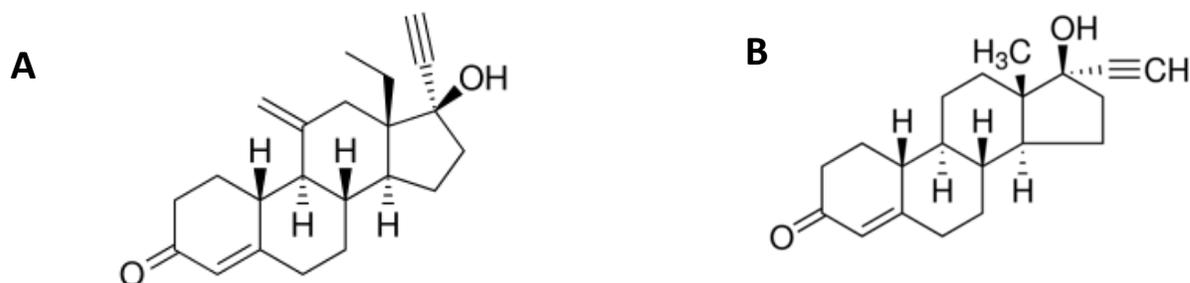


Figura 7. Estructura química del noretinodrel (A) y de la noretisterona (B).

2.3.2 MECANISMO DE ACCION DE LA TIBOLONA

Tras la administración oral, TB esta es metabolizada en tres componentes, que contribuyen el perfil farmacodinámico de este fármaco. El metabolismo de la TB se realiza rápidamente originándose 3α hidroxil TB y 3β hidroxil TB en las formas sulfatadas e inactivas; a partir de ellas o directamente de la TB se produce un tercer compuesto que es el delta 4 isómero. Los isómeros α y β tienen una gran afinidad por

el RE mientras que el delta 4 sólo tiene afinidad por el RA y RP. Por lo tanto el efecto de la TB está determinado por el tipo de tejido y los metabolitos que se forman (*Figura 8*). La acción es estrogénica en el hueso, la vagina y el cerebro donde estimulan la actividad endógena mediante un promotor impulsado por ERE (Elemento de respuesta ER α) en humanos, imitarían los efectos de 17 β -estradiol (E2), el cual ejerce una amplia gama de acciones en el sistema nervioso central (SNC), actuando sobre la plasticidad sináptica, la morfología neuronal y la neuroprotección glial (Henriques *et al.*, 2010; Farfan-García *et al.*, 2014; Pinto-Almán *et al.*, 2014), sobre los oligodendrocitos y los astrocitos (De Marinis *et al.*, 2013). (Reed y Kloosterboer, 2004). La evidencia respalda los efectos protectores de la TB sobre SNC.; por otra parte, el efecto es progestacional sobre el endometrio y androgénico sobre el hígado y el cerebro. Investigaciones han demostrado que el efecto estrogénico de la TB es mediado por los metabolitos 3 β -OH-TB, Aunque se desconoce el mecanismo de acción completo de la TB, hasta la fecha las acciones selectivas de los metabolitos de la TB están bajo el control de la actividad específica de las enzimas sulfatasa y sulfotransferasa en cada uno de los tejidos blanco (Reed & Kloosterboer, 2004; Zhang *et al.*, 2006). El metabolismo de la TB no está limitado al hígado y al intestino. Los efectos importantes se explican por el metabolismo local específico. En la glándula mamaria la TB inhibe la actividad sulfatasa y la 17 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa resultando en un bloqueo a la conversión de estrona a estradiol y en el endometrio, el isómero Δ -4 es producido primariamente, este se une al RP, y protege el endometrio de los efectos agonistas de los metabolitos

estrogénicos. De esta manera se explica la versatilidad y especificidad de la acción de TB (Tang *et al.*, 1993).

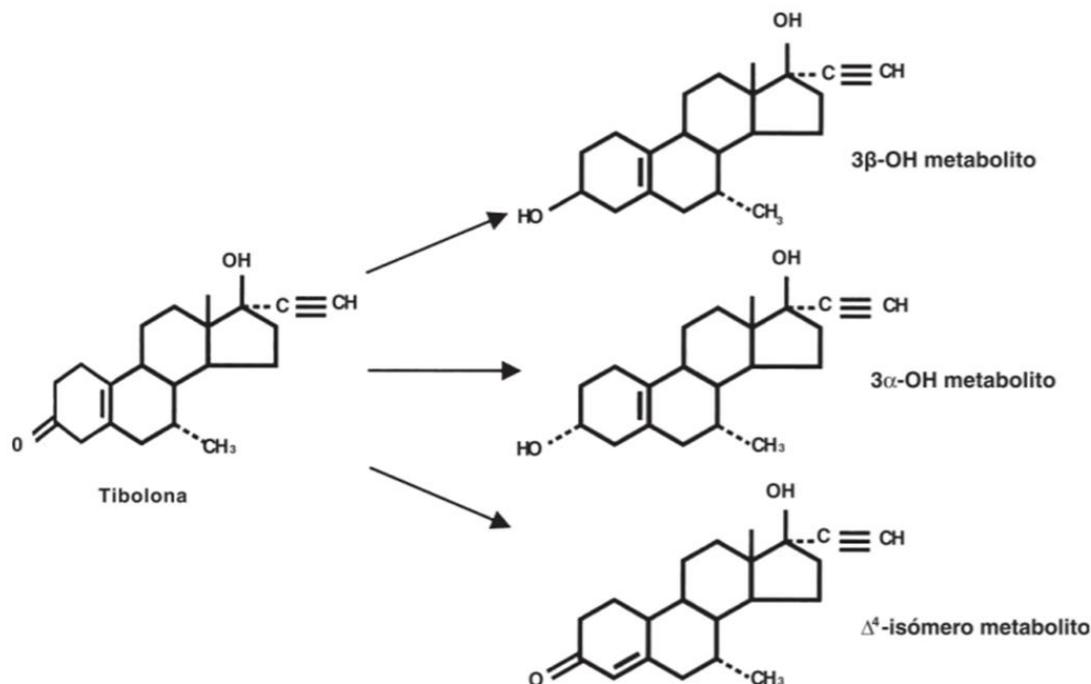


Figura 8. La Tibolona y sus metabolitos

2.3.3 ABSORCIÓN, BIOTRANSFORMACIÓN Y EXCRECIÓN DE LA TIBOLONA.

Después de la administración oral, la TB se absorbe rápida y extensamente. Sin embargo, debido al rápido metabolismo, los niveles plasmáticos de TB son muy bajos. Las concentraciones máximas de TB en plasma son de 1.37 ng/mL y 1.72 ng/ml después de dosis únicas y múltiples, respectivamente, alcanzándose más o menos en una hora. Los niveles plasmáticos del Δ⁴ isómero de TB son también muy

bajos, a veces por debajo el límite de detección. Los niveles plasmáticos máximos de los metabolito 3 α -OH y 3 β -OH son más altos, pero no se produce acumulación.

En mujeres posmenopáusicas se reportó que el 98% de los metabolitos con actividad estrogénica se encuentran en forma disulfurada en suero y tejidos. De los metabolitos conjugados, el 3 α -hidroxi-TB predomina en el suero, mientras que el Δ 4 TB predomina en miometrio y la vagina. Los niveles de metabolitos disulfatados en el suero y tejidos son de 3 a 5 veces más altos después de dosis múltiples que después de una dosis única (Verheul *et al.*, 2007).

La excreción de TB tiene lugar principalmente en forma de conjugados sulfatados. Parte del compuesto administrado se excreta en la orina, pero la mayor parte se elimina por las heces. (Verheul *et al.*, 2007).

2.3.4 RELACION DE LA TIBOLONA CON ALTERACIONES METABOLICAS

En un estudio hecho por Von Eckardstein en el 2001. Investigaron los cambios en la concentración de lípidos en suero de mujeres tratadas por 84 días con TB. Ellos observaron una disminución del colesterol HDL y de la Lp en el grupo de quienes tomaron 2.5 mg/ día en comparación con el grupo de mujeres que recibieron placebo (Von Eckardstein *et al.*, 2001). En el mismo año (2001) Boyanov, a 22 mujeres que tomaron la misma dosis de TB (2.5 mg/día) durante 1 año, mientras reportaron que en estas mujeres no se observó incremento significativo de peso,

mientras que los controles no tratados se incrementaron los valores de peso, Desde la perspectiva de los autores fue que el uso de la TB podría considerarse como una alternativa preferencial a la TRH convencional en mujeres posmenopáusicas (Boyanov *et al.*, 2001).

Skouby en el 2008. Reportaron disminución significativa de triglicéridos en muestras de sangre de mujeres postmenopáusicas que tomaron TB en dosis de 2.5 mg/día, durante 12 meses (Skouby *et al.*, 2008).

Existen reportes donde el uso de TB mejoró los niveles de colesterol total (Henriques *et al.*, 2010), mientras que, en los estudios realizados con mujeres posmenopáusicas, el tratamiento con TB mejoró la presión arterial, la inflamación, la glicemia, los niveles de insulina, el colesterol HDL y los triglicéridos (Gallagher *et al.*, 2001).

Otro estudio donde utilizaron ratas de la cepa Wistar (hembra) y administraron TB a una dosis de 0.04mg/kg, durante 15 días. El estudio evaluó el sistema cardiovascular, el metabolismo de lípidos y el estado redox en el hígado de ratas OVX. Al analizar el estado redox del hígado, mostraron que la TB restauró el contenido de glutatión reducido y la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, redujo los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) y la generación de especies reactivas del oxígeno mitocondrial. Los autores concluyeron que el uso de TB revirtió las principales alteraciones causadas por la hipertensión y la deficiencia de estrógenos (Gilglioni *et al.*, 2013).

2.3.5 RELACION DE LA TIBOLONA CON EL ESTRÉS OXIDANTE

El aumento en la concentración de peróxido de lípidos en el suero de ratones hembras después de una ooforectomía bilateral es evidencia de la actividad antioxidante de las hormonas femeninas (Yagi *et al.*, 1999).

El tratamiento con TB en ratas ovariectomizadas sometidas a un modelo de estrés oxidante inducido por ozono, se demostró que la TB tuvo efecto para disminuir los indicadores de estrés oxidativo como el MDA (Farfán-García *et al.*, 2014), la oxidación de proteínas y la muerte neuronal en el hipocampo; mejoró la memoria y previno las alteraciones motoras en los animales expuestos a ozono (Pinto-Almazán *et al* 2014).

3. ENFERMEDADES METABÓLICAS Y EL SÍNDROME METABOLICO EN MÉXICO

La interrupción de los procesos metabólicos normales como la obtención de energía y el desequilibrio redox establece la base de muchas condiciones fisiopatológicas en el cuerpo, que se denominan trastornos o enfermedades metabólicas (Vibha *et al.*, 2016). Las enfermedades metabólicas, según la enciclopedia médica, “son aquellas que interfieren en los procesos bioquímicos del organismo involucrados en el crecimiento y conservación de la buena salud de los tejidos orgánicos, en la eliminación de productos de desechos y en la producción de energía para llevar a cabo las funciones corporales”. Las principales patologías son directamente

relacionadas con el sobrepeso y la obesidad, especialmente en la distribución abdominal de una persona (Agencia informativa, conacyt, 2017). Dentro de las enfermedades metabólicas se encuentran: dislipidemia, hipertensión arterial, hígado graso, intolerancia a la glucosa, DMT 2 y SM (Braun *et al.*, 2011).

El SM es un conjunto de anormalidades metabólicas consideradas como un factor de riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular y DMT2 (Lizarzaburu *et al.*, 2013). Desde el punto de vista biomédico un mismo individuo debe tener la coexistencia de al menos tres factores de riesgo para ser diagnosticado con síndrome metabólico (Urióstegui-Flores *et al.*, 2018).

Los criterios diagnósticos propuestos para síndrome metabólico son diversos.

Desde el año 1988, en que el Dr. Gerald Reaven describe el síndrome como una serie de anormalidades que incluye hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipidemia, denominándolo 'síndrome X', donde la resistencia a insulina constituía el factor o principal mecanismo fisiopatológico (Reaven *et al.*, 1988; Isomaa *et al.*, 1988; De Fronzo *et al.*, 1991).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), Federación Internacional de Diabetes (IDF), Tercer panel de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (ATP III) y la Asociación Americana de endocrinología clínica (AACE) han propuesto sus criterios diagnósticos o componentes del SM (Lizarzaburu *et al.*, 2013) (tabla 1).

Tabla 1. Componentes del SM considerando su definición, según, el Tercer panel de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (ATP III), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Asociación Americana de endocrinología clínica (AACE) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF).

	ATP III	OMS	AACE	IDF
Triglicéridos mayor o igual a 150 mg/dL	X	X	X	X
HDL menor de 40 mg/dL en varones y 50 mg/dL en mujeres	X	X	X	X
Presión arterial mayor de 130/85 mmHg	X	X	X	X
Insulino resistencia (IR)		X		
Glucosa en ayunas mayor de 100 mg/dL	X		X	X
Glucosa 2 h: 140 mg/dL			X	
Obesidad abdominal	X			X
Índice de masa corporal elevado		X	X	
Microalbuminuria		X		
Factores de riesgo y diagnóstico	3 más IR	Más de 2	Criterio clínico	Obesidad abdominal

La etiología del SM y de cada uno de sus componentes aún está en discusión, sin embargo puede ser atribuible a una interacción entre factores genéticos, metabólicos y ambientales.

La prevalencia de SM en el mundo varía entre <10.0% y hasta 84.0%, según el sexo, la edad y el origen étnico de la población estudiada, así como de la definición de SM utilizada (Kaur *et al.*, 2014).

De acuerdo con los criterios diagnósticos de la ATP III, la prevalencia de SM entre los adultos en varios países de América Latina va desde 18.8% a 43.3% (Márquez-

Sandoval *et al.*, 2011), y particularmente en México varía desde 24.4% a 36.8% (Méndez-Hernández *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que existe una relación directa entre la armonía de las hormonas sexuales y el metabolismo. Los cambios metabólicos que ocurren durante la etapa de transición de la premenopausia a la postmenopausia determinan profundas alteraciones en el metabolismo y composición corporal (Hernández-Galván *et al.*, 2008). Dentro las alteraciones más significativas está el aumento y la redistribución de la grasa corporal, la cual predispone a la mujer a ECV y SM (Tabares-Trujillo *et al.*, 2012), debido a que los esteroides sexuales tienen una función anabolizante; su déficit perturba el uso y el depósito de recursos energéticos, echo que después de la menopausia (postmenopausia) la prevalencia aumenta independiente de la edad, dando pie a la progresión de los componentes del SM e incrementando en un 60% el riesgo de padecer este padecimiento (*Figura 9*) (Jansen *et al.* 2008; González-Concepción *et al.*, 20013).

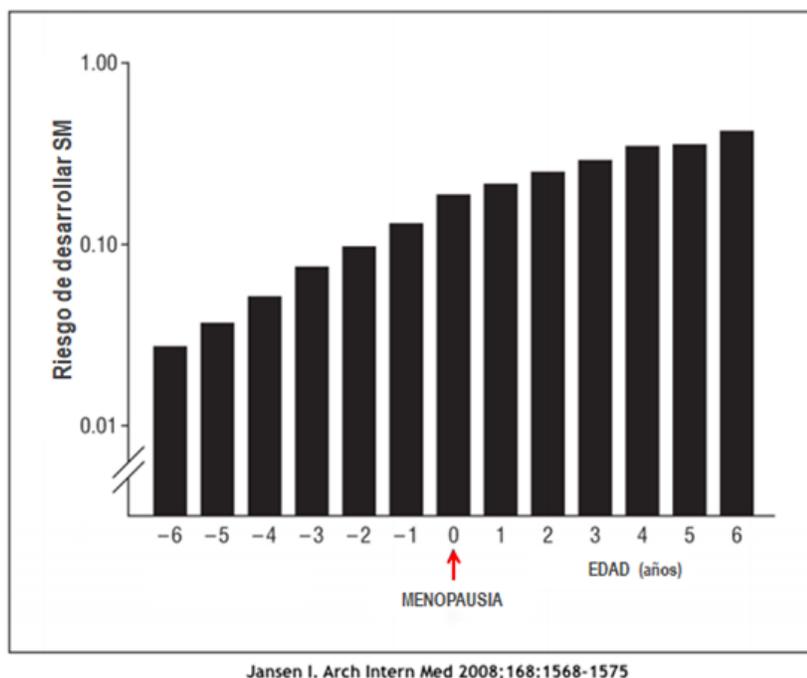


Figura 9. Riesgo de desarrollar SM por envejecimiento, años después del final del período menstrual (menopausia).

La principal causa de mortalidad en el mundo tanto en hombres como en mujeres es ECV (GBD *et al.*, 2013), la cual representa un grave problema para muchos países de Latinoamérica (Alwan *et al.*, 2011) en México muere una mujer cada 15 minutos por ECV (INEGI, 2015). La morbilidad y mortalidad por esta causa es más frecuente en el hombre que en la mujer hasta la sexta década de la vida (Artaud-Wild *et al.*, 1993) en la población femenina aparece 10 a 15 años después, etapa que coincide con la posmenopausia (Rossouw *et al.*, 2002). Ya que como se ha mencionado la

aparición de SM en mujeres postmenopáusicas va desde los 50 a a los 59 años, alcanzado un porcentaje del 35%. Durante la última década este porcentaje ha aumentado y se estima que la mitad de todas las ECV en la mujer pueden estar relacionadas con SM (Chu *et al.*, 2008).

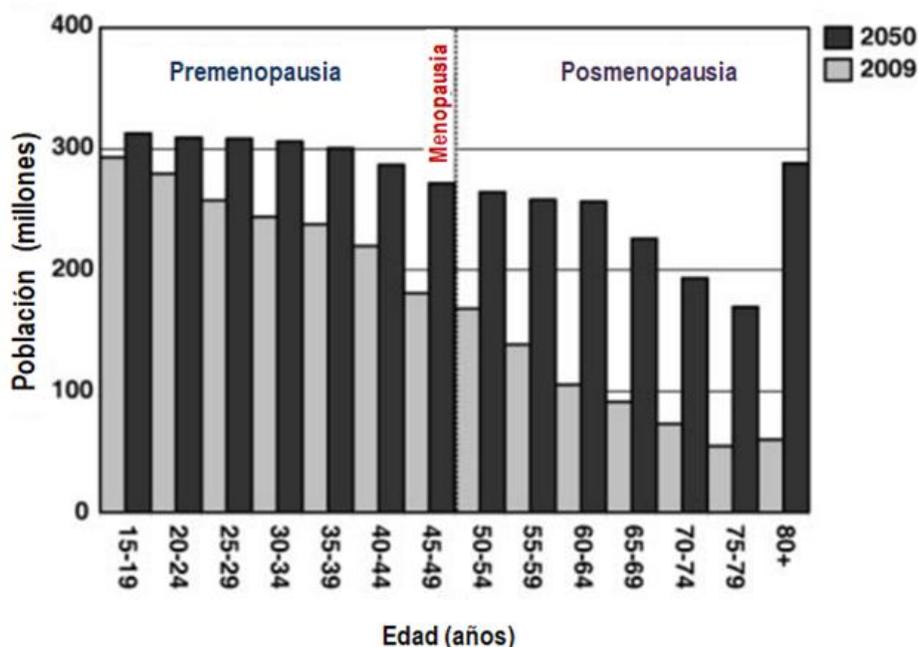
La mujer pre menopáusica parece estar protegida para eventos cardiovasculares comparadas con hombres de su misma edad. Aunque la mujer menor de 50 años rara vez desarrolla enfermedad cardiovascular, la incidencia en mujeres mayores de 70 años se iguala a la de los hombres; lo anterior sugiere que la deficiencia de Est causa una rápida aceleración en el incremento de este riesgo (Dubey *et al.*, 2005).

3.1 TRATAMIENTO DE SÍNDROME METABÓLICO DURANTE LA MENOPAUSIA

El notable incremento de la esperanza de vida al nacimiento en la población, particularmente en mujeres, durante la última mitad del siglo XX condicionó que un mayor número de mujeres mexicanas cursen una parte considerable de su vida en la condición posmenopáusica (Fenochio-González *et al.*, 2012) (*Figura 9*), presentando un alto riesgo para el desarrollo de diferentes patologías). Etapa en la que la prevalencia de SM en mujeres de 50 a 59 años es del 35% asociadas al SM (Chu *et al.*, 2008) y a la pérdida de la producción de estrógenos endógenos, lo que constituye a ser la principal causa de mortalidad (Sócrates-Aedo *et al.*, 2006).

Razón por la cual, se prevé que para el año 2050, la proporción de las personas mayores de 50 años seguirá en aumento, mostrando un pronunciado cambio en el

perfil de la población general, acompañado de una extensión sustancial en el número de mujeres posmenopáusicas (Figura 10) (Barton *et al.*, 2009).



Matthias Barton, Matthias R. Meyer, *Hypertension* 2009;54:11-18

Figura 10. Desarrollo proyectado de la población mundial femenina en las próxima 4 décadas. Hasta 2050, la proporción de personas de 50 años continuará aumentando, lo que provocará un cambio pronunciado en el perfil de la población general. Aumento sustancial en el número de mujeres posmenopáusicas, que están en alto riesgo de desarrollo de hipertensión y enfermedad cardiovascular debido a la pérdida de producción de estrógenos endógenos.

Las mujeres menopáusicas que cumplen criterios para diagnóstico de SM deben ser tratadas para reducir el riesgo cardiovascular. El enfoque terapéutico debe combinar

cambios en el estilo de vida y la implementación de terapia farmacológica (James et al., 2014; American Diabetes Association, 2015).

Al observar, retrospectivamente, el efecto de los distintos tipos de TRH, con estrógeno oral administrado en forma crónica sobre la glicemia en ayunas y perfil lipídico, se puede inferir que en la TRH con baja dosis de estrógeno se asocia a un perfil lipídico y glicemia ayunas normal, a diferencia del grupo de TRH con estrógeno en alta dosis con progestina periódica donde se observa un aumento del colesterol lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos (fuera del rango normal) los cuales se incrementan aún más cuando la modalidad de la TRH usada es con estrógeno en dosis alta con progestina continua (Sócrates-Aedo *et al.*, 2006).

Como se mencionó con anterioridad hay que destacar el uso de TRH convencional, no está libre de posibles efectos adversos; se ha relacionado con posibles efectos a nivel oncológico y de trombosis venosa profunda o tromboembolismo pulmonar. Es necesario realizar más estudios que permitan asociar los posibles efectos (benéficos o perjudiciales) a nivel sistémico secundario al uso de TRH en mujeres posmenopáusicas (Fenochio-González *et al.*, 2012).

La medicina actual se dirige a retardar el envejecimiento, buscando terapias que a la vez corrijan las alteraciones consecuentes. Para ello, en la mujer menopausica climatérica debe realizar una adecuada exploración clínica, que no debe ser solo física, sino que comprenderá las áreas nutricional, metabólica, endocrina, inmunitaria, psíquica y neurológica, y que requerirá la complementación con métodos

auxiliares de laboratorio y/o experimentos que ayuden a través de la simulación a tener un enfoque más claro acerca de los cambios metabólicos-hormonales que ocurren durante la menopausia y comprender mejor las complicaciones que se presentan en esta etapa de vida que se presentan en esta etapa de vida. (Pacheco et al., 2010).

4. DIETAS HIPERCALORICAS COMO MODELOS EXPERIMENTALES EN LOS TRASTORNOS METABOLICOS

La actual epidemia mundial de enfermedades metabólicas es consecuencia de la alta disponibilidad y consumo de dietas altamente hipercalóricas (Barrera-Cruz *et al.*, 2013). Los estudios en modelos animales constituyen una valiosa herramienta para comprender los procesos fisiopatológicos. Una gran parte de los trabajos se desarrollan en los roedores (ratones y ratas principalmente), dada su similitud biológica con el hombre y el gran conocimiento que se tiene a todos los niveles (genético, molecular, enzimático, etc.) de estas especies (Ayala *et al.*, 2008).

Con el fin de obtener una mayor comprensión de trastornos metabólicos en humanos, las ratas y ratones son un modelo de uso común, ya que estos animales ganan peso fácilmente cuando se les proporcione una dieta alta en grasas y también desarrollarán otros factores de riesgo asociados con el SM. Por lo tanto, los modelos de obesidad inducidos por la dieta pueden ser más apropiados para estudiar esta patología (Campos *et al.*, 2012).

4.1. DIETA ALTAS EN GRASA

Numerosas dietas de alto contenido de grasa para roedores están disponibles en diferentes marcas comerciales. No todas las dietas altas en grasas son lo mismo, ya que tanto el nivel como la fuente de grasa pueden diferir entre las dietas. Si bien la mayoría de la investigación sobre la obesidad es conducida con dietas de ingredientes purificados, algunos estudios usan una mezcla de chow y grasa añadida. Esto puede conducir a insuficiencias nutricionales (proteína, vitaminas, minerales y fibra) se van perdiendo (Gajda *et al.*, 2007).

Al elegir una dieta con grasa elevada, de debe tenerse en cuenta el nivel de grasa en la dieta. Si bien estos términos no tienen definiciones estrictas, las dietas bajas en grasa (LFD) tienen alrededor de 10% de calorías procedentes de la grasa, las dietas altas en grasa (HFD) tienen alrededor de 30-50% de calorías procedentes de la grasa y las dietas muy altas en grasa (VHFD) generalmente contienen 50 kcal% de la grasa. A modo de comparación, la mayoría de las dietas bajas en grasa contienen 10-12% de las calorías de la grasa. Para inducir obesidad ambas dietas (HFD) y (VHFD) son comúnmente utilizadas y hay una dosis-respuesta para el peso corporal como una función de grasa dietética (Ghibaudi *et al.*, 2002).

4.2. DIETA ALTAS EN FRUCTOSA

La ingesta calórica excesiva se ha relacionado con alimentos con alto contenido de grasas, el aumento en el tamaño de las porciones y las dietas altas, ambas en forma simple azúcares como sacarosa y en jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF) como

fuentes de fructosa (FC) (Young *et al.*, 2002; Elliott *et al.*, 2002). Un modelo para producir obesidad en roedores es proporcionar endulzantes (sacarosa, maltosa, etc.) a las bebidas (Aldrete-Velasco *et al.*, 2017). La solución endulzada calóricamente reduce la ingesta de alimentos sólidos, pero no lo suficiente como para evitar un equilibrio calórico positivo y el lento desarrollo de la obesidad. Añadiendo la misma cantidad de sacarosa o maltosa como un sólido en la dieta no lo hace producir la misma respuesta. Por ejemplo, en ratas, una dieta rica en fructosa ocasiona en dos semanas un incremento en los niveles de TG. Las ratas macho wistar son más vulnerables al hígado graso inducido por fructosa, y se le considera un modelo aceptado de SM. Cuando se alimentan con fructosa 10% la síntesis hepática de ácidos grasos y la esterificación se incrementan significativamente. La fructosa promueve la síntesis hepática de triacilglicerol y su liberación en plasma en forma de VLDL (Echandi *et al.*, 2009).

Por lo tanto, en animales de experimentación, endulzando las bebidas parecen mejorar el consumo calórico. Debido a que es tan dulce y barato, el jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF) se utiliza en muchos alimentos procesados que comen los humanos y encuestas recientes han sugerido que la ingesta de carbohidratos va en aumento. En modelos de roedores, las dietas que contienen alto contenido de fructosa o sacarosa elevan la producción de TG y la producción de glucosa en el hígado y esto incrementa la disponibilidad de nutrientes y finalmente conduce a resistencia a la insulina (RI) e hipertrigliceridemia (Basciano *et al.*, 2005).

4.3. DIETA COMBINADA (FRUCTOSA-GRASA)

En la última década se han demostrado cambios drásticos tanto la composición de la dieta diaria como en los hábitos básicos alimenticios de las sociedades occidentales, donde un alto porcentaje de la población consume dieta que contienen un exceso de calorías. Diversos estudios han establecido que la alimentación o la excesiva ingesta calórica son suficientes para promover alteraciones metabólicas sistémicas en roedores y en humanos. (Lê *et al.*, 2006).

Muchas evidencias demuestran que en los últimos cuarenta años ha existido un alto consumo de FS en la dieta, con lo cual ha surgido una creciente preocupación, ya que en humanos el consumo de alta fructosa puede ser la posible responsable del aumento de peso y la aparición asociación de obesidad en todo el mundo (Tappy *et al.*, 2010).

Dietas combinadas en concentraciones altas de carbohidratos y grasa imitan mejor dietas humanas inductoras de SM en roedores, los cuales originan un incremento de peso corporal, aumento de grasa abdominal, inflamación, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e incremento de ácidos grasos libres circulantes (Lomba *et al.*, 2010; Chun *et al.*, 2010) dado que las dietas en carbohidratos y grasas generan en los roedores la mayoría de las complicaciones presentes en el SM humano; estos modelos son probablemente la mejor manera de estudiar la fisiopatología de las complicaciones surgidas por una dieta hipercalórica (Zivkovic *et al.*, 2007).

Para obtener un modelo experimental de animal obeso mediante una ingesta alta en grasas, alta en carbohidratos y por las dietas de la cafetería ha sido sugerido que las ratas se vuelven más obesidadas por el consumo de dietas de cafetería en lugar de dietas altas en grasas, lo que indica quizás una mayor hiperfagia que surge de la variedad de alimentos (Panchal *et al.*, 2011). Sin embargo, una dieta de cafetería presenta algunas limitaciones, como la dificultad para determinar el consumo de componentes dietéticos y el hecho que la comida se ofrece en forma natural y puede estar en estado de deterioro (Eguchi *et al.*, 2008). Además se han efectuado trabajos utilizando animales de laboratorio sometidos a dietas ricas en fructosa bajo condiciones controladas, tratando de extrapolar a los seres humanos.

El afán por encontrar la causa y el remedio contra de los procesos de envejecimiento se han proporcionado una gran cantidad de teorías, entre las que la del estrés oxidante es una de las más aceptadas. La evidencia experimental indica que los oxidantes son determinantes en el envejecimiento celular. Estos hechos tienen, en el campo de la nutrición, una evidente interacción, puesto que ésta puede ejercer una clara influencia desde una perspectiva preventiva. Se conoce el importante papel de las grasas y los carbohidratos de la dieta en la epidemiología de enfermedades como las cardiovasculares. El consumo de dietas hipercalóricas conlleva al aumento de ácidos grasos libres (AGL), citocinas proinflamatorias y producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Estas alteraciones inducen estrés oxidante y nitrosativo que daña a los tejidos causando disfunción de

los mismos y en consecuencia se pueden desarrollar enfermedades crónicas (Qulies *et al.*, 2004).

4. 4 DIETA ATEROGÉNICA

Puesto que la esteatohepatitis no alcohólica se ha correlacionado con enfermedades cardiovasculares, diversos autores han investigado el uso de dietas aterogénicas para reproducir la patología de la esteatohepatitis. Así Matsuzawa *et al.* (2007) demostraron lesiones precirróticas de esteatohepatitis tras 24 semanas de suministro de una dieta aterogénica a ratones. Si se le añadía un componente rico en grasa a la dieta se presentaba resistencia a la insulina y se aceleraba el proceso de esteatohepatitis.

4.5 DIETAS QUE INDUCEN LIPOGÉNESIS HEPÁTICA SIN OBESIDAD

Las ratas macho Sprague-Dawley alimentadas con una dieta deficiente en arginina durante 21 días tienen significativamente disminuida la ganancia de masa corporal pero aumentado el índice de biosíntesis lipídica hepática y la excreción urinaria de ácido orótico y desarrollan marcadamente hígado graso independientemente de su edad. Las dietas deficientes en arginina producen una gran reducción del contenido hepático de ATP en las ratas (52%), hamsters (38%) o conejos (27%)(Milner y Hassan, 1981).

4.6 DIETAS QUE INHIBEN LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Las dietas deficientes en colina y metionina alteran la betaoxidación mitocondrial en ratones normales y sobrerregulan la expresión del citocromo 2E1 (Leclercq *et al.*, 2000). Se han empleado también ratas SpragueDawley a las que se sometía a una dieta deficitaria en colina durante 12 semanas, que daba lugar a infiltración grasa del hígado en forma severa, con ligera inflamación y fibrosis, además de una marcada elevación de las aminotransferasas (Ibáñez *et al.*, 2007). Otra variante experimental son las dietas deficientes en metionina y colina, y ricas en grasa, que aplicadas durante 8 semanas, inducen también hígado graso en ratas (Ustundag *et al.*, 2007). Un problema asociado a las dietas deficientes en metionina y colina, tanto en ratas como en ratones, es la pérdida significativa de peso que pueden perder los animales (hasta el 40 % en 10 semanas), algo que no se observa en la enfermedad humana (London y George, 2007).

5. ESTRÉS OXIDANTE

Al tener un concepto más claro acerca de lo que son los procesos oxidativos y antioxidativos del cuerpo, se puede analizar el climaterio como una etapa de desequilibrio oxidativo, generado por especies reactivas de oxígeno, que es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en

nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos (Avello *et al.*, 2006).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el radical peróxido (RO_2^{\bullet}) pueden resultar beneficiosas ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar patógenos, también utilizadas en la señalización celular (Valko *et al.*, 2005). Sin embargo cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula, se produce el estrés oxidante, el cual está presente en diversas enfermedades degenerativas, tanto de tipo metabólico como el SM, hasta de tipo neuronal como la enfermedad de Alzheimer, además de ser parte fundamental del proceso de envejecimiento, donde se observan alteraciones sobre la funcionalidad celular, a través del daño a moléculas biológicas como y ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas y lípidos (Pacheco *et al.*, 2010).

5.1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular. La membrana celular contiene proteínas que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva

(Goodam, 1998). Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), que forman parte de los fosfolípidos de membrana, sus propiedades fisicoquímicas y son responsables de su fluidez y permeabilidad, lo que condiciona la función de las proteínas ligadas a la membrana así como su susceptibilidad al ataque oxidante y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica (Quiles *et al.*, 2004). Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas (Figura 11). Los antioxidantes, pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular (Halliwell, 1990).

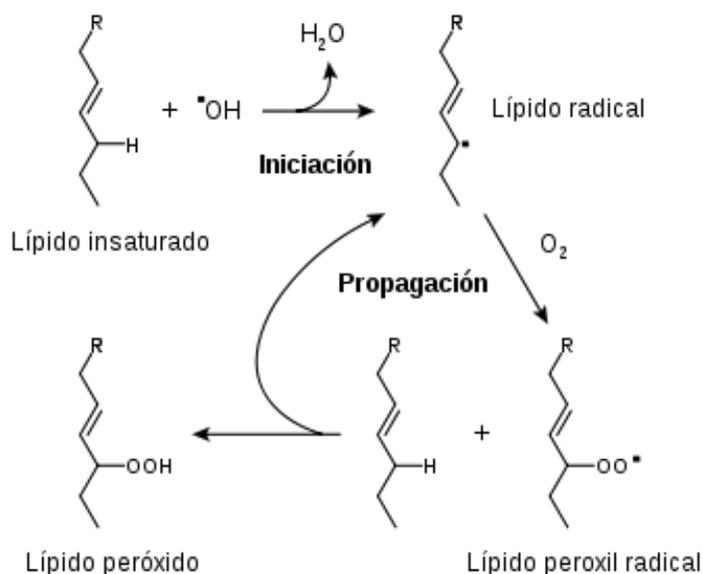


Figura 11. Proceso de Lipoperoxidación.

Los mecanismos homeostáticos con que el organismo enfrenta el daño oxidativo que habitualmente causan estas especies son numerosos y diversos, reflejando la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas, como también los numerosos compartimientos donde actúan en el organismo y las propiedades físicas de éstos (Kinsella *et al.*, 1993).

5.2 ANTIOXIDANTES

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres. Estas defensas por un lado tienden a impedir su formación y, por otro, los neutralizan una vez formados (moléculas con actividad antioxidante). La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres (Palamanda y Kehrer, 1992). Estos mecanismos son adecuados a la muy corta vida media de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante. Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes se clasifican en dos grupos, los de origen exógeno y los de origen endógeno (Avello *et al.*, 2006).

5.2.1 ANTIOXIDANTES EXÓGENOS

Este grupo lo conforma el α -tocoferol (vitamina E) que pertenece al grupo de vitaminas liposolubles ampliamente distribuida en los alimentos. Su función principal es la de destruir la mayor parte de las ERO y de otros radicales libres, protegiendo a

los ácidos grasos insaturados de la oxidación, con lo que se previene el daño oxidativo de los lípidos de la membrana. Este antioxidante no reacciona acoplado a enzima alguna, sino a través de su sitio activo que es el OH• en la posición 6 del anillo cromanol (Brigelius y Traver, 1999).

La participación de la vitamina E como antioxidante es de suma importancia, por la que se ha propuesto su uso en la prevención de enfermedades como isquemia cardíaca, toxemia del embarazo, tromboflebitis, fibrosis de seno y en traumas, donde existe una destrucción importante de células. La vitamina E se absorbe en el intestino y es necesario que se encuentren en presencia de grasas (Mc Call y Frei 2002).

El ácido ascórbico (vitamina C) tiene una potente acción antioxidante hidrosoluble en los fluidos biológicos, como secuestrador de ERO, generando la especie radical denominada ascorbilo. Otro mecanismo antioxidante de la vitamina C se asocia con su capacidad de regenerar antioxidantes de bajo peso molecular como la vitamina E, el glutati6n y el β -caroteno, partiendo de sus especies radicales (Halliwell *et al.*, 1996).

El β -caroteno es una vitamina abundante en algunas frutas y verduras; es uno de los antioxidantes más efectivos para proteger el organismo de las enfermedades cr6nicas provocadas por los RL ya que neutraliza al oxigeno singulete. Posee funciones espec6ficas que lo diferencian del resto. En cuanto a las ERO, los carotenoides pueden interactuar con ellas esencialmente de tres maneras:

transferencia de electrones, remoción de iones hidrógeno o adición de especies radicales. Además, es precursor de la vitamina A e influye en el sistema inmunológico, favoreciendo la reproducción de glóbulos blancos y protege del cáncer, pues estimula a las células para que secreten mayor cantidad TNF- α (Hemila *et al.*, 2002).

5.2.2 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS

Los antioxidantes endógenos están conformados por los grupos de tipo enzimático y de tipo no enzimático.

5.2.3 ANTIOXIDANTES DE TIPO ENZIMÁTICO.

Primer nivel. Consiste en evitar la reducción del O₂• mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar su reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano (Tzu *et al.*, 2003).

Segundo nivel. Lo constituyen enzimas especializadas en captar el radical O₂

- Éstas son la familia de las superóxido dismutasas (SOD):

Descubiertas por McCord y Fridovich (1969), constituyen la primera fase de defensa antioxidante, son un grupo de metaloenzimas que se encuentran frecuentemente en organismos aeróbicos, aerotolerantes, esenciales para la defensa contra la toxicidad de los metabolitos parcialmente reducidos, durante la reducción biológica normal del

oxígeno molecular. En mamíferos, existen tres tipos de enzimas que constituyen a la familia SOD. La primera es la enzima Cu/Zn-SOD (SOD1) localizada principalmente en el citosol, el núcleo, en la membrana externa de la mitocondria (Fridovich, 1978), la segunda enzima es la EC-SOD (SOD3), ubicada en fluidos extracelulares (Marklund, 1982) y la tercera enzima es la Mn-SOD (SOD2), la cual se concentra en la matriz mitocondrial y es inducida por el incremento en el estado oxidativo celular. Estas enzimas catalizan la conversión de O_2^{\bullet} , en H_2O_2 y O_2 y controlan su concentración intracelular evitando el daño al ADN, así como la oxidación de lípidos y proteínas que pueden resultar en la inactivación de ciertas enzimas (McCord y Fridovich, 1969).

La compartimentación de las diferentes SOD se explica en gran medida por el hecho de que el O_2^{\bullet} no puede cruzar con facilidad las membranas que separan los compartimientos celulares y mitocondriales.

Tercer nivel. Integrado por un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno. Entre ellas están:

a) Catalasa (CAT). Tiene una amplia distribución en el organismo, con una alta concentración en hígado y riñón, baja concentración tanto en tejido conectivo como en epitelios y prácticamente nula en tejido nervioso. A nivel celular se localiza en: mitocondrias, peroxisomas y citosol de los eritrocitos. Presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa, y forma parte del sistema antioxidante

CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Hadju *et al.*, 1977).

b) Glutación peroxidasa (GPx). Es una enzima seleno proteína. Esta enzima requiere de un tripeptido de bajo peso molecular llamado glutación reducido (GSH), para reducir el H_2O_2 a agua. El GSH es el donador de equivalentes reductores en dicha reacción, de esta manera, la reducción de H_2O_2 a agua y la oxidación del GSH a glutación oxidado (GSSG) ocurren simultáneamente. Se puede localizar en la mitocondria y el citosol de la célula hepática, en el citosol de los eritrocitos formando complejos con la hemoglobina y en el lisosoma de neutrófilos, macrófagos y otras células fagocíticas del sistema inmune (Arthur *et al.*, 2000)

Existen tres formas de GPx:

- GPx-c o forma celular: tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por lipoperóxido.
- GPx -p o forma extracelular: presenta afinidad semejante para ambos sustratos.
- GPx-PH: Tiene afinidad específica para los lipoperóxidos.

Las formas GPx-c y GPx-p no son capaces de utilizar los lipoperóxidos como sustrato (Ya y Diamont, 2003)

c) Glutation Reductasa (GR)

La GR es una flavoenzima dependiente del nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del GSSG a GSH el cual será utilizado

por la GPx para la reducción del H₂O₂ y de lipoperóxidos (L-OOH), los cuales son elementos tóxicos. Es decir, específicamente tiene una función de pivoteo en el estrés oxidante. Esta se encuentra en todos los organismos aeróbicos, así como en algunas plantas superiores por lo que aparenta ser una enzima casi universal (Cisneros-Prego *et al.*, 1995).

La GR es una enzima homodimérica compuesta por 2 subunidades idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro (cis 90-cis 90'); cada subunidad contiene 478 aminoácidos y en su estructura presenta una extensión N-terminal flexible y 4 dominios estructurales bien definidos. Dominio unido al flavín adenín dinucleótido (FAD), dominio de unión al NADPH, dominio central y dominio de interfase. Ambas subunidades presentan residuos esenciales que contribuyen a los sitios activos y de unión al GSSG, por lo que no presenta actividad enzimática en su forma monomérica ya que su sitio de unión para el sustrato y su sitio catalítico están compuestos por residuos de ambas subunidades (Cancino- Badías *et al.*, 2001).

La GR contiene FAD y un disulfuro en su sitio activo. La reacción catalítica requiere de la reducción del sitio activo por el NADPH, produciendo una semiquinona del FAD, un radical sulfuro y un tiol. Después de la reducción del centro activo por el NADPH, el NADP puede ser liberado antes o después del paso catalítico que involucra al glutatión (Cisneros-Prego *et al.*, 1995).

5.2.4 ANTIOXIDANTES DE TIPO NO ENZIMÁTICO.

El glutatión es una molécula única que participa en aspectos esenciales del homeostasis celular. Es un tripéptido formado por los aminoácidos γ - glutamil- cisteil- glicina. El glutatión (L-g-glutamyl-L-cysteinyl-glicina) es un tripéptido hidrosoluble formado por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina (Sastre *et al.*, 2005). Esta molécula es un antioxidante celular esencial, que está presente en todos los órganos y tejidos, especialmente en el hígado, donde se encuentran las mayores concentraciones (Raftos *et al.*, 2010). La molécula se encuentra libre y unida a proteínas. La concentración total de glutatión (GSht) es la suma de la fracción de glutatión libre y la fracción de glutatión unida a proteínas. A su vez, la fracción libre está integrada por la forma tiol reducida llamada GSH y la forma oxidada o disulfuro llamada GSSG. La forma reducida GSH es la forma activa de la molécula, es la más abundante y se la encuentra en el interior de las células en concentraciones milimolares en el rango de 0,1 a 10 Mm (Tapiero *et al.*, 2003), en tanto que extracelularmente se encuentran niveles micromolares de GSH

El grupo activo de la molécula está representado por el grupo tiol (-SH) del residuo de cisteína (*Figura 12*) (Pastore *et al.*, 2003).

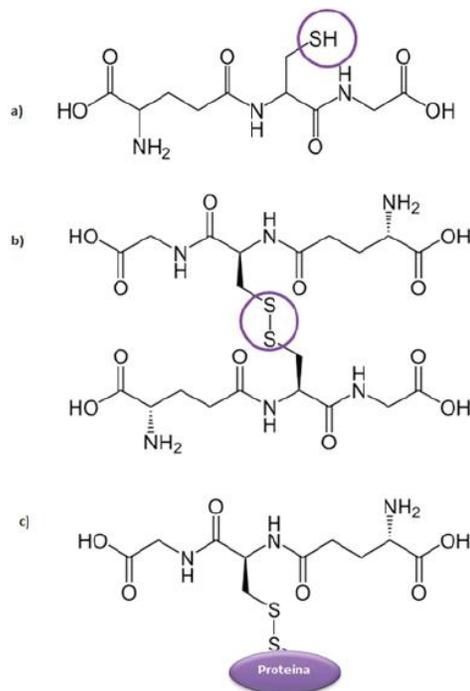


Figura 12. Estructura química de las distintas formas de glutatión.
a) Glutatión reducido (GSH), su grupo activo es el grupo SH del residuo de Cisteína (círculo). **b) Glutatión oxidado, formado por dos moléculas de GSH unidas por un enlace disulfuro (círculo).** **(GSSG).** **c) Glutatión unido a proteínas.**

Las células están sujetas a niveles fisiológicos de estrés oxidativo derivado de la respiración mitocondrial.

Los intermediarios formados tales como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) pueden llevar a la formación de formas tóxicas del oxígeno que causan peroxidación lipídica y daño celular. Del mismo modo, GSH reacciona con los intermediarios reactivos del nitrógeno (Han *et al.*, 2006). El peróxido de hidrógeno formado durante el metabolismo aeróbico es metabolizado formando GSSG. La reacción ocurre por la acción de la enzima glutatión peroxidasa, tanto en el citosol como en la mitocondria y también por la enzima catalasa que está ausente en la

mitocondria. El GSSG formado luego es reducido para formar nuevamente GSH por acción de la enzima GSH reductasa usando NADPH, formando así un ciclo de óxido-reducción. Los peróxidos orgánicos (ROOH) pueden ser reducidos por dos enzimas, la glutatión peroxidasa o la enzima GSHT-transferasa. En condiciones de estrés oxidativo severo, la habilidad de la célula para reducir GSSG a GSH se encuentra superada, tendiendo entonces a la acumulación de GSSG. Para evitar un cambio en el equilibrio redox intracelular, GSSG es activamente transportado fuera de la célula o bien reacciona con los sulfidrilos de las proteínas para formar disulfuros mixtos (PSSH) (Lu *et al.*, 2009) (Figura 13).

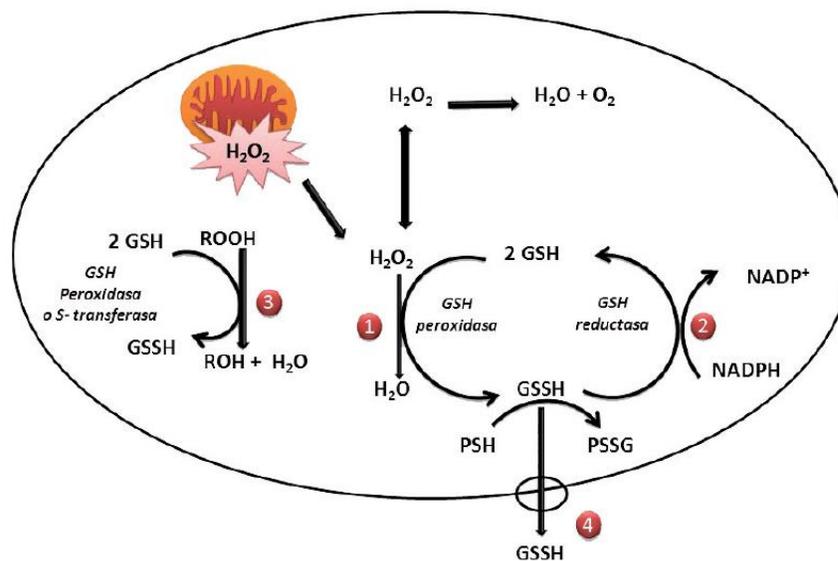


Figura 13. Función antioxidante de GSH. 1) El peróxido de hidrógeno formado por el metabolismo aeróbico es metabolizado por la enzima GSH peroxidasa formando GSSH. 2) GSSH formado en la reacción anterior es reducido por la enzima GSH reductasa utilizando NADPH como cofactor. 3) Los peróxidos orgánicos formados pueden ser reducidos por GSH peroxidasa. 4) El GSSH formado durante el estrés oxidativo que no puede ser reducido a GSH es exportado de la célula para mantener el equilibrio redox.

5.2.5 ESTROGENOS COMO ANTIOXIDANTES

Los estrógenos per se, son antioxidantes, (Ayres *et al.*, 1998; Subbiah *et al.*, 1993; Taniguchi *et al.*, 1994), ya que poseen un anillo fenol, el cual puede actuar como un barredor de radicales libres y, a la vez, le permite donar un átomo H⁺ (Wen *et al.*, 2000). Esta propiedad le posibilita al estrógeno intervenir en diferentes etapas de la oxidación lipídica. Estudios in vitro han evidenciado la capacidad antioxidativa de los estrógenos, al disminuir la oxidación de LDL y el CuSO₄, e inclusive se ha mostrado una disminución de lesiones inducidas por radicales libres en cadenas de ADN (Demirbag *et al.*, 2005). Se ha evidenciado que los diferentes estrógenos y sus metabolitos poseen distintas capacidades antioxidativas (Markides *et al.*, 1998)

Los estrógenos no solo participan como antioxidantes per se, sino que también pueden modificar los niveles y capacidades de los mecanismos oxidativos y antioxidativos del cuerpo. Strehlow en el 2003., demostraron que el estradiol disminuía la producción de radicales libres inducido por la angiotensina II en cultivos celulares de músculo liso (Strehlow *et al.*, 2003). Wassmann en el 2005 concluyó que el estradiol aumenta la transcripción, expresión y actividad de MnSOD y de ecSOD, sin afectar los niveles o actividad de la Cu-ZnSOD, GPx ni catalasa (Wassmann *et al.*, 2005).

5.3 ESTRÉS OXIDANTE EN TRASTORNOS METABÓLICOS Y LA DEFICIENCIA ESTROGÉNICA.

El estrés oxidante como lo mencionamos con anterioridad es la disparidad en la producción y degradación de las ROS. Las evidencias disponibles indican que el estrés oxidativo sistémico elevado está estrechamente relacionado con SM (Furukawa *et al.*, 2004; Reuter *et al.*, 2010). Se ha establecido una correlación positiva entre la presencia de estrés oxidante y el aumento de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y Lipoproteínas de baja densidad (HDL) en los modelos animales. Varios mecanismos se han propuesto para evaluar el estrés oxidante en desordenes metabólicos. Uno de los mecanismos es la disfuncionalidad de la capacidad antioxidante de la HDL, mecanismo por el cual resulta la disminución de HDL en los desórdenes metabólicos (Hansel *et al.*, 2004). La presencia de marcadores de estrés oxidante en plasma se correlaciona inversamente con niveles bajos de HDL, mientras que los productos de peroxidación lipídica se correlacionan con un bajos niveles de HDL en el SM (Marques de Mattos *et al.*, 2012). Por otro lado también se ha observado que puede ocurrir aumento de peroxidación lipídica, carbonilación de proteínas y incremento en la actividad NADPH oxidasa, así como la disminución de los niveles de GSH en el SM, lo cual conduce a un aumento en la formación de ROS (Holvoet *et al.*, 2004).

La producción de radicales libres durante el trastorno metabólico también se puede atribuir al desequilibrio redox y la disminución del potencial del sistema de eliminación de radicales libres. Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD), el cual es

regulado a la baja junto con otro sistema antioxidante en el organismo como catalasa y GPx (Hutcheson *et al.*, 2012). El anión superóxido ($O_2\bullet$) tiene la capacidad de cambiar post-traduccionalmente biomoléculas como lípidos, proteínas, ADN y antioxidantes de bajo peso molecular. Esta especie también pueden causar cambios oxidativos en las proteínas celulares por la nitrosilación de los residuos de tirosina, un marcador importante del problema cardiovascular, y hacerlos disfuncionales (Huang *et al.*, 2005).

Como sabemos, el estrés oxidante afecta en un sin número de funciones biológicas y participa en el desarrollo de enfermedades humanas de tipo crónico degenerativas con impacto epidemiológico como el SM.

En la actualidad existen evidencias basadas en ensayos clínicos controlados bien diseñados, en que el empleo de TRH con estrógenos tiene efectos beneficiosos, eficaces no sólo sobre el síndrome climatérico (Oláiz-Fernández *et al.*, 2006), sino también sobre el metabolismo de hidratos de carbono y perfil lipídico alteraciones propias de trastornos como el SM (Córdova-Villalobos *et al.*, 2008).

Durante la menopausia ocurre una serie de cambios importantes sobre el metabolismo de los lípidos y a nivel del endotelio vascular que facilita la aterogénesis lo que se agrava con la presencia del SM (González *et al.*, 2013).

La terapia oral puede tener efectos metabólicos benéficos tales como, aumentar los niveles de HDL-C, la síntesis de proteínas hepáticas como las globulinas transportadoras SHBG responsable de la regulación los andrógenos libres, globulina

unida a la tiroxina (TBG) y la globulina unida al cortisol (CBG), aumenta la producción apolipoproteína A1 (apoA1), mejora la tolerancia a los hidratos de carbono e inhibe la lipasa hepática (Salpeter *et al.*, 2006); pero a la vez produce efectos indeseables tales como aumento de los factores de coagulación, producción excesiva del sustrato renina, aunque disminuye los niveles circulantes de LDL-C, modifica el tamaño de las partículas a más pequeñas de LDL-C, las cuales son más aterogénicas e incrementan la concentración de triglicéridos generando mayor riesgo de pancreatitis y cálculos en vesícula (Escobar-Sánchez *et al.*, 2011).

Los estrógenos administrados por vía oral con o sin un progestágeno durante un año de tratamiento, mostró reducción en la glucosa e insulina en ayunas y una menor probabilidad de desarrollar diabetes (Kanaya *et al.*, 2003). Aunque los datos han sido controvertidos y pueden ser diferentes dependiendo del tipo de pacientes tratadas, de la dosis, el tipo y vía de administración de estrógenos, los resultados del estudio sugieren que la implementación de la TRH con estradiol mejoró los parámetros determinados en dicho estudio (Tabares-Trujillo *et al.*, 2012), haciendo énfasis en que la vía transdérmica puede ser preferible a la oral, en pacientes con SM (Chu *et al.*, 2006).

En diversos estudios se ha observado un efecto protector para SM en mujeres que reciben TRH, principalmente en la terapia de estrógenos con progestágenos, por vía transdérmica (Fenochio-González F *et al.*, 2012). La TRH con estrógenos, solos o combinados, no está libre de posibles efectos adversos; se ha relacionado con posibles efectos a nivel oncológico y de trombosis venosa profunda o

tromboembolismo pulmonar (Sturdee et al, 2011). Debido a ello, la TRH debe prescribirse sólo en casos de síntomas climatéricos que alteren la calidad de vida de la paciente, a la dosis mínima eficaz y durante el tiempo más corto posible, ya que muchos de los tratamientos empleados se prescriben mucho tiempo después del comienzo del decline estrogénico. Además este tipo de terapia puede tener efectos benéficos o perjudiciales en función de los factores de riesgo que presente la paciente, edad, años desde la menopausia, estado de salud del sistema vascular y metabólico, naturaleza de los compuestos hormonales, dosis y vías de administración oral, transdérmica o vaginal, como también del progestágeno asociado, efectos que se siguen investigando.

Por tal motivo es necesario realizar más estudios que permitan asociar los posibles efectos (benéficos o perjudiciales) a nivel sistémico secundario al uso de TRH en mujeres posmenopáusicas. Por otro lado el uso de la TRH ha estado relacionada con la variación en el tiempo del comienzo del tratamiento, así como a la aparición de cuadros oncológicos (Sturdee *et al*, 2011). Debido a esto surge el interés de probar una TRH, que ayude a prevenir y/o mejorar todas y cada y una de las complicaciones tanto de origen metabólico e inducidas por el estrés oxidante durante los primeros estadios del decline estrogénico, y a la vez, que no tenga los efectos adversos tan agresivos como los que se presentan con el uso de la TH convencional.

Como lo hemos visto en los datos anteriores la prevención y el control de las enfermedades metabólicas se traducen en un retraso en la expresión clínica de estos procesos crónico-degenerativos y, por tanto, en una paralela disminución de su

prevalencia y de los costos que suponen. En este sentido, este proyecto se pretendió definir el efecto de la administración de TB sobre parámetros, bioquímicos y moleculares del SM, a través de la modulación del estrés oxidativo.

JUSTIFICACIÓN

El aumento de peso corporal, y en consecuencia el desarrollo de obesidad, genera mayor prevalencia del SM en mujeres posmenopausicas, y con esto el riesgo de desarrollar DT2 aumenta. La TRH puede ayudar a reducir los componentes del SM (obesidad, hipertensión, resistencia a la insulina, marcadores de inflamación, dislipidemia, estrés oxidante) en mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, en aquellas mujeres posmenopáusicas que cuentan con diagnostico de SM, se ha observado que con la TRH con estradiol y estradiol/progesterona puede generar aumento en el desarrollo de complicaciones asociadas al SM, así como un mayor riesgo en la aparición de cuadros oncologicos. Cabe meciona que el uso de la TRH tiene una amplia variación en cuanto al tiempo de inicio del tratamiento. Esta situación ha provocado un renovado interés acerca de las posibles ventajas del empleo de hormonas sintéticas como la TB durante un tiempo más temprano, es decir al inicio del decline estrogenico, ya que hay pocos estudios acerca del efecto de esta hormona sobre el SM y sus componentes y el estrés oxiadante. El estudio de dichas variables permitirá comprender los mecanismos que se presentan durante este transtorno. Por ello, es necesario estudiar los efectos de la administración de TB a corto plazo, como agente preventivo y/o mejorar todas y cada una de las complicaciones tanto de origen metabólico o inducidas por el estrés oxidante durante los primeros estadíos del decline estrogénico.

HIPÓTESIS

Sí la dieta alta en fructuosa y grasa induce trastornos metabólicos y estrés oxidante, entonces el efecto de la administración aguda de tibolona, demostrará una disminución de parámetros metabólicos y marcadores de estrés oxidante en suero ratas ovariectomizadas

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la administración aguda de TB sobre el perfil metabólico y el estrés oxidante en suero de ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta alta en fructosa y grasa.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el efecto agudo de la TB sobre consumo de alimento, consumo de agua, ingesta calórica el peso corporal, de ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta alta en fructosa y grasa.
- Establecer el efecto de la administración de la TB durante siete días sobre los niveles de glucosa, sensibilidad a la insulina, así como la formación de productos de glicación avanzada en suero de ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta alta en fructosa y grasa.
- Determinar el efecto agudo de la TB sobre los niveles triglicéridos y colesterol en suero de ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta alta en fructosa y grasa.
- Analizar el efecto a corto plazo de la administración de TB sobre actividad de enzimas antioxidantes (SOD, GPx y GR) en suero de ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta alta en fructosa y grasa.
- Señalar el efecto por siete días de la TB sobre las concentraciones del ratio GSH/GSSG como indicador del estado redox celular en suero de ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta alta en fructosa y grasa.
- Determinar el efecto agudo de TB sobre la formación de marcadores de EO en (MDA) suero de ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta alta en fructosa y grasa.

10. MATERIAL Y METODOS

10.1 Animales

Las ratas hembras Sprague-Dawley adultas (250-270 g) estuvieron individualmente bajo condiciones estándar de bioterio (ciclos de luz / oscuridad de 12 horas, 22 ° C). Todos los procedimientos experimentales fueron realizados por las Directrices Mexicanas para el Cuidado y Manejo de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Todas se hicieron esfuerzos para minimizar la incomodidad de los animales y reducir la cantidad de animales utilizados. El protocolo fue autorizado por el comité de ética de la Comisión Nacional de Investigación Científica de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS

10.2 Procedimientos quirúrgicos

Los animales fueron ovariectomizados (OVX) bajo i.p. ketamina (90 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) (Vetoquinol, Ciudad de México, México) anestesia. Ambos ovarios se extirparon quirúrgicamente para eliminar los esteroides ováricos endógenos.

10.3 Dietas

Los animales control fueron alimentados con dieta estándar para roedores (3 kcal/g; LabDiet® México) y agua (DE). Los grupos de dieta alta en fructuosa y grasa (HFFD), *por sus siglas en inglés* fueron alimentados con dieta para roedores estándar suplementado con 10% de manteca de cerdo (5.4 kcal/g) y 20% de alta

fructosa mezclado en el agua de beber (0.83 kcal / ml, disponible comercialmente como jarabe de maíz). Los animales fueron alimentados *ad libitum* con sus dietas correspondientes. La ingesta de agua y alimentos, así como el peso del animal, se registraron diariamente durante los siete días de tratamiento.

10.4 Tratamiento

Tibolona (1 mg/kg; Livial®, Organon, México) o vehículo (agua) se administró diariamente por sonda gástrica durante siete días. Recientemente se ha demostrado que esta dosis de TB tiene propiedades neuroprotectoras reduciendo la peroxidación lipídica y mejorando déficits conductuales/funcionales después de la exposición al ozono (Pinto-Almazán et al., 2014). Las soluciones que contienen TB o vehículo fueron codificadas independientemente antes de la administración.

10.5 Diseño experimental

Diez días después de OVX, los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes grupos: (1) INT-DE+V, animales intactos alimentados con DE y tratados con vehículo (V); (2) INT-DE+TB; animales intactos alimentados con DE y tratado con TB; (3) INT-HFFD+V, animales intactos alimentados con HFFD y V; (4) INT-HFFD+TB, animales intactos alimentados con HFFD y TB; (5) OVX, animales ovariectomizados alimentados con DE y V; (6) OVX-DE+TB, animales ovariectomizados alimentados con DE y TB; (7) OVX-HFFD+V, ovariectomizado animales alimentados con HFFD y V; y (8) OVX-HFFD+TB, animales ovariectomizados alimentados con HFFD y TB (*Figura 14*).

10.5.1 Determinación del peso corporal

El peso corporal de los animales se registró diariamente, y el peso promedio para cada grupo fue calculado.

10.5.2 Determinación del consumo de alimento

Se cuantificó la cantidad de alimento consumido al día (g) y se hizo una relación de a cuerdo a la cantidad de alimento que se les dejó a cada grupo el día anterior.

10.5.3 Determinación del consumo de fructosa

Se cuantificó la cantidad de líquido (agua o fructosa al 20%, según fuera el caso) consumido al día (mL) y se hizo una relación de a cuerdo a la cantidad de líquido que se les dejó a cada grupo el día anterior.

10.5.4 Determinación del consumo de la ingesta calórica

Con cada uno de los valores finales de consumo de alimento, fructosa y agua al día se cuantificaron los valores calóricos (kcal/g o kcal/mL) de cada grupo.

10.5.5 Determinación de colesterol y triglicéridos en suero

Se recolectó la sangre total y se centrifugó para separar el suero, posteriormente se almacenaron alícuotas a -80 ° C hasta su análisis.

Los niveles de triglicéridos (TG) y colesterol total (COL) se determinaron usando métodos espectrofotométricos (kits SPINREACT, España).

10.5.6 Determinación de niveles de glucosa y sensibilidad a la insulina

Para las mediciones de glucosa en sangre, las ratas se mantuvieron en un ayuno de 4-6 h antes de la determinación, a partir de un corte del extremo de la cola se obtuvo sangre y se colocó una gota en la tira reactiva y usando un analizador de glucosa en sangre de contorno (Abbott, Illinois, EE. UU.). Con la finalidad de analizar la sensibilidad a insulina, a cada animal se le inyectó un bolo de insulina de 5U/kg (HUMALOG MIX50 KWIKPEN, Lilly Lab, Madrid, España) de peso. Después de un tiempo de espera de 15 minutos de la inyección se volvió a tomar una muestra de glucosa.

10.5.7 Actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se determinó usando un kit comercial (CAYMAN, Michigan, EE. UU.). Este método permite la detección de los principales tipos de SOD (Cu / Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-CÉSPED). La reacción se realizó en los pozos de microplacas donde se colocaron 200 μ L de cada una de las muestras de suero. Posteriormente, se añadieron a la mezcla 10 μ L de extracto enzimático o un estándar de SOD. La reacción se inició añadiendo 20 μ L de xantina oxidasa (preparada diluyendo 50 μ L). Xantina oxidasa en 1.95 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8.0), catalizando así la liberación de radicales superóxido los cuales son captados por la sal de tetrazolio y cuantificados a una absorbancia de 450 nm siendo la concentración de radicales fue inversamente proporcional a la actividad de SOD en las muestras. Donde una unidad

(U/mL) de SOD es definida como la cantidad de enzima necesaria para mostrar el 50% de la dismutación del radical pueróxido.

10.5.8 Actividad específica de Glutación Peroxidasa (GPx) y Glutación Reductasa (GR)

Las actividades enzimáticas de GPx y GR en el suero se cuantificaron mediante la producción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺), usando los métodos previamente descrito (Lawrence RA & Burk RF, 1979). Donde se reporto la concentración y la relación de cada una de las enzimas, y el resultado se expresó en U/mL en una muestra de suero.

10.5.9 Relación Glutación Reducido /Glutación oxidado (GSH/GSSG)

GSH (glutación reducido) se determinó usando el método descrito por Sedlak y Lindsay (1968), en la cual se midieron los grupos tiol en ácido 2-nitrobenzoico (DTNB) (Sedlak y Lindsay et l., 1968). Brevemente, se mezclaron 0.05 mL de suero con 800 µL de ácido meta-fosfórico, 2 mL de Tampón TRIS y 50 µL de DTNB, y la absorbancia se registró a 412 nm. GSSG (glutación oxidado) se redujo a GSH, que a su vez se cuantificó con el Ellman reactivo, 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (Tietze F et al., 1969). La reducción fue catalizada por GR cuando NADPH estaba presente. El cambio de color durante la reacción y la velocidad de reacción son proporcionales a las concentraciones de GSH y GSSG.

10.5.10 Productos Finales de la Glicosilación Avanzada (AGES)

La determinación de AGES se basó en la detección espectrofluorométrica de algunos productos fluorescentes según Münch et al. 1997 y Henle et al. 1999. (Münch G et al., 1997). El suero sanguíneo se diluyó 1:50 con PBS pH 7.4 y se registró la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión (~ 440 nm) tras la excitación a 350 nm (Fluoromax-3) espectrofluorómetro, HORIBA Jobin Yvon, EE. UU.). La intensidad de fluorescencia se expresó en unidades arbitrarias (UAF).

10.5.11 Determinación de Malondialdehído (MDA)

MDA es el producto final de la peroxidación de ácidos grasos y un marcador de radicales libres. El procedimiento para la determinación de MDA se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del kit del fabricante (Abcam, Cambridge, MA, EE. UU.). Todos los ensayos se prepararon en placas de 96 pozos y estudiado en duplicados. El contenido total de MDA en muestras de suero fue determinado por diferencia entre la prueba y las muestras estándar.

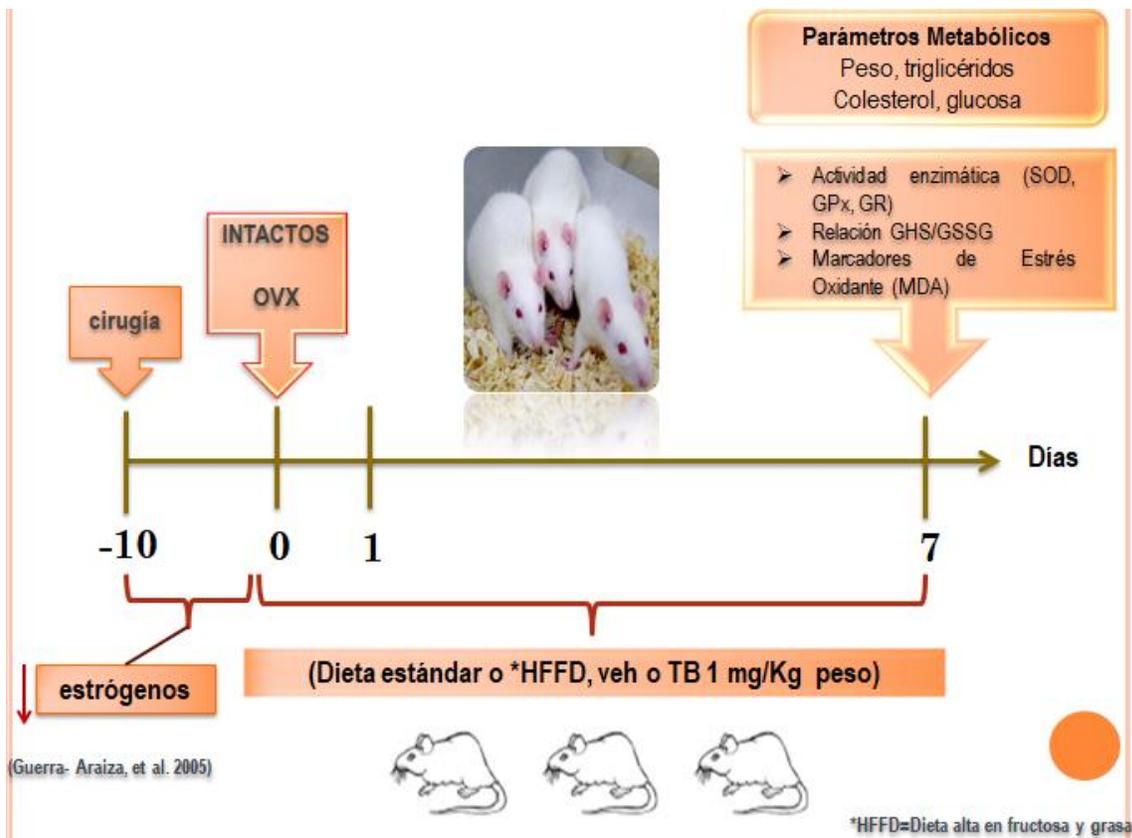


Figura 14. Diseño Experimental

10.5. Análisis Estadístico

Los datos se expresaron como media \pm error estándar (EE). Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. La comparación entre grupos se determinó con ANOVA de una vía seguido de una prueba *pos hoc* de Tukey, utilizando GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos).

11. RESULTADOS

En las gráficas que a continuación se presentan están representados en el eje de las abscisas todos y cada uno de los grupos de experimentales, los cuales se encuentran divididos en dos grandes familias: intactos (INT) y ovariectomizados (OVX), que a su vez están ordenados tal y como se detalló en la sección de metodología. Mientras que, en el eje de las ordenadas estarán representados todos y cada uno de los parámetros que fueron determinados para la realización de este trabajo (peso corporal, ingesta calórica, niveles de glucosa, actividad enzimática, etc.)

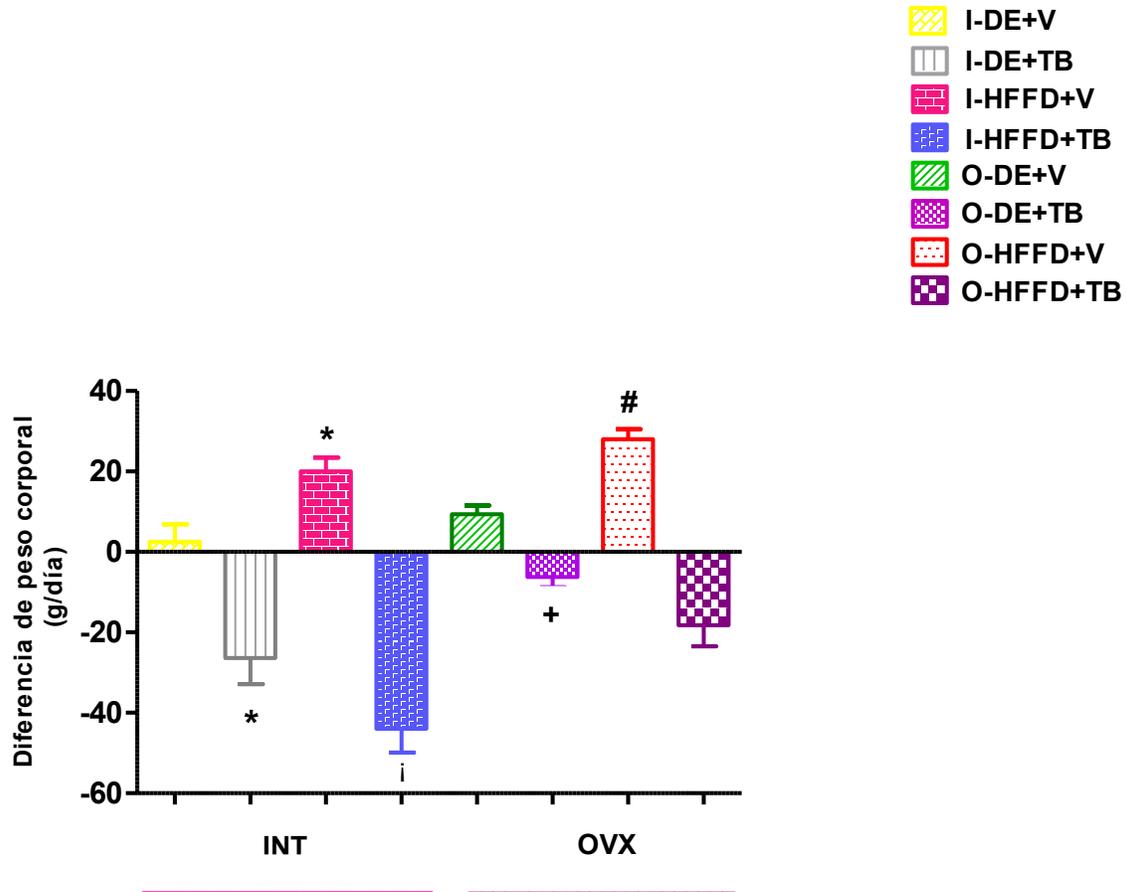
El humano es un organismo heterótrofo, que obtiene sus alimentos del medio ambiente, por lo que requiere de un sistema muy bien organizado que regule la ingestión de alimentos, el mantenimiento del balance energético y la conservación del peso corporal. Cuando este sistema falla, se presentan trastornos de tipo metabólico la desnutrición y la obesidad, con base a lo anterior en este trabajo se analizaron cada uno de los componentes de dicho sistema de regulación.

Los resultados muestran en la grafica 1 el comportamiento de cada grupo con respecto al peso de los animales tratados en el estudio, Los resultados indican que siete días de alimentación con HFFD son suficientes para incrementar significativamente el peso tanto de los animales INT ($+20 \pm 3.48$ g vs $+2.51 \pm 4.29$ g; $p < 0.05$) y OVX ($+9.33 \pm 2.23$ g vs $+2.51 \pm 4.29$ g; $p < 0.05$), ambos comparados con el

grupo control (Tabla 2). Por otro lado, los resultados muestran que siete días de alimentación con HFFD son suficientes para incrementar significativamente el peso tanto de los animales INT ($+20 \pm 3.48$ g vs $+2.51 \pm 4.29$ g; $p < 0.05$) y OVX ($+9.33 \pm 2.23$ g vs $+2.51 \pm 4.29$ g; $p < 0.05$), ambos comparados con el grupo control (Tabla 2)

Por otro lado se puede apreciar que la OVX por sí sola, no causó cambios significativos de peso en los animales de este grupo de experimentación (OVX-DE+V), sin embargo el tratamiento por siete días con TB mostró disminución significativa de peso tanto en animales INT-DE+TB (-44 ± 5.85 g vs $+20 \pm 3.48$ g ; $p < 0.05$) y OVX-DE+TB (-6.25 ± 2.52 g vs $+9.33 \pm 2.23$ g; $p < 0.05$) que fueron alimentados con dieta estándar comparados con sus grupos controles (Tabla 2)

Efecto de la TB sobre la diferencia de peso corporal inducidos por la OVX y la HFFD



Gráfica 1. Efecto de la TB sobre los cambios de peso corporal en animales INT y OVX, alimentados con DE y HFFD. Las barras representan la media \pm EE (n=10), * $p < 0.05$, INT-DE+TB, INT-HFFD+V vs INT-DE+V; $i p < 0.05$ INT-HFFD+TB vs INT-HFFD+V; * $p < 0.05$ OVX-DE+TB vs OVX-DE+V; # $p < 0.05$ OVX-HFFD+V vs OVX-DE+V; & $p < 0.05$ OVX-HFFD+TB vs OVX-HFFD+V. $p < 0.05$, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

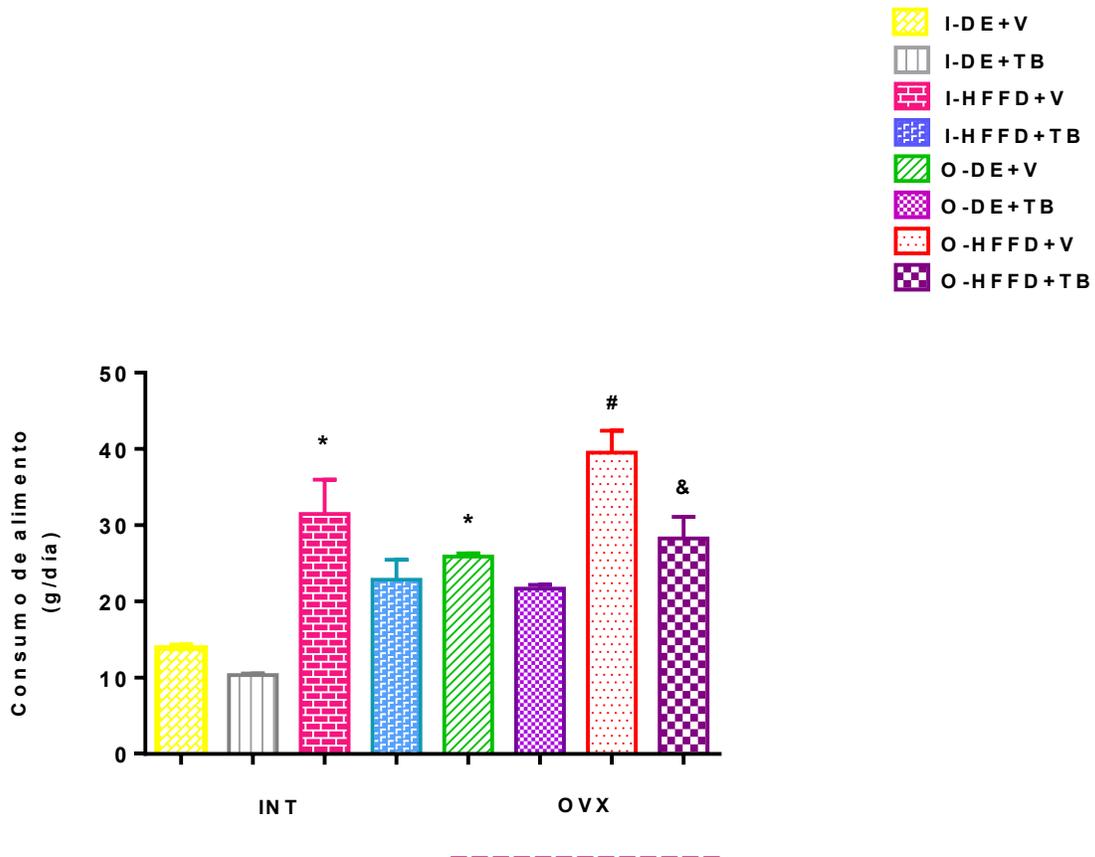
Grupo	Peso corporal (g)	* Diferencia de peso corporal (ΔWg)
I-DE+V	256±3.48	+2.51±4.29
I-DE+TB	234.8±0.67*	-26.40±6.49*
I-HFFD+V	286.8±1.79*	+20±3.48*
I-HFFD-TB	249.5±3.28**	-44±5.85**
OVX-DE+V	268.9±4.90	+9.33±2.23
OVX-DE+TB	239.3±5.98 [#]	-6.25±2.52
OVX-HFFD+V	289.8±5.83 [#]	+28±2.51 [#]
OVX-HFFD-TB	255.6±5.75 ^{##}	-18.20±5.27 ^{##}

Tabla 2. Efecto de la TB sobre la ganancia (+) o pérdida (-) de peso, expresada como la diferencia de peso (ΔWg) en animales INT y OVX alimentados con DE y HFFD. Los datos representan la media \pm EE (n=10), * vs control, ** vs C-HFFD, [#] vs OVX, ^{##} vs OVX-HFD. $p < 0.05$, ANOVA, Pos hoc de Tukey.

Con la finalidad de observar si el consumo de alimento se veía modificado en cada una de las condiciones bajo las que se realizó este estudio, se decidió medir el alimento consumido en cada uno de los grupos. La gráfica muestra que la HFFD incrementa significativamente el consumo de alimento, tanto en animales INT-HFFD+V (31.48 ± 4.48 g vs 13.90 ± 0.46 g; $p < 0.05$) como OVX-HFFD+V (39.53 ± 2.85 g vs 25.88 ± 0.42 g; $p < 0.05$), en comparación con el grupo control (INT-DE+V) para INT-HFFD+V y (OVX-HFFD+V) para OVX-DE+V; además se aprecia que los animales ovariectomizados alimentados con dieta estándar (OVX-DE+V) también tuvieron un incremento significativo en el consumo de alimento con respecto al grupo INT-HFFD+V (25.88 ± 0.42 g vs 13.90 ± 0.46 g; $p < 0.05$)

Al dar el tratamiento simultáneo por siete días con TB pudimos observar una disminución significativa del consumo de alimento sólo en el grupo de animales OVX, que fueron alimentados con HFFD (OVX-HFFD+TB) en comparación con el grupo de animales OVX-HFFD+V (28.27 ± 2.84 g vs 39.53 ± 2.85 g; $p < 0.05$) (*Gráfica 2*)

Efecto de la TB sobre los cambios en el consumo de alimento inducidos por la OVX y la HFFD



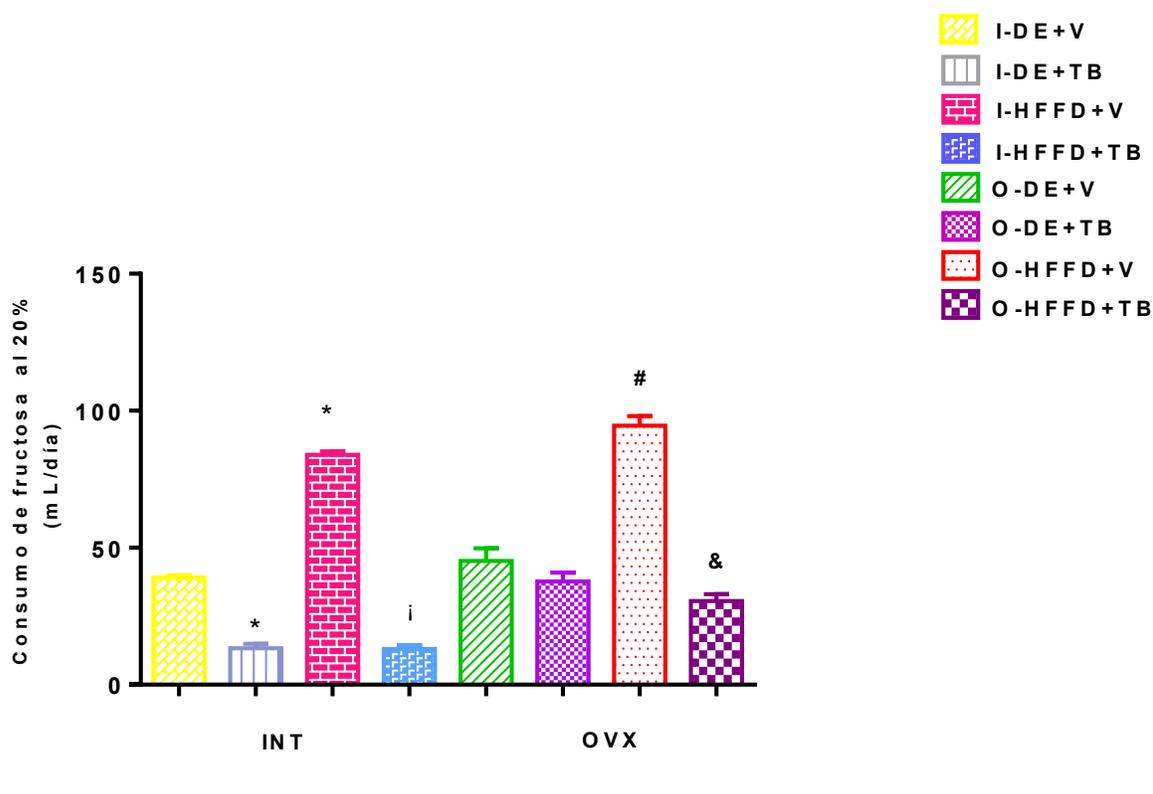
Gráfica 2. Efecto de la TB sobre el consumo de alimento en animales INT y OVX, alimentados con DE y HFFD. Las barras representan la media \pm EE (n=10), * $p < 0.05$ INT-HFFD+V, OVX-DE+TB vs INT-DE+V; # $p < 0.05$ OVX-HFFD+V vs OVX-DE+V; & $p < 0.05$ OVX-HFFD+TB vs OVX-HFFD+V. $p < 0.05$, ANOVA, *Post hoc* de Tukey.

La fructosa es un monosacárido presente en forma natural en frutas, verduras, miel y en forma agregada en alimentos etiquetados como diet o light, bebidas y néctares. La ingesta de este monosacárido se ha incrementado considerablemente en los últimos años, especialmente en la forma de "Jarabe de maíz alto en fructosa. Estudios recientes sugieren que la dieta específicamente alta en fructosa ha contribuido a la presencia de alteraciones metabólicas que resultan en ganancia de peso, diabetes mellitus tipo II, hiperlipidemia e hiperuricemia, por tal motivo uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la ingesta de fructosa de cada uno de los grupos de experimentación. Los resultados indican que en los grupos alimentados con HFFD se aumentó el consumo de fructosa al 20% en animales INT (83.89 ± 1.32 mL/día vs 39.17 ± 0.79 mL/día) y OVX (94.51 ± 3.60 mL /día vs 45.20 ± 4.57 mL/día; $p < 0.05$), aumento que fue corroborado al ser comparados con sus grupos control (INT-HFFD+V) y (OVX-HFFD+V).

Por otra parte los resultados muestran que la OVX no causó modificaciones estadísticamente significativas, en cuanto al consumo de fructosa. Por el contrario a lo ocurrido con la toma de TB, ya que en los animales INT con HFFD (13 ± 1.39 mL/día vs 83.89 ± 1.33 mL/día; $p < 0.05$) y sin HFFD (13.34 ± 1.62 mL/día vs 39.17 ± 0.79 mL/día; $p < 0.05$) el consumo de fructosa bajó significativamente dicho consumo, comparado a los grupos que fueron tratados con las mismas condiciones; pero que se les dio solo el vehículo.

De igual manera se notó que la TB en los OVX que consumieron HFFD, pudo reducir el consumo de fructosa con respecto al grupo OVX-HFFD+V (30.57 ± 2.50 mL/día vs 94.51 ± 3.60 mL/día; $p < 0.05$) (Gráfica 3)

Efecto de la TB sobre los cambios en el consumo de fructosa al 20% inducido por la OVX y la HFFD

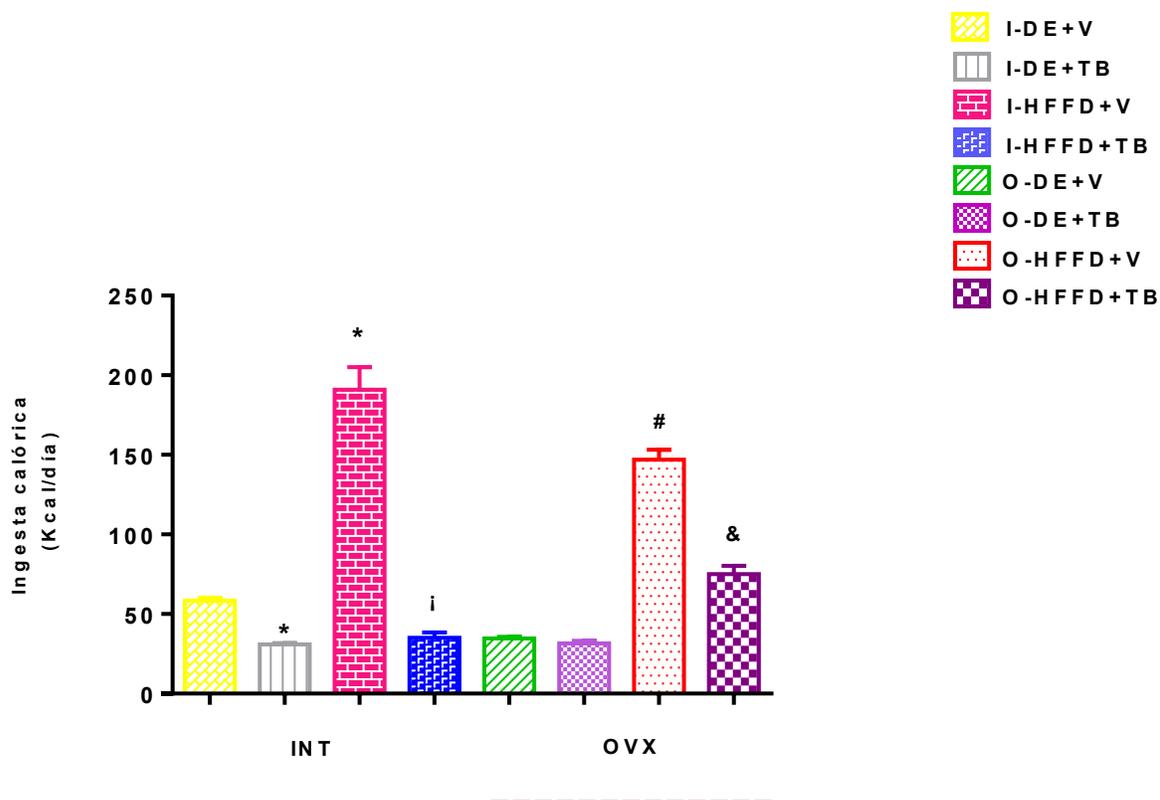


Gráfica 3. Efecto de la TB sobre el consumo de fructosa en animales INT y OVX, alimentados con DE y HFFD. Las barras representan la media \pm EE ($n=10$), * $p < 0.05$ INT-DE+TB, INT-HFFD+V vs INT-DE+V; i $p < 0.05$ INT-HFFD+TB vs INT-HFFD+V; # $p < 0.05$ OVX-HFFD+V vs OVX-DE+V; & $p < 0.05$ OVX-HFFD+TB vs OVX-HFFD+V. $p < 0.05$, ANOVA, Pos hoc de Tukey.

En la actualidad es bien sabido que los excesos de calorías consumidas desencadenan algunas enfermedades crónicas como: sobrepeso, obesidad, diabetes y SM, entre otras, en las cuales el factor mayormente asociado a ellas, es el desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, ya que existe un aumento en la ingesta de alimentos de alto contenido calórico, que son ricos en grasa, azúcar y sal; y un descenso en la actividad física debido a la naturaleza cada vez más sedentaria. Evidencia que dirigió a la determinación de la ingesta calórica en nuestro modelo de estudio, donde los datos mostraron que los grupos INT-HFFD+V y OVX-HFFD+V, tuvieron un incremento estadísticamente significativo de la ingesta calórica en comparación con el grupo control (INT-DE+V) para INT-HFFD+V (191 ± 14.23 Kcal/día vs 58.37 ± 1.96 Kcal/día; $p < 0.05$) y (OVX-HFFD+V) (147.1 ± 6.24 Kcal/día vs 31.50 ± 1.73 Kcal; $p < 0.05$) para OVX-DE+V (*Gráfica 4*).

Por otra parte se puede apreciar que la OVX por sí sola, no causó modificaciones significativas en cuanto a la ingesta calórica (OVX-DE-V), efecto que fue disminuido significativamente en los animales que se les administró TB tanto en intactos alimentados con dieta estándar (INT-DE+TB) (31.03 ± 0.70 Kcal/día vs 58.37 ± 1.96 Kcal/día; $p < 0.05$) e INT alimentados con HFFD (INT-HFFD+TB) (35.10 ± 3.39 vs 3.39 Kcal; $p < 0.05$); además este efecto se mostró similar (disminuyó) en el grupo OVX-HFFD+TB (75.05 ± 5.32 Kcal/día vs 147.1 ± 6.24 Kcal/día; $p < 0.05$) comparado con el grupo OVX-HFFD-V (*Gráfica 4*)

Efecto de la TB sobre los cambios en la ingesta calórica inducidos por la OVX y la HFFD



Gráfica 4. Efecto de la TB sobre el consumo de fructosa en animales INT y OVX, alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE de (n=10), * $p < 0.05$ INT-DE+TB, INT-HFFD+V vs INT-DE+V; $i p < 0.05$ INT-HFFD+TB vs INT-HFFD+V; # $p < 0.05$ OVX-HFFD+V vs OVX-DE+V; & $p < 0.05$ OVX-HFFD+TB vs OVX-HFFD+V. $p < 0.05$, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

La medición de los procesos biológicos es un aspecto de la biomedicina denominada "biomarcador". Los biomarcadores son parámetros anatómicos, fisiológicos, bioquímicos o moleculares asociados con la presencia y severidad de estados específicos de determinadas enfermedades por lo que indican una medida de salud. El colesterol total y los triglicéridos son ejemplos de biomarcadores. Sus concentraciones son de indiscutible valor diagnóstico y pronóstico ya que están directamente correlacionadas con el inicio y progresión de las enfermedades vasculares, cuales constituyen las primeras causas de muerte en el mundo. Dado a lo anterior los resultados en este estudio con respecto a los niveles de triglicéridos séricos mostraron que en los animales intactos (INT), ni la HFFD, ni la administración de TB causó modificaciones significativas en cuanto a la concentración de triglicéridos en ninguno de estos grupos, efecto que se observó similar en los animales OVX alimentados con dieta estándar (OVX-DE+V) (*Fig. 5*)

Sin embargo, en los animales OVX que fueron alimentados con HFFD (OVX-HFFD+V) se observó un incremento estadísticamente significativo (139.55 ± 6.93 mg/dL vs 71.53 ± 4.33 mg/dL; $p < 0.05$) de los niveles de triglicéridos en suero en comparación con el grupo (OVX-DE+V) (*Gráfica 5*)

Al administrar TB durante siete días logramos apreciar que el fármaco disminuyó las concentraciones de triglicéridos en suero de los animales OVX alimentados con dieta estándar (OVX-DE+V) (34.55 ± 7.79 mg/dL vs 71.53 ± 4.33 mg/dL; $p < 0.05$) en comparación con el grupo ovx que fue alimentado con dieta estándar más la administración del vehículo (OVX-DE+V).

Finalmente los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa de los niveles de triglicéridos en suero cuando se le administro TB al grupo de animales que fueron alimentados con HFFD (OVX-HFFD+TB) (26.01 ± 5.39 mg/dL vs 139.55 ± 6.93 mg/dL; $p < 0.05$) en comparación con el grupo OVX que fue alimentado con dieta HFFD más la administración del vehículo (OVX-HFFD+V) (Gráfica 5).

Efecto de la TB sobre la concentración de triglicéridos inducidos por la OVX y la HFFD en suero

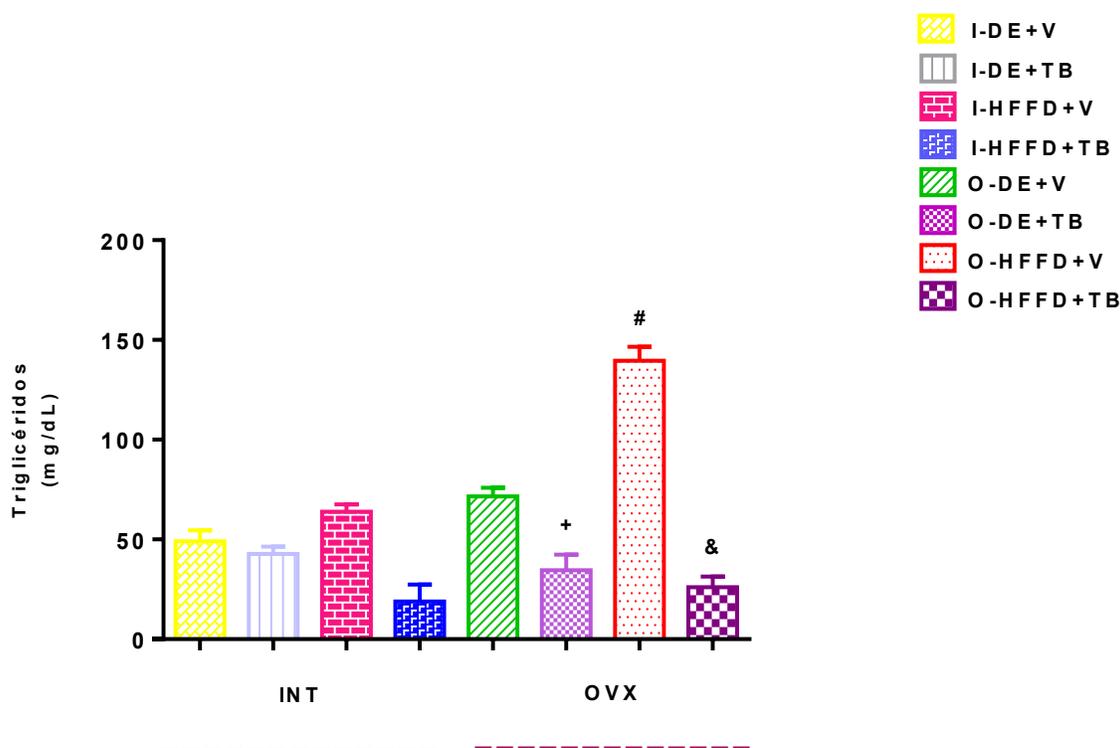


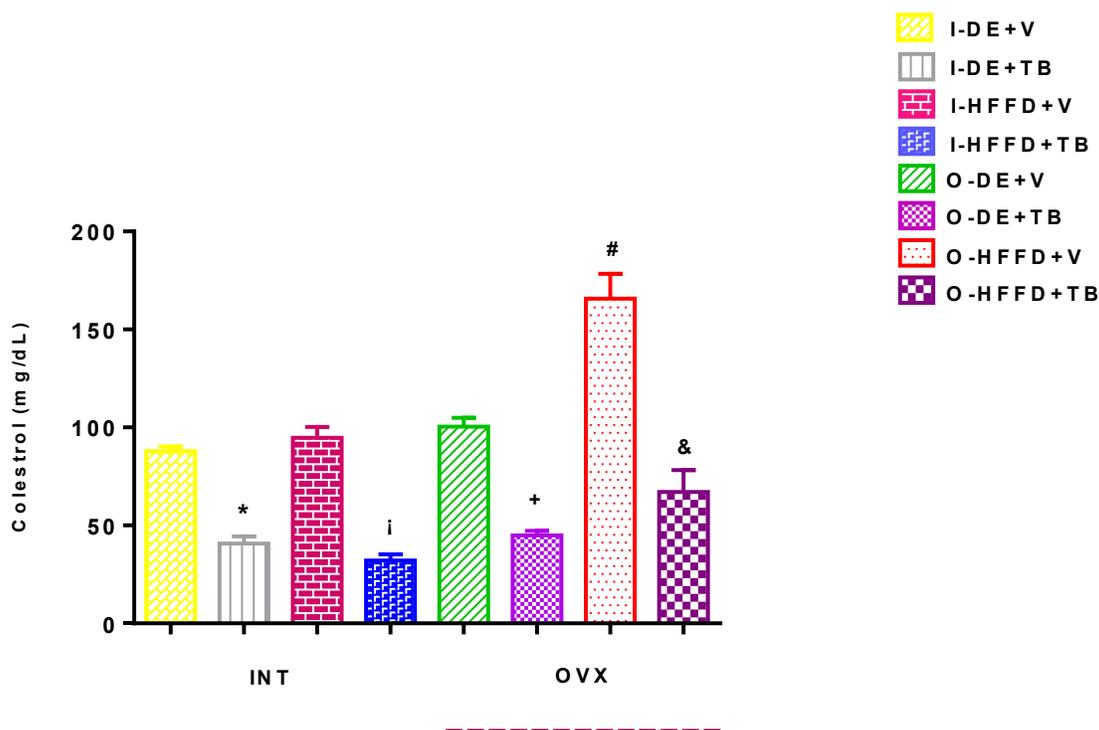
Fig. 5. Efecto de la TB sobre la concentración de TG en suero de animales INT y OVX, alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE (n=10). $^+p < 0.05$ OVX-DE+TB vs OVX-DE+V; $^{\#}p < 0.05$ OVX-HFFD+V vs OVX-DE+V; $^{\&}p < 0.05$ OVX-HFFD+TB vs OVX-HFFD+V. $p < 0.05$, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

El colesterol es un tipo de grasa (lípidos) que se encuentra en la sangre y otras partes del organismo. Diversos estudios han señalado la estrecha relación que existe entre la dieta y el nivel medio de colesterol total del suero. Las poblaciones con alto consumo calórico de grasas saturadas y de colesterol, poseen niveles séricos mucho más altos que las que consumen pocas calorías provenientes de estos compuestos, con respecto a lo anterior, los datos de este estudio no muestran cambios significativos de en los niveles de colesterol en suero de animales intactos que fueron alimentados con HFFD (INT-HFFD+V), ni en los OVX alimentados con dieta estándar (OVX-DE+V) comparados con el grupo control (INT-DE+V). Efecto que en los animales OVX que se les administró HFFD (OVX-HFFD+V) se observó un aumento significativo de las concentraciones de colesterol en suero comparado con su grupo control (OVX-DE+V) (165.8 ± 12.69 mg/dL vs 100.4 ± 4.59 mg/dL; $p < 0.05$) (Gráfica 6)

Adicionalmente los datos muestran que la administración de TB causó una reducción significativa de los niveles de colesterol en suero de animales intactos alimentados con dieta estándar (INT-DE+TB) comparados con el grupo control (INT-DE+V) (40.79 ± 3.54 vs 87.96 ± 2.23 mg/dL; $p < 0.05$), una reducción significativa de los niveles de colesterol en suero de animales intactos alimentados con HFFD (INT-HFFD+TB) en comparación con su grupo control (INT-HFFD+TB) (32.06 ± 3.23 mg/dL vs 94.83 ± 5.35 mg/dL; $p < 0.05$). Asimismo, se percibió un descenso significativo de colesterol en suero de animales OVX que fueron alimentados con dieta estándar y se les dió TB (OVX-DE+TB) (44.96 ± 2.79 mg/dL vs 100.4 ± 4.59 mg/dL; $p < 0.05$) cuando fueron

comparados con su grupo control (OVX-DE+V). Igualmente, se observó una disminución significativa de la concentración de colesterol en suero del grupo OVX con HFFD (OVX-HFFD+TB) comparado con su grupo control (OVX-HFFD+V) (67.93 ± 11.23 mg/dL vs 165.8 ± 12.69 mg/dL; $p < 0.05$) (Gráfica 6).

Efecto de la TB sobre las concentraciones de colesterol inducidos por la OVX y la HFFD en suero



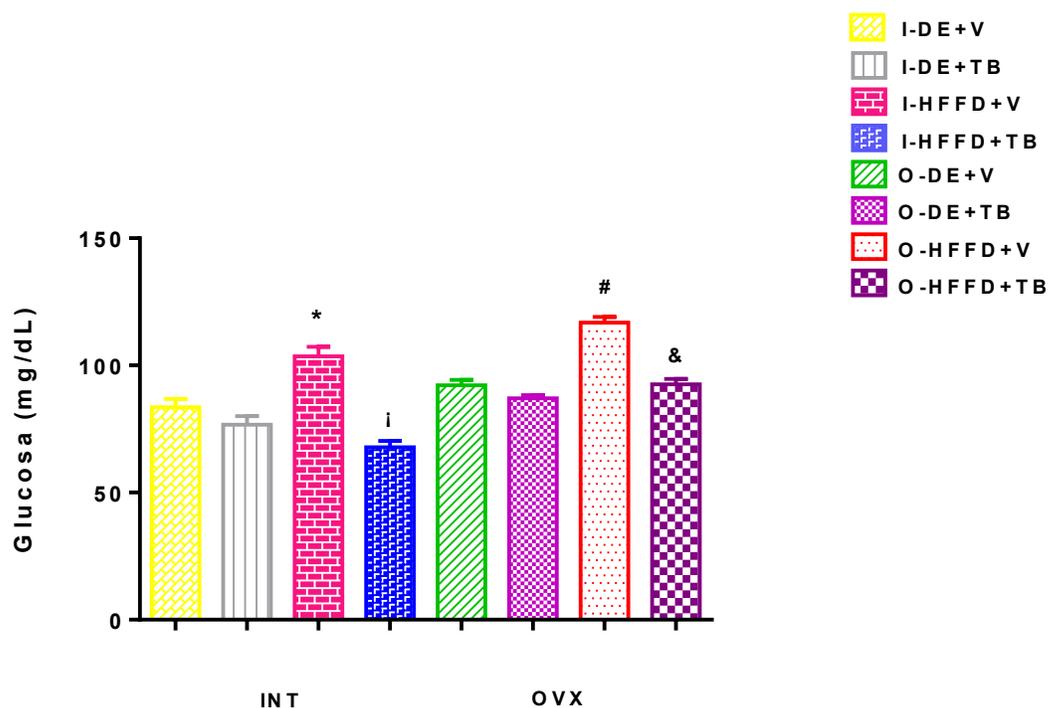
Gráfica 6. Efecto de la TB sobre la concentración de colesterol en suero de animales INT y OVX, alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). (n=10). * $p < 0.05$ INT-DE+TB vs INT-DE+V; $i p < 0.05$ INT-HFFD+TB vs INT-HFFD+V $+ p < 0.05$ OVX-DE+TB vs OVX-DE+V; $\# p < 0.05$ OVX-HFFD+V vs OVX-DE+V; $\& p < 0.05$ OVX-HFFD+TB vs OVX-HFFD+V. $p < 0.05$, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

La hiperglucemia origina cambios químicos y funcionales en las proteínas y ocasiona alteración en la expresión de genes, que han sido identificadas como factor de riesgo para el surgimiento de ECV. Los resultados indican que la HFFD indujo un aumento significativo de los niveles de glucosa en suero de los animales tanto INT como OVX, al ser comparados con sus respectivos grupos controles, (INT-DE+V) para el INT-HFFD+V (103.6 ± 3.75 mg/dL vs 83.57 ± 3.23 mg/dL; $p < 0.05$) y (OVX-DE+V) para el OVX-HFFD+V (116.9 ± 2.20 mg/dL vs 92.17 ± 2.12 mg/dL; $p < 0.05$) (Gráfica 7)

Por otra parte en la gráfica se puede apreciar que la OVX no ocasionó cambios significativos en los niveles de glucosa en el suero de los animales alimentados durante siete días con la dieta estándar (OVX-DE+V) (Gráfica 7).

Adicionalmente, la administración de TB durante siete días, mostró niveles estadísticamente bajos de glucosa en suero de los animales INT y OVX que se alimentaron con HFFD en comparación con sus grupos controles (INT-HFFD+V) para el grupo INT-DE+TB (67.86 ± 2.44 mg/dL vs 103.6 ± 3.75 mg/dL; $p < 0.05$) y (OVX-HFFD+V) para el grupo OVX-HFFD+TB (92.50 ± 2.24 mg/dL vs 116.9 ± 2.20 mg/dL) (Gráfica 7).

Efecto de la TB sobre las concentraciones de glucosa inducidas por la OVX y la HFFD en suero



Gráfica 7. Efecto de la TB sobre las concentraciones de glucosa en suero de animales INT y OVX, alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE (n=10). * $p < 0.05$ INT-HFFD+V vs INT-DE+V; $i_p < 0.05$ INT-HFFD+TB vs INT-HFFD+V; # $p < 0.05$ OVX-HFFD+V vs OVX-DE+V; & $p < 0.05$ OVX-HFFD+TB vs OVX-HFFD+V. $p < 0.05$, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

La sensibilidad a la insulina es la respuesta normal de los tejidos a su acción en tanto que la resistencia a la Insulina es la respuesta biológica disminuida en los tejidos blancos, principalmente músculo, hígado y grasa a los efectos biológicos de esta

hormona, con respecto a lo anterior se optó por medir los niveles de glucosa después de la inyección de un bolo de insulina, los datos muestran que, aunque los niveles de glucosa en el estado basal fueron distintos en los animales INT que consumieron HFFD (*Gráfica7*), después de inyectar el bolo de insulina de 5 U/kg, se observó una disminución notable en los niveles de glucosa en el estado basal de los grupos de animales INT que se alimentaron con DE y con HFFD. I-DE+V + INS (59.43 ± 3.301 mg/dL vs 83.57 ± 3.236 mg/dL, $p<0.05$) comparado con I-DE+V; I-HFFD+V + INS (61.67 ± 7.981 mg/dL vs 103.6 ± 3.754 mg/dL, $p<0.05$) comparada con I-HFFD+V. Respuesta que fue similar en los grupos OVX, O-DE-V + INS (68.00 ± 2.309 mg/dL vs 92.17 ± 2.120 mg/dL, $p<0.05$) al compararla con su control O-DE-V.

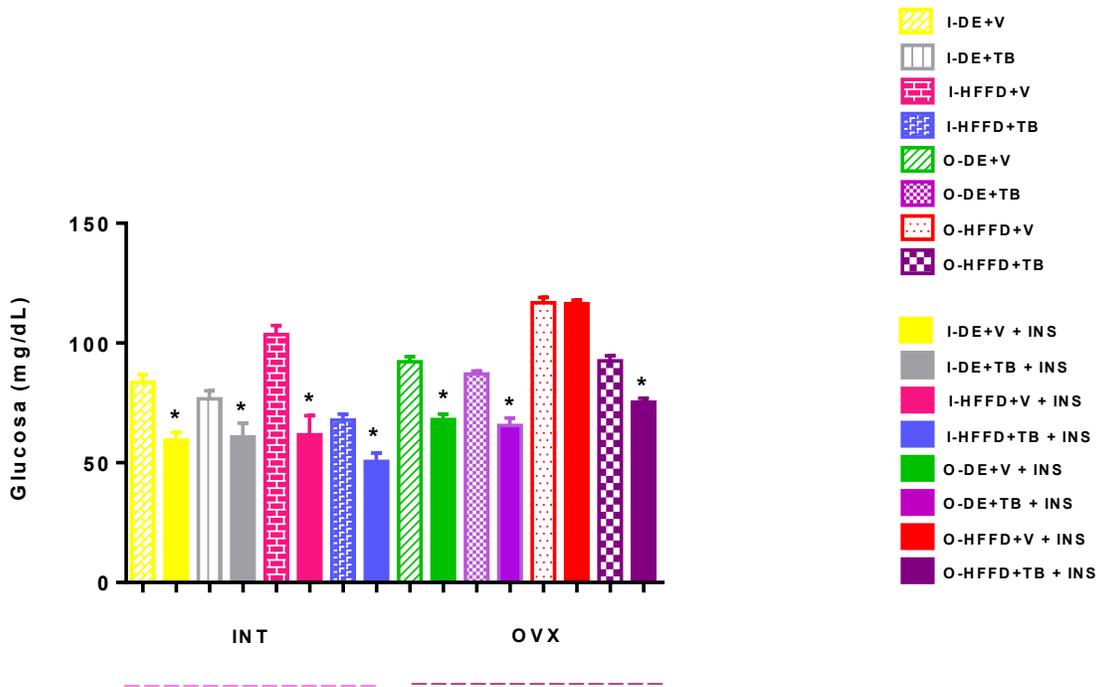
Efecto que también se mostró similar en aquellos grupos INT que recibieron TB: I-DE+TB + INS (60.86 ± 5.750 mg/dL vs 76.71 ± 3.400 mg/dL, $p<0.05$) comparado con I-DE+TB; I-HFFD+TB + INS (50.57 ± 3.463 mg/dL vs 67.86 ± 2.444 mg/dL, $p<0.05$) comparado con I-HFFD+TB y OVX que también recibieron TB: O-DE+TB + INS (65.50 ± 3.213 mg/dL vs 87.00 ± 1.336 mg/dL, $p<0.05$) disminución con respecto a al grupo O-DE+TB y en O-HFFD-TB + INS (75.25 ± 1.698 mg/dL vs 92.50 ± 2.244 mg/dL, $p<0.05$) comparado con su respectivo control O-HFFD-TB (*Gráfica 8*).

Cabe destacar que este resultado no fue estadísticamente significativo en el grupo de animales OVX que se alimentó con HFFD y que recibieron el bolo de insulina (O-HFFD+V + INS) al compararlos con el grupo O-HFFD+V (116.4 ± 1.478 mg/dL vs 116.9 ± 2.209 mg/dL, $p<0.05$), lo cual indica que en estos animales no disminuyó la

glucosa cuando se les dio la insulina, respuesta que muestra claramente que este grupo perdió la sensibilidad a la insulina (*Gráfica 8*).

La glicación consiste en una reacción lenta, no enzimática, de azúcares reductores como glucosa con grupos aminoácidos de una proteína. Los productos resultantes de la glicación se acumulan tanto dentro como fuera de las células y se unen a proteínas de la membrana plasmática, a proteínas circulantes y a proteínas estructurales. Los productos resultantes de la glicación se conocen con el nombre colectivo de productos finales de la glicación avanzada o AGE por su nomenclatura en inglés (Advance Glication End Products) y se acumulan en la matriz extracelular. Los datos evidenciaron que los niveles de los Productos Finales de Glicación Avanzada (AGE's) en suero de los grupos alimentados con HFFD, aumentaron significativamente en los animales INT-HFFD+V (4.08 ± 0.53 UAF vs 2.50 ± 0.21 UAF; $p < 0.05$) comparados con el control INT-DE+V, de la misma manera se observó un aumento significativo de los niveles de AGE's en los animales OVX-HFFD+V (12.32 ± 0.67 UAF vs 6.24 ± 1.16 UAF; $p < 0.05$) en comparación con el grupo OVX-DE+V (*Gráfica 9*).

Efecto de la TB sobre la sensibilidad a la insulina inducida por la OVX y la HFFD en suero

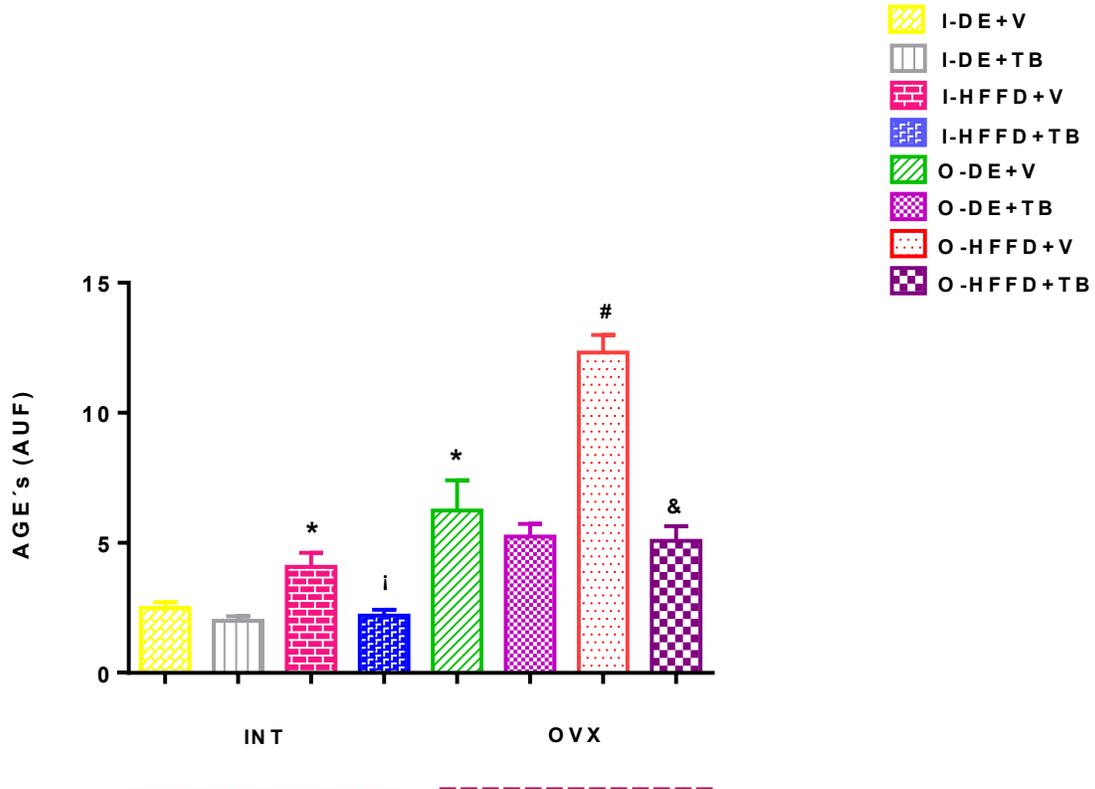


Gráfica 8. Efecto de la TB sobre la sensibilidad a la insulina y los niveles de glucosa en el estado basal, en suero después de la administración de un bolo de insulina de 5U/kg en animales INT y OVX, alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE de diez animales por cada grupo, * $p < 0.05$. T-student.

Nuevamente podemos apreciar en esta gráfica que la OVX no mostró cambios significativos de los niveles de AGE's en el grupo que se alimentó con DE (OVX-DE+V); sin embargo, al administrar la dosis de TB, se se observó que el fármaco es efectivo para atenuar significativamente los niveles de AGE's en suero, tanto de animales INT como OVX, resultados obtenidos al compararlos con sus respectivos grupos controles (INT-HFFD+V) para el grupo INT-HFFD+TB (2.20 ± 0.22 UAF vs 4.08 ± 0.53 UAF; $p < 0.05$) y (OVX-HFFD+V) para el grupo OVX-HFFD+TB (5.08 ± 0.56 UAF vs 12.32 ± 0.67 UAF; $p < 0.05$) (*Gráfica 9*).

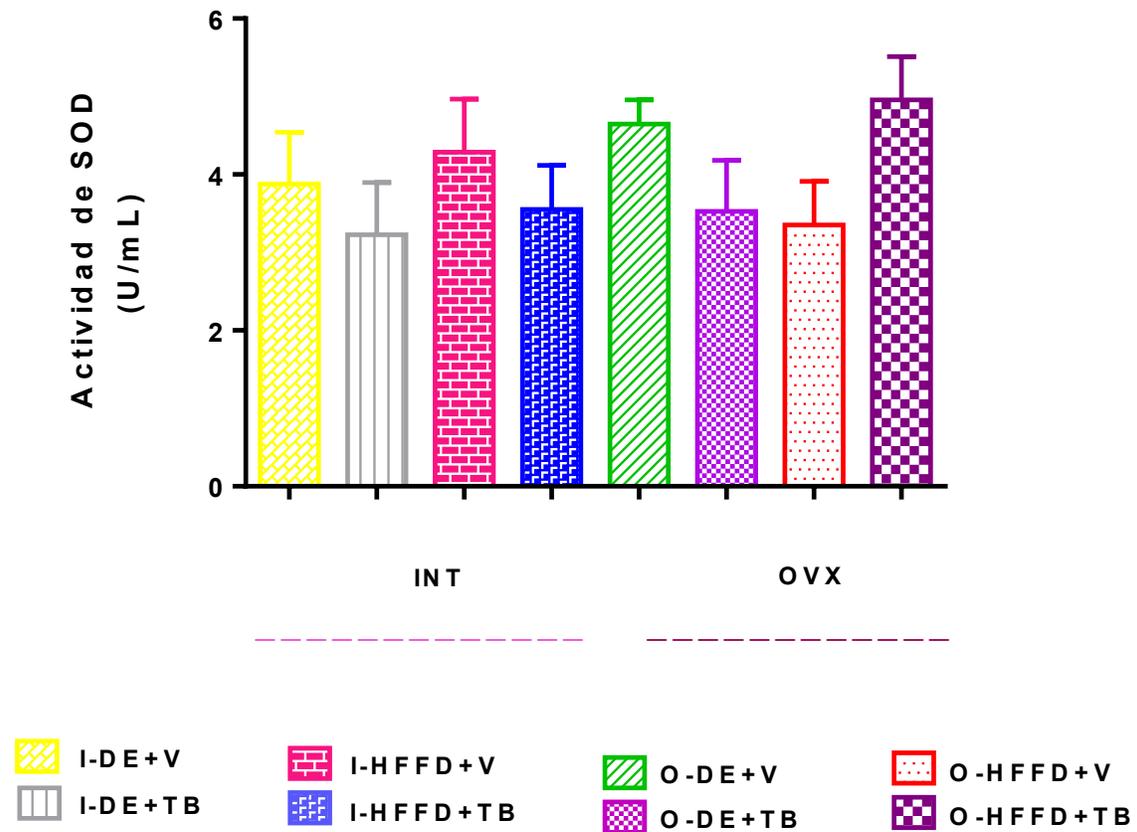
El oportuno control del $O_2\bullet$ representa para la célula el punto neutral en el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, por lo que la SOD juega talvez el papel central en este equilibrio. Un exceso de $O_2\bullet$ genera toxicidad, pero al mismo tiempo, el $O_2\bullet$ y la SOD son generadores del H_2O_2 , el cual tiene funciones muy importantes en la transducción de señales y la activación de genes, por lo que un buen funcionamiento de la SOD asegura un correcto estado redox, que permite una adecuada actividad celular. Con base a lo anterior al determinar los niveles en suero de la SOD en cada uno de los grupos experimentales podemos apreciar que ni la HFFD, ni la OVX, ni la administración de TB por siete días, o causo modificaciones estadísticamente significativas con respecto a la actividad de la Superoxido Dismutasa en ninguno de los grupos de experimentación (*Gráfica10*).

Efecto de la TB sobre las concentraciones de AGE's inducido por la OVX y la HFFD en suero



Gráfica 9. Efecto de la TB sobre los niveles de productos finales de glicación avanzada (AGE's) en animales INT y OVX alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE (n=10). * $p < 0.05$ INT-HFFD+V vs INT-DE+V; $i p < 0.05$ INT-HFFD+TB vs INT-HFFD+V; # $p < 0.05$ OVX-HFFD+V vs OVX-DE+V; & $p < 0.05$ OVX-HFFD+TB vs OVX-HFFD+V. $p < 0.05$, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

Efecto de la TB sobre la actividad de la SOD inducida por la OVX y la HFFD en suero

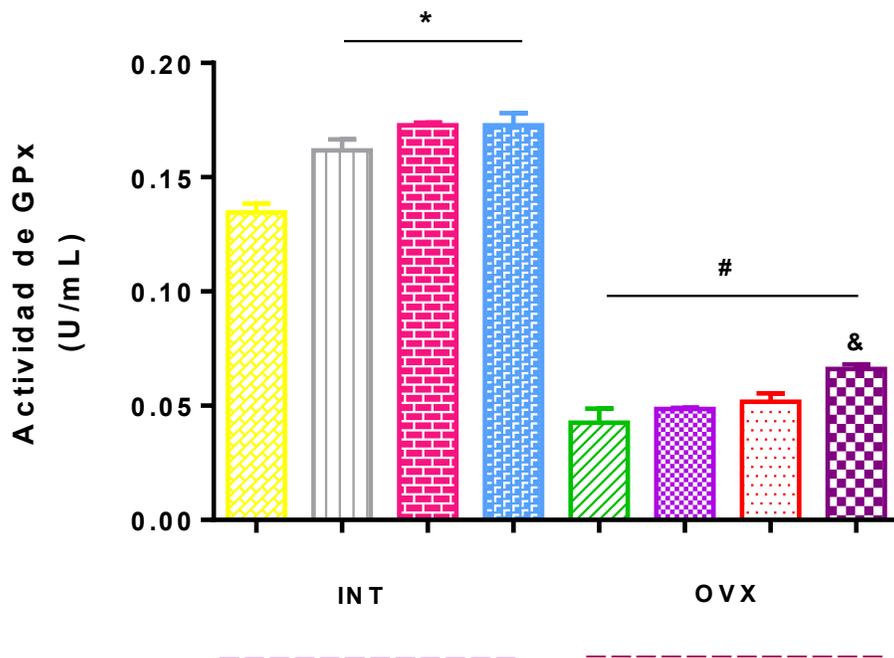


Gráfica 10. Efecto de la OVX, la HFFD y la TB sobre la actividad de la enzima de la Superóxido Dismutasa (SOD) en suero de animales INT y OVX alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE (n=10). $p < 0.05$, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

Las especies reactivas del oxígeno son moléculas capaces de provocar daños importantes en órganos y tejidos. Para combatirlas el organismo presenta medios de defensa entre los que se encuentra el sistema de glutatión peroxidasa/glutatión reductasa. La glutatión peroxidasa es una enzima que juega un papel central en los procesos celulares de óxido-reducción, es un importante mecanismo de defensa celular contra las formas de oxígeno altamente reactivas (radicales libres) que se producen en el organismo durante el metabolismo aerobio habitual. Al analizar la actividad de esta enzima en el suero de los animales INT los datos animales INT que se alimentaron con la HFFD incrementó significativamente la actividad de la GPx comparados con el grupo control (0.17 ± 0.001 U/mL vs 0.13 ± 0.001 U/mL). Sin embargo la GPx fue afectada por la OVX, ya que esta condición decreció significativamente la actividad de la enzima en todos los grupos OVX, independientemente de la alimentación con HFFD y/o con la administración de TB, al ser comparadas con el grupo control de los animales INT (0.025 ± 0.003 U/dL vs 0.134 ± 0.001 U/dL). Mientras que en los animales OVX la HFFD no modificó significativamente la actividad de la GPx cuando se comparó con el grupo OVX que fue alimentado con dieta estándar.

En resumen solo los animales OVX que recibieron TB y se alimentaron con HFFD (OVX-HFFD+TB) incrementaron la actividad de la GPx, comparados con el grupo OVX-HFFD+V (0.07 ± 0.001 U/mL vs 0.05 ± 0.001 U/mL) (*Gráfica 11*)

Efecto de la TB sobre la actividad de la GPx inducido por la OVX y la HFFD en suero



Gráfica 11. Efecto de la TB sobre la actividad de la enzima Glutación Peroxidasa (GPx) en suero de animales INT y OVX alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE (n=10). * $p < 0.05$ INT-DE+TB, INT-HFFD+V, INT-HFFD+TB vs INT-DE+V; # $p < 0.05$ los grupos OVX vs respectivos grupos INT; & $p < 0.05$ OVX-HFFD+V vs OVX-HFFD+TB. $p < 0.05$, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

La GR es una enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa para la reducción del peróxido y de lipoperóxidos, los cuales son especies reactivas del oxígeno. Esta enzima juega un importante papel en la defensa antioxidante y debido a su presencia en los diferentes tejidos y órganos está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades. Por tal motivo al medir la actividad de dicha enzima podemos apreciar que ni la HFFD, ni la administración de TB por siete días, no causo modificaciones estadísticamente significativas de la actividad de la GR en ninguno de los grupos de animales INT. Efecto que se apreció igual en el grupo OVX-DE+V.

Sin embargo, en los animales OVX que fueron tanto alimentados con HFFD y a los que además e la HFFD se les dio TB, se apreció que siete días fueron suficientes para elevar significativamente la actividad de la enzima GR (0.21 ± 0.01 U/mL vs 0.08 ± 0.01 U/mL; $p < 0.05$) cuando se comparó con el grupo OVX que se alimentó durante el mismo periodo, pero con dieta estándar (OVX-DE+V) (*Gráfica 12*)

Efecto de la TB sobre la actividad de la GR inducido por la OVX y la HFFD en suero

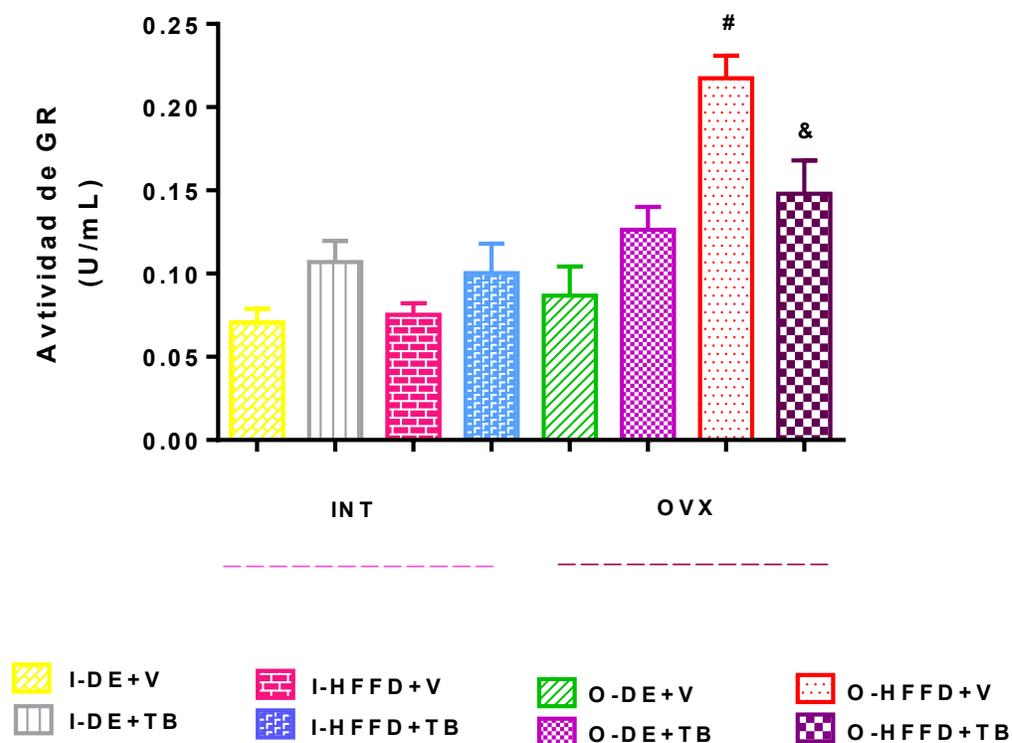


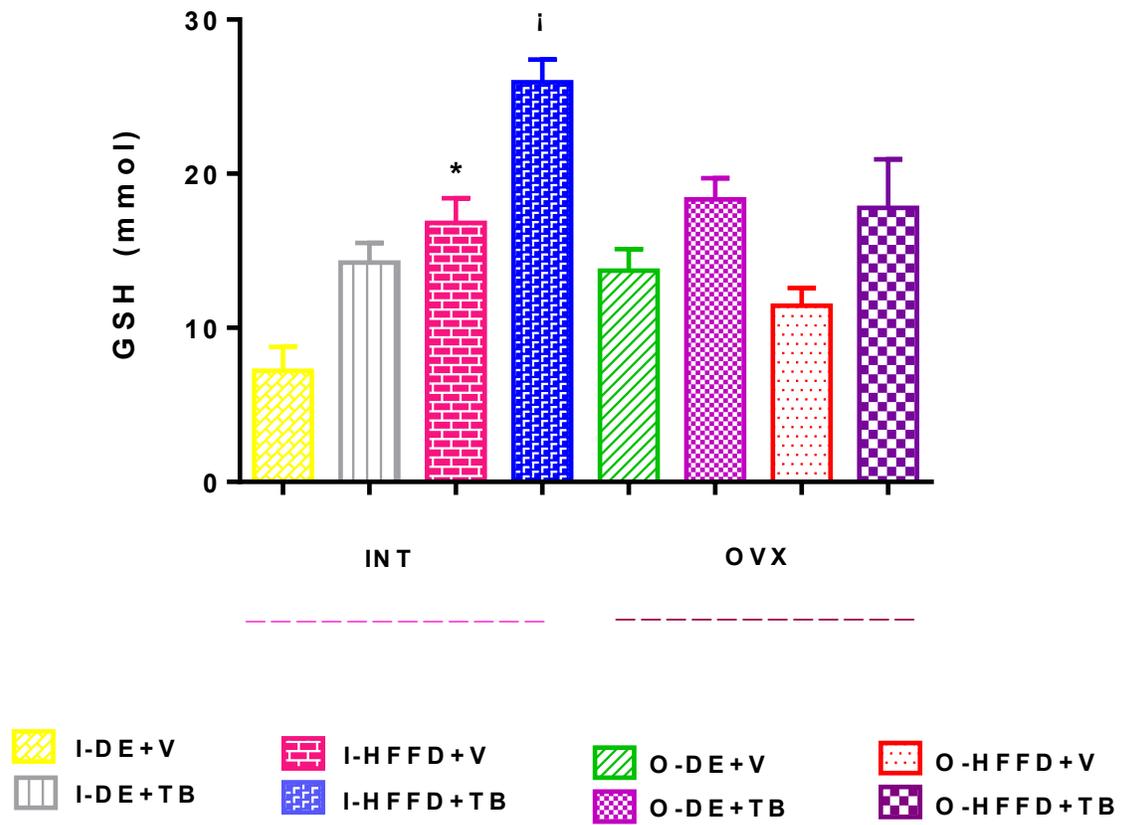
Figura. 12. Efecto de la TB sobre la actividad de la enzima Glutathión Reductasa (GR) en animales INT y OVX alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE (n=10).[#]p<0.05 OVX-HFFD+V vs OVX-DE+V; [&]p<0.05 OVX-HFFD+TB vs OVX-HFFD+V. p<0.05, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

El glutati3n es un antioxidante end3geno que protege a las c3lulas del da1o oxidativo y de la peroxidaci3n. La proporci3n de GHS respecto a la de glutati3n oxidado dentro de las c3lulas se utiliza a menudo cientificamente como una medida de toxicidad celular. Raz3n por la cual en el presente trabajo se decidi3 medir los niveles de GSH en el suero de las ratas. Los resultados muestran un aumento significativo de la concentraci3n de GHS en el grupo de animales INT que ingirieron la HFFD durante siete d3as (INT-HFFD+V) en comparaci3n con el grupo que solo se aliment3 con la dieta est3ndar (INT-DE+V) (16.61 ± 1.61 mmol vs 7.20 ± 1.56 mmol; $p < 0.05$).

Por otro lado se hizo notar que con el tratamiento con TB agrand3 la concentraci3n de GHS en los animales INT que comieron HFFD (INT-HFFD+TB) en comparaci3n con los que de igual manera comieron HFFD, pero que se les administr3 el veh3culo (25.94 ± 1.47 mmol vs 15.52 ± 1.84 mmol; $p < 0.05$) (*Gr3fica 13*).

Finalmente podemos notar que la OVX por si sola, ni en combinaci3n con la HFFD o con el tratamiento con TB por siete d3as modifico de forma estadística la concentraci3n de GHS (*Gr3fica 13*).

Efecto de la TB sobre la concentración de GSH inducido por la OVX y la HFFD en suero



Gráfica 13. Efecto de la TB sobre la concentración de Glutación Reducido (GSH) en animales INT y OVX alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE (n=10). * $p < 0.05$ INT-HFFD+V vs INT-DE+V; $i p < 0.05$ INT-HFFD+TB vs INT-HFFD+V. $p < 0.05$, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

La oxidación enzimática del GSH se produce como producto de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx). El GSSG obtenido durante el curso de la reacción de la GPx, es reciclado a GSH por la GR, que utiliza NADPH, proveniente de la vía pentosa fosfato como dador de electrones manteniendo así la proporción GSH/GSSG. De modo que en este trabajo se determinó medir los niveles de GSSG.

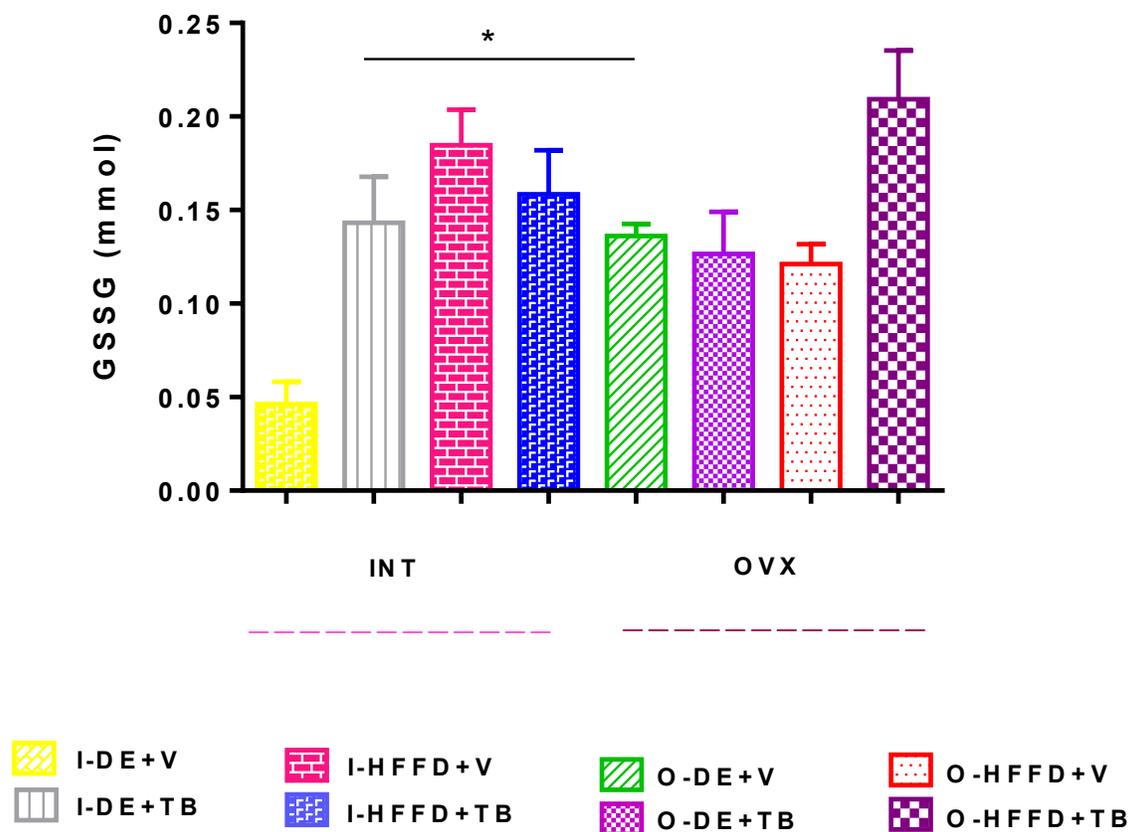
En la gráfica podemos apreciar que en los animales INT la HFFD (0.18 ± 0.01 mmol vs 0.04 ± 0.01 mmol) elevó significativamente las concentraciones de GSSG en comparación con el grupo que se alimentó con dieta estándar (INT-DE+V).

Mientras en los animales OVX, de misma forma se observó que esta condición elevó la concentración de GSSG en este grupo en comparación con el grupo control (0.13 ± 0.006 mmol vs 0.04 ± 0.01 mmol). Además, los datos mostraron que la TB también incremento las concentraciones de GSSG tanto en los animales INT que se alimentaron con DE (0.14 ± 0.02 mmol vs 0.04 ± 0.01 mmol) y en aquellos se alimentaron con HFFD (0.15 ± 0.02 mmol vs 0.18 ± 0.01 mmol).

Finalmente, en la gráfica se observó que ni la HFFD ni la TB cambiaron significativamente las concentraciones de GSSG en ninguno de los animales ovariectomizados (*Gráfica 14*)

Efecto de la TB sobre la concentración de GSSG inducido por la OVX y la HFFD

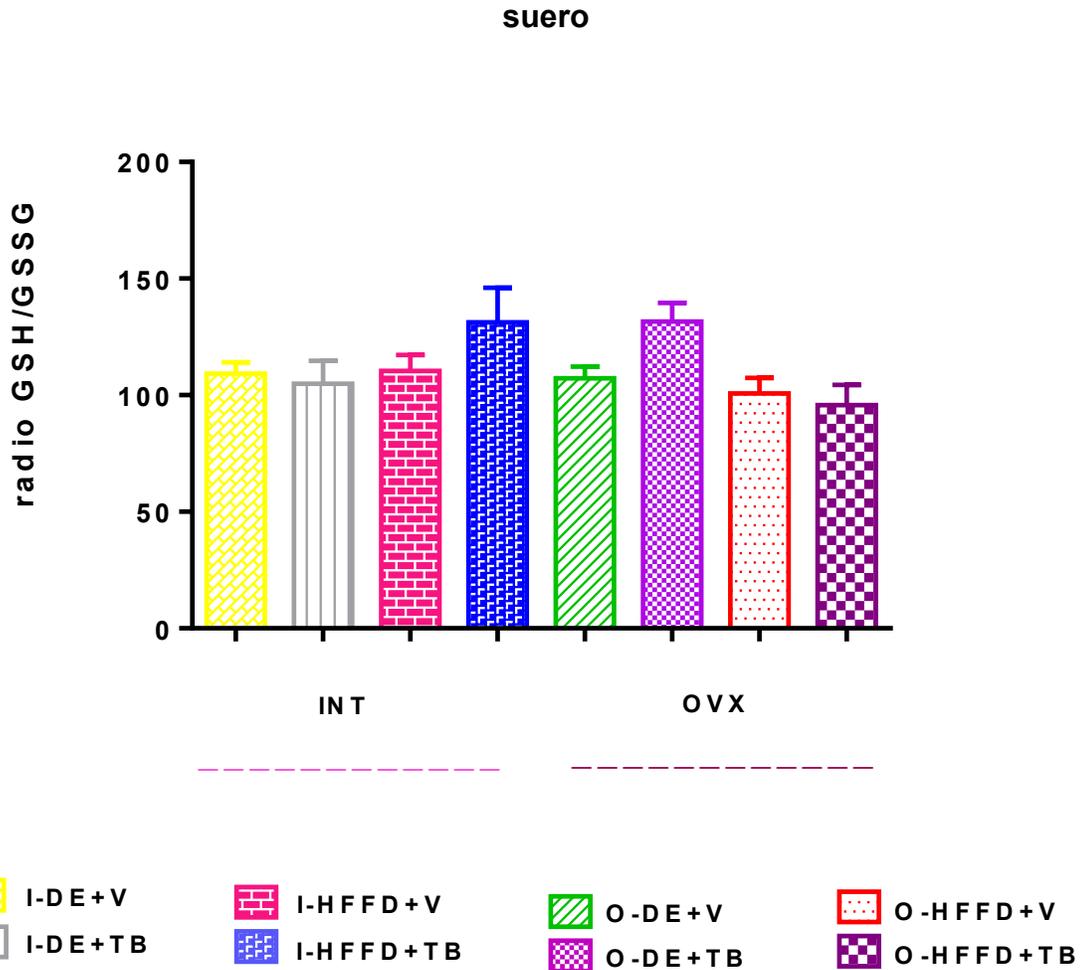
en suero



Gráfica 14. Efecto de TB sobre la concentración de Glutación Reducido (GSSG) en animales INT y OVX alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE (n=10). *p < 0.05 vs INT-DE+TB, INT-HFFD+V INT-HFFD+TB, OVX+DE+V vs INT+DE+V. p < 0.05, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

Las concentraciones de GSH, GSSG y GSH/GSSG son indicadores de la función celular y su alteración está asociada con varios procesos de enfermedad en humanos y en animales, ya que con el estrés oxidante se acumula GSSG y disminuye la relación GSH/GSSG, lo que indica cambios en el estado redox, que afectan el balance de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Analizada esta relación en el suero de los animales de este estudio, los resultados muestran que ni la HFFD, ni OVX, ni mucho menos la TB causó modificaciones significativas en la relación GSH/GSSG en ninguno de los grupos experimentales (*Gráfica 15*).

Efecto de la TB sobre el radio GHS/GSSG inducido por la OVX y la HFFD en



Gráfica 15. Efecto de la TB sobre el radio GHS/GSSG en suero de animales INT y OVX alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE(n=10)., $p < 0.05$, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

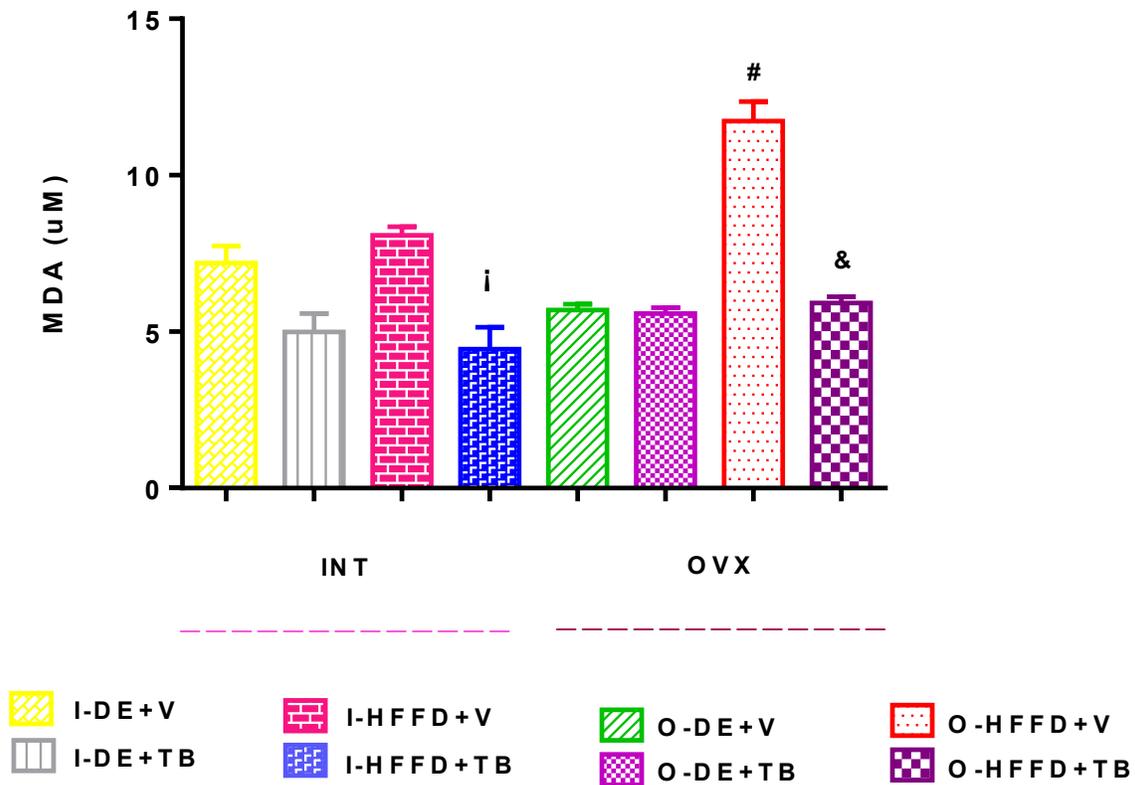
El estrés oxidante se ha implicado en la patogénesis del envejecimiento y la deficiencia de estrógenos, y puede surgir a través del aumento de la producción de peróxidos de lípidos, manifestándose en la generación de un metabolito final, malondialdehído (MDA), que indica la presencia de radicales libres y cuya concentración es directamente proporcional al daño en el organismo.

Con los datos obtenidos se mostró que en la HFFD aumento significativamente las concentraciones de MDA en comparación con el grupo que se alimentó con la DE durante siete días, tanto en los animales INT ($0.08 \pm 0.27 \mu\text{M}$ vs $5.69 \pm 0.18 \mu\text{M}$; $p < 0.05$) como OVX ($11.73 \pm 0.62 \mu\text{M}$ vs $7.19 \pm 0.54 \mu\text{M}$; $p < 0.05$), comparados con sus respectivos grupos controles.

Por otro lado se evidenció que la OVX por sí sola, después de siete días, no causó cambios estadísticamente significativos en cuanto a la formación de productos de lipoperoxidación como el MDA, con respecto a la formación de MDA, se observó que el tratamiento con TB durante siete días fue suficiente para decrecer significativamente la concentración de este producto en los animales INT ($4.44 \pm 0.69 \mu\text{M}$ vs $8.08 \pm 0.27 \mu\text{M}$; $p < 0.05$), y OVX ($5.91 \pm 0.20 \mu\text{M}$ vs $2.84 \pm 0.23 \mu\text{M}$; $p < 0.05$) que fueron alimentados con HFFD durante el mismo tiempo datos comparados con sus respectivos controles (*Gráfica 16*).

Efecto de la TB sobre la concentración de MDA inducido por la OVX y la HFFD

en suero



Gráfica 16. Efecto de la TB sobre la concentración de MDA en animales INT y OVX alimentados con dieta estándar (DE) y dieta alta en fructosa y grasa, *por sus siglas en inglés* (HFFD). Las barras representan la media \pm EE (n=10).ⁱp <0.05 INT-HFFD+TB vs INT-HFFD+V; [#]p<0.05 OVX-HFFD+V vs OVX-DE+V; [&]p<0.05 OVX-HFFD+TB vs OVX-HFFD+V. p<0.05, ANOVA, *Pos hoc de Tukey*.

12. DISCUSIÓN

Con el modelo experimental propuesto en el presente trabajo notamos que la HFFD presento un incremento significativo en el consumo de alimento sólido y líquido durante los 7 días. Manifestandose hiperfagia, incremento de peso y menor sensibilidad a la insulina (Calvo-Ochoa, *et al*, 2014), efecto que se ve reflejado en un aumento de la ingesta calórica y una significativa ganancia de peso corporal, tanto en animales INT como en OVX. Los resultados obtenidos en los los grupos OVX mostraron que, aunque se observó una tendencia a incrementar los efectos antes mencionados, este incremento no fue estadísticamente significativo, respuesta que puede ser comparable a lo descrito en trabajos anteriores, donde informan que el agotamiento de estrógenos endógenos inducido por OVX aumenta la ingesta de alimentos, la ingesta calórica y peso corporal durante los primeros 18 días después de la OVX (Wu *et al.*, 2016), razón por la cual es probable que a los siete días nosotros aun no apreciamos cambios significativos con respecto a estos parámetros, dicha respuesta sugiere que la ganancia rápida de peso en los primeros 18 días después de la extirpación de los ovarios parece ser el resultado del aumento de la ingesta calórica dada por la administración de la HFFD y a la redistribución del tejido adiposo, una posible explicación a este echo sería el papel que juega el hipotálamo al ser una región cerebral encargado de la coordinación del consumo de alimento, peso corporal y la homeostasis en el gasto energético (Kim *et al.*, 2011), otro mecanismo sugerido es que los estrógenos directa e indirectamente modulan la actividad de moléculas involucradas en el aumento de la ingesta alimentaria (Hart-

Unger *et al.*, 2011), debido a que los receptores estrogénicos están presentes en el tejido adiposo, ya que se ha demostrado que la ausencia del RE- α produce una hiperplasia e hipertrofia del adipocito en tejido adiposo blanco pero no en tejido adiposo marrón y es acompañada por una RI e intolerancia a la glucosa (Ropero *et al.*, 2008), indicando que estos receptores son capaces de regular funciones en este tejido (Acosta-García *et al.*, 2012), el RE- α predominantemente regula la homeostasis vía crecimiento y proliferación de adipocitos y RE- β regula la distribución sexo específico del tejido adiposo, teniendo así, que el cese en la secreción de estrógenos gonadales, con el consiguiente desbalance andrógenos/estrógenos, favorece el depósito graso abdominal con aumento de la grasa visceral (Milewicz *et al.*, 2001; Feigelson *et al.* 2004) en ese sentido se ha reportado que en animales adultos (ratones y hámster) ovariectomizados (Beato *et al.*, 1996; Demir *et al.* 2008) esta deficiencia esta relaciona con la ganancia de peso corporal y el desarrollo de obesidad, respuesta que se ha relacionado, a que parte de las funciones de los estrógenos es regular la composición corporal, el balance energético, regular la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina en mujeres y hombres (Guthrie *et al.*, 2004). El peso corporal se incrementa con varias condiciones asociadas a la deficiencia estrogénica como son ovariectomía, síndrome de ovario poliquístico o la falta de funcionalidad de la aromatasa o por alteraciones en su gen, y todos pueden ser corregidos por tratamiento con E₂ (Pedersen *et al.*, 1992).

En cuanto a los parámetros metabólicos, los resultados mostraron un aumento significativo en la concentración de colesterol y triglicéridos en animales OVX después de siete días de HFFD. Este efecto fue disminuido por la administración de TB, tal y como lo mencionan estudios clínicos en mujeres posmenopáusicas, donde se ha demostrado que la administración de TB durante 20 semanas mejoró los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos (Villanueva *et al.*, 1999; Henriques *et al.*, 2010), lo que indica con nuestros resultados la TB puede reducir estos parámetros en un período más corto. Respuesta que puede ser dada por un efecto androgénico por parte del Delta 4-isómero de TB sobre la lipasa hepática (Kloosterboer *et al.*, 2001), enzima encargada de hidrolizar los lípidos de las lipoproteínas remanentes y las lipoproteínas de alta densidad, por lo tanto promueve la degradación del colesterol (Cedó *et al.*, 2017).

Otro parámetro que se analizó en este trabajo fue la cantidad de glucosa en sangre en ayunas, ya que se ha demostrado que con altos niveles de glucosa (hiperglucemia), las biomoléculas se someten a una reacción de glicación, es decir, los azúcares reductores reaccionan de una manera no enzimática principalmente con grupos amino que pertenecen a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que conduce a la formación de una serie de compuestos complejos conocidos como AGEs (Díaz-Casasola *et al.*, 2016) y en consecuencia, esto resulta en el daño de las funciones biológicas de macromoléculas ocasionando modificaciones en su conformación estructural.

Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de glucosa basal después de siete días de alimentación con HFFD en los animales OVX, tal y como se reporta en diversos estudios, donde el uso de dietas ricas en grasas saturadas y carbohidratos están asociadas con intolerancia a la glucosa, efecto presentado once semanas después del uso de la dieta, lo que indica que nuestro modelo experimental fue adecuado para inducir hiperglucemia a corto plazo (Liu *et al.*, 2001). Sin embargo, después de inyectar un bolo de insulina, se observó una disminución notable en los niveles de glucosa en la sangre en animales cada uno de los grupos INT alimentados con DE y HFFD, pero no en los OVX con HFFD, lo que indica el menor sensibilidad a la insulina sistémica en el grupo de animales O-HFFD+V. Respuesta que es consistente a lo ya reportado donde se indica que el consumo crónico de dietas altas en grasas saturadas y en azúcares procesados (alto contenido de grasa y fructosa), particularmente alta en fructosa, está fuertemente asociada con una variedad de enfermedades metabólicas, incluyendo, obesidad, resistencia a la insulina sistémica y SM (Wang *et al.*, 2001) efecto que en nuestro modelo ocurrió a un tiempo más corto, tal y como lo había demostrado un estudio previo, donde se evidenció que siete días de alimentación con HFFD son suficientes para ocasionar menor sensibilidad a la insulina sistémica (Wang *et al.*, 2001; Samuel *et al.*, 2004; Calvo-Ochoa *et al.*, 2014)

Por otra parte en nuestro estudio se observó que los animales que recibieron TB durante el mismo tiempo (siete días) tuvieron una disminución de los niveles de glucosa en ayunas, respuesta semejante a lo reportado en informes anteriores,

donde el empleo de 17-beta estradiol (tiempo más prolongado) (Cagnacci *et al.*, 1992) y el uso de TB (2.5 mg/kg/día, por tres meses) mostraron una respuesta similar, debido a que no se encontró efecto negativo sobre el metabolismo de la glucosa (Cagnacci A *et al.*, 1996). Como lo observamos en el presente trabajo que el uso TB durante un menor tiempo, redujo la hiperglucemia.

Si bien se desconocen los mecanismos de estos efectos, se sabe que los estrógenos estimulan el transporte de glucosa en diversos órganos diana al alterar la expresión de genes que codifican proteínas y enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa (Shinkarenko *et al.*, 1992). Al afectar la expresión de los genes de los transportadores de glucosa, los estrógenos son capaces de alterar su transporte y metabolismo, lo que lleva a un metabolismo anormal de la glucosa y que podría ser asociado al desarrollo de la obesidad (Brennan *et al.*, 2004), sin embargo la respuesta obtenida por el uso de TB puede deberse a que los progestágenos reducen la sensibilidad a la insulina periférica, ya que se ha reportado que es posible que el efecto progestagénico se ejerza principalmente en tejidos, como el endometrio o el hígado, donde la TB se metaboliza localmente en potentes derivados progestágenos (Elkind-Hirsch *et al.*, 1993). En los tejidos periféricos que carecen de esta capacidad, la TB puede actuar predominantemente como un estrógeno (Tang *et al.*, 1993). De hecho, la administración de 0.625 mg/día de estrógenos conjugados (como la TB) a mujeres posmenopáusicas disminuye los niveles de glucosa en ayunas y mejora la sensibilidad a la insulina en el tejido periférico (Lindheim *et al.*, 1993), tal y como se mostró en nuestro estudio.

Por lo tanto, en cuanto a la formación de AGE's, los resultados mostraron una relación directa de las concentraciones de glucosa con respecto a los niveles de estos productos de glicación. Donde se muestra que la alimentación durante siete días con la HFFD se relacionó con las altas concentraciones de AGE's, respuesta que coincidió con estudios previos, donde se reporta que el uso de azúcares, como la fructosa, promueve el aumento de la formación AGE's a tiempos más agudos (Aragno and Mastrocola 2017), y contribuye a la lesión tisular mediante la activación de RAGE (receptor para AGE), generación de ERO y aumento de la producción de IL-6 que empeora progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Merhi *et al.*, 2014).

Por otro lado mostró que el uso de TB de forma aguda disminuyó los niveles de AGE's en los mismos grupos experimentales que tuvieron alza de glucosa, consecuencia que podría estar asociada con la actividad estrogénica del fármaco, ya que, *in vitro* indicaron que el tratamiento con estradiol (principalmente a través del RE- α) por seis meses inhibió la síntesis de AGE's en el epitelio vaginal de mujeres posmenopáusicas (Jackson *et al.*, 2009), lo que sugieren un posible papel antiinflamatorio y protector de la TB en la mujer posmenopáusicas.

Debido a que uno de los propósitos de este estudio fue analizar el papel del estrés oxidante en nuestro modelo y con base a, que éste se puede detectar midiendo la actividad de las enzimas antioxidantes (Jarukamjorn *et al.*, 2016). Al analizar la actividad de las enzimas antioxidantes en cada uno de los grupos tratados, no se observaron cambios significativos en la actividad de SOD en ninguno de los grupos,

lo que sugiere que esta enzima puede mantener su actividad independientemente del tratamiento (HFFD o TB). Por el contrario, la actividad de GPx se vio afectada por OVX y HFFD. Ambas condiciones produjeron una disminución significativa en la actividad de esta enzima, reacción que está asociada con la acumulación de H₂O₂, compuesto que puede reaccionar con el anión OH⁻ (reacción de Fenton), y dañar a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular, efecto que se deduce al encontrar aumentando la concentración de productos de la per oxidación lipídica como el MDA (Guerra *et al.*, 2014).

El glutatión, un agente fisiológico con gran capacidad antioxidante, esto lo convierte en una de las sustancias orgánicas más importantes presentes en el cuerpo humano, ya que los cambios de concentración de GSH en sangre podrían dar una medida del estrés oxidativo in vivo (Viña *et al.*, 1989). La importancia de sus funciones dentro de los sistemas biológicos ha dado lugar a la existencia de un sistema GSH que incluye además enzimas relacionadas con su metabolismo, responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister *et al.*, 1988). En sujetos sanos, los niveles de glutatión en sangre han demostrado ser importantes en el control del desarrollo de radicales libres (Cross *et al.*, 1987).

Al analizar los valores de GSSG, en los resultados se observaron valores mayores de este compuesto en los grupos de animales INT, principalmente en aquellos que consumieron la HFFD, respuesta que pudo ser dada al EO, el cual se caracteriza por un aumento de la susceptibilidad del organismo al daño oxidativo tras la ingesta de alimento rico en grasas y/o hidratos de carbono. Por lo tanto los macronutrientes

pueden tener un efecto en el balance redox del organismo siendo blanco de modificaciones oxidativas tras su absorción o presentándose en forma de pro-oxidantes en la dieta (Bowen *et al.*, 2004), lo que conduce a la acumulación del glutatión en su forma oxidada (GSSG) y a la afectación el equilibrio de proliferación, diferenciación y muerte celular (Ye *et al.*, 2015). Respuesta que fue inversa en cuanto a los niveles de GSH, ya que se encontró que el glutatión en su forma reducida (GSH) en la circulación, se vio favorecido, y se constató con los valores de la relación GSH/GSSG, debido a que estos no evidenciaron cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales. La determinación de la relación GSH/GSSG plasmática reflejaría los cambios que aparentemente ocurren en los tejidos extra hepáticos. Consecuencia que puedo ser dada a como se ha demostrado anteriormente, donde la presencia de insuficiente cantidades de GSH desencadena la síntesis de Novo de GSH. Este tipo de síntesis se lleva a cabo a partir de los precursores del GSH y no por transformación a partir del GSSG. La finalidad de este mecanismo es restablecer los valores de GSH (Ji-Young *et al.*, 2015). Otra posible explicación podría ser el envío de GSH de los glóbulos rojos, que tienen un poderoso sistema de recuperación debido a la agresión oxidativa permanente de la molécula de oxígeno que debe ser transportado por la hemoglobina (Di Toro *et al.*, 2003). En el presente estudio, proporcionamos evidencia de que OVX en ratas condujo a un aumento temprano (después de siete días) en los parámetros de estrés oxidante: disminución de la relación GSH/GSSG, así como depleción de la actividad de enzimas antioxidantes en suero. Estas observaciones son consistentes con varios estudios en los que correlación entre el agotamiento de estrógenos endógenos y el

aumento de los niveles de estrés oxidativo en las mujeres posmenopáusicas (Cisneros *et al.*, 2011; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012; Bloch-Damti *et al.*, 2005; Dilek *et al.*, 2010), además se ha encontrado una relación decreciente de GSH/GSSG en la sangre, de ratas ovariectomizadas (Bloch-Damti *et al.*, 2005) y de mujeres posmenopáusicas (Cisneros *et al.*, 2011).

Además, el equilibrio de las vías NAD y NADP está involucrado en el mantenimiento del estado redox celular (Patki *et al.*, 2103). Aparentemente, es posible que HFFD y TB puedan afectar este equilibrio. Sin embargo, se requerirá más investigación para verificar esta hipótesis.

El estrés oxidativo ha sido implicado en la patogénesis del envejecimiento y la deficiencia de estrógenos, ambos puede surgir a través del aumento de la producción de peróxidos lipídicos.

La destrucción y la degradación de estos productos genera un metabolito final, MDA, que indica la presencia de radicales libres y cuya concentración es directamente proporcional al daño en el organismo (Baynes *et al.*, 1991; Blacker *et al.*, 2016). En la presente investigación, se observó elevados niveles séricos de MDA en ratas INT y OVX ambas alimentadas con HFFD. Estos hallazgos indican que la oxidación de lípidos aumentó posiblemente debido al estrés oxidativo generado por el consumo de la HFFD, lo que sugiere que el agotamiento de estradiol (OVX) más HFFD aumentó las especies reactivas de oxígeno, las cuales oxidan a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular y favorecen estrés oxidante (Guerra *et al.*,

2014). Nuestros resultados mostraron un aumento significativo de casi el 100% en la concentración de MDA en los animales INT-HFFD+V en comparación con el grupo de control.

Los resultados concuerdan con los estudios previos, en los que HFFD produjo obesidad, aumento de la per oxidación lipídica, y condujo a incremento en los depósitos de grasa (Nielsen *et al.*, 1997). Por el contrario, no se observaron cambios significativos en los niveles de MDA en otros estudios. Sin embargo, es importante enfatizar que en estos estudios el tiempo de alimentación fue más largo (seis meses) y la composición de la dieta era diferente, lo que indica que el tipo de dieta, así como el tiempo de alimentación es importante para inducir cambios en los marcadores de estrés oxidativo como el MDA (Coelho *et al.*, 2011)

Algunos informes indican que los niveles séricos de peróxidos lipídicos aumentan en mujeres y en modelos experimental en ratones después de una ooforectomía bilateral, que apoya un posible papel antioxidante de las hormonas (Wu *et al.*, 2016). Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados ya que un aumento fue observado en animales OVX alimentados con HFFD (Bellanti *et al.*, 2013).

Finalmente con los resultados obtenidos en este estudio se demostró que la administración de TB disminuyó significativamente la concentración de MDA, lo que sugiere que esta hormona puede proteger contra la oxidación de los lípidos, similar a los estrógenos, como se informó en un estudio anterior donde la TB disminuyó la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas en ratas expuestas al ozono (Pinto-

Almazán *et al.*, 2014), efecto observado a un tiempo más prolongado, respuesta que puede deberse a la actividad estrogénica de TB. Los estrógenos ejercen su actividad antioxidante a través de la donación de átomos de hidrógeno, el drenaje del grupo hidroxilo del anillo fenólico a los lípidos radicales peroxilo, así como a otros radicales perjudiciales (Yagi *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha reportado que, casi todos los metabolitos sulfatados muestran actividad antioxidante; el más fuerte es el 3b-17b-disulfatado-tibolona (Ruiz-Larrea *et al.*, 2000). Este metabolito muestra una actividad comparable con el compuesto de referencia, estradiol, siendo más abundante en mujeres tratadas con tibolona (Stark *et al.*, 2005) En conjunto, estas acciones podrían ser responsables de inhibir la lipoperoxidación (Vos *et al.*, 2002)

13. CONCLUSION

En general, los resultados de este trabajo sugieren que nuestro modelo experimental (con dieta HFFD y ovariectomía) es eficaz para inducir los principales cambios fisiológicos asociados con el consumo incrementado de grasa y fructosa, así como alteraciones en el estrés oxidativo a través de MDA inducido por una disminución estrogénica. Pero el tratamiento a corto plazo con TB revierte parte de las alteraciones metabólicas inherentes a la deficiencia estrogénica, que a su vez reducen los marcadores de enfermedades cardiovasculares. En este trabajo sugerimos que el tratamiento agudo de la TB está asociado con una mejora la

formación de MDA y AGE's durante los primeros estadios de la deficiencia de estrógenos.

14.0 PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto de la TB a largo plazo en el mismo modelo de estudio (OVX+HFFD) sobre los biomarcadores de estrés oxidante
- Determinar el efecto de la TB a largo plazo (OVX+HFFD) sobre el estrés oxidante en tejidos insulino dependientes, principalmente en el cerebro.
- Determinar el efecto de la TB a largo plazo (OVX+HFFD) en la consolidación de procesos cognitivos (memoria y aprendizaje).

15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta García Edgar Obesity, adipose tissue and insulin resistance. Acta Bioquím Clín Latinoam 2012; 46 (2): 183-94.

Aldrete-Velasco J. Analysis of the available evidence for the intake of non-caloric sweeteners. Med. interna Méx;2017 33 (1): 61-83.

Alwan Ala. Global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization, 2011.

Amado, J. A., and J. Flórez. "Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales." Farmacología humana (2003): 887-911.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care. 2015; 38(Suppl 1): S1-S2.

Aragno M and Mastrocola R. Dietary Sugars and Endogenous Formation of Advanced Glycation Endproducts: Emerging Mechanisms of Disease. Nutrients. 2017; 9(4):385.

Artaud-Wild, Sabine M., et al. "Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox." Circulation 88.6 (1993): 2771-2779.

Arthur, J. R. "Two novel phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes of *Paragonimus westermani* induced by oxidative stress." *Cellular and Molecular Life Sciences* 57 (2000): 1825-1835.

Avello, Marcia, and Mario Suwalsky. "Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección." *Atenea (Concepción)* 494 (2006): 161-172.

Ayala, Ignacio, et al. "Modelos animales experimentales de enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico." *An. Vet.(Murcia)* 24 (2008): 5-16.

Ayres, Stacey, et al. "Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17 β on lipid peroxidation and DNA damage." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 274.6 (1998): E1002-E1008.

Barrera Sotolongo Julián, and Osorio León Sarah. "Hipertensión arterial en mujeres climatéricas." *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 25.4 (2006): 0-0.

Barrera-Cruz, Antonio, Arturo Rodríguez-González, and Mario Antonio Molina-Ayala. "Escenario actual de la obesidad en México." *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 51.3 (2013): 292-299.

Barton Matthias, Meyer Matthias R. Postmenopausal Hypertension. Mechanisms and Therapy. *Hypertension*. (2009); 54:11-18.

Basciano H, Federico,L, Adeli,K: Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr.Metab Lond.* (2005) 2:5..

Baynes, John W. "Role of oxidative stress in development of complications in diabetes." *Diabetes* 40.4 (1991): 405-412.

Beato M, Chavez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroid* 1996; 61:240–251.

Bechlioulis A, Naka KK, Calis KA, Makrigiannakis A, Michalis L, Kalantaridou SN. Cardiovascular effects of endogenous estrogen and hormone therapy. *Curr Vasc Pharmacol.* 2010; 8(2):249-58.

Bednarek G, Tupikowski K, Bidzinska B, Bohdanowicz-Pawlak A, Antonowicz-Juchniewicz J, Kosouska B, et al. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol.* (2004); 19: 57-63.

Bellanti F, Matteo Maria, Rollo Tiziana et al., Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: Impact of estrogen therapy. *Redox Biol.* 2013; 1(1): 340–346.

Biglia N, Maffei S, Lello S, Nappi RE. Tibolone in postmenopausal women: a review based on recent randomised controlled clinical trials. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* (2010); 26:804-814.

Blacker T. S., & Duchon, M. R. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radical Biology and Medicine.*(2016); 100: 53-65.

Bloch-Damti A & Bashan. N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 2005; 7(11-12), 1553-1567.

Blom MJ, editor. Thesis. Steroids and steroid analogues for hormone replacement therapy; metabolism in target tissues; Chapter 5, p. 63–80.

Bowen, P.E. and G. Borthakur, Postprandial lipid oxidation and cardiovascular disease risk. *Curr Atheroscler Rep*, 2004. 6(6): p. 477-84.

Boyanov MA, Shinkov AD. Effects of tibolone on body composition in postmenopausal women: a 1-year follow up study. *Maturitas*. 2005 Aug 16; 51(4):363-9.

Braun S; Bitton-Worms K; LeRoith D.The link between the metabolic syndrome and cancer, *Int. J. Biol. Sci.* 7 (2011) 1003–1015.

Brennan CL, Hoenig M, Ferguson DC. GLUT4 but not GLUT1 expression decreases early in the development of feline obesity. *Domest Anim Endocrinol* (2004); 26:291–301.

Cagnacci A, Mallus E, Tuveri F, Cirillo R. Effect of Tibolone on Glucose and Lipid Metabolism in Postmenopausal Women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. (1996); 82(1):251-253.

Cagnacci A, Soldani, R., Carriero, P. L., Paoletti, A. M., Fioretti, P., & Melis, G. B. Effects of low doses of transdermal 17 beta-estradiol on carbohydrate metabolism in

postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, (1992); 74(6):1396-1400.

Calvo-Ochoa E, Karina Hernández-Ortega, Patricia Ferrera, Sumiko Morimoto and Clorinda Arias. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (2014) 34, 1001–1008.

Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O., González-Arenas, A. y Guerra-Araiza, C. Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain, *Neuroendocrinology*, (2002), 76, 267-271.

Campos A, Orozco M, Cabrera M, Ramos J, Xochimilco M. Evaluación del efecto de niacina en un modelo de obesidad con síndrome metabólico en ratas Zucker-Zucker (fa/fa) longevas. *Rev Mex Cienc Farm* (2012); 43(4): 47-54.

Cancino Badías, Lourdes, et al. "VIMANG: los efectos antígenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa." *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 20.1 (2001): 48-53.

Cedó L, Santos D, Roglans N, Julve J, Pallarès. Human hepatic lipase overexpression in mice induces hepatic steatosis and obesity through promoting hepatic lipogenesis and white adipose tissue lipolysis and fatty acid uptake. *PLoS ONE* (2017) 12(12).

Chu MC, Cospers P, Nakhuda GS, Lobo RA. Comparison of oral and transdermal short-term estrogen therapy in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Fertil Steril* (2006); 86: 1669-75.

Chu MC, Cushman M, Solomon R, Rogerio A, Lobo RA. Metabolic syndrome in postmenopausal women: the influence of oral or transdermal estradiol on inflammation and coagulation markers. *Am J Obstet Gynecol* (2008); 199: e1-7.

Chun, Mu-Ryun, et al. "Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diet composition on muscle insulin resistance in rats." *Journal of Korean medical science* (2010); 25.7:1053-1059.

Cisneros R, Oré R, Arnao I, Suárez S. Value of reduced / oxidized glutathione (GSH / GSSG) in diabetic rats treated with maca (*Lepidium meyenii* Walp). *An. Fac. med.* (2011); 72(2): 107-111.

Cisneros-Prego Yagi K. Female hormones act as natural antioxidants – a survey of our research. *Acta Biochim Pol* (1999); 44: 701–9.

Coelho LO, Pereira-Lancha D.S, Chaves D, Diwan R, Ferraz, PL, Campos-Ferraz JR. Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2011) 44: 966-972.

Córdova-Villalobos, José Ángel, et al. "Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral." salud pública de México (2008); 50.5 419-427.

Cross, E. C., B. Holliwell, E. T. Borisch, W. A. Pryor, B. N. Ames, R. L. Saul, J. M. McCord, and D. Harman. Oxygen radicals and human diseases. Ann. Intern. Med. (1987);107: 526-545..

De Fronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care. (1991): 14(3):173-94.

De Marinis, E., et al. "17 β -Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor β -mediated neuroglobin up-regulation." Journal of neuroendocrinology 25.3 (2013): 260-270.

Demir B, Ozturkoglu E, Solaroglu A, Baskan B, Kandemir O, Karabulut E, Haberal A. The effects of estrogen therapy and estrogen combined with different androgenic progestins on carbohydrate and lipid metabolism in overweight-obese younger postmenopausal women. Gynecol Endocrinol (2008); 24:347–353.

Demirbag R, Yilmaz R, Erel O. The association of total antioxidant capacity with sex hormones. Scan Cardiovasc J. (2005); 36: 172-176.

Di Toro C. Glutación como agente protector endógeno en las enfermedades degenerativas y psiquiátricas. Psicofarmacología. (2003); 22.

Díaz-Casasola L, and Luna-Pichardo D. Advanced glycation end products in cardiovascular disease as a complication of diabetes. *Rev Med Inv* (2016); 4:52-7.

Dilek M, Nazırođlu M. Oral H. B., Övey, İ. S., Küçükayaz, M., Mungan, M. T & Sütçü, R. Melatonin modulates hippocampus NMDA receptors, blood and brain oxidative stress levels in ovariectomized rats. *Journal of Membrane Biology*, (2010); 233(1-3): 135-142.

Dubey RK. Vascular consequences of menopause and hormone therapy: Importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovascular Research*.(2005); 66: 295-306.

Echandi, Clara Nanne, Ernesto Rojas Umaña, and Jorge Granados Zúñiga. "Efecto del consumo de fructosa sobre los niveles plasmáticos de ácido úrico, colesterol y triacilglicéridos en ratas." *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica* 3.2 (2009): 43-52.

Eguchi, Ricardo, et al. "Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats with diet-induced obesity." *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 14.3 (2008): 182-187.

Elkind-Hirsch KE, Sherman LD, Malinak R. Hormone replacement therapy alters insulin sensitivity in young women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab.* (1993); 76:472– 475.

Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* (2002); 76:911–22.

Enriori PJ, Enriori CL. The pathogenesis of osteoporosis in older women and men: a review. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2002); 82:1-6.

Escalante-Gómez C, Quesada MS, Zeledón SF. Perfil oxidativo de la mujer menopáusica: Papel de los estrógenos en la prevención y tratamiento de las enfermedades. *Acta Méd Costarric.* (2009); 51(4):206-12.

Escobar SÁNCHEZ FABIO. "Terapia hormonal en casos especiales. Terapia hormonal oral y no oral en el síndrome metabólico." *REVISTA COLOMBIANA DE MENOPAUSIA* (2011); 7-2.

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, and Wehling M.. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* (2000); 52:513-556.

Farfan-Garcia ED, Castillo-Hernandez MC, Pinto-Almazan R, Rivas-Arancibia S, Guerra-Araiza CH. Tibolone Prevents Oxidation and Ameliorates Cholinergic Deficit Induced by Ozone Exposure in the Male Rat Hippocampus. *Neurochem Res* (2014) 39:1776–1786.

Farfan-Garcia ED, Castillo-Hernandez MC, Pinto-Almazan R, Rivas-Arancibia S, Guerra-Araiza CH. Tibolone Prevents Oxidation and Ameliorates Cholinergic Deficit

Induced by Ozone Exposure in the Male Rat Hippocampus. *Neurochem Res* (2014) 39:1776–1786.

Feigelson HS, Jonas CR, Teras LR, Thun MJ, Calle EE. Weight gain, body mass index, hormone replacement therapy, and postmenopausal breast cancer in a large prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2004); 13:220–224.

Fenochio-González F, Pichardo-Cuevas Mauricio, Linares-Pérez María de la Luz. Prevalencia de síndrome metabólico en mujeres posmenopáusicas con y sin tratamiento hormonal sustitutivo. *Rev Invest Med Sur Mex*, (2012); 19 (2): 60-63.

Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR. Obesity and reproductive hormone levels in the transition to menopause. *Menopause*. (2010); 17(4):718-26.

Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., et al., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J. Clin. Invest.* (2004); 114: 1752–1761.

Gajda Angela M., et al. "Diet-induced metabolic syndrome in rodent models." *Animal Lab News* (2007): 74: 775-793.

Gallagher JC, Baylink DJ, Freeman R, and McClung M. Prevention of bone loss with Tibolone in postmenopausal women: Results of two-randomized, doubleblind, placebo-controlled, dose-finding studies. *J Clin Endocrinol Metab* (2001); 86:4717-26.

GBD. 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for causes of death,

1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. (2015); 385:117-71.

Ghibaudi, L, Cook,J, Farley,C, van Heek,M, Hwa,JJ: Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes.Res* (2002); 10:956-963.

Gilgioni, Eduardo Hideo, et al. "Beneficial effects of tibolone on blood pressure and liver redox status in ovariectomized rats with renovascular hypertension." *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences* (2012);68.5:510-520.

González-Arenas Aliesha, Reyna-Neyra Andrea, Gómez María de Jesús, et al., Los mensajeros químicos del sistema neuroinmuno endócrino. Educación Química, UNAM, 2001.

González-Concepción Virginia, and Ramos González Luis Humberto. "Menopausia y su relación con el síndrome metabólico." *Acta Médica del Centro* (2013);7.2: 114-123.

Goodman S.T. 1998. *Medical cell biology*, vol. II, pp. 27-65, USA: Goodman, S.T., ed. Lippincott-Raven Publishers.

Guerra R, Cambray, Zuñiga-Muñoz, Guarner – Lans. Modulation of the Activities of Catalase, Cu-Zn, Mn Superoxide Dismutase, and Glutathione Peroxidase in

Adipocyte from Ovariectomised Female Rats with Metabolic Syndrome. *International journal of endocrinology*, (2014); 4: 10.

Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, Lehert P, Burger HG. The menopausal transition: a 9-year prospective population-based study. The Melbourne Women's Midlife Health Project. *Climacteric*. (2004); 7(4):375-89.

Hadju J, Wyss S., Aebi H. Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *Eur J Biochem* (1977) 80: 199-207.

Halliwell B. "How to characterize a biological antioxidant", in *Free Radical Research Communication* (1990); 9:1-32.

Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2006); 291 (1): G1-7.

Hansel B., Giral P., Nobecourt E., et al., Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 4963–4971.

Hansen KA, Eyster KM. What Happened to WHI: Menopausal Hormonal Therapy in 2012. *Clin Obstet Gynecol* (2012); 55(3): 706-12.

Hart-Unger S, Korach KS. Estrogens and obesity: is it all in our heads? *Cell Metab.* 2011; 14(4):435-6.

Hart-Unger S. Estrogens and Obesity: Is It All in Our Heads? *Cell Metabolism* (2011); 14, (4, 5):453-465.

Hemila H., Kaprio J., Albanes D. Vitamin C, vitamin E, and beta carotene in relation to common cold incidence in male smokers. *Epidemiology*; (2002). 13: 32–37.

Henriques HN, Camara NR, de Carvalho AC, Pantaleao JA, Guzmán-Silva MA. Effect of high doses of tibolone in body weight and lipid profile of ovariectomized rats. *Rev Bras Ginecol Obstet.* (2010); 32(2):88-93.

Henriques HN, Camara NR, de Carvalho AC, Pantaleao JA, Guzmán-Silva MA. Effect of high doses of tibolone in body weight and lipid profile of ovariectomized rats. *Rev Bras Ginecol Obstet.* (2010); 32(2):88-93.

Heredia-Hernández B, Lugones Botell M. Principales manifestaciones clínicas, psicológicas y de la sexualidad en un grupo de mujeres en el climaterio y la menopausia. *Rev Cubana Obstet Ginecol.* (2007); 33(3).

Hernández-Galván R, Jiménez Huerta J, Sánchez Contreras J. Incidencia de Síndrome Metabólico en la etapa de climaterio en el Servicio de Ginecología del Hospital Juárez de México. *Rev Hosp Jua Mex* 2008; 75(4): 241-246.

Holvoet P; B. Kritchevsky S., Tracy R.P., Mertens A., et al. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly

people in the health, aging, and body composition cohort, *Diabetes* 53 (2004) 1068–1073.

Huang PL., Unraveling the links between diabetes, obesity, and cardiovascular disease, *Circ. Res.* 96 (2005) 1129–1131.

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

Ibañez P., Solis N., Pizarro M., Aguayo G., Duarte I., Miquel J.F., Accatino L., Arrese M. Effect of losartan on early liver fibrosis development in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* (2007): 22(6): 846-851.

Ignacio DL, Frankenfeld TG, Fortunato RS, Vaisman M, Werneck-de-Castro JP, Carvalho DP. Body mass regulation by estrogen and physical activity. *Arq Bras Endocrinol Metabol* (2009); 53(3):310-7.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Causas de mortalidad. Defunciones generales de mujeres por principales causas de mortalidad, 2013. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía; 2015.

Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* (2001); 24(4):683-9.

Jackson S, James M, Abrams P. The effect of oestradiol on vaginal collagen metabolism in postmenopausal women with genuine stress incontinence. *BJOG*. (2002);109:339–344.

James PA, Oprail S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J et al. 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adult: Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. (2014); 311(5):507-520.

Janssen Imke. Menopause and the Metabolic Syndrome: The Study of Women's Health Across the Nation. *Arch Intern Med*. 2008 July 28; 168(14): 1568–1575.

Jarukamjorn, Kanokwan, et al. "A high-fat, high-fructose diet induces antioxidant imbalance and increases the risk and progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Scientifica (Cairo)*. 2016;(2016); 5029414.

Ji-Young A, Hyeyoon Eo, and Yunsook Lim. "Mulberry leaves (*Morus alba* L.) ameliorate obesity-induced hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress in high-fat diet-fed mice." *Genes Nutr*. 2015;10(6):46.

Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, Lin F, Grady D, Bittner V et al. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the heart and estrogen/progestin replacement study: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* (2003); 138: 1-9.

Kaur J A. Comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract* 2014; (2014):1-21.

Kim J, Koho D, Williams X and Elmquist JK, "SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: a key regulator of homeostasis" *Molecular and Cellular Endocrinology* (2011); 336, (1-2):219-223.

Kinsella JE, Frankel, E.; German, B. & Kanner, J. 1993. "Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plants foods", in *Food Technology*, pp. 85-89.

Kloosterboer HJ. "Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 76.1-5 (2001): 231-238.

Knobil E, Neill JD. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1994. p. 1083.

Kuiper G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* (1997);138: 863–870.

Lê, Kim-Anne, and Luc Tappy. "Metabolic effects of fructose." *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 9.4 (2006): 469-475.

Leclercq I., Farrell G., Field J., Bell D., Gonzalez F., Robertson G.. Cyp2E1 and Cyp4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine non-alcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Invest.* (2009);105: 1067- 1075.

Lindheim SR, Presser SC, Ditkoff EC, Vijod MA, Stanczyk FZ, Lobo RA. A possible bimodal effect of estrogen on insulin sensitivity in postmenopausal women and the attenuating effect of added progestin. *Fertil Steril.* (1993); 60:664–667.

Liu, Simin, and JoAnn E. Manson. "Dietary carbohydrates, physical inactivity, obesity, and the 'metabolic syndrome' as predictors of coronary heart disease." *Current opinion in lipidology* 12.4 (2001): 395-404.

Lizarzaburu Robles JC. Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. *An Fac med.* (2013); 74(4):315-20.

Lomba, Almudena, et al. "Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis." *Lipids in health and disease* 9.1 (2010): 60.

London R.M., George J.. Pathogenesis of NASH: Animal Models. *Clin. Liver Dis.* (2007): 11: 55-74.

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* (2009); 30 (1-2): 42-59.

Ma L, Hofling M, Masironi B, von Schoultz B, Cline JM, Sahlin L. Effects of tibolone and conventional HRT on the expression of estrogen and progesterone receptors in the breast. *Maturitas.* (2008): 345-9.

Markides C, Roy D, Liehr G. Concentration dependence of prooxidant and antioxidant properties of catecholestrogens. *Arch Biochem Biophys.* (1998); 360: 105-112.

Marques de Mattos A; Marino L., Ovidio P., et al. Almeida, P.G. Chiarello, Protein oxidative stress and dyslipidemia in dialysis patients, *Ther. Apher. Dial.* 16 (2012) 68–74.

Márquez-Sandoval F, Macedo-Ojeda G, Viramontes-Hörner D, Fernández Ballart JD, Salas Salvadó J, Vizmanos B. The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr* (2011); 14(10):1702-13.

Martino S, Cauley JA, Barrett-Connor E et al. Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *J Natl Cancer Inst* (2005); 97: 1262-1271.

Matsuzawa N., Takamura T., Kurita S., Misu H., Ota T., Ando H., Yokoyama M., Honda M., Zen Y., Nakanuma Y., Miyamoto K., Kaneko S.. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* (2007): 46(5): 1392-1403.

McCord and D. Harman. Oxygen radicals and human diseases. *Ann. Intern. Med.* (1987),107: 526-545..

Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem.* (1988); 263(33):17205-8.

Méndez-Hernández P, Flores Y, Siani C, Lamure M, Dosamantes-Carrasco LD, Halley-Castillo E, et al. Physical activity and risk of metabolic syndrome in an urban Mexican cohort. *BMC Public Health* (2009); 9(1):276.

Merhi Zaher Doswell Angela . Vitamin D Alters Genes Involved in Follicular Development and Steroidogenesis in Human Cumulus Granulosa Cells *J Clin Endocrinol Metab*, June 2014, 99(6):E1137–E1145.

Milewicz A, Tworowska U, Demissie M: Menopausal obesity -myth or fact? *Climateric* (2001); 4: 273-83.

Milner J.A., Hassan A.S. Species specificity of arginine deficiency-induced hepatic steatosis. *J. Nutr.* (1981).111: 1067-1073.

Mirkin S et al. Effect of 17 beta-estradiol, progesterone, synthetic progestins, tibolone, and tibolone metabolites on vascular endothelial growth factor mRNA in breast cancer cells. *Fertil Steril.* (2005); 84:485-91.

Modelska K, Cummings S. Tibolone for postmenopausal women: systematic review of randomized trials. *N Engl J Med* (2005); 353: 595-603.

Mosca L, Collins P, Herrington DM, Mendelsohn ME, Pasternak RC, Robertson RM, Schenck-Gustafsson K, Smith SC, Jr., Taubert KA, Wenger NK Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* (2001); 104:499-503.

Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* (1997); 43:1209-14.

Oláiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Ávila M, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, Morelos: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.

Ortmann O, Lattrich C, The treatment of climacteric symptoms. *DtschArztebl Int*. 2012 Apr; 109(17):316-24.

Pacheco J. Estrés oxidativo en la mujer climatérica. *Rev Peruana Ginecol Obstet*. (2010); 56:856.

Padró-Suárez L, Pelegrín Martínez AA. Perimenopausia y riesgo cardiovascular. *Medisan*(2011); 15(10):1485-92.

Palamanda, Jairam R., and James P. Kehrer. "Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes." *Archives of biochemistry and biophysics* 293.1 (1992): 103-109.

Panay N, Hamoda H, Arya R, Savvas M. The 2013 British Menopause Society & Women's Health Concern recommendations on hormone replacement therapy. *Menopause Int* (2013); 19(2): 59-68.

Panchal Sunil K. and Brown Lindsay. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2011):351982; 14.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analyses of Glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* (2003); 333 (1): 19-39.

Patki G, Solanki N, Atrooz F, Allam F, Salim S. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. (2013): 1539; 73-86.

Pavón de Paz C, Alameda Hernando y J. Roldán Olivar. Obesity and menopause. *Nutr Hosp.* (2006); 21(6):633-637.

Pedersen SB, Borglum JD, Moller-Pedersen T, Richelsen B. Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* (1992);85(1-2):13-9.

Pinto-Almazán R, Rivas-Arancibia S, Farfán-García ED, Rodríguez-Martínez E, Guerra-Araiza C. Efecto neuroprotector de la tibolona contra el estrés oxidativo inducido por la exposición a ozono. *Rev Neurol* (2014); 58: 441-9.

Pinto-Almazán R, Rivas-Arancibia S, Farfán-García ED, Rodríguez-Martínez E, Guerra-Araiza C. Efecto neuroprotector de la tibolona contra el estrés oxidativo inducido por la exposición a ozono. *Rev Neurol* (2014); 58: 441-9.

Prieto G., Villamar-Cruz O., Saqui-Salces M., Neri-Gómez T., Almaraz-Nieves A., Hernández-Molina V., Valdez Rodríguez H. and et al. ¿Cómo actúan las hormonas esteroides? *Educación Química. UNAM*, 2003; 14:4.

Raftos JE, Whillier S, Kuchel PW. Glutathione synthesis and turn over in the human erythrocyte: Alignment of a model based on detailed enzyme kinetics with experimental data. *J Biol Chem* (2010); 285 (31): 23557-67.

Ratiani L, Parkosadze G, Koptonashvili L, Ormotsadze G, Sulaqvelidze M, Sanikidze T. Correlation of atherogenetic biomarkers and estradiol changes in postmenopause. *Georgian Med News* (2011); 195:100-5.

Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* (1988); 37(12):1595-607.

Reed, Michael J., and Helenius J. Kloosterboer. "Tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR)." *Maturitas* 48 (2004): 4-6.

Reuter S; Gupta C., Chaturvedi M., Aggarwal B., Oxidative stress, inflammation and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 1603–1616.

Rojas, Rosalba, et al. "Metabolic syndrome in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006." *Salud pública de México* 52 (2010): S11-S18.

Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids.* (2008); 73(9-10):874-9.

Rosano G. Enfermedad cardiovascular en las mujeres posmenopáusicas. *Climateric*(2009); 12(1):41-6

Rossouw JE. Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* (2002); 53 550-557.

Rossouw JE. Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* (2002); 53 550-557.

Ruiz-Larrea M, Begoña, et al. "Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens." *Chemistry and Physics of Lipids*. (2000); 105.2: 179-188.

Salpeter SR, Walsh JM, Ormiston TM, Greyber E, Buckley NS, Salpeter EE. Meta-analysis; effect of hormone-replacement therapy on components of metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes obesity and metabolism* (2006); 538-554.

Samuel VT, Liu ZX, Qu XQ, Elder BD, Bilz S, Befroy D et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* (2004); 279:

Samuel VT, Liu ZX, Qu XQ, Elder BD, Bilz S, Befroy D et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32345-53.

Sánchez-Rodríguez MA, Zacarías-Flores M, Arronte-Rosales A, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause* (2012); 19: 361–367.

Sastre J, Pallardo FV, Viña J. Glutathione. *The Handbook of Environm Chem* (2005); 9; 2: 91–108.

Schilling A. "Experiencia chilena con el uso de un anticonceptivo oral combinado de acetato de clormadinona/etinilestradiol: estudio no intervencional." *Revista chilena de obstetricia y ginecología* 73.5 (2008): 293-298.

Schwartz M, et al. "A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids." *Molecular cell* 9.3 (2002): 505-514.

Shinkarenko L, Kaye AM, Degani H. C NMR kinetic studies of the rapid stimulation of glucose metabolism by estrogen in immature rat uterus. *NMR Biomed* (1994); 7:209–217.

Signorelli S, Neri S, Sciacchitano S, Di Pino L, Costa M, Marchese G. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas*. (2006); 53: 77-82.

Skouby SO, Sidelmann JJ, Nilas L, Gram J, Jespersen J. The effect of continuous combined conjugated equine estrogen plus medroxyprogesterone acetate and tibolone on cardiovascular metabolic risk factors. *Climacteric* (2008); 11(6):489-97.

Sócrates-Aedo M, Arnaldo Porcile J, Domingo Laiz R, Fernando Urzúa V. Implicancias de diferentes modalidades de THR oral en los componentes del síndrome metabólico en las mujeres en climaterio del servicio de salud metropolitano oriente (Santiago de Chile). *Rev Obstet Ginecol* 2006; 1: 23-9.

Sócrates-Aedo M, Arnaldo Porcile J, Domingo Laiz R, Fernando Urzúa V. Implicancias de diferentes modalidades de THR oral en los componentes del síndrome metabólico en las mujeres en climaterio del servicio de salud metropolitano oriente (Santiago de Chile). Rev Obstet Ginecol 2006; 1: 23-9.

Stark J; Varbiro, S., Sipos, M., Tulassay, Z., Sara, L., Adler, I; & Kloosterboer, H. J. Antioxidant effect of the active metabolites of tibolone. Gynecological Endocrinology. (2015); 31(1):31-35.

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K. et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. Circ Res (2003); 93: 170-177.

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K. et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. Circ Res (2003); 93: 170-177.

Sturdee DW. Y Pines A. Recomendaciones actualizadas sobre terapia hormonal de la postmenopausia y estrategia preventivas para la salud de la mediana edad. Sociedad Internacionalde Menopausia, 2011.

Subbiah MT, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. J Clin Endocrinol Metab. (1993); 77: 1095-1097.

Tabares-Trujillo, María Katherine, et al. "Síndrome metabólico en menopausia: implicaciones de la terapia hormonal." *Perinatología y reproducción humana* 26.1 (2012): 26-29. Tabares-Trujillo K, Aguilera-Pérez J, Velázquez-Valassi B, Garza-Ríos P. Síndrome metabólico en menopausia: implicaciones de la terapia hormonal. *Perinatol Reprod Hum* 2012; 26 (1): 25-29.

Taddei S. La presión arterial en el envejecimiento y la menopausia. *Rev Climaterio*. 2010; 13(74):79-84.

Tang B, Markiewicz L, Kloosterboer HJ, Gurside E. Human endometrial 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase can locally reduce intrinsic estrogenic:progesterogenic activity ratios of a steroidal drug (ORG OD 14). *J Steroid Biochem Mol Biol*. (1993); 45:345–351.

Tang B, Markiewicz L, Kloosterboer HJ, Gurside E. Human endometrial 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase can locally reduce intrinsic estrogenic:progesterogenic activity ratios of a steroidal drug (ORG OD 14). *J Steroid Biochem Mol Biol*. (1993); 45:345–351

Taniguchi S, Yanase T, Kobayashi K, Takayanagi R, Haji M, Umeda F, et al. Catechol estrogens are more potent antioxidants than estrogens for the Cu(2+) catalyzed oxidation of low or high density lipoprotein: antioxidative effects of steroids on lipoproteins. *Endocr J*(1994); 41:605-611.

Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* (2003); 57 (3-4): 145-55.

Tappy, Luc, and Kim-Anne Lê. "Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity." *Physiological reviews* 90.1 (2010): 23-46.

Teede HJ, Lombard C, Deeks AA. Obesity, metabolic complications and the menopause: an opportunity for prevention. *Climacteric*. (2010); 13(3):203-9.

The Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2012; 19: 257-71.

Torres-Jiménez, Ana Paola, and José María Torres Rincón. "Climaterio y menopausia." *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 61.2 (2018): 51-58.

Tresguerres J. *Fisiología Humana*. 3ra. ed. Ed. McGRAW-HILL, España, 2005.

Tzu C., Kwam L., Hish C. Age dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxide and superoxide dismutase inm human live mitochondria. *Free Radic Biol Med*; (2003);16: 207-14.

Urióstegui-Flores A; García-Bravo María de la Luz, Pérez-Pinto Alejandro y Orea-Lara Altagracia. Medición de parámetros asociados al síndrome metabólico en alumnos de enfermería en Taxco, México. *Rev. Salud Pública* (2018);20 (3): 334-339.

Ustundag B., Bahcecioglu I.H., Sahin K., Duzgun S., Koca S., Gulcu F., Ozercan I.H.. Protective effect of soy isoflavones and activity levels of plasma paraoxonase and arylesterase in the experimental nonalcoholic steatohepatitis model. *Digest. Dis. Sci.* (2007): 52(8): 2006-1.

Valko M., Morris H., Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress. *Cur Med Chem* (2005); 12: 1161-208.

Verheul HA, Blok LJ, Burger CW, Hanifi-Moghaddam P, Kloosterboer HJ. 2007. Levels of tibolone and estradiol and their nonsulfated and sulfated metabolites in serum, myometrium, and vagina of postmenopausal women following treatment for 21 days with tibolone, estradiol, or estradiol plus medroxyprogesterone acetate. *Reprod Sci.*; 2007;14:160-8.

Vibha Yadav, Umesh, et al. "Oxidative stress in metabolic disorders: pathogenesis, prevention, and therapeutics." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016 (2016).

Villanueva, L. A., et al. "Effects of tibolone on lipid and glucose metabolism as well as insulin secretion in postmenopausal women." *Ginecologia y obstetricia de Mexico* 67 (1999): 473-477.

Villasmil ER, Guerra VM, Torres MM, Reyna N, Mejía MY. Perfil lipídico en mujeres premenopáusicas y posmenopáusicas. *Rev Obstet Ginecol Venezuela.* (2007); 67(2):107-13.

Viña J, Pérez C, Furukawa T, Palacín M, Viña JR. Effect of oral glutathione on hepatic glutathione levels in rats and mice. *Br J Nutr.* (1989); 62:683-91.

Von Eckardstein A, Schmiedem Karin, Gu'lbahç,e Esmā, et al. Lowering of HDL cholesterol in post-menopausal women by tibolone is not associated with changes in

cholesterol efflux capacity or paraoxonase activity. *Atherosclerosis* 159 (2001); 433–439.

Vos RM, Krebbers SF, Verhoeven CH, Delbressine LP. The in vivo human metabolism of tibolone. *Drug Metab Dispos* (2002); 30: 106–12.

Wang JL, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng ZH, Rossetti L. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes New York* (2001);50(12):2786-2791.

Wassmann K, Wassmann S, Nickenig G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res.* (2005); 97: 1046-1054.

Wen Y, Doyle M, Cooke T, Feely J. Effect of menopause on lowdensity lipoprotein oxidation: is oestrogen an important determinant? *Maturitas.* (2000); 34: 233-238.

Witherby S, Johnson J, Demers L, Mount S, Littenberg B, Maclean CD, et al. Topical testosterone for breast cancer patients with vaginal atrophy related to aromatase inhibitors: a phase I/II study. *Oncologist* (2011); 16(4): 424-31.

Witherby S, Johnson J, Demers L, Mount S, Littenberg B, Maclean CD, et al. Topical testosterone for breast cancer patients with vaginal atrophy related to aromatase inhibitors: a phase I/II study. *Oncologist* (2011); 16(4): 424-31.

Wu P, Zhang F, Dai Y, Han L, Chen S. Serum TNF- α , GTH and MDA of high-fat diet-induced obesity and obesity resistant rats. *Saudi Pharmaceutical Journal* (2016); 24(3):333-336.

Ya Jand Diamond A. Role of Glutathione Peroxidase1 in Breast Cancer:Loss of Heterozygosity and Allelic Differences in the Response to Selenium .Cancer R (2003).63:3347-51.

Yagi K. Female hormones act as natural antioxidants a survey of our research. Acta Biochim Pol (1999); 44: 701–9

Ye, Zhi-Wei, et al. "Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects (2015): 1850.8: 1607-1621.

Young LR, Nestle M. The contribution of expanding portion sizes to the US obesity epidemic. Am J Public Health (2002); 92:246–9.

Zárate A, Hernández M, Saucedo R. Lugar de la tibolona en la terapia de reemplazo hormonal en la postmenopausia. Acta Médica (2004); 2: 93-195.

Zhang, Wei, et al. "Progestagenic Effects of Tibolone are Target Gene—Specific In Human Endometrial Cells." Journal of the Society for Gynecologic Investigation 13.6 (2006): 459-465.

Zilberman JM. Hipertensión y menopausia. PROSAC, Sociedad argentina de Cardiología (2008);2(1):71-81.

Zivkovic J. B, German, and A. J. Sanyal, "Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease," American Journal of Clinical Nutrition (2007); 86(2):285–30.

**Complimentary and personal copy for
Norma Angélica Estrada Cruz, Julio César Almanza
Pérez, Ángeles Fortis Barrera, Juan Manuel Gallardo,
Leticia Manuel Apolinar, Julia Jeanett Segura Uribe,
Sandra Orozco Suárez, Angélica Coyoy Salgado, et al.**

www.thieme.com

**Acute Administration of
Tibolone Prevents Oxidative
Stress in Ovariectomized
Rats Fed
High-Fat-and-Fructose Diet**

DOI 10.1055/a-0659-9928
Exp Clin Endocrinol Diabetes

This electronic reprint is provided for non-commercial and personal use only: this reprint may be forwarded to individual colleagues or may be used on the author's homepage. This reprint is not provided for distribution in repositories, including social and scientific networks and platforms.

Publishing House and Copyright:

© 2018 by
Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
ISSN 0947-7349

Any further use
only by permission
of the Publishing House

 **Thieme**

Acute Administration of Tibolone Prevents Oxidative Stress in Ovariectomized Rats Fed High-Fat-and-Fructose Diet

Authors

Norma Angélica Estrada Cruz^{1, 2}, Julio César Almanza Pérez³, Ángeles Fortis Barrera³, Juan Manuel Gallardo⁴, Leticia Manuel Apolinar⁵, Julia Jeanett Segura Uribe⁶, Sandra Orozco Suárez⁶, Angélica Coyoy Salgado⁷, Christian Guerra Araiza¹

Affiliations

- 1 Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico
- 2 Posgrado en Biología Experimental, División en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico
- 3 Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, División en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico
- 4 Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico
- 5 Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico
- 6 Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico
- 7 CONACyT-Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

Key words

Hormonal therapy, estrogen deficiency, glutathione, malondialdehyde, advanced glycation end products

Received 11.04.2018

Revised 14.06.2018

Accepted 17.07.2018

Bibliography

DOI <https://doi.org/10.1055/a-0659-9928>

Published online: 14.8.2018

Exp Clin Endocrinol Diabetes

© J. A. Barth Verlag in Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

ISSN 0947-7349

Correspondence

Christian Guerra-Araiza

Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades

Centro Médico Nacional Siglo XXI

Instituto Mexicano del Seguro Social. Av. Cuauhtémoc 330

Colonia Doctores

Delegación Cuauhtémoc

C.P. 06720

Mexico City

Mexico

Tel.: +52/55/56 27 69 00 ext. 21367

christianguerre2001@gmail.com

ABSTRACT

In addition to oxidative stress due to the increase of free radicals, estrogen deficiency is associated with changes in enzymatic activity, glutathione redox ratio (GSH/GSSG), and the content of oxidative markers such as malondialdehyde. Tibolone, a synthetic steroid, has been used as an elective treatment for the relief of menopausal symptoms. However, the acute effects of hormonal therapy with tibolone on metabolic parameters and oxidative stress markers associated with the first stages of estrogen deficiency are still unknown. The study aimed to evaluate if the acute administration of tibolone reduces oxidative stress in ovariectomized rats fed high-fat-and-fructose diet. Rats were fed a standard diet or a diet consisting of 10% lard-supplemented chow and 20% high-fructose syrup in the drinking water plus tibolone or vehicle for seven days. Weight, cholesterol, triglycerides, and glucose levels, as well as antioxidant enzymes and oxidative stress markers were quantified in the serum of each experimental group. It was observed that seven days of diet and tibolone treatment in the ovariectomized group reduced weight, triglycerides, cholesterol, glucose levels and advanced glycation end products but did not change GSH/GSSG ratio nor the enzymatic activity of superoxide dismutase. Also, both glutathione peroxidase and glutathione reductase activity decreased, as well as malondialdehyde levels. These results suggest that the acute treatment with tibolone prevented the changes in the metabolic parameters analyzed as well as the increase in the levels of malondialdehyde and AGEs induced by ovariectomy and high-fat diet.

Introduction

Estrogens are sex steroid hormones essential during the fertile stage that are produced in the ovaries and the adrenal glands [1]. During the climacteric estrogen deficiency (ED), the body and metabolism of women change significantly. The mechanisms that regulate oxidative stress are not the exception [2]. As estrogens are antioxidants per se, more studies on their antioxidant effects as a possible treatment for some diseases, such as cardiovascular disease, hypertension, osteoporosis, cancer, and metabolic diseases [3, 4], which relate both estrogen decrease and redox imbalance, have been recently encouraged.

Oxidative stress (OS) is originated from the excessive production of free radicals (FR) and failures in the biologic system capacity to rapidly detox FR or repair the resulting injury [5, 6]. The mechanisms of protection against FR can be either non-enzymatic, including antioxidants such as tocopherols, vitamin C, and reduced glutathione (GSH), which is presently used as a marker of cellular redox state [7], or enzymatic, including glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and glutathione reductase (GR) enzymes [8].

Studies have demonstrated that chronic hormonal therapy (HT) consisting of estrogens given orally with or without a progestogen showed beneficial effects for over six months, such as the reduction in metabolic parameters and a decrease in oxidative stress markers [9]. However, the current issue of discussion is whether estrogen therapy might increase the risk of carcinogenesis, especially breast and endometrial cancer [10]. Consequently, it is necessary to evaluate another HT with the same beneficial effects of estrogens but the adverse effects.

Tibolone (TB), a synthetic steroid that has been used as an elective treatment for the relief of menopausal symptoms, and its various metabolites have estrogenic as well as progestogen/androgenic effects [11]. TB treatment in rats decreased OS markers [12], body weight, and total cholesterol levels [13], whereas in studies conducted with postmenopausal women, TB improved blood pressure, glycemia [14], insulin levels, HDL cholesterol, and triglycerides [15]. However, the acute effects of HT with TB on metabolic parameters and OS markers associated with the first stages of ED are still unknown. Therefore, this work aimed to evaluate the effect of acute TB administration on OS markers in the serum of rats fed a high-fat-and-fructose diet.

Materials and Methods

Animals

Adult Sprague-Dawley female rats (250–270 g) were individually housed under standard conditions (12-h light/dark cycles, 22 °C). All experimental procedures were performed by the Mexican Guidelines for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999). All efforts were made to minimize animal discomfort and reduce the number of animals used.

Surgical procedures

Animals were ovariectomized (OVX) under i.p. ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) (Vetoquinol, Mexico City, Mex) anes-

thesia. Both ovaries were surgically removed to eliminate endogenous ovarian steroids [16].

Diets

Control animals were fed with standard rodent chow (3 kcal/g; Lab-Diet® St. Louis, MO, USA) and tap water (standard diet, SD). The high-fat and fructose diet (HFFD) groups were fed with standard rodent chow supplemented with 10% lard (5.4 kcal/g) and 20% high-fructose mixed in the drinking water (0.83 kcal/ml, commercially available as corn syrup). Animals were fed ad libitum on their corresponding diets. Food and water intake, as well as the animal weight, were recorded daily during the seven days of treatment.

Treatments

Tibolone (1 mg/kg; Livial®, Organon, Mexico) or vehicle (water) was administered daily by oral gavage for seven days. It has been recently demonstrated that this dose of TB has neuroprotective properties by reducing lipid peroxidation and ameliorating behavioral/functional deficits after ozone exposure [12, 17]. The solutions containing TB or vehicle were independently coded before administration (► Fig. 1).

Experimental design

Ten days after OVX, animals were randomly assigned to one of the following groups: (1) INT + SD + V, intact animals fed with SD and treated with vehicle (V); (2) INT + SD + TB, intact animals fed with SD and treated with TB; (3) INT + HFFD + V, intact animals fed with HFFD and V; (4) INT + HFFD + TB, intact animals fed with HFFD and TB; (5) OVX + SD + V, ovariectomized animals fed with SD and V; (6) OVX + SD + TB, ovariectomized animals fed with SD and TB; (7) OVX + HFFD + V, ovariectomized animals fed with HFFD and V; and (8) OVX + HFFD + TB, ovariectomized animals fed with HFFD and TB. The treatments were administered simultaneously for seven days according to each group. Animals were sacrificed by decapitation at the end of the treatments. Blood from the trunk was collected in 10 ml tubes. The blood samples were left at room temperature for one hour and centrifuged at 3500 rpm for 5 min to obtain serum, which was stored at –80 °C until the analysis was performed.

Determination of body weight

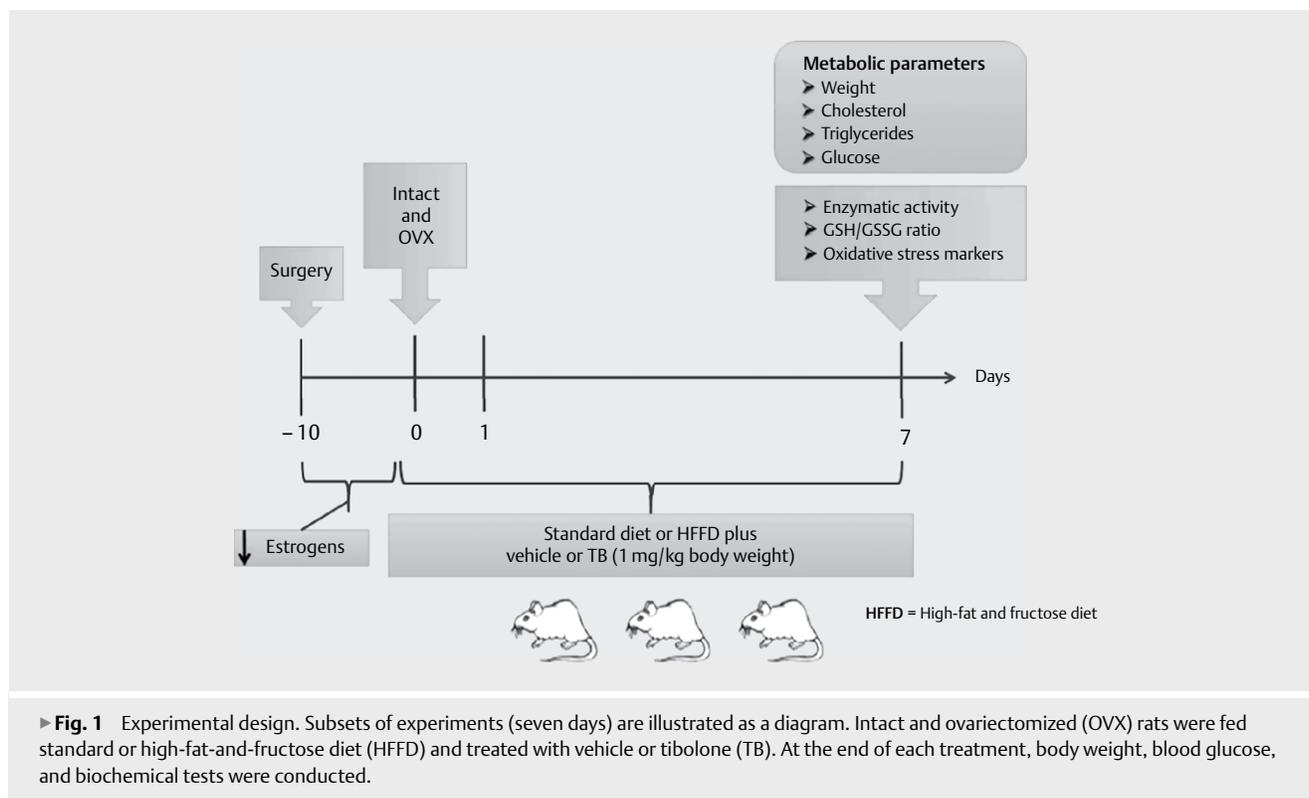
The body weight of the animals was monitored daily since day 0 (before the administration of the treatments), and the mean weight for each group was calculated. ΔW is the representation of the weight change between day 0 and day 7.

Serum cholesterol and triglycerides determination

After blood centrifugation, serum was collected, and aliquots were stored at –80 °C until analyzed. Levels of triglycerides (TG) and total cholesterol (CHOL) were determined using spectrophotometric methods (SPINREACT kits, Spain).

Glucose determination

Rats fasted for 4–6 h before blood glucose measurements. Baseline blood glucose levels were determined from tail blood using a contour blood glucose analyzer (Abbott, Illinois, USA) and a corresponding sensor strip.



Superoxide dismutase activity

SOD activity was determined using a commercial kit (CAYMAN, Michigan, USA). This method allows the detection of the major types of SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, and Fe-SOD). The reaction was performed in the wells of microplates. Briefly, 50 μ L of the radical detector (tetrazolium salt) was diluted in 19.95 mL of 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, containing 0.1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and 0.1 mM hypoxanthine. Subsequently, 10 μ L of enzymatic extract or a standard of SOD were added to the mix. The reaction was initiated by adding 20 μ L xanthine oxidase (prepared by diluting 50 μ L xanthine oxidase in 1.95 mL of 50 mM Tris-HCl pH 8.0), thereby catalyzing the release of superoxide radicals captured by the tetrazolium salt. Quantification was performed at 450 nm. The radical concentration was inversely proportional to the SOD activity in the samples.

Glutathione peroxidase- and glutathione reductase-specific activity

GPx and GR enzymatic activities in serum were quantified by the production of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), using the methods previously described [18].

GSH/GSSG ratio

GSH (reduced glutathione) was determined using the method described by Sedlak and Lindsay (1968), in which the thiol groups in 2-nitrobenzoic acid (DTNB) were measured [19]. Briefly, 0.05 mL of serum was mixed with 800 μ L of meta-phosphoric acid, 2 mL of TRIS buffer and 50 μ L of DTNB, and the absorbance was recorded at 412 nm. GSSG (oxidized glutathione) was reduced to GSH, which in turn was quantified with the Ellman's reagent, 5,5'-dithiobis-(2-

nitrobenzoic acid) [20]. The reduction was catalyzed by GR when NADPH was present. The color change during the reaction and the reaction rate are proportional to GSH and GSSG concentrations.

Advanced glycated end-products assay

Determination of AGEs was based on the spectrofluorometric detection of some fluorescent products according to Münch et al. (1997) and Henle et al. (1999) [21, 22]. Blood serum was diluted 1:50 with PBS pH 7.4 and fluorescence intensity was recorded at the emission maximum (~450 nm) upon excitation at 370 nm (Fluoromax-3 spectrofluorometer, HORIBA Jobin Yvon, USA). A spectrofluorometer, which excitation and emission wavelengths (λ) were calibrated using 5 μ M quinine bisulfate in 0.2 M sulfuric acid, was used. The operating conditions for the evaluation of AGEs were established using a BSA solution (50 μ M) incubated with glucose (0.5 M) for 90 days. In this solution, the maximum fluorescence intensity was obtained at $\lambda = 450$ nm by excitation with a $\lambda = 370$ nm light source. The fluorescence intensity was expressed as arbitrary units (AUF) relative to the control solution. Each measurement was normalized to a protein concentration of 1 mg/mL. The fluorescence intensity was expressed in arbitrary units per milliliter of serum (AUF/mL).

Malondialdehyde determination

MDA is the final product of fatty acids peroxidation and a marker of free radicals. MDA determination procedure was conducted according to the instructions of the kit manufacturer (Abcam, Cambridge, MA, USA). All assays were prepared in 96-well plates and studied in duplicates. Total MDA content in serum samples was determined by the difference between the test and the standard samples.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Significance was determined with one-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test, using the GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Effects of OVX, HFFD, and TB on metabolic parameters

According to the present findings, OVX produced a significant increase in weight (4%) in animals fed with SD without altering the other metabolic parameters (triglycerides, cholesterol, and glucose concentrations). However, the HFFD increased both body weight (11%) and glucose concentration (19.4%) in INT animals, while in OVX animals, HFFD showed a significant increase in body weight (7.7%), cholesterol (65.12%), triglycerides, and glucose levels ($p < 0.05$). In contrast, it was observed that TB treatment for seven days sufficed to reduce body weight in both INT and OVX rats fed SD. A significant reduction in body weight, cholesterol, triglycerides, and glucose levels in the OVX + HFFD + V group was observed as well (► **Table 1**).

Effects of OVX, HFFD, and TB on basal blood glucose and AGEs

HFFD increased the levels of basal glucose in the INT + HFFD + V group in comparison with the intact fed standard diet group (INT + SD + V), as well as in the OVX + HFFD + V group compared with the OVX + SD + V (40%, $p < 0.001$) (► **Fig. 2a**).

On the contrary, it was observed that the administration of TB reduced basal glucose levels in the INT + HFFD + TB group compared with the INT + HFFD + V group (63.6%, $p < 0.0001$). In the OVX + HFFD + TB group, a decrease was also observed when compared with the OVX + HFFD + V group (75.3%, $p < 0.001$) (► **Fig. 2a**).

As for AGEs, its concentration was significantly increased in the INT + HFFD + V group concerning the INT + SD + V group, while TB treatment prevented this increase (INT + HFFD + TB). In OVX animals, OVX + HFFD + V group showed a significant increase in the concentration of AGEs of more than double that the OVX + SD + V animals (6.243 ± 1.160 AUF vs. 2.508 ± 0.2126 AUF; $p < 0.001$).

In contrast, TB decreased AGEs levels in the OVX + HFFD + TB group, which were significantly lower than the OVX + HFFD + V group (5.243 ± 1.160 AUF vs. 12.508 ± 0.2126 AUF; 61.6%, $p < 0.001$) (► **Fig. 2b**).

Effects of OVX, HFFD, and TB on SOD, GPx, and GR activity

These results did not indicate any significant changes in SOD activity ($p = 0.4532$) in none of the experimental groups after seven days of treatment (► **Fig. 3a**).

However, GPx was affected by OVX showing a significant decrease in the activity of this enzyme (0.025 ± 0.003 U/dL vs. 0.134 ± 0.001 U/dL) in all the groups (33.3%) compared with the intact groups (► **Fig. 3b**). Also, it was observed that the administration of TB and HFFD in the intact animals increased the activity of GPx when compared with the SD + V group. In the OVX animals, an increase in GPx activity was observed only in the HFFD + TB group concerning the HFFD + V group (► **Fig. 3b**). Interestingly, neither TB nor the HFFD modified the activity of GR enzyme in the intact animals (► **Fig. 3c**), while TB administration significantly decreased the activity of GR in the OVX + HFFD + TB group compared with the OVX + HFFD + V (0.148 ± 0.20 U/dL vs. 0.217 ± 0.13 U/dL) (► **Fig. 3c**).

Effects of OVX, HFFD, and TB on GSH/GSSG ratio

The consumption of HFFD is associated with a decrease in GSH. Thus, changes in blood concentration could give a measure of in vivo oxidative stress [23]. Furthermore, [GSH]/[GSSG] ratio is often used as an indicator of the redox state or antioxidant capacity of the cell. Under physiological conditions, [GSH]/[GSSG] ratio is > 100 [24]. Therefore, we decided to measure the levels of this non-enzymatic antioxidant in intact and OVX animals fed with HFFD, as well as with SD.

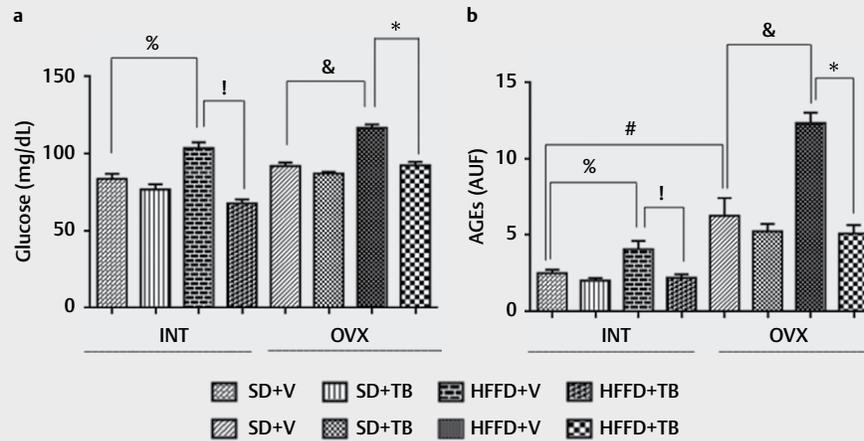
A significant increase of GSH was observed in the INT + HFFD + V animals compared with the INT + SD + V group (16.61 ± 1.61 mmol vs. 7.20 ± 1.56 mmol). This effect was significantly enhanced when TB was administered (INT + HFFD + TB) compared with the INT + HFFD + V group (25.94 ± 1.47 mmol vs. 15.52 ± 1.84 mmol) (► **Fig. 4a**), whereas in OVX animals, no significant changes were observed with either HFFD or TB.

Concerning GSSG, it was observed that in INT animals the administration of HFFD, as well as TB, increased the levels of GSSG with respect to the SD + V group, while the OVX increased the GSSG

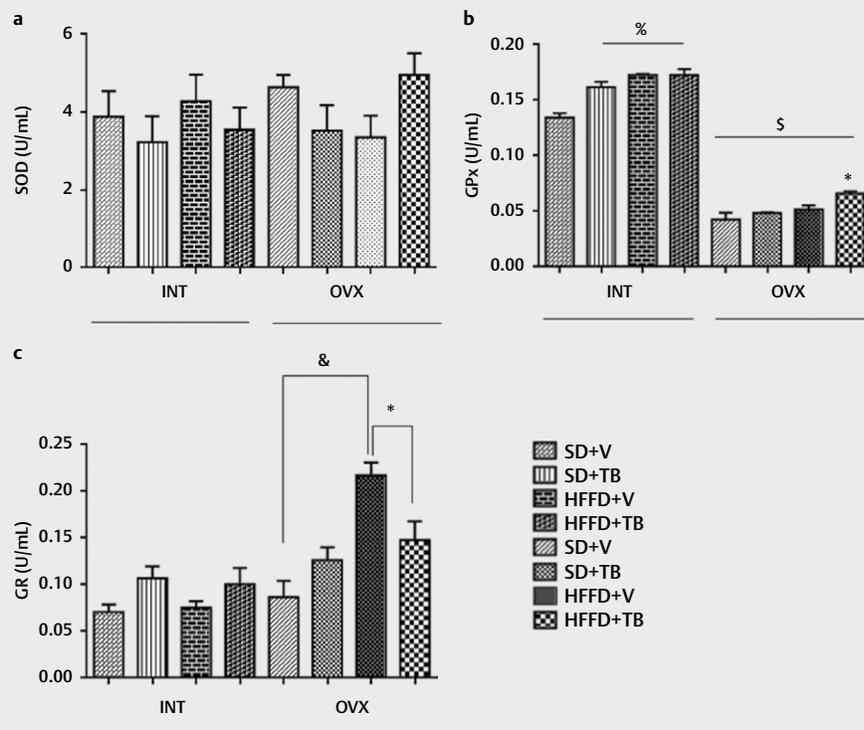
► **Table 1** Effects of tibolone on metabolic parameters.

	Weight (g)	Difference in weight (ΔW) ^a	Cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Glucose (mg/dL)
INT + SD + V	256 \pm 3.48	+ 2.51 \pm 4.29	87.96 \pm 2.23	49.02 \pm 5.58	83.57 \pm 3.23
INT + SD + TB	234.8 \pm 0.67 *	- 26.40 \pm 6.49 *	40.79 \pm 3.54 *	42.70 \pm 3.77	76.71 \pm 3.40
INT + HFFD + V	286.8 \pm 1.79 *	+ 20 \pm 3.48 *	94.83 \pm 5.35	63.90 \pm 3.60	103.6 \pm 3.75 *
INT + HFFD + TB	249.5 \pm 3.28 **	- 44 \pm 5.85 **	32.06 \pm 3.23	19 \pm 8.39 **	67.86 \pm 2.44 **
OVX + SD + V	268.9 \pm 4.90	+ 9.33 \pm 2.23	100.4 \pm 4.59	71.53 \pm 4.33	92.17 \pm 2.12
OVX + SD + TB	239.3 \pm 5.98#	- 6.25 \pm 2.52	44.96 \pm 2.79#	34.55 \pm 7.79#	87 \pm 1.33
OVX + HFFD + V	289.8 \pm 5.83#	+ 28 \pm 2.51#	165.8 \pm 12.69#	139.6 \pm 6.938#	116.9 \pm 2.20#
OVX + HFFD + TB	255.6 \pm 5.75##	- 18.20 \pm 5.27##	67.93 \pm 11.23(##)##	26.01 \pm 5.39##	92.50 \pm 2.24##

^a ΔW , difference in weight expressed as the average of lost (-) vs. gained (+) weight (g); Cholesterol, triglycerides, and glucose levels in intact (INT) and OVX rats fed standard diet (SD) or HFFD diet treated with vehicle (V) or tibolone (TB). The data is represented as the mean \pm SE of 10 animals per group. * vs. INT; **vs. INT + HFFD; #vs. OVX; ##vs. OVX + HFFD; $p < 0.05$.



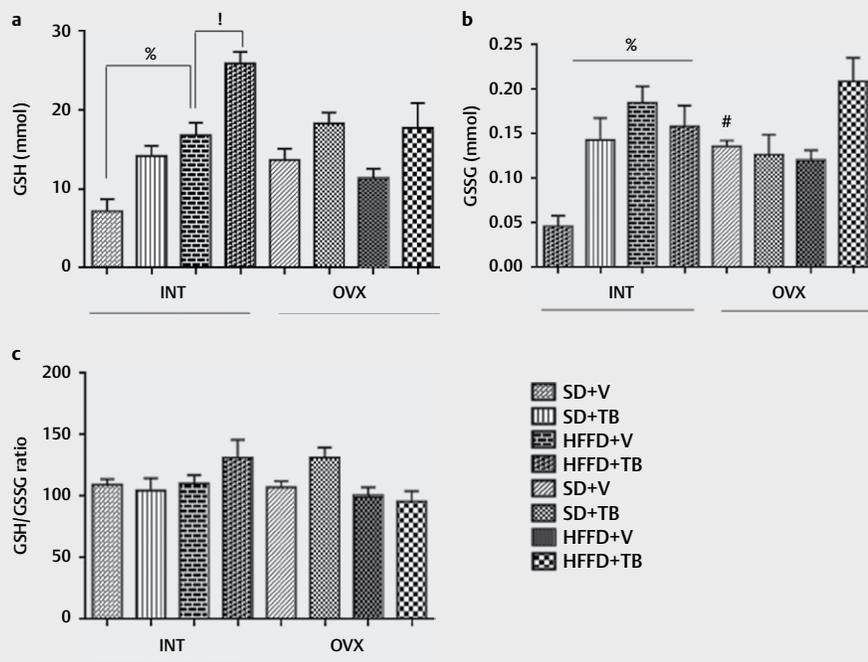
► **Fig. 2** Effect of tibolone (TB) on basal blood glucose **a** and advanced glycation end products (AGEs) **b** in intact (INT) and ovariectomized (OVX) rats fed standard (SD) or high-fat-and-fructose diet (HFFD). The bars represent the mean \pm SEM of ten animals per group. % $p < 0.05$ INT + SD + V vs. INT + HFFD + V; ! $p < 0.05$ INT + SD + V vs. OVX + SD + V; & $p < 0.05$ INT + HFFD + V vs. INT + HFFD + TB, # $p < 0.05$ OVX + SD + V vs. OVX + HFFD + V, * $p < 0.05$ OVX + HFFD + V vs. OVX + HFFD + TB.



► **Fig. 3** Effect of tibolone (TB) on superoxide dismutase (SOD) **a**, glutathione peroxidase (GPx) **b**, and glutathione reductase (GR) **c** activity in intact (INT) and ovariectomized (OVX) rats fed standard (SD) or high-fat-and-fructose diet (HFFD). The bars represent the mean \pm SEM of ten animals per group. % $p < 0.05$ vs. INT + SD + V; § $p < 0.05$ vs. the respective groups of INT animals; * $p < 0.05$ OVX + HFFD + V vs. OVX + HFFD + TB. & $p < 0.05$ OVX + SD + V vs. OVX + HFFD + V.

levels in the SD + V group compared with the INT + SD + V group. In this group of animals (OVX), neither HFFD nor TB affected the GSSG concentration (► **Fig. 4b**).

None of the groups showed any significant changes regarding GSH/GSSG ratio (► **Fig. 4c**). Moreover, neither OVX nor HFFD modified GSH/GSSG ratio.



► **Fig. 4** Effect of tibolone (TB) on reduced glutathione (GSH) **a**, oxidized glutathione (GSSG) **b**, and GSH/GSSG ratio **c** in intact (INT) and ovariectomized (OVX) rats fed standard (SD) or high-fat-and-fructose diet (HFFD). The bars represent the mean \pm SEM of ten animals per group. * $p < 0.05$ INT + SD + V vs. INT + HFFD + V; † $p < 0.05$ INT + SD + V vs. INT + HFFD + TB; # $p < 0.05$ INT + SD + V vs. OVX + SD + V.

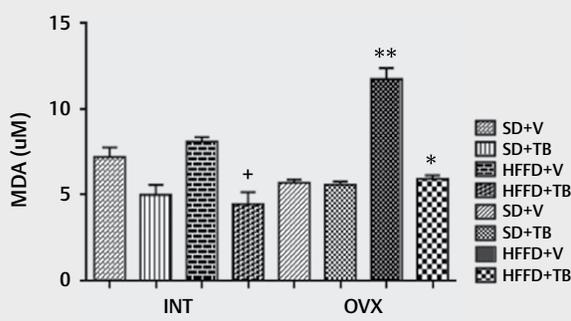
Effects of HFFD and TB on lipoperoxidation

We observed that neither the HFFD nor the OVX increased MDA levels. However, in the OVX + HFFD + V group, animals showed significantly higher levels of MDA ($p < 0.0001$) compared with the OVX + SD + V group (► **Fig. 5**).

Conversely, TB treatment decreased MDA levels in the INT + HFFD + TB group ($4.446 \pm 0.6029 \mu\text{M}$ vs. $8.207 \pm 0.5482 \mu\text{M}$, $p < 0.0001$) as well as in the OVX + HFFD + TB group ($5.910 \pm 0.67 \mu\text{M}$ vs. $11.73 \pm 0.41 \mu\text{M}$, $p < 0.05$) in comparison with the groups treated with vehicle (INT + HFFD + V and OVX + HFFD + V) (► **Fig. 5**).

Discussion

The present results showed that seven days of HFFD increased the weight significantly in both INT and OVX animals. These results agree with previous studies, which reported that seven days of HFFD are enough to produce hyperphagia and weight gain in adult male rats [25]. Regarding the effect of OVX on body weight, although there was a tendency to increase, our results indicated that this increase is not significant. A previous study reported that OVX-induced estrogen depletion increases food intake, body mass, and caloric intake during the first 18 days postsurgery [26], suggesting that the rapid weight gain during this period after the removal of the ovaries seems to be the result of an increased caloric intake and the redistribution of adipose tissue. Probably, this may be the reason why a significant change regarding this parameter is not noticeable after seven days. A possible explanation for this response could be the role of the hypothalamus as an important center for coordination of food consumption, body weight homeostasis, and



► **Fig. 5** Effect of tibolone (TB) on oxidative stress markers. Lipoperoxidation products (MDA) in intact (INT) and ovariectomized (OVX) rats fed standard (SD) or high-fat-and-fructose diet (HFFD). The bars represent the mean \pm SEM of ten animals per group. * $p < 0.05$ vs. INT + HFFD + V; ** $p < 0.05$ OVX + HFFD + V vs. OVX + SD + V and OVX + SD + TB; * $p < 0.05$ vs. OVX + HFFD + V.

energy expenditure [27]. Furthermore, estrogens modulate, directly and indirectly, the activity of molecules involved in food intake and can regulate the energy intake through the direct action of the estrogen receptor- α (ER- α) or indirectly through decreasing orexigenic peptides. Therefore, the absence of estrogens may promote hyperphagia [28] since ERs are present in the adipose tissue and act as its regulators [29]. ER- α predominantly regulates homeostasis via growth and proliferation of adipocytes, whereas the estrogen receptor-beta (ER- β) regulates the sex-specific distribution of adipose tissue. Thus, the interruption of gonadal estrogen se-

cretion, with the consequent androgen/estrogen imbalance, favors abdominal fat deposition with increased visceral fat [30, 31]. In other studies, it has been reported that this deficiency is related to body weight gain and development of obesity in adult humans, mice and the OVX hamster [32–34].

Body weight loss in rats treated with steroid hormones seems to be associated with less food consumption, and with an increase in energy expenditure [35].

These results suggest that TB can cause a decrease in body weight in both INT and OVX rats due to the short-term estrogenic action on the centers of intake regulation in the hypothalamus, inducing less food consumption [36].

Regarding the metabolic parameters, a significant increase in the concentration of cholesterol and triglycerides was observed in OVX animals after seven days of HFFD. This effect was diminished by the administration of TB. Clinical studies in postmenopausal women have shown that TB improves plasma cholesterol and triglyceride levels after 20 weeks of treatment [13, 37]. Our results suggest that TB may reduce these parameters in a shorter time.

Another parameter analyzed in this work was the amount of fasting blood glucose. It has been shown that under a high glucose load (hyperglycemia), biomolecules undergo a glycation reaction. Namely, when reducing sugars react in a non-enzymatic manner—mainly with amino groups belonging to proteins, lipids, and nucleic acids—which leads to the formation of a series of complex compounds known as advanced glycation-end products (AGEs) [38]. Consequently, this results in the deprivation of the functions of biological macromolecules due to modifications in their structural conformation. Our results showed a significant increase in fasting glucose levels after seven days of HFFD, which was higher than the OVX group. This effect was related to the increase in AGEs levels in these animals. Moreover, this result is consistent with previous reports in which the use of sugars, such as fructose, promoted a faster formation of AGEs [39]. In these animals, the administration of TB for a short time (seven days) decreased fasting glucose levels, as mentioned in previous reports [40]. Our results suggest that the administration of TB for a short period reestablished glucose levels almost to normal values in INT and OVX animals fed HFFD (INT + HFFD + TB and OVX + HFFD + TB) compared with their respective control groups (V). The latter findings could be associated with the estrogenic activity of TB since studies *in vitro* indicated that estradiol inhibits the effect of AGEs in human platelet aggregation. In peripheral tissues, TB may act predominantly as an estrogen. Indeed, the administration of 0.625 mg/day of conjugated estrogens (as TB) to postmenopausal women decreases fasting glucose levels [40].

When analyzing the activity of the antioxidant enzymes, no significant changes in SOD activity were observed in any of the groups, suggesting that this enzyme can maintain its activity regardless of the treatment (HFFD or TB). In contrast, OVX produced a significant decrease in GPx activity, which is associated with the accumulation of H₂O₂, which in turn could react with the anion OH⁻ (Fenton reaction) and oxidize cell membrane polyunsaturated fatty acids, increasing the concentration of MDA [41].

Under physiological conditions, GSH/GSSG ratio is > 100. However, oxidative stress produces GSSG accumulation, thus decreasing this ratio, which in turn indicates changes in the redox state that affect the balance of proliferation, differentiation, and cell death [42].

We observed that in the intact animals, the HFFD increased GSH and GSSG levels (► Fig. 4a and b), without statistically significant changes in the GSH/GSSG ratio. This result is probably because HFFD caused an increase in the activity of the glutathione system since GPx activity was increased by the number of reactive species generated due to the diet. However, as the organism tries to maintain its homeostasis, the cellular redox environment is not altered even when the GSH/GSSG ratio shifts, as mentioned in the literature [43].

After analyzing this ratio in blood serum, it was found that the reduced form of circulating glutathione was favored since the values of the GSH/GSSG ratio were around 170 in the INT and OVX groups fed SD and treated with TB, although these values were not statistically significant. The determination of the serum GSH/GSSG ratio would reflect the changes that occur in extrahepatic tissues. The presence of insufficient amounts of GSH triggers the *de novo* synthesis of GSH. This type of synthesis is carried out from GSH precursors and not by GSSG transformation. The purpose of this mechanism is to restore GSH values [44]. Another possible explanation could be the export of GSH (reduced glutathione) from red blood cells, which have a powerful GSH recovery system due to the permanent oxidative aggression of the oxygen molecule that must be transported by hemoglobin [45]. In the present study, we provide evidence that OVX significantly decreased the activity of GPx, without modifying the activity of SOD or GR. Furthermore, HFFD significantly increased the levels of GSH and GSSG without modifying the GSH/GSSG ratio. These observations are consistent with several studies in which a correlation between estrogen depletion and increased oxidative stress levels in women [6, 46] and rats [47, 48] has been found. A reduced GSH/GSSG ratio in the blood of ovariectomized rats [47] and postmenopausal women [46] was reported as well.

Additionally, the balance of the NAD and NADP pathways is involved in the maintenance of the cellular redox state [49]. It is possible that HFFD and TB may be affecting this balance. However, further research will be required to verify this hypothesis.

Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of aging and estrogen deficiency and may arise through the increased production of lipid peroxides. The destruction and degradation of these products generate a final metabolite, MDA, which indicates the presence of free radicals and whose concentration is directly proportional to the damage in the organism [50, 51].

In the present research, it was noticed that neither the HFFD nor the OVX increased MDA levels. However, the combination of both treatments significantly increased MDA levels (OVX + HFFD + V group). This result is probably because seven days post-OVX or HFFD alone is not sufficient to cause lipoperoxidation and the antioxidant systems are still able to reverse the damage that these conditions could cause. Conversely, when combined, the effects of OVX and HFFD are synergized and able to exceed the antioxidant capacity and, therefore, increase MDA levels [41].

These findings indicate that lipid oxidation increased, possibly due to oxidative stress generated by the consumption of the HFFD diet, suggesting that depletion of estradiol (OVX) plus HFFD increased reactive oxygen species, which oxidize cell membrane polyunsaturated fatty acids and favor oxidative stress [41]. Our results showed a significant increase of almost 100% in the concentration

of MDA in the OVX + HFFD + V group compared with the OVX + SD + V group. These results agree with those reported in previous studies, in which HFFD produced obesity, increased lipid peroxidation, and led to more fat deposits [52]. Interestingly, no significant changes in MDA levels were observed in other studies. However, it is important to emphasize that the feeding time was longer (six months) and the composition of the diet was different in these studies, which indicates that the type of diet, as well as the feeding time, are important to induce changes in OS markers such as MDA levels [53].

Some reports indicate that serum levels of lipid peroxides increase in women and female mice after a bilateral oophorectomy, which supports a possible antioxidant role of female hormones [54]. These findings coincide with our results since a 33.4% increase was observed in OVX animals fed HFFD [55].

It was observed that TB administration significantly decreased the concentration of MDA, which suggests that this hormone can protect against lipid oxidation, similar to estrogens, as reported in a previous study where TB decreased lipoperoxidation and protein oxidation in rats exposed to ozone [17]. This effect observed in the short-term may be due to the estrogenic activity of TB. It has been reported that estrogens exert their antioxidant activity through the donation of hydrogen atoms, drainage of the hydroxyl group from the phenolic ring to the lipid peroxy radicals, as well as other detrimental radicals [56]. Moreover, it has been shown that some of the TB metabolites have pronounced antioxidant activity. Beyond the steroid structure, other chemical specificities have been observed in this action. Almost all of the sulfated metabolites display antioxidant activity; the strongest is the 3b-17b-disulfated-tibolone [57]. This metabolite shows an activity comparable with the reference compound, estradiol, and is present in large quantities in women treated with tibolone [58]. As a whole, these actions might be responsible for inhibiting lipoperoxidation [59].

Overall, the present results suggest that this model is effective to induce some of the major physiological changes associated with the chronic consumption of fat and fructose, as well as oxidative stress. Short-term treatment with TB reverses some of the metabolic parameters inherent to estrogenic deficiency. Furthermore, the acute TB treatment is associated with an improvement in the systemic redox state, as well as a decrease in the formation of MDA and AGEs during the first stages of estrogen deficiency.

Acknowledgments

We thank D.V.M. Inés Pérez and Technician Alberto Ramírez for the aid provided during the experiments. Norma Estrada-Cruz received CONACYT and IMSS scholarships. Christian Guerra-Araiza received Beca de Excelencia en Investigación by Fundación IMSS, A. C. This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree of Norma Estrada-Cruz at the Doctorado en Biología Experimental Program (Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interests of any nature.

References

- [1] Cópola F, Nader J, Aguirre R et al. Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama. *Rev Med Uruguay* 2005; 21: 15–22
- [2] Escalante-Gómez C, Quesada-Mora S, Zeledón-Sánchez F et al. [Oxidative profile of the menopausal woman: Estrogens' role in the prevention and treatment of diseases]. *Acta Med Costarric* 2009; 51: 206–211
- [3] Agarwal A, Gupta S, Sekhon L et al. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: From molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1375–1403
- [4] Rivera MDC, Bayona ASY. Climaterio y función sexual: Un abordaje integral a la sexualidad femenina. *CES Salud Pública* 2014; 5: 70–76
- [5] Pacheco J. Estrés oxidativo en el climaterio y menopausia y cáncer ginecológico. *Rev Per Ginecol Obstet* 2010; 56: 108–119
- [6] Sánchez-Rodríguez MA, Zacarías-Flores M, Arronte-Rosales A et al. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause* 2012; 19: 361–367
- [7] Denzoin VLA, Soraci AL, Tapia MO. Homeostasis del glutatión. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2013; 47: 529–539
- [8] Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91 (3C): 315–385
- [9] Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E et al. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2003; 138: 1–9
- [10] Silva-Vial R. Menopausia y terapia de reemplazo hormonal. *Rev Med Clin Las Condes* 2003; 14: 1–11
- [11] Biglia N, Maffei S, Lello S et al. Tibolone in postmenopausal women: A review based on recent randomised controlled clinical trials. *Gynecol Endocrinol* 2010; 26: 804–814
- [12] Farfán-García ED, Castillo-Hernández MC, Pinto-Almazán R et al. Tibolone prevents oxidation and ameliorates cholinergic deficit induced by ozone exposure in the male rat hippocampus. *Neurochem Res* 2014; 39: 1776–1786
- [13] Henriques HN, Câmara NR, de Carvalho AC et al. [Effect of high doses of tibolone in body weight and lipid profile of ovariectomized rats]. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2010; 32: 88–93
- [14] Vassalle C, Cicinelli E, Lello S et al. Effects of menopause and tibolone on different cardiovascular biomarkers in healthy women. *Gynecol Endocrinol* 2011; 27: 163–169
- [15] Gallagher JC, Baylink DJ, Freeman R et al. Prevention of bone loss with tibolone in postmenopausal women: Results of two randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4717–4726
- [16] Waynforth HB, Flecknell PA. Experimental and surgical technique in the rat. London: Academic Press; 1992: 276–278
- [17] Pinto-Almazán R, Rivas-Arancia S, Farfán-García ED et al. Efecto neuroprotector de la tibolona contra el estrés oxidativo inducido por la exposición a ozono. *Rev Neurol* 2014; 58: 441–448
- [18] Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952–958
- [19] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192–205
- [20] Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969; 27: 502–522
- [21] Münch G, Mayer S, Michaelis J et al. Influence of advanced glycation end-products and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymeri-

- zation of beta-amyloid peptide. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1360: 17–29
- [22] Henle T, Deppisch R, Beck W et al. Advanced glycosylated end-products (AGE) during haemodialysis treatment: Discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1968–1975
- [23] Viña J, Perez C, Furukawa T et al. Effect of oral glutathione on hepatic glutathione levels in rats and mice. *Br J Nutr* 1989; 62: 683–691
- [24] Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 922–935
- [25] Calvo-Ochoa E, Hernández-Ortega K, Ferrera P et al. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34: 1001–1008
- [26] Chen Y, Heiman ML. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E315–E322
- [27] Kim KW, Sohn JW, Kohno D et al. SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: A key regulator of homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 336: 219–223
- [28] Hart-Unger S, Korach KS. Estrogens and obesity: Is it all in our heads? *Cell Metab* 2011; 14: 435–436
- [29] Pedram A, Razandi M, Blumberg B et al. Membrane and nuclear estrogen receptor α collaborate to suppress adipogenesis but not triglyceride content. *FASEB J* 2016; 30: 230–240
- [30] Milewicz A, Tworowska U, Demissie M. Menopausal obesity—myth or fact? *Climacteric* 2001; 4: 273–283
- [31] Feigelson HS, Jonas CR, Teras LR et al. Weight gain, body mass index, hormone replacement therapy, and postmenopausal breast cancer in a large prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 220–224
- [32] Demir B, Ozturkoglu E, Solaroglu A et al. The effects of estrogen therapy and estrogen combined with different androgenic progestins on carbohydrate and lipid metabolism in overweight-obese younger postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24: 347–353
- [33] Kristensen K, Pedersen SB, Vestergaard P et al. Hormone replacement therapy affects body composition and leptin differently in obese and non-obese postmenopausal women. *J Endocrinol* 1999; 163: 55–62
- [34] Beato M, Chávez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 1996; 61: 240–251
- [35] Guyard B, Fricker J, Brigant L et al. Effects of ovarian steroids on energy balance in rats fed a highly palatable diet. *Metabolism* 1991; 40: 529–533
- [36] Lizcano F, Guzmán G. Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 757461
- [37] Villanueva LA, Ortega R, Morimoto S et al. Effects of tibolone on lipid and glucose metabolism as well as insulin secretion in postmenopausal women. *Ginecol Obstet Mex* 1999; 67: 473–477
- [38] Díaz-Casasola L, Luna-Pichardo D. Advanced glycation end products in cardiovascular disease as a complication of diabetes. *Rev Med Inv* 2016; 4: 52–57
- [39] Aragno M, Mastrocola R. Dietary sugars and endogenous formation of advanced glycation endproducts: Emerging mechanisms of disease. *Nutrients* 2017; 9: E385
- [40] Cagnacci A, Soldani R, Carriero PL et al. Effects of low doses of transdermal 17 β -estradiol on carbohydrate metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metabol* 1992; 74: 1396–1400
- [41] Guerra RC, Zuñiga-Muñoz A, Guarnier Lans V et al. Modulation of the activities of catalase, Cu-Zn, Mn superoxide dismutase, and glutathione peroxidase in adipocyte from ovariectomized female rats with metabolic syndrome. *Int J Endocrinol* 2014; 2014: 175080
- [42] Ye ZW, Zhang J, Townsend DM et al. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850: 1607–1621
- [43] Ji-Young A, Hyeyoon Eo, Yunsook L. Mulberry leaves (*Morus alba* L.) ameliorate obesity-induced hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress in high-fat diet-fed mice. *Genes Nutr* 2015; 10: 46
- [44] Di Toro C. Glutathione como agente protector endógeno en las enfermedades degenerativas y psiquiátricas. *Psicofarmacología* 2003; 22: 12–16
- [45] Cisneros R, Oré R, Arnao I et al. Value of reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) in diabetic rats treated with maca (*Lepidium meyenii* Walp). *An Fac Med* 2011; 72: 107–111
- [46] Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1553–1567
- [47] Dilek M, Naziroğlu M, Baha Oral H et al. Melatonin modulates hippocampus NMDA receptors, blood and brain oxidative stress levels in ovariectomized rats. *J Membr Biol* 2010; 233: 135–142
- [48] Patki G, Solanki N, Atrooz F et al. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res* 2013; 1539: 73–86
- [49] Blacker TS, Duchon MR. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic Biol Med* 2016; 100: 53–65
- [50] Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405–412
- [51] Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997; 43: 1209–1214
- [52] Coelho DF, Pereira-Lancha LO, Chaves DS et al. Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 966–972
- [53] Wu P, Zhang F, Dai Y et al. Serum TNF- α , GTH and MDA of high-fat diet-induced obesity and obesity resistant rats. *Saudi. Pharm J* 2016; 24: 333–336
- [54] Bellanti F, Matteo M, Rollo T et al. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: Impact of estrogen therapy. *Redox Biol* 2013; 1: 340–346
- [55] Yagi K. Female hormones act as natural antioxidants—a survey of our research. *Acta Biochim Pol* 1997; 44: 701–709
- [56] Ruiz-Larrea MB, Martín C, Martínez R et al. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem Phys Lipids* 2000; 105: 179–188
- [57] Stark J, Varbiro S, Sipos M et al. Antioxidant effect of the active metabolites of tibolone. *Gynecol Endocrinol* 2015; 31: 31–35
- [58] Vos RM, Krebbers SF, Verhoeven CH et al. The in vivo human metabolism of tibolone. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 106–112
- [59] Guerrero AL, Dorado-Martínez C, Rodríguez A et al. Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. *Neuroreport* 1999; 10: 1689–1692