

**HELEN PENHA GOMES PASQUALON**

**PERFIL OXIDATIVO EM CÃES SUBMETIDOS A PROCEDIMENTOS  
CIRÚRGICOS DE ESTERILIZAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientadora: Silvia Almeida Cardoso

Coorientadoras: Andréa Pacheco Batista Borges  
Patrícia de Oliveira Salgado

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2020**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de  
Viçosa - Campus Viçosa

T

P284p  
2020 Pasqualon, Helen Penha Gomes, 1984-  
Perfil oxidativo em cães submetidos a procedimentos cirúrgicos de  
esterilização / Helen Penha Gomes Pasqualon. - Viçosa, MG, 2020.  
52 f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Silvia Almeida Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cães - Esterilização. 2. Estresse oxidativo. 3. Ovariectomia.  
4. Histerectomia. 5. Orquiectomia. 6. Cirurgia veterinária. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Medicina e Enfermagem. Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0897

HELEN PENHA GOMES PASQUALON

PERFIL OXIDATIVO EM CÃES SUBMETIDOS A PROCEDIMENTOS  
CIRÚRGICOS DE ESTERILIZAÇÃO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de agosto de 2020.

Assentimento:



---

Helen Penha Gomes Pasqualon  
Autora



---

Silvia Almeida Cardoso  
Orientadora

A meu amor Daniel, companheiro de todas as horas, minha segurança e inspiração. Deus me abençoou quando colocou você em minha vida!

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos, força, cuidado, proteção e realização dos teus planos em minha vida.

Aos meus Pais, Evani e Almiro, pelas constantes orações e pelo exemplo de luta.

Aos meus queridos irmãos, Heloar, Henrique, Maxwell por fazerem parte da minha vida e pela inspiração de ser melhor a cada dia.

Ao meu sogro, Tarcísio e cunhados Bruno, Denilza, André e Juliana, pelo carinho, apoio e amizade.

Aos meus sobrinhos Maria Clara, Ítalo, Pedro Augusto, Rafaela e Antonella, por alegrarem o meu coração.

Ao meu esposo Daniel, pela paciência, companheirismo, amor e constante apoio.

À amiga Mariana pela amizade, compreensão, por acreditar sempre em mim e me fazer acreditar em minha capacidade.

À querida orientadora Silvia, pela oportunidade, sabedoria, incentivo, conhecimento. Sem o seu apoio, compreensão, amizade eu não conseguiria concluir esse estudo.

À querida coorientadora Andréa, pela confiança, por fazer parte deste projeto, desde o início, com disponibilidade, atenção, conhecimento e carinho.

Ao professor Leandro, pelas aulas, orientação e por disponibilizar o laboratório para realização de análises.

Aos professores da banca, por aceitarem o convite com carinho.

Ao professor Mafra, por despertar em mim a curiosidade pelo mundo acadêmico.

Aos colegas de Mestrado, em especial ao colegas Leonardo, Emanuele e Ronaldo, pelo companheirismo, amizade, cafés e constante ajuda.

Ao meu amigo e veterinário, José de Oliveira, pelo incentivo, conhecimento e disponibilidade.

À Alessandra, pela presteza, paciência, atenção e análises.

À Leila e Elisângela, pela atenção e constata ajuda.

Aos residentes Veterinários 1 e 2 do ano de 2019, pela atenção, disponibilidade, carinho, coletas e realização dos procedimentos cirúrgicos.

Ao laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, em especial à Cíntia e Aécio por toda ajuda, cuidados com as amostras, análises e apoio.

Aos professores do departamento de Veterinária, pela constante ajuda, em especial ao professor Rodrigo, Fabrício Evandro, Lukyia e Artur.

À Meire, Rogério e Etelvina pela ajuda constante nos agendamentos e busca dos protuários.

Aos tutores, por compeenderem a importância do estudo, nos confiando os seus companheiros de estimação.

Ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio em todas as fases deste Mestrado.

A todos os colegas do departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, companheiros no trabalho diário, com quem sempre pude contar em especial ao Alexsandro, pelas dicas e ensinamentos nas buscas de artigos.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Depatamento de Medicina e Enfermagem, pela realização deste sonho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros  
de gigantes”.*

**(Isaac Newton)**

## RESUMO

PASQUALON, Helen Penha Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2020. **Perfil oxidativo em cães submetidos a procedimentos cirúrgicos de esterilização.** Orientadora: Silvia Almeida Cardoso. Coorientadoras: Andréa Pacheco Batista Borges e Patrícia de Oliveira Salgado.

O ato cirúrgico é um evento que resulta em inúmeras respostas orgânicas e está relacionado a produção de espécies reativas, que em desequilíbrio com o sistema antioxidante contribui para o estresse oxidativo. Os efeitos deletérios do estresse oxidativo, resultantes do dano oxidativo, podem comprometer funções sistêmicas assim como a recuperação pós-cirúrgica. O estudo objetiva avaliar o nível dos marcadores de estresse oxidativo e do sistema enzimático de defesa antioxidante no soro de caninos, estabelecendo um perfil oxidativo no perioperatório de esterilização. A pesquisa foi realizada com cães hípidos de raças, idades e portes variados, provenientes da rotina cirúrgica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa/Minas Gerais. As técnicas cirúrgicas escolhidas para realização da castração em machos foi a orquiectomia e em fêmeas a ovariosterectomia. O experimento foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV), protocolo nº15/2019 e autorização dos tutores. Todos os caninos foram submetidos a coletas sanguíneas em momentos distintos, T0 coleta realizada no momento da realização dos exames pré-cirúrgicos, T1 coleta realizada no dia da cirurgia com o animal em jejum pré-operatório antes da tricotomia e cateterização e T2 a coleta foi realizada 01 hora após o procedimento cirúrgico. A partir do soro foram realizadas avaliações espectrofotométricas para determinação da capacidade antioxidante total, atividade das enzimas Catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e Glutathione-S-transferase (GST) e quantificação dos marcadores de dano proteínas carboniladas e produto de lipoperoxidação. O perfil oxidativo sérico dos cães machos e fêmeas, antes de qualquer interferência, apresentava-se em níveis similares. Cães machos apresentaram redução significativa da atividade das enzimas CAT e GST após a finalização do procedimento de castração em comparação ao tempo T1. Apenas a enzima GST apresentou redução significativa da atividade, no grupo de cães fêmeas após o procedimento de castração. Embora não tenha sido observado alteração no marcador MDA, resultante da peroxidação lipídica, nos diferentes tempos avaliados, houve redução significativa da carbonilação de proteínas em T1 e T2 no grupo de cães fêmeas. Nossos achados demonstram que os procedimentos cirúrgicos para esterilização de cães machos e fêmeas induzem alterações oxidativas. Apenas as fêmeas apresentaram redução de carbonilação de proteínas,

demonstrando o impacto do procedimento cirúrgico no perfil oxidativo de fêmeas durante a castração.

Palavras-chave: Ovariohisterectomia. Orquiectomia. Estresse Oxidativo. Castração.

## ABSTRACT

PASQUALON, Helen Penha Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2020. **Oxidative profile of dogs submitted to sterilization surgical procedures.** Advisor: Silvia Almeida Cardoso. Co-advisers: Andréa Pacheco Batista Borges and Patrícia de Oliveira Salgado.

The surgical act is an event that results in numerous organic responses and is related to the production of reactive species, which, in imbalance with the antioxidant system, contribute to oxidative stress. The deleterious effects of oxidative stress, resulting from oxidative damage, may compromise systemic functions as well as postoperative recovery. The study object to evaluate the level of oxidative stress markers and the enzymatic system of antioxidant defense in canine serum, establishing an oxidative profile in the perioperative sterilization. The research was conducted with healthy dogs of varying breeds, ages and sizes, from the surgical routine of the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa/Minas Gerais. The surgical techniques chosen to perform castration were orchietomy in males and ovariohysterectomy in females. The experiment was carried out after the approval of the Animal Research Ethics Committee at the Federal University of Viçosa (CEUA-UFV), n°15/2019 protocol and authorization of the owners. All canines were submitted to blood collections at different times, T0 collection performed at pre-surgical examinations, T1 collection performed on the day of the surgery with the animal fasting preoperatively before trichotomy and catheterization and the T2 collection was performed 01 hour after the surgical procedure. From the serum, spectrophotometric evaluations were performed to determine the total antioxidant power, activity of the enzymes Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Glutathione-S-transferase (GST) and quantification of the markers of damage carbonyl protein and lipid peroxidation product. The serum oxidative profile of male and female dogs, before any interference, was at similar levels. Male dogs showed a significant reduction in the activity of CAT and GST enzymes after the end of the castration procedure compared to the T1 time. Only the GST enzyme showed a significant reduction in activity in the group of female dogs after the castration procedure. Although there was no alteration in the MDA marker, resulting from lipid peroxidation, at the different times evaluated, there was a significant reduction in protein carbonylation at T1 and T2 in the group of female dogs. Our findings demonstrate that surgical procedures for sterilization of male and female dogs induce oxidative changes. Only females showed reduction of protein carbonylation, demonstrating the impact of the surgical procedure on the oxidative profile of females during castration.

Keywords: Ovariectomy. Orchiectomy. Oxidative stress. Castration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Capacidade antioxidante total sérica. Avaliação da capacidade de redução férrica (FRAP).....	32
Figura 2	Quantificação de marcadores de dano tecidual. Avaliação de peroxidação lipídica determinada por MDA (A) e proteínas carboniladas (B).....	33

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Características dos animais submetidos à esterilização.....	31
Tabela 2 – Perfil oxidativo sérico de cães no pré-cirúrgico (T0).....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CAT	Catalase
CDNB	1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno
CEUA-UFV	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFMG
DEM	Departamento de Enfermagem e Medicina
DMSO	Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetilo
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Capacidade de Redução Férrica
GSH	Glutationa
GST	Glutationa - S - Transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HCL	Ácido Clorídrico
MDA	Malondialdeído
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-Difenil Brometo de Tetrazolina
NADPH	Hidrogênio Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
OH	Ovariohisterectomia
OQ	Orquiectomia
PPTc	Proteínas Carboniladas
PROESAH	Programa de Estratégias em Saúde Animal e Humana
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SOD	Superóxido Dismutase
SRD	Sem Raça Definida
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFV	Universidade Federal de Viçosa

## SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	16
2 INTRODUÇÃO.....	16
2.1 Cirurgia e estresse cirúrgico.....	16
2.2 Procedimentos cirúrgicos de esterilização em caninos.....	17
2.3 Procedimentos cirúrgicos e o estresse oxidativo.....	18
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4 METODOLOGIA.....	21
4.1 Desenho do estudo.....	21
4.2 Coleta de amostra biológica.....	21
4.3 Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo.....	21
4.3.1 Capacidade sérica antioxidante total.....	21
4.3.2 Atividade das enzimas antioxidantes.....	22
4.3.3 Marcadores de dano.....	23
4.4 Análise estatística.....	24
5 PRODUTO FINAL.....	25
5.1 Artigo Original.....	25
5.2 Produto Técnico – Livreto: Estresse Oxidativo e sua relação com a saúde.....	39
6 CONCLUSÃO.....	47
7 REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo.....	49
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	51

## 1 APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa – UFV. O corpo do trabalho compreende a introdução geral, os objetivos, geral e específicos, a metodologia, um artigo científico, uma produção técnica e a conclusão geral. O artigo original foi intitulado: **“Oxidative profile of dogs submitted to sterilization surgical procedures”** foi formatado de acordo com as normas da revista Preventive Veterinary Medicine (Qualis B1 – Medicina I), para qual o artigo foi submetido (ANEXO A). A produção técnica foi intitulada: **“Estresse Oxidativo e sua relação com a saúde”**, editado na forma de livreto.

## 2 INTRODUÇÃO

### 2.1 Cirurgia e estresse cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos fazem parte da rotina hospitalar, é um evento que resulta não apenas em lesão tecidual localizada, mas em inúmeras respostas sistêmicas mediadas pelo estresse fisiológico resultante do trauma cirúrgico, caracterizando desta forma o estresse cirúrgico (DESBOROUGH, 2000; STEVENS et al., 2019).

O estresse cirúrgico pode ocorrer antes, durante e após os procedimentos operatórios, proveniente do estresse psicológico, de lesão tecidual, de alterações vasculares, de agentes anestésicos ou mesmo de complicações pós-operatórias. Qualquer evento que venha alterar a homeostase do organismo pode ser considerado um agente estressor capaz de desenvolver reações intituladas de resposta de estresse. O estresse pode ser considerado como uma batalha pela sobrevivência, através de um ajuste fisiológico capaz de contrabalançar as condições adversas do meio e restabelecer o equilíbrio (STEVENS et al., 2019; NOGUEIRA et al., 2003; LEE; KIM, 2014).

A manutenção do equilíbrio homeostático nos sistemas biológicos é fundamental para continuidade da vida, situações traumáticas desafiam este equilíbrio. Quando ocorre uma agressão ao organismo independente do agente causador, é iniciado um complexo conjunto de respostas a partir da estimulação de vários sistemas, como o neural, endócrino e imunológico a fim de se manter a homeostase. Essa resposta metabólica é originada por fatores mediados por feridas ou infecção e tem continuidade pela liberação sistêmica de hormônios relacionados ao estresse (FARIA NETO; MENDONÇA FILHO, 2005., MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2017).

A resposta ao estresse cirúrgico envolve hormônios, citocinas, alterações na função celular e efeitos significativos sobre a neurotransmissão; é um mecanismo importante, pois evita danos secundários, protegendo órgãos essenciais. Nas cirurgias, a perda sanguínea, dor, infecção, e o jejum prolongado são fatores que podem contribuir para agravar os eventos da resposta orgânica. Maior morbidade, mortalidade e custos são relatados quando a resposta ao estresse é prolongada. Kehlet (1997) atribuiu o atraso da recuperação dos pacientes à resposta ao estresse cirúrgico que afeta adversamente a função dos órgãos após a cirurgia, assim como Desborough (2000) que relatou que a magnitude e a duração da resposta são proporcionais à lesão cirúrgica e ao desenvolvimento de complicações como sepse (MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2017; SAKUNDECH et al., 2020).

Sob condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, que pode ser facilmente desestruturado sob condições adversas. A resposta ao trauma é dependente da sua intensidade, podendo ser observada apenas uma resposta inflamatória localizada para dar início à cicatrização, em contrapartida induzir um processo inflamatório generalizado. A inflamação e a formação de radicais livres são duas constantes em cirurgia presentes em maior ou menor grau, na dependência da técnica cirúrgica escolhida e do cirurgião, que pode atenuar ou contribuir para que estes fatores levem ao desequilíbrio da homeostase (MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2017; DALMOLIN et al., 2016).

O trauma cirúrgico pode ocasionar alteração no perfil oxidativo. Níveis mais elevados de estresse oxidativo estão relacionados a técnicas mais invasivas em comparação às minimamente invasivas. O processo inflamatório é elemento-chave na evolução cirúrgica, e o estresse oxidativo é um importante contribuinte (SERIN et al., 2008; STEVENS et al.; 2019).

## **2. 2 Procedimentos cirúrgicos de esterilização em caninos**

Os procedimentos cirúrgicos de esterilização são realizados com grande frequência na prática de animais de companhia. A ovariectomia (OH) e a orquiectomia (OQ) são as técnicas cirúrgicas mais comumente utilizadas (ADIN, 2011; SHAVER; LARROSA; HOFMEISTER, 2019; URFER; KAEBERLEIN, 2019).

A esterilização é considerada a interrupção permanente da reprodução e geralmente é o objetivo na medicina veterinária de pequenos animais. Associado a essa completa interrupção da fertilidade, há uma diminuição na fisiologia e nos comportamentos reprodutivos em animais de estimação, incluindo exsudação de secreção vulvar associada ao calor nas cadelas, montagem em cães prisioneiros, marcação de território, além de ser eficaz para o controle populacional em populações de cães de vida livre, reduzindo o risco de mordidas e transmissão de doenças zoonóticas (ROOT KUSTRITZ, 2018; URFER; KAEBERLEIN, 2019).

Os procedimentos cirúrgicos de OH e OQ são utilizados rotineiramente com fins profiláticos e terapêuticos. Em fêmeas, realiza-se como parte do tratamento para afecções mediadas por hormônios gonadais, como neoplasias em glândula mamária, cistos ovarianos, pseudogestação, hiperplasia e prolapso vaginal/uterino, muco/hemo/piometra, entre outras. Em machos, como parte do tratamento para afecções andrógeno-dependentes, como hiperplasia prostática benigna, prostatite crônica, cistos e abscessos prostáticos/paraprostáticos, desordens epididimárias e testiculares como neoplasia, torção do funículo espermático, orquite e

epididimite (VOORWALD & TIOSSO, 2013), e ainda na estabilização de doenças sistêmicas, como nos casos de epilepsia e diabetes melito (HEDLUND, 2008).

Adin, em 2011, descreveu várias complicações advindas destes procedimentos como hemorragia intra-abdominal, problemas à cicatrização, remanescentes do pedículo ovariano, piometra de coto, entre outras, o que não o surpreende dada a frequência com que são realizados. Jones e colaboradores (2020) relataram um caso de dano uretral iatrogênico, uma complicação incomum, mas grave, da orquiectomia prescritiva de rotina.

O sexo foi identificado como a maior variável isolada, afetando a duração da cirurgia e anestesia. Em machos, a OQ possui natureza menos invasiva em comparação a OH em fêmeas, tendo em vista que se trata de um procedimento que é realizado com grande rapidez por uma pequena incisão pre-escrotal. Já nas fêmeas o procedimento cirúrgico tem duração e trauma cirúrgico maior devido a abertura e manipulação da cavidade abdominal, tração do pedículo ovariano e a incisão peritoneal (SHAVER; LARROSA; HOFMEISTER, 2019; QUARTERONE et al., 2017).

Vários estudiosos apontam a associação dos procedimentos cirúrgicos de esterilização e o estresse oxidativo. Lee e Kim (2014), demonstraram que que procedimentos cirúrgicos, como ovariectomia laparoscópica e aberta, aumentam o status oxidante total plasmático e o índice de estresse oxidativo e diminuem o status antioxidante total em cães. (JUODŽENTĖ, KARVELIENĖ, RIŠKEVIČIENĖ, 2018) mostraram que a separação a longo prazo do proprietário no novo ambiente ativou mecanismos de defesa antioxidante em cães aumentando os níveis de oxidantes com a diminuição dos níveis de antioxidantes. Sakundech e colaboradores em 2020, concluíram que OH causou maior dor em cadelas, estresse oxidativo e redução do poder antioxidante total.

### **2.3 Procedimentos cirúrgicos e o estresse oxidativo**

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) faz parte da biologia celular normal e pode ser observada em diversas condições fisiológicas, sejam como sinalizadores ou reguladores. As reações de oxidação/redução (redox) são fundamentais para as vias bioquímicas que conduzem o maquinário celular. As células devem manter a produção das EROs sob controle, de forma a equilibrar a formação e eliminação destas espécies, caso contrário poderá conduzir ao estresse oxidativo ( VASCONCELOS et al., 2007; STEVENS et al.; 2019; BARBOSA et al., 2010).

O estresse oxidativo (EO) é a consequência de um desequilíbrio entre a produção de

espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante total do organismo; sua propagação está relacionada ao desenvolvimento de várias doenças sistêmicas e comorbidades que podem contribuir para aumento do risco perioperatório (PECH et al., 2019; PIZZINO et al., 2017; JUODŽENTĖ; KARVELIENĖ; RIŠKEVIČIENĖ, 2018).

O EO perioperatório é uma resposta complexa que envolve fatores do paciente, cirúrgicos e anestésicos. A magnitude da lesão tecidual infligida, e a duração e a natureza do procedimento anestésico influenciam a condição. Além disso, é provável que a suscetibilidade ao impacto do estresse oxidativo nos indivíduos, seja altamente variável e potencialmente ligada a comorbidades subjacentes. O impacto dos fatores de risco pré-operatórios e a propagação intra-operatória do EO tendem a ser confirmados no pós-operatório e podem se manifestar como complicações indesejadas e danos a longo prazo ( STEVENS et al., 2019).

A produção de espécies reativas está correlacionada com processos inflamatórios, o consumo de oxigênio por macrófagos e neutrófilos ativados ocorre durante este processo, com uma superabundância de EROs. Caso este exagero não seja controlado por mecanismos antioxidantes, pode ocorrer dano tecidual (AGARWAL et al., 2005).

Campos e colaboradores em 2018, concluíram que o EO é uma condição metabólica de difícil diagnóstico em decorrência da ausência de sinais clínicos específicos. Ainda que não se manifestem clinicamente, o monitoramento de animais enfermos torna-se importante, uma vez que há correlações da injúria celular cumulativa com diversas doenças de caráter crônico-degenerativa.

Dentro deste enfoque, o presente estudo tem como objetivo avaliar os níveis de marcadores de estresse oxidativo e do sistema enzimático de defesa antioxidante no soro de caninos do hospital veterinário da Universidade Federal de Viçosa /MG, estabelecendo o perfil oxidativo no perioperatório de esterilização em machos e fêmeas.

### **3OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o nível dos marcadores de estresse oxidativo e do sistema enzimático de defesa antioxidante no soro de caninos, estabelecendo um perfil oxidativo no perioperatório de esterilização.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Quantificar a capacidade antioxidante sérica total.
- Quantificar a atividade de enzimas antioxidantes.
- Quantificar os marcadores de dano relacionados ao processo oxidativo.
- Estabelecer um perfil oxidativo dos cães machos e fêmeas no perioperatório de procedimentos de esterilização.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Desenho do estudo**

O estudo contou com a participação de caninos de raças e portes variados, provenientes da rotina cirúrgica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa/Minas Gerais. As amostras foram coletadas no período de outubro a dezembro de 2019, após a aprovação do Comissão de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV), parecer número 15/2019.

Foram incluídos cães hígidos de ambos os sexos, indicados para cirurgia eletiva de esterilização do Programa de Estratégias em Saúde Animal e Humana (PROESAH). Após autorização de seus tutores, mediante assinatura do Termo de Consentimento, os cães foram submetidos à avaliação clínica veterinária e laboratorial para indicação cirúrgica. Cães que apresentaram alterações nos exames pré-cirúrgicos, que apresentavam comorbidades ou que não tivessem autorização por parte dos tutores foram excluídos dos estudos. Os proprietários que aceitaram participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (ANEXO B).

### **4.2 Coleta de amostra biológica**

A amostra sanguínea foi coletada por punção venosa, sendo realizada por profissional veterinário devidamente habilitado. Foram coletadas em três momentos: T0 na semana anterior à cirurgia, sem jejum; T1 pré-operatório antes da tricotomia e cateterização, com animal em jejum de 12 horas e T2 uma hora após a finalização do procedimento cirúrgico. Foram coletados tubos sem anticoagulante para obtenção do soro; após retração do coágulo a amostra foi centrifugada e o soro armazenado a - 4°C, para as análises posteriores.

### **4.3 Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo**

#### **4.3.1 Capacidade sérica antioxidante total**

A quantificação da capacidade sérica antioxidante total foi baseada no método da capacidade de redução férrica (FRAP) (BENZIE et al., 1996). Para tanto, 10 µL de amostra/padrão foram adicionados a 220 µL de solução FRAP em microplacas de poliestireno,

que foram incubadas no escuro por 30 minutos. Como agente oxidante foi utilizada uma solução de Trolox, partindo de uma concentração de 2 mmol.L<sup>-1</sup>. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Multiskan GO Microplate Spectrophotometer spectrophotometer (Thermo Scientific) em comprimento de onda 570 nm. As concentrações relativas foram obtidas a partir da curva padrão, sendo os resultados expressos em µM.

#### 4.3.2 Atividade das enzimas antioxidantes

A determinação da atividade catalítica da Superóxido Dismutase (SOD) foi realizada pelo método do pirogalol baseado na capacidade da enzima de catalisar a reação do superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de acordo com Sarban e colaboradores (2005). Para isso, 30 µl de amostra foram adicionadas a 99 µl de tampão fosfato (0,1M pH 7,0), 6 µl de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (1,25 mm) e 15 µl de pirogalol (100 µM) em placa de 96 poços e incubados durante 5 minutos a 37 °C. O padrão e o branco foram feitos da mesma maneira, porém para ambos sem amostra e utilizando 129 µl e 144 µl de tampão, respectivamente. No branco não foi adicionado pirogalol. Após a incubação, foi estabelecida a reação com 150 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) (1,25 mm), e as amostras foram submetidas à leitura a 570 nm em leitor de placas (Thermo Scientific Multiskan™ GO). A atividade enzimática foi expressa em Unidades de SOD/mg de proteína.

A atividade enzimática da Catalase (CAT) foi avaliada medindo a cinética de decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de acordo com AEBI (1984). Para isso, 6 µL de amostra juntamente com 600 µL de tampão Fosfato (0,1 M e pH 7,0) foram utilizados como branco para cada amostra enquanto que, para leitura, o tampão Fosfato foi acrescido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Dessa forma, em uma cubeta de Quartzo, as amostras foram submetidas à leitura a 240 nm em espectrofotômetro, durante 60 segundos, para acompanhamento da cinética enzimática. A atividade enzimática foi expressa em Unidades de CAT/ mg de proteína.

Na determinação da atividade enzimática da Glutationa S-transferase (GST), no soro dos voluntários, foi realizada a quantificação do produto formado a partir da complexação de Glutationa reduzida (GSH) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) de acordo com o método descrito por HABIG e colaboradores (1974) e foi calculada pela taxa de oxidação de NADPH. Dessa forma, em uma cubeta de Quartzo, foram pipetados 682 µl de tampão Fosfato (0,1 M e pH 7,0) juntamente com 6 µl de CDNB (0,1 M), 6 µl de amostra e 6 µl de solução de GSH (0,1 M) e a taxa de reação da enzima presente nas amostras foi monitorada a 340 nm em espectrofotômetro, durante 90 segundos, para acompanhamento da cinética enzimática. Foi

realizado também um branco para o experimento, o qual não possui adição da amostra e foi utilizado para verificar a taxa de reações não-enzimáticas. A atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ , onde uma unidade de atividade representa a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto e por grama de amostra, nas condições do ensaio.

### 4.3.3 Marcadores de dano

Para quantificar os produtos provenientes da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular), as amostras de soro foram submetidas à reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com a metodologia de BUEGE e AUST (1978). Dessa forma, 200  $\mu\text{l}$  de cada amostra foram adicionados a 400  $\mu\text{l}$  de solução de TBARS (15% de TCA, 0,375% de TBA e 0,25M de HCL), agitados no vórtex durante 10 segundos e colocados em banho-maria, a 90 °C, durante 40 minutos. Em seguida, após resfriamento, foi efetuada a extração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico com a adição de 600  $\mu\text{l}$  de n-butanol, seguida da centrifugação a 3500 rpm, durante 5 minutos. Por fim, após centrifugação, 200  $\mu\text{l}$  dos sobrenadantes foram cuidadosamente retirados e submetidos à leitura a 535 nm. Os valores de TBARS foram expressos em  $\eta\text{mols}$  de malondialdeído (MDA)/mg de proteína.

A dosagem de proteínas carboniladas (PPTc) no soro foram determinadas de acordo com a metodologia de Levine e colaboradores (1990). Dessa forma, o precipitado obtido pela centrifugação foi ressuscitado com 1 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e este dividido em dois tubos cônicos (amostras e brancos), com 500  $\mu\text{L}$  em cada. Em seguida, ambos foram precipitados com 500  $\mu\text{l}$  de solução de TCA 10% e centrifugados a 5000 g, durante 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante descartado. Posteriormente, apenas as amostras foram incubadas em temperatura ambiente, durante 30 minutos, com 500  $\mu\text{l}$  de solução contendo 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM e HCL 2 M. Logo após, as amostras e os brancos foram novamente precipitados com TCA 10% e centrifugados, durante 10 minutos, a 5000 g. Os precipitados foram, então, lavados duas vezes com solução etanol: acetato de etila (1:1) e centrifugados a 10000 g, durante 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante descartado. Por fim, os precipitados obtidos foram ressuscitados em 1 ml de solução de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%, novamente centrifugados a 10000 g, durante 10 minutos, a 4 °C e 200  $\mu\text{l}$  dos sobrenadantes foram cuidadosamente retirados e submetidos à leitura a 370 nm em leitor de placas (Thermo Scientific-Multiskan™ GO). O conteúdo de PPTc foi expresso em  $\eta\text{mol}$  de PPTc/ml de

amostra.

#### **4.4 Análise estatística**

As variáveis analisadas apresentaram distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk, portanto, foram realizadas análises paramétricas. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, com significância estatística considerada quando  $p < 0,05$ . Para análise do tempo inicial foi utilizado o teste T e na avaliação comparativa dos três tempos foi utilizado teste one-way ANOVA pareado. O tratamento estatístico foi realizado através do programa GraphPad Prism 7.0 program (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

## 5 PRODUTO FINAL

### 5.1 Artigo Original

#### **Oxidative profile of dogs submitted to sterilization surgical procedures**

Helen Penha Gomes Pasqualon<sup>a</sup>, Patrícia de Oliveira Salgado<sup>a</sup>, Andréa Pacheco Batista Borges<sup>b</sup>, Leandro Licursi de Oliveira<sup>c</sup>, Silvia Almeida Cardoso<sup>a\*</sup>.

a Postgraduate Program Professional Master in Health Sciences, Medicine and Nursing Department. Federal University of Viçosa – Minas Gerais – Brazil.

b Postgraduate Program in Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine. Federal University of Viçosa - Minas Gerais – Brazil.

c Postgraduate Program in Cell and Structural Biology, Department of General Biology. Federal University of Viçosa - Minas Gerais – Brazil.

\*Corresponding author. Silvia Almeida Cardoso, PhD, Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa. 36570-900 - Viçosa, Brazil. E-mail: [silvia.cardoso@ufv.br](mailto:silvia.cardoso@ufv.br)

---

**Abstract**

The surgical act is an event that results in numerous organic responses and is related to the production of reactive species, which, in imbalance with the antioxidant system, contribute to oxidative stress. The deleterious effects of oxidative stress, resulting from oxidative damage, may compromise systemic functions as well as postoperative recovery. This study aimed to evaluate the level of oxidative stress markers and the enzymatic system of antioxidant defense in canine serum, establishing an oxidative profile in the perioperative sterilization. Research conducted with 18 healthy dogs of varying breeds, ages and sizes, from the surgical routine of the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa/Minas Gerais. The surgical techniques chosen to perform castration were Orchiectomy in males and Ovariohysterectomy in females. The experiment was carried out after the approval of the Animal Research Ethics Committee at the Federal University of Viçosa (CEUA-UFV) and authorization of the owners. All canines were submitted to blood collections at different times, T0 collection performed at pre-surgical examinations, T1 collection performed on the day of the surgery with the animal fasting preoperatively before trichotomy and catheterization and the T2 collection was performed 01 hour after the surgical procedure. From the serum, spectrophotometric evaluations were performed to determine the total antioxidant power (FRAP), activity of the enzymes Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Glutathione-S-transferase (GST) and quantification of the markers of damage carbonyl protein and lipid peroxidation product (MDA). The serum oxidative profile of male and female dogs, before any interference, was at similar levels. Male dogs showed a significant reduction in the activity of CAT and GST enzymes after the end of the castration procedure. Only the GST enzyme showed a significant reduction in activity in the group of female dogs after the castration procedure. Although there was no alteration in the MDA marker, resulting from lipid peroxidation, at the different times evaluated, there was a significant reduction in protein carbonylation after the anesthesia and after the end of the procedure, in the group of female dogs. Our findings demonstrate that surgical procedures for sterilization of male and female dogs induce oxidative changes. Only females showed reduction of protein carbonylation, demonstrating the impact of the surgical procedure on the oxidative profile of females during castration.

**Keywords:** Ovariohysterectomy, Orchiectomy, Oxidative stress, Castration.

## 1. Introduction

Surgical procedures are part of the hospital routine, being an event that results not only in local tissue injury, but in numerous systemic responses mediated by surgical stress (Desborough, 2000; Stevens et al., 2019).

Surgical stress may occur before, during and after surgical procedures, resulting from psychological stress, tissue injury, vascular alterations, anesthetic agents or even postoperative complications. Maintaining homeostatic balance in biological systems is critical and can be challenged in stressful situations, triggering an adaptive response, with stimulation of various systems such as neural, endocrine and immunological in order to restore the altered balance. The degree of physiological response is proportional to the magnitude of the lesion with the increased demand for organic functions (Faria Neto and Mendonça Filho, 2005; Lee and Kim., 2014; Sakundeck et al., 2020)

The response to surgical stress is a compensatory and important mechanism, because it avoids secondary damage by increasing the availability of substrates required by essential organs and scar tissues, however if the stress response is prolonged, it results in damage and higher morbidity (Medeiros and Dantas Filho, 2017; Sakundeck et al., 2020)

Surgical trauma may cause changes in the oxidative profile, depending on the magnitude of the surgery, technique used and sequelae of inflammation experienced, with high levels of oxidative stress in more invasive techniques compared to minimally invasive ones. The inflammatory process is a key element in surgical evolution, and oxidative stress is an important contributor (Serin et al., 2008; Stevens et al., 2019).

Oxidative stress is the consequence of an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROSs) and the body's total antioxidant power, if sustained, contributes to the development of various systemic lesions, slow healing, among other comorbidities that may contribute to increased perioperative risk (Pech et al., 2019; Pizzino et al., 2017; Juodžentė et al., 2018). Strongly related to surgical stress and postoperative recovery (Tsuchiya et al., 2018; Rautela and Katiyar, 2019).

Within this approach, the present study aims to evaluate the levels of oxidative stress markers and the enzymatic system of antioxidant defense in canine serum of the veterinary hospital of the Federal University of Viçosa /MG, establishing the oxidative profile in the perioperative sterilization in males and females.

## 2. Methodology

### 2.1. Study design

The study included 18 dogs of varying breeds and size, from the surgical routine of the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa/Minas Gerais. The samples were collected from October to December 2019, after the approval of the Animal Research Ethics Committee at the Federal University of Viçosa (CEUA-UFV), opinion number 15/2019.

Healthy dogs of both sexes were included, indicated for elective castration surgery of the Family Health Program at the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa (UFV). After authorization from their owners upon signing the consent form, the dogs were submitted to veterinary and laboratory clinical evaluation for surgical indication. Dogs that presented alterations in pre-surgical examinations, who presented comorbidities or who were not authorized by the owners were excluded from the studies.

### 2.2. Collection of biological sample

The blood samples were collected by venipuncture, being performed by a veterinarian duly qualified. They were collected in three moments: T0 on the day before surgery, without fasting; T1 preoperatively before trichotomy and catheterization, with the animal fasting and T2 one hour after the completion of the surgical procedure. Tubes without anticoagulant were collected to obtain the serum, after clot retraction the sample was centrifuged and the serum stored at  $-4^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

### 2.3. Evaluation of markers of oxidative stress

#### 2.3.1. Total serum antioxidant power

The quantification of total serum antioxidant power was based on the method of ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benie et al., 1996). For this, ten  $\mu\text{L}$  of sample/standard were added to 220  $\mu\text{L}$  of FRAP solution in polystyrene microplates, which were incubated in the dark for 30 minutes. A Trolox solution was used as an oxidizing agent beginning with a concentration of  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ . The readings were performed on the Multiskan GO Microplate

Spectrophotometer (Thermo Scientific) at wavelength of 570 nm. The relative concentrations were obtained from the standard curve and the results were expressed in  $\mu\text{M}$ .

### 2.3.2. Activity of antioxidant enzymes

The determination of the catalytic activity of SOD was performed by the pyrogallol method based on the ability of the enzyme to catalyze the reaction of superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) and hydrogen peroxide, according to Sarban et al. (2005). For this, 30  $\mu\text{l}$  of sample were added to 99  $\mu\text{l}$  of phosphate buffer (0.1M pH 7.0), 6  $\mu\text{l}$  of MTT (1.25 mM) and 15  $\mu\text{l}$  of pyrogallol (100  $\mu\text{M}$ ) in 96-well plate and incubated for 5 minutes at 37°C. The standard and white were made in the same way, but, for both, without sample and using 129  $\mu\text{l}$  and 144  $\mu\text{l}$  of buffer, respectively. In the white, pyrogallol was not added. After incubation, the reaction with 150  $\mu\text{l}$  of DMSO (1.25 mM) was established and the samples were submitted to reading at 570 nm in a plate reader (Thermo Scientific Multiskan™ GO). Enzyme activity was expressed in SOD units per mg of protein.

The enzymatic activity of Catalase was evaluated by measuring the kinetics of  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposition, according to AEBI (1984). For this, 6  $\mu\text{L}$  of sample together with 600  $\mu\text{L}$  of Phosphate buffer (0.1 M and pH 7.0) were used as white for each sample, while, for reading, the Phosphate buffer was received  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). Thus, in a Quartz cuvette, the samples were submitted to 240 nm reading in a spectrophotometer for 60 seconds to monitor the enzymatic kinetics. The enzymatic activity was expressed in Catalase Units per mg of protein.

In the determination of the enzymatic activity of Glutathione S-transferase, in the serum of the volunteers, the quantification of the product formed from the complexation of reduced glutathione (GSH) with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was performed according to the method described by HABIG et al. (1974) and was calculated by the oxidation rate of NADPH. So, in a quartz cuvette, 682  $\mu\text{l}$  of Phosphate buffer (0.1 M and pH 7.0) were pipetted together with 6  $\mu\text{l}$  of CDNB (0.1 M), 6  $\mu\text{l}$  of sample and 6  $\mu\text{l}$  of GSH solution (0.1 M) and the reaction rate of the enzyme present in the samples was monitored at 340 nm in a spectrophotometer, for 90 seconds, to monitor enzymatic kinetics. A white was also performed for the experiment, which has no addition of the sample and was used to verify the rate of non-enzymatic reactions. The enzymatic activity was expressed in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ , where a unit of activity represents the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1  $\mu\text{mol}$  of product per minute and per gram of sample, under the conditions of the assay.

### 2.3.3. Markers of damage

To quantify the products derived from lipid peroxidation (lipid peroxides, malondialdehydes and other aldehydes of low molecular weight), the serum samples were submitted to reaction with thiobarbituric acid (TBARS), according to the methodology of BUEGE and AUST (1978). Thus, 200  $\mu$ l of each sample were added to 400  $\mu$ l of TBARS solution (15% of TCA, 0.375% of TBA and 0.25M of HCL), stirred in the vortex for 10 seconds and placed in bain-marie, at 90°C, for 40 minutes. Then, after cooling, thiobarbituric acid reactive substances were extracted with the addition of 600  $\mu$ l of n- butanol, followed by centrifugation at 3500 rpm for 5 minutes. Finally, after centrifugation, 200  $\mu$ l of the supernatants were carefully removed and submitted to reading at 535 nm. TBARS values were expressed in malondialdehyde (MDA)  $\eta$ mols per mg of protein.

The dosage of carbonyl proteins in the serum were determined according to the methodology of Levine et al. (1990). Thus, the precipitate obtained by centrifugation was re-suspended with 1 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), which was divided into two conical tubes (samples and whites), with 500  $\mu$ L in each. Then, both were precipitated with 500  $\mu$ l of 10% TCA solution and centrifuged at 5000 g for 10 minutes at 4°C, being the supernatant discarded. Subsequently, only the samples were incubated at room temperature for 30 minutes, with 500  $\mu$ l of solution containing 2.4- dinitrophenylhydrazine 10mM 18 and HCL 2M. Soon after, the samples and whites were precipitated again with TCA 10% and centrifuged for 10 minutes at 5000 g. The precipitates were then washed twice with ethanol solution: ethyl acetate (1:1) and centrifuged at 10000 g, for 10 minutes, at 4°C and the supernatant was discarded. Finally, the precipitates obtained were re-suspended in 1 ml of SDS 6% solution, again centrifuged at 10000 g, for 10 minutes, at 4°C and 200  $\mu$ l of the supernatants were carefully removed and submitted to reading at 370 nm in plate reader (Thermo Scientific- Multiskan™ GO). The content of carbonyl proteins was expressed in  $\eta$ mol of carbonyl proteins per ml of sample.

### 2.4. Statistical analysis

The variables analyzed presented normal distribution in the Shapiro-Wilk test, thus, parametric analyses were performed. The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation, with statistical significance considered when  $p < 0.05$ . For the initial time analysis, the T test was used and in the comparative evaluation of the three times, a one- way paired ANOVA

test was used. Statistical treatment was performed through the GraphPad Prism 7.0 program (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

### 3. Results

#### 3.1. Characterization of the population studied

In the present study, 18 healthy dogs from the surgical routine of the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa were included, able to perform the surgical procedures of castration. Among the selected dogs, 10 are females and 08 males, with ages ranging from 06 months to 5 years, without significant difference between the two groups ( $p=0.5502$ ). In both groups, the majority had undefined breed (UDB), with an average weight of 14.7 kg for males and 9.84 kg for females, with no significant difference ( $p=0.1672$ ) (Table 1).

**Table 1**  
Characteristics of the animals submitted to castration.

	Sex	Breed	Weight (Kg)	Age Months
1	M	UDB	17.40	73
2	M	UDB	6.60	17
3	M	Pit Bull	11.80	06
4	M	UDB	20.00	60
5	M	UDB	18.00	24
6	M	UDB	5.00	38
7	M	UDB	21.5	36
8	M	UDB	17.00	36
Mean $\pm$ SD			14.7 $\pm$ 6.61	36.25 $\pm$ 21.89
9	F	Pinscher	3.40	12
10	F	German Sheppard	18.00	60
11	F	Yorkshire	3.90	12
12	F	UDB	6.90	12
13	F	UDB	6.90	12
14	F	Lhasa Apso	4.00	60
15	F	UDB	22.00	24
16	F	UDB	2.30	24
17	F	UDB	10.00	24
18	F	German Sheppard	21.00	60
Mean $\pm$ SD			9.84 $\pm$ 7.63	30 $\pm$ 21.35

#### 3.2. Evaluation of baseline oxidative profile without fasting

At first, the baseline oxidative profile of the animals of both sexes at T0 was evaluated by determining the total ferric reducing antioxidant power (FRAP), the activity of antioxidant

enzymes (SOD, CAT and GST) and the quantification of oxidative damage markers (PPTc and MDA) (Table 2).

**Table 2**

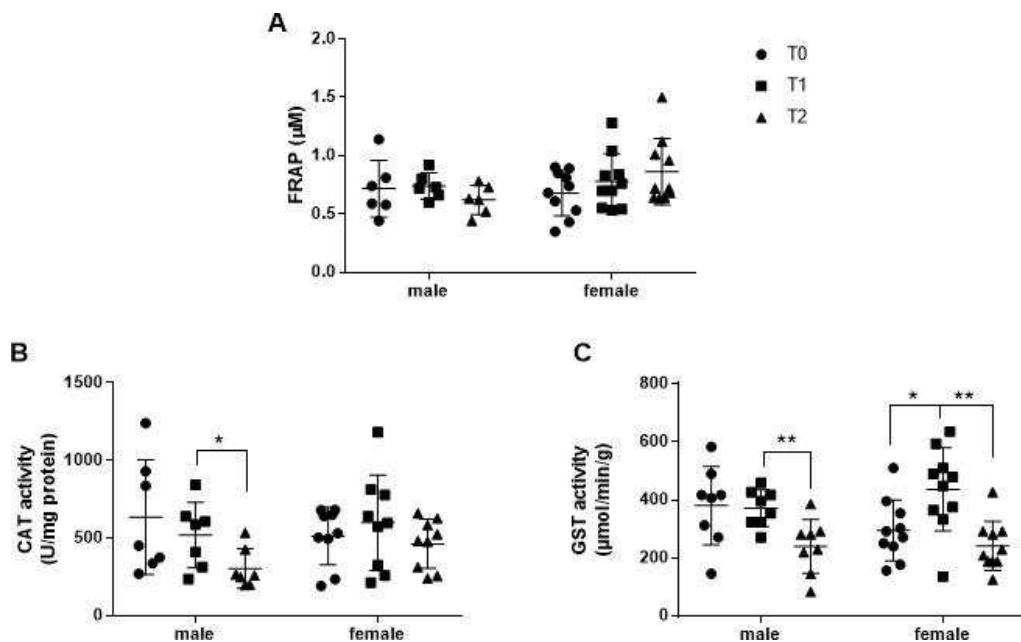
Serum oxidative profile of dogs before the surgery (T0).

	Male	Female	p
	Mean±SD		
FRAP	0.7167±0.245	0.679±0.195	>0.9999
CAT	634.286±369.498	511.653±184.843	0.9105
GST	389.208±135.245	284.791±104.866	0.5652
MDA	0.253±0.056	0.25±0.047	0.9931
PPTc	19.191±8.187	19.971±3.648	0.9997

As shown in Table 2, the serum oxidative profile of dogs of both sexes at T0, before any interference, does not present significant difference. All markers evaluated were quantified at similar levels in the serum of males and females.

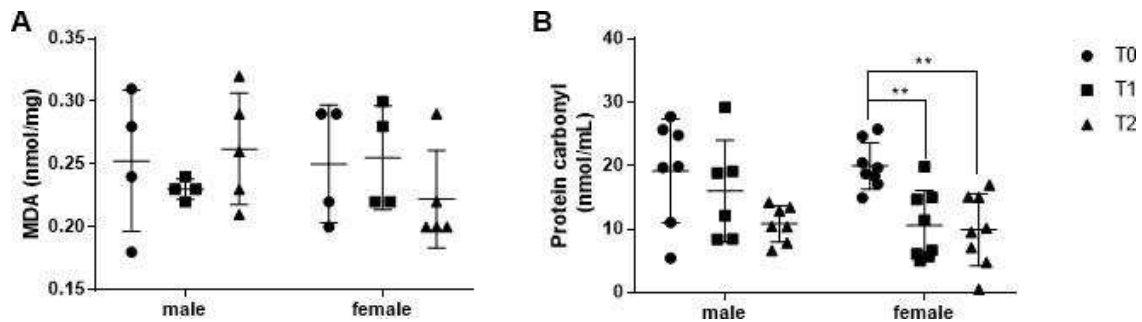
### 3.3. Evaluation of the anesthetic and surgical effect on the oxidative profile

Total serum antioxidant power (FRAP) was quantified at similar levels in both groups at all times evaluated (Figure 1A). Male dogs showed a significant reduction in catalase enzyme activity at T2 compared to T1 (Figure 1B). Similarly, a significant reduction in T2 was observed compared to T1, of the activity of the GST enzyme, in the group of male animals. As well as significant reduction of GST activity at T0 and T2 when compared to activity at T1 (Figure 1C). Both groups did not present serum detectable amounts of the antioxidant enzyme Superoxide Dismutase (SOD) at all collection times evaluated.



**Fig. 1.** Detection of total serum antioxidant power and serum enzymatic activity. Evaluation of FRAP (A), Catalase (CAT) (B) and Glutathione-S-transferase (GST) (C) at the collection times (T0, T1 and T2) in the serum of male (n = 8) and female dogs (n = 10). \* p<0.05 and \*\* p<0.01 in one-way paired ANOVA test.

Regarding the markers of tissue damage resulting from oxidative stress, lipid peroxidation and carbonyl protein were quantified. The MDA marker resulting from lipid peroxidation showed no statistical difference between the groups at the different times evaluated. There was a significant reduction in protein carbonylation in the female dogs group at T1 and T2 compared to T0.



**Fig. 2.** Quantification of tissue damage markers. Evaluation of lipid peroxidation determined by MDA (A) and carbonyl proteins (PPTc) (B), at collection times (T0, T1 and T2) in the serum of male (n=8) and female dogs (n=10). \*\* p<0.01 in one-way paired ANOVA test.

#### 4. Discussion

Surgical sterilization procedures are performed with great frequency in the practice of companion animals. Ovariohysterectomy (OH) and orchietomy (OC) are the most commonly used surgical techniques (Adin, 2011). OH and OC surgical procedures are routinely used for prophylactic and therapeutic purposes. In females, for diseases mediated by gonadal hormones, such as neoplasms in the mammary gland, ovarian cysts, pseudopregnancy, hyperplasia and vaginal/uterine prolapse, mucus/hemo/pyometra, among others. In males, for androgen-dependent disorders such as benign prostatic hyperplasia, chronic prostatitis, prostatic/paraprostatic cysts and abscesses, epididymal and testicular disorders such as neoplasm, spermatic funiculus torsion, orchitis and epididymitis (Voorwald and Tiosso, 2013),

Adin, in 2011, described several complications arising from these procedures, which are not surprising given the frequency with which they are performed. Inflammation and the formation of free radicals are two constants in surgical processes, present to a greater or lesser degree, depending on the chosen surgical technique and the surgeon, which can attenuate or contribute to these factors, leading to homeostasis imbalance (Dalmolin et al., 2016). The sex was identified as the largest variable alone, affecting the duration of surgery and anesthesia. In males, OC is less invasive compared to OH in females, considering that it is a procedure that is performed very quickly by a small prescrotal incision. In females, the surgical

procedure has longer duration and surgical trauma due to the opening and manipulation of the abdominal cavity, traction of the ovarian pedicle and peritoneal incision (Quarterone et al., 2017; Shaver et al., 2019;). In the present study, 18 dogs able to undergo sterilization surgery from the hospital surgical routine of the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa were selected, participants of extension activity that aims to provide veterinary service in the Family Health Program in poor neighborhoods. Although the groups of male and female animals are composed of animals of different breeds and variable ages, there was no significant difference in weight and age between the two groups. Adin (2011) suggests that there are differences related to age, sex and breed in dogs, which can impact on the predisposition to some diseases. Another study related age increase with oxidative damage and inflammation, where elderly dogs have reduced ability to respond to intracellular oxidative stress (Alexander et al., 2018). However, the evaluation of the oxidative profile of the two groups of dogs at T0 demonstrated similar levels of all markers evaluated, both in males and females, before preoperative fasting, anesthesia and surgical procedure.

According to Baysal et al. (2009), surgical trauma is associated with increased oxidant production and decreased antioxidant mechanisms. The postoperative period is accompanied by a series of metabolic alterations that involve compensatory response to surgical stress (Adin, 2011). Metabolism of anesthetic agents, hypothermia due to blood loss and tissue manipulation during surgery are the factors that result in oxidative damage to the body (Rautela and Katiyar, 2019).

In our study, we did not observe a significant difference in total serum antioxidant power between the two groups at all times evaluated. Regarding the serum antioxidant enzymes, the males showed a significant decrease in CAT and GST activity at the final time T2 compared to T1. The group of females also showed a reduction in GST activity at the final T2 time compared to T1 after anesthesia. For Pari and Murugan (2007), the reduction in the activity of antioxidant enzymes, such as catalase, may occur due to its excessive use in the removal of free radicals, leading to enzyme exhaustion. Mogheiseh et al. (2019) also describe reduced CAT activity after castration in male dogs. Sakundeck et al. (2020), when evaluating female dogs before, during and after castration procedures, observed that the CAT activity was not significantly altered over the experimental period, however the total antioxidant power after 14 days was significantly higher than in the preoperative period and other times of the experimental period.

Male dogs and cats submitted to orchiectomy required less postoperative analgesic intervention than female dogs and cats submitted to ovariohysterectomy (Quarterone et al., 2017). Open procedures are involved with higher production of reactive oxygen species

(ROs), due to large incisions, intestinal manipulation and inflammatory cell activation (Souza et al., 2003). These changes result in oxidative stress at the cellular level, characterized by reduced activity of the antioxidant defense system and increased production of ROs (Juodžentė et al., 2018). Oxidative stress can result in cellular damage, the secondary product of MDA lipid peroxidation is derived from the rupture of polyunsaturated fatty acids, being considered a general potential biomarker of lipid oxidative damage in plasma (Vasconcelos et al., 2007).

In our study, we did not observe changes in the levels of MDA induced by pre-anesthetic fasting and the surgical process compared to T0 for both sexes. Similarly, Sakundeck et al. (2020), did not observe changes in MDA levels in the preoperative period and 3 hours after the castration procedure in female dogs. In this study, there was an increase in MDA levels only 3 days after the procedure, differing from a study with male dogs, in which there was a significant increase in MDA during the castration procedure (Mogheiseh et al., 2019).

Proteins are the most abundant cellular constituents, which makes them important targets of ROs and markers of oxidative stress (Dalle-Donne et al. 2006). Our data demonstrate a significant reduction in the quantification of carbonyl proteins in females at T1 and T2 compared to T0, while in the group of males there was no change at the three times evaluated, differing from a study that suggests an increase in protein carbonylation in females 30 days after OH compared to the values before surgery (Szczubial et al., 2015).

## **5. Conclusion**

Our data suggest that surgical procedures for sterilization induce changes in the oxidative profile of male and female dogs. We observed significant consumption of antioxidant enzymes after the procedure in both groups. Although only GST consumption was observed in the female group, it seems to have been adequate for the control and prevention of oxidative damage, since, after anesthesia and procedure, there was a significant reduction in carbonylation of serum proteins. Our data reinforce the concept that surgical procedures for castration result in changes in the oxidative profile in both male and female dogs, suggesting the importance of evaluating the oxidative profile in animals submitted to more invasive surgeries or even animals with previous comorbidities.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte da dissertação de mestrado profissional de Helen Penha Gomes Pasqualon pela Universidade Federal de Viçosa – UFV.

## References

- Adin, C.A., 2011. Complications of ovariohysterectomy and orchietomy in companion animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 41, 5, 1023-1039. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.05.004>.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Alexander, J.E., Colyer, A., Haydock, R.M., Hayek, M.G., 2018. Understanding How dogs age: longitudinal analysis of markers of inflammation, immune function, and oxidative stress. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 73, 6, 720-728. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx182>.
- Baysal, Z., Togrul, T., Aksoy, N., Cengiz, M., Celik, H., Boleken, M.E., Kaya, M., Yavuz, G., 2009. Evaluation of total oxidative and antioxidative status in pediatric patients undergoing laparoscopic surgery. *J. Pediatr. Surg.* 44, 7, 1367-1370. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2008.11.031>.
- Dalmolin, F., Lhamas, C.L., Pinto Filho, S.T.L., Feranti, J.P.S., Poerschke, A., Beck, R.C., Abdalla, F.H., Andrade, C.M., Brun, M.V., 2016. Biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em cadelas submetidas à ovário-histerectomia videoassistida ou convencional. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 68, 3, 687-694. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8276>.
- Desborough, J.P., 2000. The stress response to trauma and surgery. *Br. J. Anaesth.* 85, 1, 109-117. <https://doi.org/10.1093/bja/85.1.109>.
- Faria Neto, H.C., Mendonça Filho, H.T.F., 2005. Resposta neuroendócrina em cirurgia, in: Marques, R.G., Técnica operatória e cirurgia experimental. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 23-33.
- Juodžentė, D., Karvelienė, B., Riškevičienė, V., 2018. The influence of the duration of the preoperative time spent in the veterinary clinic without the owner on the psychogenic and oxidative stress in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 80, 7, 1129-1133. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0066>.
- Lee, J.Y., Kim, M.C., 2014. Comparison of oxidative stress status in dogs undergoing laparoscopic and open ovariectomy. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 2, 273-276.

<https://dx.doi.org/10.1292%2Fjvms.13-0062>.

- Medeiros, A.C., Dantas Filho, A.M., 2017. Metabolic response to trauma. *J. Surg. Cl. Res.* 8, 1, 56-76. <https://periodicos.ufrn.br/jsr/article/download/13036/8923/>
- Mogheiseh, A., Koohi, F., Nazifi, S., Tabrizi, A.S., Taheri, P., Salavati, S., 2019. Oxidative-antioxidative status and hepatic and renal factors following melatonin administration in castrated and intact dogs. *Basic Clin. Androl.* 29, 14. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12610-019-0094-6>
- Pari, L., Murugan, P., 2007. Tetrahydrocurcumin prevents brain lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Med. Food.* 10, 2, 323-329. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.058>.
- Pech, L.G.M., Caballero-Chacón, S.D.C., Guarner-Lans, V., Díaz-Díaz, E., Gómez, A.M., Pérez-Torres, I., 2019. Effect of oophorosalphingo-hysterectomy on serum antioxidant enzymes in female dogs. *Sci. Rep.* 9, 1, 9674-9686. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46204-w>.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxi. Med. Cell. Longev.* 2017, 8416763. <https://dx.doi.org/10.1155%2F2017%2F8416763>.
- Quarterone, C., Luna, S.P.L., Crosignani, N., Oliveira, F.A., Lopes, C., Lima, A.F.M., Aguiar, A.J.A., 2017. Ovariohysterectomy requires more post-operative analgesia than orchietomy in dogs and cats. *Can. Vet. J.* 58, 11, 1191–1194.
- Rautela, R., Katiyar, R., 2019. Review on canine pyometra , oxidative stress and current trends in diagnostics. *Asian Pac. J. Reprod.* 8, 2, 45-55. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.254645>.
- Sakundech, K., Chompoosan, C., Tuchpramuk, P., Boonsorn, T., Aengwanich, W., 2020. The influence of duration on pain stress, oxidative stress, and total antioxidant power status in female dogs undergoing ovariohysterectomy. *Vet. World.* 13, 1, 160-164. <https://dx.doi.org/10.14202%2Fvetworld.2020.160-164>.
- Serin, G., Kiral, F., Serin, I., 2008. Acute effect of ovariohysterectomy on lipid peroxidation and some antioxidant levels in dogs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 52, 251-253. <https://pdfs.semanticscholar.org/66d8/9da354b61eb8a65aae08ab3d77f1bea2b63e.pdf>.
- Shaver, S.L., Larrosa, M., Hofmeister, E.H., 2019. Factors affecting the duration of anesthesia and surgery of canine and feline gonadectomies performed by veterinary students in a year-long preclinical surgery laboratory. *Vet. Surg.* 48, 3, 352-359. <https://doi.org/10.1111/vsu.13163>.
- Stevens, J.L., Feelisch, M., Martin, D.S., 2019. Perioperative oxidative stress: the unseen enemy. *Anesth. Analg.* 129, 6, 1749-1760. <https://doi.org/10.1213/ane.0000000000004455>.
- Szczubial, M., Kankofer, M., Bochniarz, M., Dąbrowski, R., 2015. Effects of

ovariohysterectomy on oxidative stress markers in female dogs. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 3, 393-399. <https://doi.org/10.1111/rda.12501>.

Tsuchiya, M., Shiimoto, K., Mizutani, K., Fujioka, K., Suehiro, K., Yamada, T., Sato, E.F., Nishikawa, K., 2018. Reduction of oxidative stress a key for enhanced postoperative recovery with fewer complications in esophageal surgery patients Randomized control trial to investigate therapeutic impact of anesthesia management and usefulness of simple blood test for prediction of high-risk patients. *Medicine (Baltimore)*. 97, 47, e12845. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000012845>.

Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.F., Manfredini, V., Benfato, M.S., Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím. Nova*. 30, 5, 1323-1338. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>.

Voorwald, F.A., Tiosso, C.D.F., Toniollo, G.H., 2013. Prepubertal gonadectomy in dogs and cats. *Ciênc. Rural*. 43, 6, 1082-1091. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013005000059>.

## 5.2 Produto Técnico – Livreto: Estresse Oxidativo e sua relação com a saúde



Produto Técnico - Livreto explicativo - Capa



## Sumário

Entendendo o Estresse Oxidativo	1
➤ Espécies Reativas e Radicais Livres	1
➤ Estresse Oxidativo	2
Sua Importância na Saúde	3
➤ Devemos nos preocupar com o Estresse Oxidativo?	3
Estresse Oxidativo e os Profissionais de Saúde	4
Benefícios do controle do Estresse Oxidativo	5

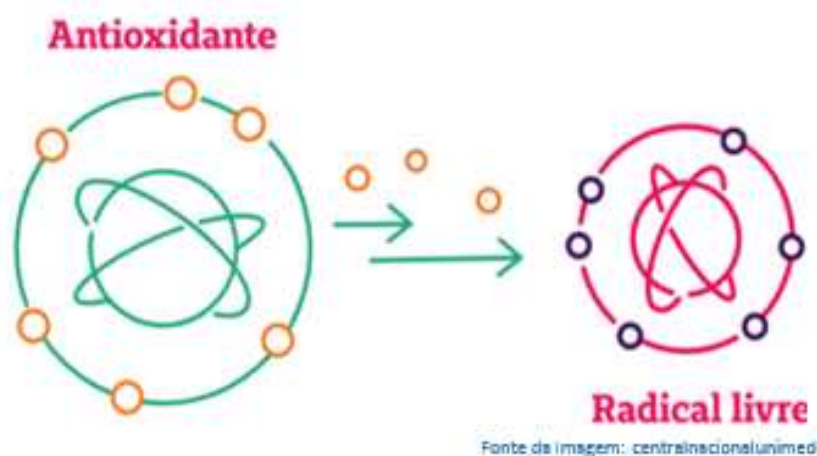
## Entendendo o Estresse Oxidativo

### Espécies Reativas e Radicais Livres

As espécies reativas são moléculas instáveis que possui uma grande capacidade de interação com outras moléculas, elas se apresentam na forma de radicais livres e/ou espécies não radicais.

Chamamos de radicais livres as moléculas que possuem uma deficiência de elétron na sua camada mais externa. Esta característica lhe confere uma reatividade ainda maior.

Ex: OH (hidroxila), O<sub>2</sub> (superóxido), NO (óxido nítrico) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio).

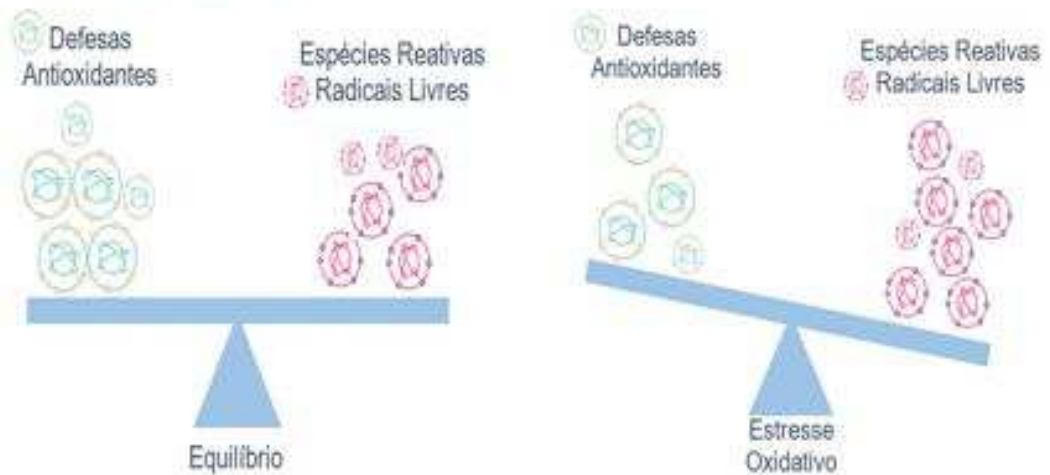


## Estresse Oxidativo



Fonte da Imagem: [scientificillustration1 - Oxidative Stress](#)

Em condições orgânicas normais, existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e o seu controle pelos sistemas antioxidantes existentes em nosso organismo. Quando de alguma forma este equilíbrio é estremecido, surge uma condição que denominamos de Estresse Oxidativo.



Fonte da Imagem: Adaptado – [centralnacionalummed](#) e [MIRON, V.V. 2018](#)

## Sua importância na saúde



Fonte da Imagem: Gettyimages. Código: 516251943

## Devemos nos preocupar com o Estresse Oxidativo?

Sim, o estresse oxidativo é capaz de causar lesões aos constituintes celulares como: lipídeos, proteínas e até mesmo ao DNA.

O estresse oxidativo está presente e/ou associado a:

- ✓ Várias patologias, com sua progressão e prognósticos: diabetes, artrite, câncer, doenças respiratórias, doenças degenerativas do SNC, etc.
- ✓ A falência de múltiplos órgãos: rins, coração, fígado, etc.
- ✓ Complicações cirúrgicas e pós cirúrgicas: necrose, infecção hospitalar, retardo na cicatrização, sepse, postergação da estadia hospitalar, resistência insulínica, etc.

---

## Estresse Oxidativo e os Profissionais de saúde



A compreensão da gênese e da epidemiologia do estresse oxidativo por médicos, médicos veterinários e outros profissionais é essencial para o seu controle.



Na rotina dos consultórios os profissionais devem incentivar ações que interfiram diretamente no controle das condições oxidativas, como por exemplo a alimentação saudável, atividade física regular, controle de enfermidades preexistentes.



Na rotina cirúrgica, os cirurgiões devem estar atentos as comorbidades preexistentes, buscar técnicas cirúrgicas capazes de reduzir injúrias desnecessárias, controle adequados da dor e atenção aos cuidados pós-operatórios. Já os anestesiologistas, devem se atentar a escolha dos anestésicos, quantidade de oxigênio utilizada durante o procedimento cirúrgico e sua duração.

## Benefícios do controle do Estresse Oxidativo

- Diminuição da morbimortalidade;
- Redução de doenças crônicas e degenerativas;
- Redução do tempo de internação, infecções hospitalares e complicações pós cirúrgicas;
- Aumento da expectativa e qualidade de vida.

*Ao otimizar os cuidados levando em consideração os efeitos deletérios do estresse oxidativo, contribuimos de forma ativa e a longo prazo na saúde e bem-estar dos pacientes.*



Fonte da Imagem: Gettyimages. Código: 1129448368



Produto Técnico - Livreto explicativo - Contra Capa

## 6 CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem que procedimentos cirúrgicos para esterilização, induzem alterações no perfil oxidativo, em cães machos e fêmeas. Observamos redução significativa na atividade de enzimas antioxidantes após o procedimento nos dois grupos. Embora apenas a redução da enzima GST tenha observado no grupo de fêmeas, esse grupo apresentou redução significativa na carbonilação de proteínas séricas, demonstrando um controle adequado de danos oxidativos. Nossos achados reforçam a importância da avaliação do perfil oxidativo em animais, com ênfase naqueles que serão submetidos a cirurgias mais invasivas ou mesmo animais com comorbidades.

Foi realizada a construção de um livreto explicativo com a finalidade de informar os profissionais de saúde e estudantes, a respeito do estresse oxidativo e a saúde do paciente, bem como seu envolvimento com várias patologias, estratégias e papel dos profissionais no seu controle.

## 7 REFERÊNCIAS

- AGARWAL AS, GUPTA, SHARMA RK. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol**. p. 3-28, 2005.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BUEGE JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**. 1978;52:302-10.
- CAMPOS, M. T. G.; LEME, F. DE O. P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **Pubvet**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2018.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- HEDLUND, C. S. Cirurgias do sistema reprodutivo e genital. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 26, p.702-774.
- JONES, S. A.; LEVY, N. A.; PITT, K. A. Iatrogenic Urethral Trauma During Routine Prescrotal Orchiectomy in a Dog. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 40, p. 100435, 2020.
- KEHLET, H. Multimodal approach to control postoperative pathophysiology and rehabilitation. **British Journal of Anaesthesia**, v. 78, n. 5, p. 606–617, 1997.
- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**. 1990;186:464-478.
- NOGUEIRA, L. C. et al. Efeitos do jejum alimentar pré-cirúrgico sobre a glicemia e o período de recuperação anestésica em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 20–25, 2003.
- ROOT KUSTRITZ, M. V. Population Control in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 48, n. 4, p. 721–732, 2018.
- SARBAN, S., Kocyigit, A., Yazar, M., Isikan, U.E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities inpatients with rheumatoid arthritisand osteoarthritis. **Clin. Biochem**, v. 38, p. 981–986, 2005
- URFER, S. R.; KAEBERLEIN, M. Desexing Dogs: A Review of the Current Literature. **Animals**, v. 9, n. 12, p. 1086, 5 dez. 2019.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

## ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo

### Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	PREVET_2020_666
<b>Title</b>	Oxidative profile of dogs submitted to sterilization surgical procedures
<b>Article type</b>	Research Paper

#### Abstract

The surgical act is an event that results in numerous organic responses and is related to the production of reactive species, which, in imbalance with the antioxidant system, contribute to oxidative stress. The deleterious effects of oxidative stress, resulting from oxidative damage, may compromise systemic functions as well as postoperative recovery. This study aimed to evaluate the level of oxidative stress markers and the enzymatic system of antioxidant defense in canine serum, establishing an oxidative profile in the perioperative sterilization. Research conducted with 18 healthy dogs of varying breeds, ages and sizes, from the surgical routine of the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa/Minas Gerais. The surgical techniques chosen to perform castration were Orchiectomy in males and Ovariohysterectomy in females. The experiment was carried out after the approval of the Animal Research Ethics Committee at the Federal University of Viçosa (CEUA-UFV) and authorization of the owners. All canines were submitted to blood collections at different times, T0 collection performed at pre-surgical examinations, T1 collection performed on the day of the surgery with the animal fasting preoperatively before trichotomy and catheterization and the T2 collection was performed 01 hour after the surgical procedure. From the serum, spectrophotometric evaluations were performed to determine the total antioxidant power (FRAP), activity of the enzymes Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Glutathione-S-transferase (GST) and quantification of the markers of damage carbonyl protein and lipid peroxidation product (MDA). The serum oxidative profile of male and female dogs, before any interference, was at similar levels. Male dogs showed a significant reduction in the activity of CAT and GST enzymes after the end of the castration procedure compared to the T1 time. Only the GST enzyme showed a significant reduction in activity in the group of female dogs after the castration procedure. Although there was no alteration in the MDA marker, resulting from lipid peroxidation, at the different times evaluated, there was a significant reduction in protein carbonylation at T1 and T2 in the group of female dogs. Our findings demonstrate that surgical procedures for sterilization of male and female dogs induce oxidative changes. Only females showed reduction of protein carbonylation, demonstrating the impact of the surgical procedure on the oxidative profile of females during castration.

<b>Keywords</b>	Ovariohysterectomy; Orchiectomy; Oxidative stress; Castration.
<b>Corresponding Author</b>	Silvia Almeida Cardoso
<b>Corresponding Author's Institution</b>	Universidade Federal de Viçosa-UFV
<b>Order of Authors</b>	Helen Pasqualon, Patrícia Salgado, Andréia Borges, Leandro Licursi de Oliveira, Silvia Almeida Cardoso

### Submission Files Included in this PDF

#### File Name [File Type]

Cover letter.doc [Cover Letter]

original article.docx [Manuscript File]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

### Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:  
data can be shared if requested

August 02, 2020

Dear Editor,

I am pleased to submit the manuscript entitled "***Oxidative profile of dogs submitted to sterilization surgical procedures***" to be considered for publication.

We believe the subject will be of interest to the audience of **Preventive Veterinary Medicine**. The manuscript describes the oxidative effect in the perioperative. We demonstrated that the serum oxidative profile of male and female dogs, before any interference, was at similar levels. Male dogs showed a significant reduction in the activity of CAT and GST enzymes after the end of the castration procedure. Only the GST enzyme showed a significant reduction in activity in the group of female dogs after the castration procedure. Although there was no alteration in the MDA marker, resulting from lipid peroxidation, at the different times evaluated, there was a significant reduction in protein carbonylation after the anesthesia and after the end of the procedure. Our findings demonstrate that surgical procedures for sterilization of male and female dogs induce oxidative changes. Only females showed reduction of protein carbonylation, demonstrating the impact of the surgical procedure on the oxidative profile of females during castration.

This manuscript describes original work and is not under consideration by any other journal. All authors had substantial contributions in this research and participated sufficiently in the work to take public responsibility for their content. This research was performed with approval of the Animal Research Ethics Committee at the Federal University of Viçosa (CEUA-UFV), number 15/2019. There are no conflicts of interest in this work. We deeply appreciate your consideration of our manuscript, and we look forward to receiving comments from the reviewers. If you have any queries, please don't hesitate to contact me.

Sincerely,

Silvia Almeida Cardoso (silvia.cardoso@ufv.br)

**ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O HVT-UFV

Eu \_\_\_\_\_  
portador do RG n°: \_\_\_\_\_, telefone: \_\_\_\_\_,  
endereço: \_\_\_\_\_,  
tutor/responsável pelo animal: \_\_\_\_\_,  
espécie: \_\_\_\_\_, raça: \_\_\_\_\_, sexo \_\_\_\_\_ registrado no  
HVT sob o número \_\_\_\_\_, autorizo a participação do animal como sujeito de  
pesquisa para fins científicos pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa.

Após esclarecimentos prévios, estou ciente da participação do animal no projeto, **“Perfil Oxidativo de cães submetidos a procedimentos cirúrgicos de esterilização”** assim como a utilização dos resultados dessa pesquisa em publicação de artigos científicos e divulgação em eventos científicos. Para fins de publicações e apresentações científicas, a identidade do tutor/responsável e do animal serão preservadas. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEAU/UFV sob o protocolo nº15/2019.

Informo que a qualquer momento poderei suspender a participação do animal/paciente na pesquisa e caso isso ocorra, o mesmo não sofrera prejuízos em seu tratamento ou retorno a esta instituição. Estou ciente que não serei gratificado monetariamente e que não receberei qualquer outro benefício pela participação na pesquisa.

Poderei receber mais informações sobre esta pesquisa caso deseje, e também poderei esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

Fui informado dos riscos específicos ao paciente durante a realização do estudo em si e que todos os procedimentos serão realizados sob a supervisão Médico Veterinário.

Concordo em seguir corretamente todas as recomendações dos profissionais do HVT-UFV durante e após a utilização do animal e, caso haja qualquer dano ao paciente referente ao não cumprimento dessas recomendações, não responsabilizarei o HVT-UFV, tampouco seus servidores e estudantes, pelo evento.

---

Assinatura do Tutor/Responsável

---

Assinatura do Pesquisador