

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**TRATAMIENTO CON RESVERATROL EN RATONES DIABÉTICOS TIPO I:
PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y COMPORTAMENTALES**

por

Maira DA CUÑA

Victoria ACOSTA

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Trabajo experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2020

T6
969

PÁGINA DE APROBACIÓN

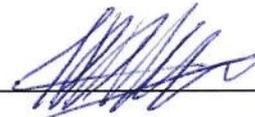
Tesis de Grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dra. Claudia Della Cella

Segundo miembro (Tutor):



Dr. Juan Pablo Damián

Tercer miembro:



Dra. Paula Pessina

Cuarto miembro (Co-tutor):



Dr. Juan Claudio Benech

Fecha:

30 de Noviembre 2020

Autores:

Br. Maira Da Cuña



Br. Victoria Acosta

SIA505 Donacion comision bsocarp 2020

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias y parejas, por el apoyo incondicional brindado desde siempre, por habernos incentivado y acompañado durante todo el trayecto universitario, respaldándonos en cada obstáculo y disfrutando a nuestro lado en cada logro obtenido.

A nuestros amigos y compañeros de facultad, habiendo compartido momentos valiosos a lo largo de la carrera y con los que compartimos la misma vocación. A nuestros amigos de toda la vida que supieron estar en momentos difíciles y en alegrías compartidas.

A nuestro tutor Dr. Juan Pablo Damián y Co-tutor Dr. Juan Benech por el apoyo, interés, motivación y conocimientos académicos que nos brindaron a lo largo de la tesis de grado. A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación de Uruguay (ANII, FCE_2009_1_2887) por la financiación del proyecto. Al Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y a sus integrantes: Natalia Oddone, María Inés Zambrana y Verónica Bervejillo por su ayuda y enseñanza de distintas técnicas. A nuestra compañera Isara Ramirez. A la Dra. Cecilia Scorza por el uso de sus equipos e instalaciones para realizar las pruebas de comportamiento, al Dr. Aldo Calliari por su ayuda en el manejo y a Héctor Rodríguez por el cuidado de los animales.

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República por brindarnos las herramientas y conocimientos para formarnos como profesionales. A los profesores que hemos tenido en todos estos años, por dedicarnos su apoyo, conocimiento y experiencia.

Al personal de la Biblioteca de Facultad de Veterinaria por ayudarnos en la búsqueda de bibliografía.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO.....	4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
1. RESÚMEN	7
2. SUMMARY.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
4.1. Diabetes mellitus	10
4.2. Diabetes y comportamiento	11
4.3. Tratamiento con Resveratrol... ..	13
5. HIPÓTESIS.....	14
6. OBJETIVOS.....	14
6.1. Objetivo general.....	14
6.2. Objetivos específicos.....	14
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
7.1. Animales.....	14
7.2. Formación de grupos experimentales.....	14
7.3. Identificación de los animales.....	15
7.4. Inducción de diabetes experimental.....	15
7.5. Tratamiento con Resveratrol... ..	15
7.6. Medida de parámetros fisiológicos.....	15
7.7. Evaluación del comportamiento	15
7.7.1. Open Field Test.....	15
7.7.2. Elevated Plus Maze	16
7.8. Análisis estadístico.....	16

8. RESULTADOS	18
8.1. Peso corporal y glicemia... ..	18
8.2. Sobrevida.....	18
8.3. Comportamiento.....	19
9. DISCUSIÓN.....	22
10. CONCLUSIONES.....	24
11. BIBLIOGRAFÍA	25

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Lista de comportamientos observados y sus respectivas descripciones...	16
Tabla 2. Comportamiento de ratones GD y GDR en el OFT en la 2 ^{da} y 4 ^{ta} semana de tratamiento con RSV.....	19
Tabla 3. Comportamiento de ratones GD y GDR en el EPM en la 2 ^{da} y 4 ^{ta} semana de tratamiento con RSV.....	20

FIGURAS

Figura 1. Test de ansiedad (A) Open field test (OFT) y (B) Elevated plus maze (EPM).....	16
Figura 2. Peso corporal (A) y glicemia (B) en ratones diabéticos sin tratamiento y con tratamiento con RSV	18
Figura 3. Tasa de supervivencia en ratones diabéticos sin tratamiento y con tratamiento con RSV.....	19
Figura 4. Frecuencia de comportamientos (media±SEM) registrados en el EPM en la 2 ^{da} (A, B y C) y 4 ^{ta} semana (D, E y F) en ratones diabéticos con y sin tratamiento con RSV (GDR y GD respectivamente).....	21

1. RESÚMEN

A nivel mundial, la diabetes mellitus es una enfermedad cada vez más prevalente. Tanto las personas como los animales con diabetes no controlada presentan trastornos neuroendocrinos y comportamentales que afectan negativamente su bienestar. Dentro de los tratamientos naturales, el resveratrol ha tomado una creciente importancia en los últimos años. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue evaluar si el tratamiento con resveratrol afecta algunos parámetros fisiológicos, modifica la sobrevida e influye en el comportamiento de ratones con diabetes tipo I inducidos por estreptozotocina (stz). Se formaron dos grupos de ratones CD1 machos con diabetes confirmada (glicemia >250mg/dl): sin tratamiento (GD, n=12) y tratados con RSV intraperitoneal (GDR, n=12). Se evaluó el peso corporal, la glicemia y la sobrevida de todos los individuos durante 4 semanas, se testeó su comportamiento mediante el Open Field Test (OFT) y Elevated Plus Maze (EPM). No se encontraron efectos significativos del tratamiento con RSV ni en el peso corporal ni en la glicemia. Se registró una mayor sobrevida en el GDR que en GD. En la 2^{da} semana de tratamiento con RSV se observó una mayor frecuencia de grooming ($P<0,05$) y una menor frecuencia de defecación y de rearing ($P<0,05$) en el OFT en el GDR en comparación con el GD. En el EPM se encontró una mayor frecuencia de grooming ($P<0,05$) y un mayor porcentaje de entradas a los brazos abiertos ($P<0,05$) en el GDR que en el GD. Sin embargo, a largo plazo (4^{ta} semana de tratamiento), el único efecto que se mantuvo fue una mayor frecuencia de grooming ($P<0,05$) en el GDR que en el GD durante el EPM. En conclusión, el tratamiento con RSV mostró efectos ansiolíticos en ratones diabéticos inducidos por stz en una ventana de tiempo corta (2 semanas) en el OFT y el EPM. Por lo tanto, se sugiere que el tratamiento con RSV podría ser beneficioso en la adaptación de los animales diabéticos a las situaciones de estrés y ansiedad, así como en mejorar la sobrevida y por tanto tener efectos positivos sobre el bienestar.

2. SUMMARY

Worldwide, diabetes mellitus is an increasingly prevalent disease. Both people and animals with uncontrolled diabetes have neuroendocrine and behavioral disorders that negatively affect their well-being. Within natural treatments, resveratrol has become increasingly important in recent years. Therefore, the objective of this thesis was to evaluate if the resveratrol treatment affects some physiological parameters, modifies survival and influences the behavior of streptozotocin (stz)-induced type 1 diabetic mice. Two groups of male CD1 mice with confirmed diabetic (>250mg/dl of glucose in blood) were formed: without treatment (GD, n=12) and treated with intraperitoneal RSV (GDR, n=12). Body weight, glycemia and survival of all individuals were evaluated for 4 weeks; their behavior was tested using the Open Field Test (OFT) and the Elevated Plus Maze (EPM). No significant effects of RSV treatment were found either body weight or glycemia. Longer survival was recorded in GDR than in GD. In the 2nd week of RSV treatment, a higher frequency of grooming ($P<0.05$) and a lower frequency of defecation and rearing ($P<0.05$) were observed in the OFT in the GDR compared to the GD. In the EPM, a higher frequency of grooming ($P<0.05$) and higher percentage of entries to open arms ($P<0.05$) in the GDR than in the GD were found. However, in the long-term (4th week of treatment), the only effect that remained was a higher grooming frequency ($P<0.05$) in the GDR than in the GD during the EPM. In conclusion, RSV treatment showed anxiolytic effects in stz-induced diabetic mice in a short time window (2 weeks) in OFT and EPM. Therefore, it is suggested that RSV treatment could be beneficial in the adaptation of diabetic animals to stress and anxiety situations, as well as in improving survival and therefore have positive effects on well-being.

3. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la diabetes mellitus es una enfermedad cada vez más prevalente. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud, pasó de afectar a 108 millones de personas adultas en 1980 a 422 millones en 2014. Aumentando la prevalencia del 4,7% al 8,5% de la población adulta mundial. Así mismo en 2012 la diabetes mellitus provocó 1,5 millones de muertes, más otros 2,2 millones se produjeron por complicaciones asociadas con niveles de glicemia superiores a los deseables (OMS, 2016). Siendo un gran porcentaje de las mismas (43%) personas menores de 70 años (OMS, 2016).

Tanto las personas como los animales con diabetes mal controlada o no controlada presentan trastornos neuroendocrinos (Leedom et al., 1987). La diabetes provoca alteraciones en el sistema nervioso central (SNC) y afecta negativamente al comportamiento, provocando depresión (Anderson et al., 2001), disfunción cognitiva (Alvarez et al., 2009) y aumento de los comportamientos en respuesta al estrés, como lo demuestra un aumento en la actividad del eje pituitario hipotálamo suprarrenal (Chan et al., 2003).

Se ha evidenciado que algunas moléculas naturales como los polifenoles presentan acción terapéutica en enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Estas moléculas poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias proporcionando un efecto neuroprotector (Sandoval et al., 2019). Dentro de los polifenoles se encuentra el resveratrol (RSV), el cual tiene una variedad de acciones biológicas, con importantes implicancias en el tratamiento de la diabetes (Kumar y Sharma, 2010). Se vio que mejora sus síntomas y disminuye sus complicaciones en un modelo animal inducido por estreptozotocina (stz), mediante la reducción del estrés oxidativo y la inflamación generada por la hiperglicemia (Park y Pezzuto, 2015). Así mismo se ha reportado que el RSV tiene propiedades neuroprotectoras, con mejoras en el aprendizaje y la memoria (Xu et al., 2010). Por otra parte se ha reportado que el RSV aumenta la supervivencia en organismos inferiores mediante la activación de SIRT1 (Koo y Montminy, 2006).

El propósito de este estudio es evaluar el tratamiento con resveratrol sobre el patrón de comportamiento en tests de ansiedad y algunos indicadores fisiológicos en ratones con diabetes mellitus tipo 1 inducidos por estreptozotocina.

4. REVISION BIBLIOGRÁFICA

4.1 Diabetes mellitus

La Diabetes mellitus es un desorden multifactorial caracterizado por hiperglicemia resultante del defecto en la secreción y/o acción de la insulina (Nelson y Couto, 2010; American Diabetes Association, 2014). La insulina es secretada por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas, dicha secreción es regulada principalmente por los niveles de glucosa sanguínea. Los islotes de Langerhans constituyen diferentes grupos celulares endocrinos ubicados dentro del páncreas exocrino. Cada tipo celular secreta una hormona diferente, los principales tipos celulares son: las células alfa que secretan glucagón, las células beta que secretan insulina y las células delta que secretan somatostatina, entre otros tipos (Little, 2014). La insulina se une a receptores específicos de membrana celular y provoca cambios asociados al metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas. Entre las principales acciones, se destaca la captación rápida de glucosa por la célula, así como su almacenamiento y el aprovechamiento principalmente en los tejidos muscular, adiposo y hepático (Guyton y Hall, 2007).

La diabetes mellitus se clasifica en tipo 1 y tipo 2 según los mecanismos fisiopatológicos y las alteraciones patogénicas que afectan a las células beta pancreáticas (Feldman y Nelson, 2007). La diabetes tipo 1 se produce por la deficiencia absoluta de la secreción de insulina provocada por la destrucción de las células beta pancreáticas (Goldman y Bennett, 2000), como resultado de la combinación de la susceptibilidad genética y destrucción inmunológica. La identificación temprana de autoanticuerpos contra insulina, células beta y/o ácido glutámico descarboxilasa (GAD) permite predecir el desarrollo de diabetes tipo 1 (American Diabetes Association, 2014). La diabetes tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la acción de la insulina y células beta disfuncionales, presenta una base genética y el desarrollo clínico de la enfermedad es acentuado por efectos ambientales como la obesidad. Los pacientes con diabetes tipo 2 en general no dependen del aporte externo de insulina, sino que logran regular los niveles de glicemia mediante la combinación de dieta, actividad física y agentes hipoglucemiantes. Sin embargo, en casos en que la insulinoresistencia y la disfunción en células beta sean pronunciados, estos pacientes se convierten en insulino dependientes para sobrevivir. Por tanto, otra forma de clasificación de diabetes mellitus es según la dependencia del aporte de insulina, como diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) o diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) (Feldman y Nelson, 2007).

Los signos clínicos clásicos de la diabetes mellitus son la poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso, dichos signos pueden ser más o menos acentuados según el grado de hiperglicemia. La deficiencia de insulina provoca una disminución en la utilización tisular de la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, así como un aumento en la glucogenólisis y gluconeogénesis hepática. Todo esto lleva a una

acumulación anormal de glucosa en la circulación sanguínea (hiperglicemia). Como consecuencia de estos niveles aumentados de glucosa sanguínea, la capacidad de reabsorción renal de la misma se ve superada y por tanto aparece glucosuria (glucosa en orina). La glucosuria a su vez promueve la diuresis osmótica (atrae mayor volumen de agua hacia la orina), lo que resulta en poliuria. La polidipsia es en consecuencia compensatoria previniendo la deshidratación. La pérdida ponderal de peso se produce por un mecanismo fisiológico en un intento por compensar la 'inanición' percibida ante la incapacidad de utilización tisular de la glucosa como forma de energía. Finalmente, la polifagia constituye una respuesta dada por la deficiente inhibición del centro de saciedad hipotalámico. Esto se debe a que normalmente la entrada de glucosa en las células de este centro es lo que regula la sensación de hambre y se encuentra mediado por insulina (Feldman y Nelson, 2007).

En medicina veterinaria, la diabetes es diagnosticada en animales de compañía. En caninos y felinos la diabetes mellitus suele clasificarse como DMID y DMNID dado que en algunos casos no es fácil diferenciar si se trata de una diabetes tipo 1 o tipo 2 (Feldman y Nelson, 2007; Nelson y Couto, 2010). Prácticamente todos los perros con diabetes son insulino dependientes en el momento del diagnóstico, siendo necesaria la administración de insulina de por vida para el control de la glicemia. La diabetes transitoria o reversible es muy poco frecuente en los mismos (Nelson y Couto, 2010). En la mayoría de los gatos la diabetes se asocia a la obesidad, desarrollando una forma similar a la diabetes tipo 2 caracterizada por la resistencia a la insulina y depósitos amiloides en los islotes de Langerhans. En algunos casos, la diabetes felina se encuentra asociada a otras patologías concurrentes como hipertiroidismo, pancreatitis crónica y acromegalia, pudiendo ser reversible mediante el tratamiento de las mismas (Felman y Nelson, 2007; Little, 2014). Según un estudio epidemiológico, en caninos la diabetes se diagnostica principalmente entre los 5 y los 15 años de edad y las hembras tienen una mayor predisposición que los machos (Guptill et al., 2003). En los felinos la mayoría tiene más de 6 años (promedio 10 años) en el momento del diagnóstico, con un predominio en los machos castrados (Felman y Nelson, 2007).

4.2 Diabetes y comportamiento

Dentro de las complicaciones de la diabetes, las neuropatías son comunes, tal es así que una diabetes prolongada sin tratamiento deriva en la neurodegeneración del hipocampo (Pamidi y Satheesha, 2012). Se ha visto que a medida que aumenta la duración de la hiperglicemia empeora el deterioro cognitivo (Ravishankar et al., 2011). La diabetes mellitus afecta el sistema neuroendocrino produciendo alteraciones en el comportamiento social, como una mayor pasividad y sumisión en ratones (Leedom et al., 1987). Se informaron reducciones de los niveles de noradrenalina, dopamina y serotonina en el sistema nervioso central de roedores diabéticos (Rowland y Bellush, 1989). Según Miyata et al. (2007) la diabetes atenúa la respuesta serotoninérgica a los estímulos estresantes de una manera específica, encontrándose disminuida en la corteza pre frontal pero no así en la amígdala. En

estudios realizados en roedores con diabetes tipo 1 (inducida por estreptozotocina), se demostró una actividad ansiogénica con respecto a los controles en las pruebas de Open field test (OFT) y Elevated Plus maze (EPM) (Ramanathan et al., 1998). En humanos hay una mayor prevalencia de ansiedad y depresión en pacientes diabéticos que en la población general (Anderson et al., 2001; Pamidi y Satheesha, 2012). Y se ha visto que los roedores diabéticos inducidos por estreptozotocina presentan características similares a pacientes con depresión (Miyata et al., 2006). La estreptozotocina es un antibiótico derivado de *Streptomyces achromogenes* y es el agente de elección para la inducción de diabetes experimental dada su acción citotóxica selectiva sobre las células beta pancreáticas (Srinivasan y Ramarao, 2007).

La ansiedad es una respuesta conductual y fisiológica ante situaciones percibidas como amenazantes o peligrosas, siendo crucial para el aprendizaje, la memoria, la adaptación al entorno y la supervivencia (Libert et al., 2011). En situaciones agudas se manifiesta con síntomas vinculados al estrés. Se diferencia del miedo en tanto que éste es un componente adaptativo del estrés en respuesta a un peligro potencial (externo o interno) que amenaza con perturbar la homeostasis. Sin embargo, se considera un síntoma de ansiedad cuando la intensidad de la reacción es desproporcionada, crónica y/o irreversible o no está asociada a ningún riesgo genuino (Millan, 2003). La ansiedad puede ser medida como estado de ansiedad o como rasgo de ansiedad. Definiendo como estado de ansiedad, aquello que es experimentado en un momento particular, en un determinado contexto y que puede ser condicionada. En tanto que rasgo de ansiedad es la tendencia individual a experimentar ansiedad a lo largo del tiempo en diferentes contextos (Clément et al., 2007; Wormald et al., 2016). En roedores, se han realizado numerosos experimentos para estudiar el estado de ansiedad, mientras que el rasgo de ansiedad es menos conocido (Clément et al., 2007). Dentro de los modelos experimentales diseñados para evaluar el estado y rasgo de ansiedad en roedores se incluyen el Open Field Tests (OFT) y el Elevated Plus Maze (EPM) (Wormald et al., 2016). El OFT es una medida común del comportamiento exploratorio y la actividad general en roedores. Consiste en un recinto de forma cuadrada, rectangular o circular con paredes circundantes que impiden el escape. La prueba tiene una duración de entre 2 y 10 minutos, dicho tiempo enfatiza el comportamiento exploratorio y respuesta a la novedad. Se evalúan parámetros relacionados al movimiento: distancia recorrida, tiempo dedicado a moverse, actividad vertical, congelación y acicalamiento; relacionados a la ubicación: tiempo pasado en el centro y relacionados al sistema nervioso autónomo: defecación y micción. Algunos de estos resultados miden aspectos de la emocionalidad como la ansiedad (Walsh y Cummins, 1976; Gould et al., 2009). El EPM es un test basado en un procedimiento empleado por Montgomery en 1958. Consiste en dos brazos abiertos y dos brazos cerrados, elevados a 40cm del piso. Se vio que los roedores prefieren permanecer en los brazos cerrados, en tanto que entrar en los brazos abiertos les provoca miedo. También se experimentó con diversas drogas tanto ansiolíticas (diazepam) como ansiogénicas (anfetamina). Se constató que el ratio entradas a brazos abiertos

(EOA) versus entradas a brazos cerrados (ECA) aumenta con la administración de ansiolíticos y disminuye con ansiogénicos (Pellow et al., 1985). Cuanto mayor tiempo permanece en los brazos abiertos del dispositivo es un indicador de menor ansiedad (Clément et al., 2007).

4.3 Tratamiento con Resveratrol

En la actualidad, numerosos trabajos estudian el efecto del resveratrol (RSV) como posible tratamiento para la diabetes (Kumar y Sharma 2010; Sharma et al., 2011). El RSV es un polifenol que en la naturaleza es producido por más de 70 especies de plantas en respuesta a situaciones estresantes. Entre los frutos que lo contienen se le da especial importancia a las uvas (Vitaceae), ya que el vino constituye una parte fundamental de la llamada dieta mediterránea de amplia difusión (Gambini et al., 2013). En algunos estudios se vio que el RSV mejora los síntomas y disminuye las complicaciones de la diabetes en modelos animales inducidos por estreptozotocina (Park y Pezzuto, 2015). Según estudios realizados por Sharma (2011) el RSV presenta efectos anti-hiperglicémicos en modelos de diabetes tipo II. Se ha visto que el RSV imita los efectos anti-envejecimiento de la restricción calórica mediante la activación de SIRT1, mejora la resistencia a la insulina, aumenta el contenido mitocondrial y prolonga la supervivencia (Milne et al., 2007). La enzima SIRT1 (Silent Information Regulator 1) es una desacetilasa NAD⁺ dependiente, de la familia de las sirtuinas (Howits et al., 2003). Es conocida su acción antioxidante, cardioprotectora y anticarcinogénica (Frémont, 2000; Baur y Sinclair, 2006).

En el tratamiento terapéutico de la depresión y los trastornos de ansiedad se busca aumentar la disponibilidad de serotonina y norepinefrina en el cerebro, con este fin se han desarrollado fármacos que inhiben la monoamino oxidasa (MAO) y la recaptación de serotonina. SIRT1 regula la ansiedad activando la transcripción del gen que codifica la enzima MAO-A (Libert et al., 2011). Además de los efectos reportados, recientemente se han encontrado otros que sugieren que el RSV presenta efectos antidepresivos. Los efectos antidepresivos del RSV podrían estar asociados con cambios en los niveles de neurotransmisores en diferentes regiones del cerebro, atenuando el aumento de la actividad de MAO (Park y Pezzuto 2015). Por ejemplo, Xu et al. (2010) reportaron que el RSV incrementa los niveles de serotonina en el hipocampo, una zona del cerebro vinculada con la respuesta de estrés y ansiedad. Sin embargo, no se ha explorado si el tratamiento con RSV genera efectos positivos en el comportamiento de animales diabéticos.

En nuestro país hace algún tiempo que es comercializado en las clínicas veterinarias de pequeños animales como un complemento de la dieta para perros indicado por su acción antioxidante “anti-envejecimiento” (Juvenia, Vitaton).

5. HIPOTESIS

El tratamiento con resveratrol normaliza algunos parámetros fisiológicos (como peso y glicemia), aumenta la sobrevida y presenta efectos ansiolíticos en ratones diabéticos.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar si el tratamiento con resveratrol afecta algunos parámetros fisiológicos, modifica la sobrevida e influye en el comportamiento de ratones con diabetes tipo I.

6.2. Objetivos específicos

- Determinar si el tratamiento con resveratrol en animales diabéticos afecta los parámetros fisiológicos de peso corporal y glicemia.
- Determinar si el efecto del tratamiento con resveratrol modifica la tasa de sobrevida de los animales diabéticos.
- Determinar si el tratamiento con resveratrol modifica el patrón de comportamiento de ratones diabéticos en tests de ansiedad.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Animales

Se utilizaron 24 ratones de la cepa CD-1, machos, de aproximadamente 45 días de edad. Todos los ratones fueron alojados en un ambiente controlado con un ciclo de 12hs de luz y 12hs de oscuridad, con un promedio de temperatura de 22 ± 2 °C con libre acceso a comida y agua. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (CEUA-IIBCE, N°. protocolo experimental 09/09/2011).

7.2. Formación de grupos experimentales

Se formaron dos grupos de 12 animales cada uno en forma aleatoria, identificados como: Grupo diabético (GD, animales diabéticos sin tratamiento) y Grupo diabético con Resveratrol (GDR, animales diabéticos tratados con Resveratrol).

7.3. Identificación de los animales

Cada individuo fue identificado con un sistema de números y colores, señalándolos con fibras permanentes en la cola.

7.4. Inducción de diabetes experimental

Se les indujo la diabetes con una inyección intraperitoneal de Estreptozotocina a una dosis de 150 mg/kg de peso vivo, disuelto en 0,1 mmol/L de buffer citrato de sodio pH 4,5 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO USA).

Se confirmó la diabetes mediante la medición de la glicemia con muestras de sangre extraídas de la vena coccígea, en el equipo Accu Chek Active del laboratorio Roche (Mannheim, Germany). Se consideraron diabéticos aquellos que superaron los 250 mg/dl de glucosa sanguínea (Jepson, 2011; Benech et al, 2014).

7.5. Tratamiento con Resveratrol

A los animales del grupo b) se les inyectó resveratrol (Enzo Clinical Labs, Farmingdale, NY, USA) a una dosis de 40 mg/kg de peso vivo por vía intraperitoneal cada 48 horas a partir de la confirmación de la diabetes y durante 4 semanas.

A los animales del grupo a) se les inyectó en iguales condiciones y volúmenes, sólo el diluyente del fármaco (DMSO).

7.6. Medida de parámetros fisiológicos

Se determinó el peso vivo de todos los animales con una balanza Radwag WTB200, (China).

La glicemia fue medida semanalmente como se explicó anteriormente.

7.7. Evaluación del comportamiento

Se realizó a todos los animales dos test de comportamiento: el Open field test y el Elevated plus maze, en la segunda y cuarta semana de comenzado el tratamiento con resveratrol.

7.7.1. Open field test

El OFT consiste en una caja de acrílico transparente de 35 x 35 x 40 cm. Los animales fueron introducidos individualmente en el centro del OFT y se dejaron mover libremente durante 10 minutos. Se midieron los siguientes comportamientos como cantidad de eventos: acicalamiento (grooming), erguimiento (rearing), defecación, micción (Tabla 1). También fueron medidos automáticamente los datos de movimiento tales como: distancia recorrida (m), duración (s) en la zona periférica (5,0 cm desde los bordes de la caja), duración (s) en la zona central (12,0 x 12,0 cm) duración (s) en el punto central y velocidad de movimiento (cm/s). Los cuáles fueron registrados usando una cámara Sony HD conectada a una computadora equipada con el software específico Ethovision XT 7,0 (Noldus, Netherlands). Luego de la monitorización de cada animal el dispositivo fue desinfectado con una solución de alcohol 70% (Fig.1A).

7.7.2. Elevated plus maze

El dispositivo de EPM consiste en dos brazos abiertos y dos cerrados (brazos abiertos: 30 x 5 cm; brazos cerrados: 30 x 5 cm, rodeados de paredes con 15 cm de altura). El mismo fue hecho de madera y elevado 40 cm del piso. Los ratones fueron ubicados individualmente en la plataforma central (5 x 5 cm) de la cruz, mirando hacia uno de los brazos cerrados y se los dejó explorar libremente durante 5 minutos. Durante ese tiempo se registraron los siguientes parámetros de comportamiento: frecuencia de grooming, rearing, defecación, micción así como la frecuencia de entradas a los brazos abiertos y cerrados y el porcentaje de entradas a los brazos abiertos. Además cada sesión de experimentación fue registrada mediante el uso de la cámara Sony HD para futuros análisis (Fig.1B).

Tabla 1. Lista de comportamientos observados y sus respectivas descripciones.

Comportamiento	Descripción
Grooming	Número de veces que un animal se acicalaba
Rearing	Número de veces que un animal se incorporó sobre sus patas traseras
Defecación	Número de bolos fecales
Micción	Número de veces que orinó un ratón

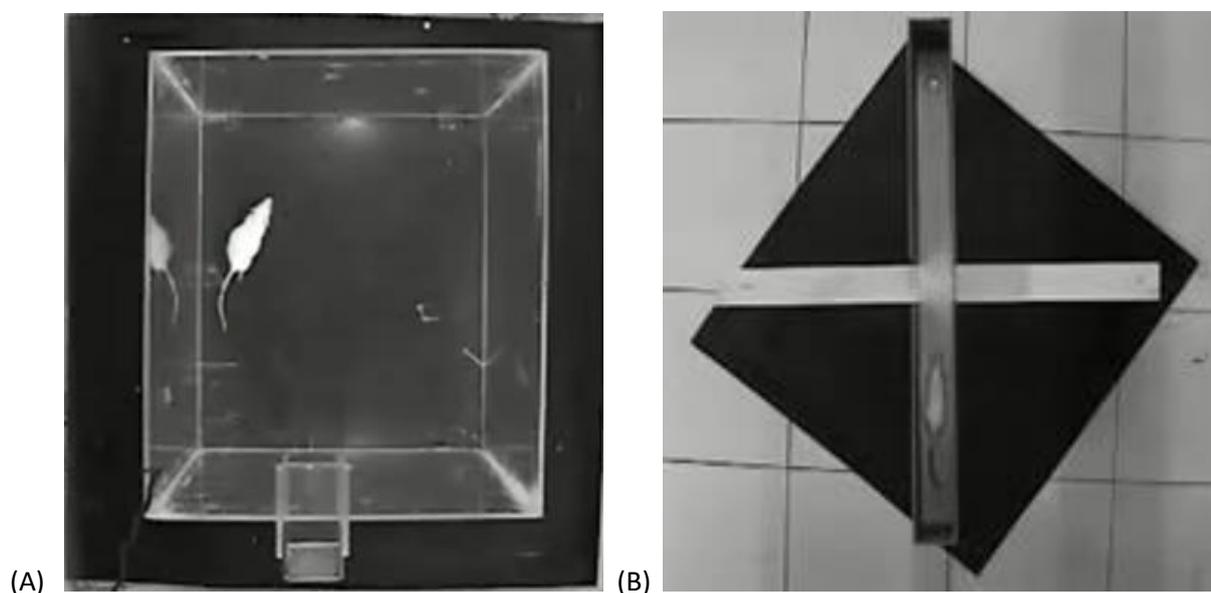


Fig.1. Test de ansiedad. (A) Open field test (OFT) y (B) Elevated plus maze (EPM).

7.8. Análisis estadístico

Los parámetros de comportamiento sin distribución normal (frecuencia de grooming, rearing, defecación, micción y frecuencia de ECA, EOA, % EOA) se compararon entre ratones del GD y GDR utilizando el test de Mann-Whitney U. Los comportamientos con una distribución normal, como la distancia recorrida, la duración en la zona periférica, la duración en la zona central, tiempo dedicado a

moverse y la velocidad, se compararon entre ratones del GD y GDR utilizando el test de Student's t no emparentado. El peso corporal y la glicemia fueron analizados con un ANOVA para revisiones repetidas.

El modelo considero los siguientes parámetros: grupo (GD o GDR), tiempo (semanas) e interacción entre grupo y tiempo como efectos fijos y los individuos de cada grupo como efecto aleatorio. Se realizaron comparaciones post hoc con la diferencia menos significativa (LSD). La curva de sobrevivencia del GD fue comparada con la del GDR mediante el test de logrank. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). Los resultados se consideraron significativos con un nivel alfa de 0,05 y se consideró que mostraban una tendencia entre 0,05 y 0,1.

8. RESULTADOS

8.1. Peso corporal y glicemia

No hubo efecto de grupo ($P=0,91$), tiempo ($P=0,81$) o interacción entre grupo y tiempo ($P=0,15$) sobre el peso corporal de los ratones (Fig. 2A). La glicemia aumento significativamente con el tiempo después de la inyección de STZ ($P<0,0001$), alcanzando los valores máximos en la semana 0 (2 semanas después de la inyección de STZ) y permaneciendo en niveles altos sin cambios hasta 4 semanas. No hubo efecto del grupo ($P=0,98$) o interacción entre grupo y el tiempo ($P=0,78$) sobre los niveles de glicemia en ratones (Fig. 2B).

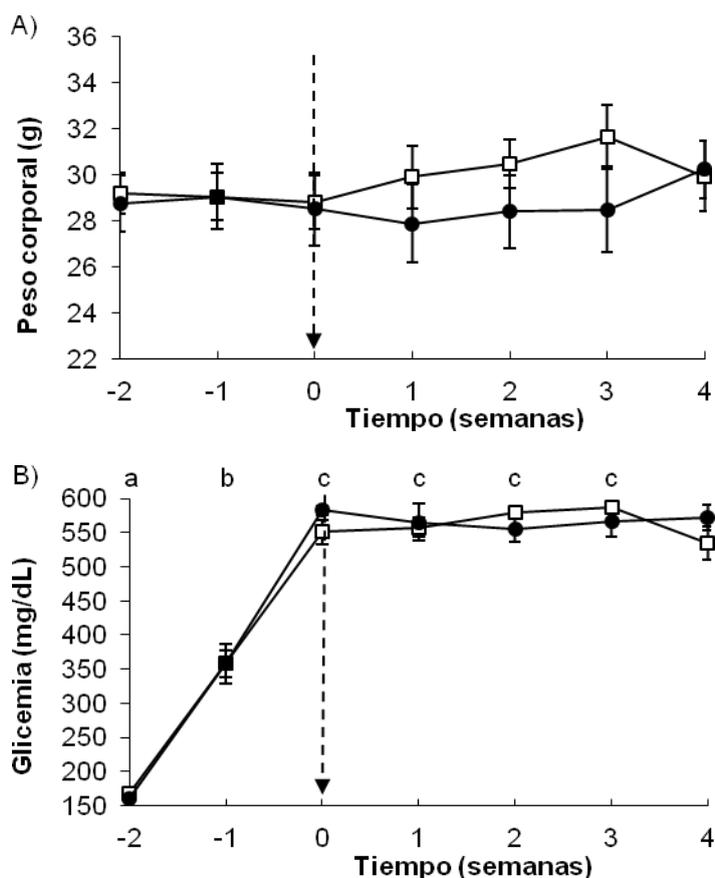


Fig.2. Peso corporal (A) y glicemia (B) en ratones diabéticos sin tratamiento (círculos negros) y con tratamiento con RSV (cuadrados blancos). Dos semanas antes del tratamiento (-2) inyección de stz. Comienzo del tratamiento con RSV (semana 0) indicado con flecha. Diferentes letras entre semanas indican diferencias significativas con $P<0,0001$.

8.2. Sobrevida

La tasa de sobrevida en el GDR fue significativamente mayor que en el GD en el lapso de un mes de tratamiento con RSV ($P=0,05$) (Fig. 3).

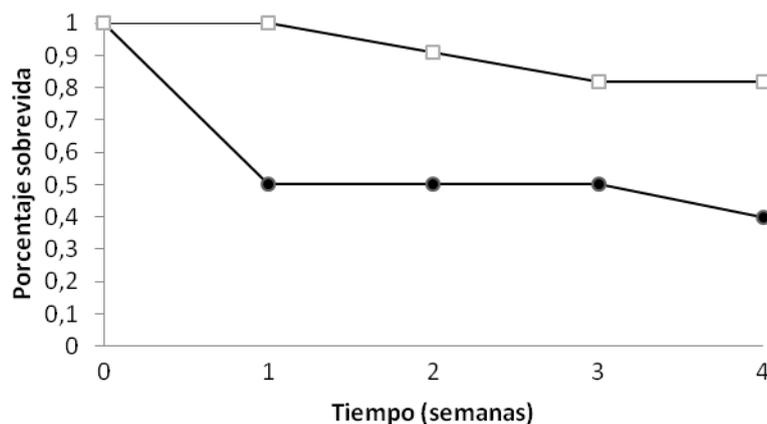


Fig.3. Tasa de sobrevivida en ratones diabéticos sin tratamiento (círculos negros) y con tratamiento con RSV (cuadrados blancos).

8.3. Comportamiento

El efecto del tratamiento con RSV en ratones diabéticos en el OFT se presenta en la Tabla 2. Después de dos semanas de tratamiento, el GDR mostro una mayor frecuencia de grooming, menor frecuencia de defecación y una tendencia a tener una menor duración en la zona central que el GD (Tabla 2). En la cuarta semana de tratamiento con RSV, solo se observó una tendencia a tener un menor tiempo dedicado a moverse en el GDR en comparación con el GD (Tabla 2).

Tabla 2. Comportamiento de ratones GD y GDR en el OFT en la 2^{da} y 4^{ta} semana de tratamiento con RSV.

Comportamiento	Tratamiento con RSV en ratones diabéticos			
	2 ^{da} semana		4 ^{ta} semana	
	GD	GDR	GD	GDR
Grooming	2,4 ± 0,2 ^a	4,7 ± 0,9 ^b	2,6 ± 0,6	2,7 ± 0,5
Rearing	47,3 ± 5,3	46,5 ± 4,9	46,5 ± 4,9	28,6 ± 5,3
Defecación	3,4 ± 0,4 ^a	1,9 ± 0,3 ^b	3,3 ± 0,7	1,8 ± 0,5
Micción	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2
Distancia recorrida (m)	29,6 ± 2,3	26,3 ± 1,6	25,5 ± 3,1	19,5 ± 2,6
Duración en zona periférica (s)	518,9 ± 11,1	509,3 ± 19,5	532,4 ± 11,4	537,8 ± 13,2
Duración en zona central (s)	10,4 ± 2,3 [†]	5,5 ± 1,0	5,6 ± 1,2	3,5 ± 0,9
Tiempo dedicado a moverse (s)	379,6 ± 15,9	352,5 ± 16,2	310,0 ± 18,9 [†]	246,6 ± 26,4
Velocidad (cm/s)	4,9 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,3 ± 0,5	3,3 ± 0,4

Letras diferentes entre los grupos GD y GDR en la misma semana indican diferencias significativas ($P < 0,05$, †: $P = 0,07 - 0,08$).

El efecto del tratamiento con RSV en ratones diabéticos sobre los comportamientos de grooming, rearing, defecación y micción en el EPM se presenta en la Tabla 3. El

GDR mostró una mayor frecuencia de grooming y menor frecuencia de rearing que el GD en la segunda semana de tratamiento (Tabla 3). El GDR tuvo una tendencia a mostrar una mayor frecuencia de entradas en brazos abiertos, menores entradas en brazos cerrados y mayor porcentaje de entradas en brazos abiertos que el GD después de dos semanas de tratamiento con RSV (Fig.4). En la cuarta semana de tratamiento con RSV, el único efecto significativo observado fue una mayor frecuencia de grooming en el GDR que en el GD (Tabla 3).

Tabla 3. Comportamiento de ratones GD y GDR en el EPM en la 2^{da} y 4^{ta} semana de tratamiento con RSV.

Comportamiento	Tratamiento con RSV en ratones diabéticos			
	2 ^{da} semana		4 ^{ta} semana	
	GD	GDR	GD	GDR
Grooming	1,4 ± 0,3 ^a	5,3 ± 1,3 ^b	2,3 ± 0,8 ^a	5,2 ± 1,1 ^b
Rearing	24,5 ± 1,5 ^a	11,3 ± 2,4 ^b	15,3 ± 2,3	15,5 ± 2,5
Defecación	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,2
Micción	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0

Letras diferentes entre los grupos GD y GDR en la misma semana indican diferencias significativas (P <0,05).

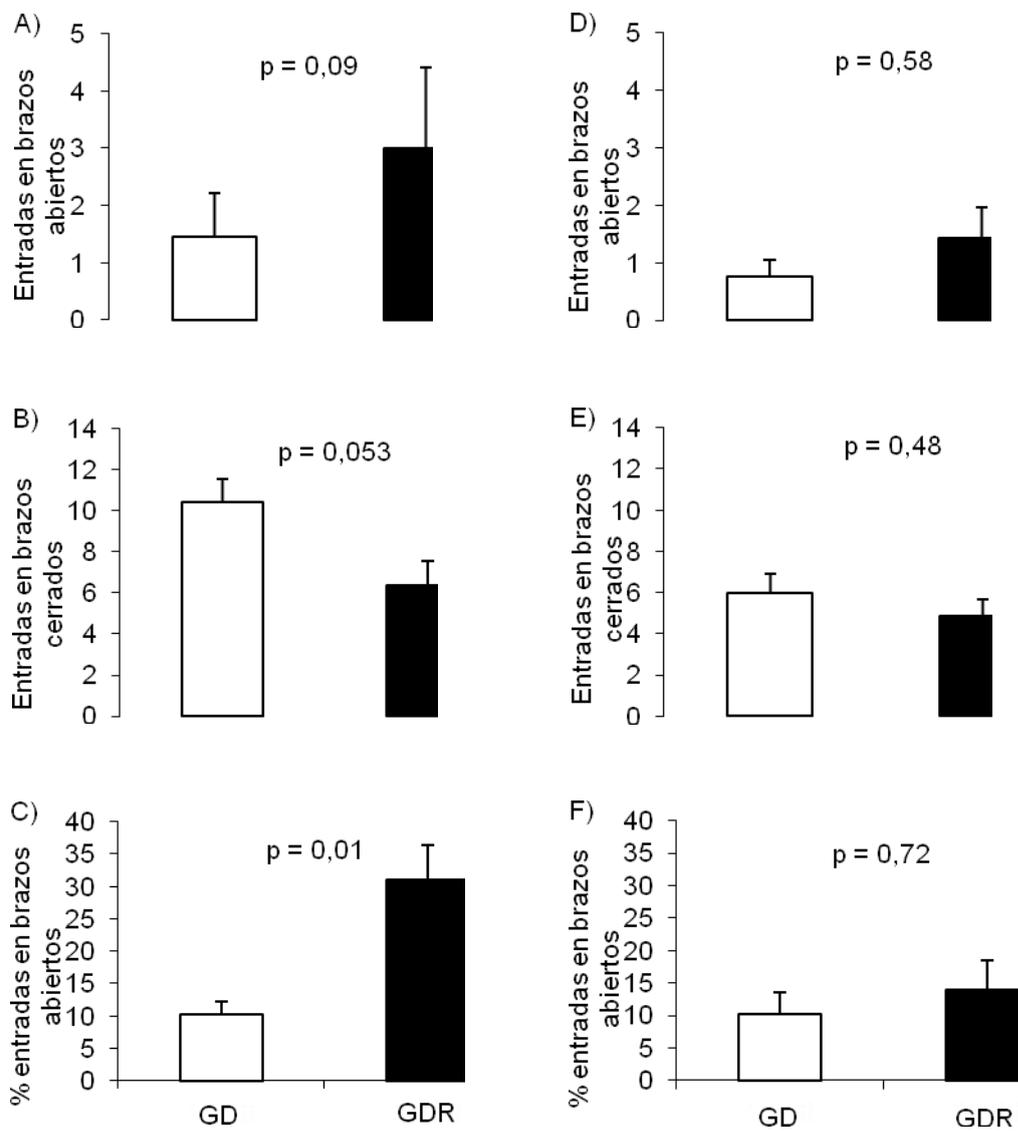


Fig.4. Frecuencia de comportamientos (media±SEM) registrados en el EPM en la 2^{da} (A, B y C) y 4^{ta} semanas (D, E y F) en ratones diabéticos con y sin tratamiento con RSV (GDR y GD respectivamente).

9. DISCUSION

En el presente estudio proporcionamos evidencia experimental de los efectos del tratamiento con resveratrol en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina. Se usó un modelo animal bien caracterizado por el que se induce la diabetes tipo 1 mediante la necrosis selectiva de las células beta pancreáticas, dando como resultado un estado de deficiencia de insulina (Srinivasan y Ramarao, 2007). De hecho, todos los animales diabéticos usados en el presente informe mostraron niveles elevados de glucosa en sangre (por encima de 250mg/dl, ver Fig. 2B) y desarrollaron síntomas de diabetes severa caracterizada por poliuria y polidipsia. En nuestro estudio, el tratamiento con RSV no alteró ni la glicemia ni el peso corporal. Dichos resultados están de acuerdo con los reportados por Schmatz et al. (2009) y Schmatz et al. (2012) en ratas diabéticas. Sin embargo, Silan (2008) observó un efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas tratadas con RSV mediante inyecciones intraperitoneales diarias a una dosis de 5 mg/kg durante 42 días.

El RSV aumenta la esperanza de vida en múltiples especies y se ha visto que previene la mortalidad asociada a obesidad en ratones, sin embargo no existe evidencia en cuanto a ratones delgados y sanos (Agarwal y Baur, 2011). Estos efectos del RSV se explicarían a través de la activación de SIRT1, imitando los efectos de la restricción calórica y de este modo prolongando la sobrevivencia (Milne et al., 2007). En este caso encontramos que en un mes de tratamiento con RSV mejoró la sobrevivencia de los animales diabéticos. Por lo tanto, RSV tiene efectos positivos sobre el bienestar de animales diabéticos.

Se observó que el tratamiento con RSV en ratones diabéticos tipo 1 producía efectos de tipo ansiolítico tanto en OFT como EPM. Estos efectos se mostraron en el OFT por una mayor frecuencia de grooming, menor defecación y menor frecuencia de rearing en el GDR en comparación con el GD y en el EPM por una frecuencia de grooming significativamente mayor, una tendencia a mostrar una mayor frecuencia de entradas en brazos abiertos, menor frecuencia de entradas en brazos cerrados y mayor porcentaje de entradas en brazos abiertos en el GDR que en el GD.

Los efectos sobre la mayoría de los comportamientos observados en ambas pruebas se registraron principalmente en una ventana de tiempo corta (2 semanas) de tratamiento. Sin embargo, a las 4 semanas de tratamiento con RSV las diferencias entre grupos desaparecieron. La ausencia de efecto del RSV sobre el comportamiento de ansiedad en animales diabéticos de larga duración puede explicarse en parte por la hiperglicemia crónica. Es bien sabido que dicha condición puede provocar grandes cambios funcionales del cerebro (Wessels et al., 2008), los cuales pueden ser más fuertes que los efectos positivos del RSV. Es importante señalar que los animales utilizados en el presente informe presentan niveles elevados de glicemia y no fueron tratados por insulina.

Como se mencionó anteriormente, el comportamiento de los roedores diabéticos tipo 1 muestra un aumento en la ansiedad en el EPM (Ramanathan et al., 1998). Este estado de ansiedad en los animales diabéticos se asocia con cambios en los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico central (Rowland et al., 1989). Se observó que el RSV aumentaba los niveles de dopamina y serotonina en varias áreas del cerebro de los ratones (Xu et al., 2010). Por tanto, el efecto ansiolítico del RSV en ratones diabéticos puede explicarse, al menos en parte, por sus acciones sobre el sistema dopaminérgico central y sistema serotoninérgico.

En roedores, un aumento en la respuesta al miedo se ha asociado con un aumento en la frecuencia de defecación tanto en el OFT como en el EPM (Candland y Nagy, 1969; Belviranli et al., 2012). Según nuestros resultados, el RSV redujo la frecuencia de defecación en el OFT en la 2^{da} semana de tratamiento, lo que sugiere que el RSV provocó una disminución de la respuesta de miedo y estrés en ratones diabéticos. Aunque la diferencia solo se observó en el OFT, la disminución de la frecuencia de defecación en ratones GDR también puede explicarse por el estado dopaminérgico (Bruhwylter et al., 1991).

Se ha visto que el grooming (acicalamiento) es un comportamiento asociado con el cuidado corporal, procedimiento de auto calma, actividad de desplazamiento y comodidad en roedores (Spruijt et al., 1992). El aumento de acicalamiento en el GDR resultó en una mejor apariencia y cuidado corporal que el GD. Incluso la mayor frecuencia de acicalamiento en el GDR que en el GD se mantuvo hasta la 4^{ta} semana de tratamiento con RSV en el EPM. Este comportamiento de acicalamiento que se mantiene a lo largo del tiempo y está relacionado con el cuidado del cuerpo, parece ser uno de los cambios de comportamiento más importante provocado por el RSV en ratones diabéticos. En un estudio, se observó que el comportamiento de acicalamiento estaba relacionado con un estado ansiolítico en roedores (Belviranli et al., 2012). Se ha informado que el sistema dopaminérgico está implicado con la manifestación de la conducta de acicalamiento (Le Foll et al., 2005). Es posible que el RSV incremente la actividad de acicalamiento en el GDR debido a un efecto dopaminérgico. Por otro lado, se encontró que los agonistas de 5-hydroxytriptamina (receptor de serotonina) aumentan el acicalamiento y tienen un efecto ansiolítico en roedores (Bagdy et al., 1992; Graf et al., 2003). Por lo tanto, se informaron efectos similares para el sistema serotoninérgico. Tomando todos los resultados de OFT y EPM juntos, sugerimos que la mayor frecuencia de acicalamiento en ratones diabéticos está asociada con un estado ansiolítico causado por RSV.

El rearing (erguimiento) es un comportamiento normal de exploración que realizan los roedores cuando se colocan en un nuevo entorno (Lever et al., 2006). Dado que en este estudio, el GD tendió a permanecer más tiempo en los brazos cerrados del EPM que el GDR, es difícil analizar los resultados del comportamiento de rearing. Los ratones GDR realizaron menos rearing pero puede también estar relacionado con el periodo más corto de tiempo que permanecieron en estos brazos.

10. CONCLUSIONES

El tratamiento con resveratrol no alteró los parámetros fisiológicos de peso corporal y glicemia en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina.

La tasa de supervivencia fue mayor en el grupo diabético tratado con RSV en el mes de tratamiento.

En los test de ansiedad OFT y EPM el tratamiento con RSV provocó efectos similares a los ansiolíticos en ratones diabéticos inducidos por STZ en una ventana de tiempo corta (2 semanas). Se sugiere que el RSV puede ayudar a los animales diabéticos a adaptarse a nuevas situaciones de estrés y ansiedad y así mejorar su bienestar.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal B., Baur J.A. (2011). Resveratrol and life extension. *Ann.N.Y.Acad.* 1215:138-143.
2. Alvarez E.O., Beauquis J., Revsin Y., Banzan A.M., Roig P., De Nicola A.F., Saravia F. (2009). Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behav. Brain Res.* 198:224-230.
3. American Diabetes Association (2015). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*37(1): S81-S90.
4. Anderson R.J., Freedland K.E., Clouse R.E., Lustman P.J. (2001). The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes. *Diabetes care.* 24:1069-1078.
5. Bagdy G., Kalogeras K.T., Szemerédi K. (1992). Effect of 5-HT_{1C} and 5-HT₂ receptor stimulation on excessive grooming, penile erection and plasma oxytocin concentrations. *Eur. J. Pharmacol.* 229:9-14.
6. Baur J.A., Sinclair D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5 (6):493-506.
7. Belviranlı M., Atalik K.E., Okudan N., Gökbel H. (2012). Age and sex affect spatial and emotional behaviors in rats: the role of repeated elevated plus maze test. *Neuroscience.* 227:1-9.
8. Benech J.C., Benech N., Zambrana A.I., Rauschert I., Bervejillo V., Oddone N. y Damián J.P. (2014). Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *Am J Physiol Cell Physiol* 307:C910-C919.
9. Bruhwyler J., Chleide E., Liégeois J.F., Delarge J., Mercier M. (1991). Effects of specific dopaminergic agonists and antagonists in the open-field test. *Pharmacol Biochem Behav.* 39:367-371.
10. Candland D.K., Nagy Z.M. (1969). The open field: some comparative data. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 159:831-851.
11. Chan O., Inouye K., Riddell M.C., Vranic M., Matthews S.G. (2003). Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Minerva Endocrinol.* 28:87-102.
12. Clément Y., Joubert C., Kopp C., Lepicard E.L., Venault P., Misslin R., Cadot M., Chapouthier G. (2007). Anxiety in Mice: A Principal Component Analysis Study. *Neural Plast.* 35457.
13. Feldman E.C., Nelson R.W. (2007). *Endocrinología y reproducción Canina y Felina*. 3ra. ed. Buenos Aires, Ed. Inter-Médica, 1218p.
14. Fremont L. (2000). Biological effects of resveratrol. *LifeSci* 66 (8):663-673.

15. Gambini J., López-Grueso R., Olaso-González G., Inglés M., Abdelazid K., El Alami M., Bonet-Costa V., Borrás C. y Viña J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriatria y Gerontología* 48(2):79–88.
16. Goldman L., Bennett C. (2000). CECIL Tratado de Medicina Interna. 21va edición. Madrid, Ed. McGraw-Hill Interamericana, 2726 p.
17. Gould TD., Dao DT., Kovacsics CE (2009). Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice, Neuromethods. *Humana Press, a part of Springer Science+Business Media*. 42:1-20.
18. Graf M., Kantor S., Anheuer Z.E., Modos E.A., Bagdy G. (2003). m-CPP-induced self-grooming is mediated by 5-HT_{2C} receptors. *Behav. Brain Res.* 142:175–179.
19. Guptill L., Glickman L., Glickman N. (2003). Time Trends and Risk Factors for Diabetes Mellitus in Dogs: Analysis of Veterinary Medical Data Base Records (1970–1999). *The Veterinary Journal* 165:240-247.
20. Guyton A. y Hall J. (2007). Tratado de fisiología médica. 13ra edición. Madrid, Ed. Elsevier, 2924p.
21. Howitz KT., Bitterman KJ., Cohen HY., Lamming DW., Lavu S., Wood JG., Zipkin RE., Chung P., Kisielewski A., Zhang LL., Scherer B., Sinclair DA. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* life span. *Nature* 425 (6954):191-196.
22. Jepson L. (2011) Medicina de animales exóticos. *Elsevier España, S.L.* Travessera de Gràcia, 17-21-08021 Barcelona, España p.167.
23. Koo S.H., Montminy M. (2006). In vino veritas: a tale of two sirt1s? *Cell* 127:1091-1093.
24. Kumar A., Sharma SS. (2010). NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochemical and biophysical research communications* 394 (2):360-365.
25. Le Foll B., Diaz J., Sokoloff P. (2005). Neuroadaptations to hyperdopaminergia in dopamine D₃ receptor-deficient mice. *Life Sci.* 76:1281–1296.
26. Leedom LJ., Meehan WP., Zeidler A. (1987). Avoidance responding in mice with diabetes mellitus. *PhysiolBehav* 40 (4):447-451.
27. Lever C., Burton S., O'Keefe J. (2006). Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev. Neurosci.* 17:111–133.
28. Libert S., Pointer K., Bell EL., Das A., Cohen DE., Asara JM., Kapur K., Bergmann S., Preisig M., Otowa T., Kendler KS., Chen X., Hettema JM., van

- den Oord EJ., Rubio JP., Guarente L. (2011) SIRT 1 Activates MAO-A in the Brain to Mediate Anxiety and Exploratory Drive. *Cell* 147(7):1459-1472.
29. Little S.E. (2014). El Gato Medicina clínica y tratamiento. Buenos Aires, Ed. Inter-Médica, 912 p.
30. Millan MJ. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in neurobiology*. 70(2):83-244.
31. Milne JC., Lambert PD., Schenk S., Carney DP., Smith JJ., Gagne DJ., Jin L., Boss O., Perni RB., Vu CB., Bemis JE., Xie R., Disch JS., Ng PY., Nunes JJ., Lynch AV., Yang H., Galonek H., Israelian K., Choy W., Iffland A., Lavu S., Medvedik O., Sinclair DA., Olefsky JM., Jirousek MR., Elliott PJ., Westphal CH. (2007). Small molecule activators of SIRT 1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 450 (7170):712-6.
32. Miyata S., Saitoh A., Hirano S., Kamei J. (2006). Effect of streptozotocin-induced diabetes on the function of the central nervous system in rodents. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 26(2):83-7
33. Miyata S., Yamada N., Hirano S., Tanaka S., Kamei J. (2007). Diabetes attenuates psychological stress-elicited 5-HT secretion in the prefrontal cortex but not in the amygdala of mice. *Brain Res* 1147:233-239.
34. Nelson RW., Couto CG. (2010). Medicina Interna de Pequeños Animales. 4ª edición. España, Ed.Elsevier, 1467p.
35. Organización Mundial de la Salud (2016). Informe mundial sobre la diabetes. www.who.int/diabetes/global-report
36. Pamidi N., Satheesha NB. (2012). Effect of streptozotocin induced diabetes on rat hippocampus. *Bratisl Lek Listy*. 113 (10) 583-588.
37. Park E.J., Pezzuto J.M. (2015). The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1852:1071-1113.
38. Pellow S., Chopin P., File SE., Briley M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 14:149-167.
39. Ramanathan M., Jaiswal AK., Bhattacharya SK. (1998). Differential effects of diazepam on anxiety in streptozotocin induced diabetic and non-diabetic rats. *Psychopharmacology (Berl)* 135 (4):361-367.
40. Ravishankar R., Sanjiva DK., Shivaprasad SG. (2011). Effects of Duration of Diabetes on Behavioural and Cognitive Parameters in Streptozotocin-Induced Juvenile Diabetic Rats. *Original Article* 18(4): 26-31.
41. Rowland, N.E., Bellush, L.L. (1989). Diabetes mellitus: stress, neurochemistry and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 13:199-206.
42. Sandoval-Avila S., Diaz N.F., Gómez-Pinedo U., Canales-Aguirre A.A., Gutiérrez-Mercado Y.K., Padilla-Camberos E., Marquez-Aguirre A.L., Díaz-Martínez N.E. (2019). Efecto neuroprotector de fitoquímicos en cultivo de neuronas dopaminérgicas. *Neurología*. 34(2):104-124.

43. Schmatz R., Mazzanti C.M., Spanevello R., Stefanello N., Gutierrez J., Corrêa M., da Rosa M.M., Rubin M.A., Chitolina Schetinger M.R., Morsch V.M. (2009). Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 610:42–48.
44. Schmatz R., Perreira L.B., Stefanello N., Mazzanti C., Spanevello R., Gutierrez J., Bagatini M., Martins C.C., Abdalla F.H., da Silva Serres, J.D., Zanini D., Vieira J.M., Cardoso A.M., Schetinger M.R., Morsch V.M. (2012). Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie* 94:374–383.
45. Sharma S., Misra CS., Arumugam S., Roy S., Shah V., Davis JA., Shirumalla RK., Ray A. (2011). Antidiabetic activity of resveratrol, a known SIRT 1 activator in a genetic model for type-2 diabetes. 25(1):67-73.
46. Silan C. (2008). The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 897–902.
47. Spruijt B.M., van Hooff J.A., Gispen W.H. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev.* 72:825–852.
48. Srinivasan K., Ramarao P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res.* 125:451-472.
49. Walsh RN., Cummins RA. (1976). The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin.* 83:482-504.
50. Wessels A.M., Scheltens P., Barkhof F., Heine R.J. (2008). Hyperglycaemia as a determinant of cognitive decline in patients with type 1 diabetes. *Eur J Pharmacol.* 585:88–96.
51. Wormald D., Lawrence AJ., Carter G., Fisher AD. (2016). Validation of modified open field behaviour as a measure of trait anxiety in the dog. *Applied Animal Behaviour Science.*
52. Xu Y., Wang Z., You W., Zhang X., Li S., Barish PA. et al. (2010). Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of serotonin and noradrenaline system. *Eur Neuropsychopharmacol* 20 (6):405-413.