



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACEDÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA**



**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

---

**Efecto del resveratrol sobre la hiperfagia y la expresión del  
receptor de grelina (GHSR-1a) en núcleo arcuato de ratas  
diabéticas**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A:**

**I.B.Q. Fernando Villanueva Flores**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Mónica Espinoza Rojo**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Mónica Ramírez Ruano**



Chilpancingo, Guerrero, enero 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 18 días del mes de diciembre de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto del resveratrol sobre la hiperfagia y la expresión del receptor de grelina (GHSR-1a) en núcleo arcuato de ratas diabéticas", presentada por el alumno Fernando Villanueva Flores, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Mónica Espinoza Rojo  
Dirección de tesis

Dra. Mónica Ramírez Ruano  
Codirección de tesis

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Alejandro Millán Vega

Dra. Penélope Aguilera Hernández

Vo/Bo

Daniel Hernández Sotelo  
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas

Vo/Bo

Dr. Oscar del Moral Hernández  
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas



UAG  
FCQB  
Coordinación de la  
Maestría en Ciencias Biomédicas

DIRECCIÓN 2018 - 2021

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, así como en el laboratorio de Proteómica y Genómica Funcional de la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo Guerrero.

Bajo la dirección de la  
**Dra. Mónica Espinoza Rojo**

La codirección de la  
**Dra. Mónica Ramírez Ruano**

La asesoría externa de la  
**Dra. Penélope Aguilera Hernández**  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN)  
“Manuel Velazco Suárez”

La asesoría de:  
**Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez**  
**Dr. Alejandro Millán Vega**

Esta investigación se realizó durante el periodo que el C. Fernando Villanueva Flores curso la Maestría en Ciencias Biomédicas recibiendo un apoyo de beca del CONACyT.



## **Agradecimientos**

Este trabajo no fue hecho sino con la ayuda y trabajo de personas que estuvimos tras este objetivo, gracias a sus aportaciones, asesorías, capacitaciones y apoyo en la realización de los experimentos.

A la Dra. Mónica Espinoza Rojo por abrirme las puertas del laboratorio de biología molecular y genómica para permitirme trabajar, poder aplicar mis conocimientos y llevar a cabo la realización de este trabajo de investigación. Así también le agradezco su apoyo y confianza que depósito en mi a lo largo de este camino.

A la Dra. Mónica Ramírez Ruano por brindarme su apoyo y confianza a lo largo de este camino en la realización de este trabajo de investigación. Así mismo por abrirme las puertas del laboratorio de proteómica y genómica funcional, para la realización de las técnicas experimentales de este proyecto.

A mis sinodales Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, Dr. Alejandro Millán Vega y a la asesoría externa de la Dra. Penélope Aguilera Hernández, por orientarme y brindarme la asesoría necesaria para mejorar este proyecto.

A la Dra. Martha Isela Barragán Bonilla por apoyarme en la capacitación para la manipulación de los procedimientos en modelos experimentales *in vivo* como en las técnicas moleculares necesarias para la realización del proyecto, así mismo por compartir de sus conocimientos adquiridos y fundamentos teóricos necesarios para poder ejercer las técnicas moleculares de experimentación.

Al Maestro en Ciencias Juan Miguel Mendoza Bello por compartir de su conocimiento y fundamentos teóricos necesarios para la manipulación de los modelos experimentales *in vivo* y en algunas técnicas moleculares. También por su apoyo y participación en la realización de algunos procedimientos experimentales.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biología Molecular y Genómica, por haber formado un equipo de trabajo: tesis de la Maestría en Ciencias Biomédicas y licenciatura, alumnos de servicio social, de las áreas de Químico Biólogo Parasitólogo como de Biotecnología: Oscar Bahena, Karen García, Adilene Cortez, Idaily Garay, Sergio Trinidad, Gema Damián, Isaac Almazán, Brenda Escamilla, Isamar Maydeth y Ruth Poblete ¡Muchas gracias chavos!

A mis compañeros y amigos de generación de la Maestría en Ciencias Biomédicas 2017-2019 por haber formado un buen grupo de estudio y trabajo durante este tiempo: Magda, José Manuel, Luis, Ivón y Sayuri.

# *Dedicatoria*

Este trabajo es dedicado principalmente a Dios que me ha acompañado a lo largo de este camino, no dejándome caer en cada tropiezo, y triunfando a mi lado en cada logro demostrándome que todas las cosas para él son posibles.

A todos los animales con fines de experimentación, que gracias a su vida se han hecho grandes avances en la ciencia con el objetivo de mejorar la calidad de vida humana.

A mis padres Fernando Villanueva Méndez y Guadalupe Flores Martínez, que siempre he contado con su apoyo, cariño y confianza, de los cuales me siento muy orgulloso.

A mi abuelita †Lucina Méndez del Moral que, gracias a sus consejos, siempre me ayudaron a cumplir mis metas, gracias a ella tuve ese encuentro con Dios en mi vida.

A mi B612 por permitir conocer esa extraordinaria persona, estar conmigo siempre en los momentos malos y buenos, por ayudarme a visualizar ciertas cosas desde otra perspectiva, eres increíble.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>12</b>
<b>IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>V. REFERENCIAS .....</b>	<b>21</b>

## RESUMEN

**Antecedentes.** La hiperfagia se considera una manifestación clásica en la diabetes mellitus (DM), pese a que existen fármacos de primera línea que mejoran diversos síntomas de la enfermedad, no existe en la actualidad un medicamento capaz de controlar la conducta hiperfágica. Se ha propuesto que el resveratrol podría mejorar cambios en la conducta alimentaria a través de su acción en el sistema nervioso central modificando la expresión de proteínas clave en la regulación del apetito como el receptor de grelina (GHSR-1a).

**Objetivo.** Evaluar el efecto del resveratrol sobre la hiperfagia y la expresión del GHSR-1a en núcleo arcuato de ratas Wistar diabéticas.

**Materiales y métodos.** Se empleó un modelo establecido de DM por nuestro grupo de trabajo que consistió en la inyección vía intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) en ratas Wistar de edad neonatal y suplementación con agua azucarada al 10% en edad adulta. Una vez obtenidos los animales diabéticos se aplicaron los siguientes esquemas de tratamiento vía oral durante 28 días: metformina (Met; 100 mg/kg), resveratrol (Rsv; 2.25 mg/kg); y se incluyó un grupo con alimentación controlada (PF, pair feed). Se evaluaron parámetros como peso corporal, consumo de alimento y glucosa en ayuno. Para evaluar el efecto del resveratrol sobre la hiperfagia en los animales diabéticos se calculó el promedio del consumo de alimento durante los 28 días de tratamiento, ajustando la cantidad de alimento ingerida por cada 100g de su peso corporal. Se utilizó la inmunofluorescencia en muestras de tejido cerebral de los grupos de animales de estudio para evaluar la expresión del GHSR-1a en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo.

**Resultados.** Las ratas diabéticas no muestran cambios significativos en la ganancia de peso corporal, sin embargo, muestran menor ganancia de peso que el grupo control. El resveratrol mostro una ligera disminución en los niveles de glucosa en ayuno después de 28 días de tratamiento sin cambios significativos, al igual que una rata con alimentación controlada. Se observó que los animales diabéticos sin tratamiento consumían en promedio 4 gramos más de alimento que una rata control sana, pese a eso el resveratrol no afecto esa conducta hiperfágica. No se mostraron cambios significativos en los niveles de expresión del GHSR1-a en el ARC, en los grupos diabéticos. Sin embargo, las ratas diabéticas tratadas con resveratrol presentan una disminución del nivel de expresión de GHSR-1a que una rata diabética sin tratamiento.

**Conclusión.** El resveratrol no mejora la hiperfagia en las ratas diabéticas. Sin embargo, existe una tendencia no significativa en disminuir los niveles de glucosa en ayuno y los niveles de expresión del GHSR-1a.

Palabras clave: Hiperfagia, Núcleo arcuato, GHSR-1a, resveratro

## ABSTRACT

**Background.** Hyperphagia is a classic manifestation in diabetes mellitus (DM), although there are first-line drugs that improve various symptoms of the disease, there is currently no medication capable of controlling hyperphagic behavior. It has been proposed that resveratrol could improve changes in eating behavior through its action in the central nervous system by modifying the expression of key proteins in the regulation of appetite such as ghrelin receptor (GHSR-1a).

**Objective.** To evaluate the effect of resveratrol on hyperphagia and the expression of GHSR-1a in the arcuate nucleus of diabetic Wistar rats.

**Materials and methods.** An established model of DM was used by our working group that consisted of intraperitoneal streptozotocin (STZ) injection in Wistar rats of neonatal age and supplementation with 10% sugar water in adulthood. Once the diabetic animals were obtained, the following oral treatment schedules were applied for 28 days: metformin (Met; 100 mg / kg), resveratrol (Rsv; 2.25 mg / kg); and a group with controlled feeding (PF, pair feed) was included. Parameters such as body weight, food consumption and fasting glucose were evaluated. To assess the effect of resveratrol on hyperphagia in diabetic animals, the average food consumption during the 28 days of treatment was calculated, adjusting the amount of food ingested per 100g of their body weight. Immunofluorescence was used in brain tissue samples from the study animal groups to evaluate the expression of GHSR-1a in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus.

**Results.** Diabetic rats do not show significant changes in body weight gain, however, they show less weight gain than the control group. Resveratrol showed a slight decrease in fasting glucose levels after 28 days of treatment without significant changes, as did a rat with controlled feeding. It was observed that untreated diabetic animals consumed an average of 4 grams more food than a healthy control rat, despite this, resveratrol did not affect this hyperphagic behavior. There were no significant changes in the levels of GHSR-1a expression in the ARC, in the diabetic groups. However, diabetic rats treated with resveratrol have a decreased level of GHSR-1a expression than a diabetic rat without treatment.

**Conclusion.** Resveratrol does not improve hyperphagia in diabetic rats. However, there is a non-significant tendency to decrease fasting glucose levels and GHSR-1a expression levels.

**Keywords:** Hyperphagia, Arcuato nucleus, GHSR-1a, resveratrol



## I. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se caracteriza por un defecto en la regulación de la glucemia originada por una deficiencia en la producción de insulina o falta de respuesta a esta hormona (Cervantes y Presno, 2013). La DM tipo 2 (DM2) es la forma más frecuente de diabetes, incluye a más del 90% de todos los diabéticos (International Diabetes Federation, 2012). La DM2 está asociada frecuentemente con la reducción de la sensibilidad a la insulina en los tejidos blanco identificada como resistencia a la insulina. Los síntomas de la DM2 incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, visión borrosa e hiperfagia (American Diabetes Association, 2013). La hiperfagia es una manifestación clásica de la DM (Song *et al.*, 2000), que consiste en el aumento excesivo de sensación de apetito e ingesta de alimento (Endocrine Society, 2017). La ingesta de alimentos y el gasto de energía son controlados por el sistema nervioso central (SNC), siendo el hipotálamo la zona específica que regula estos procesos (Procaccini *et al.*, 2012).

El hipotálamo detecta señales periféricas, como son los cambios en concentración de las hormonas insulina, leptina y grelina. Dichos cambios son directamente relacionados con la expresión de neuropéptidos que regulan la homeostasis energética del cuerpo (Procaccini *et al.*, 2012). Morfológicamente, el hipotálamo se divide en diferentes núcleos, como el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo ventromedial (VMH), el núcleo dorsomedial (DMH), el núcleo lateral hipotalámico (LH) y el núcleo arcuato (ARC) (Williams *et al.*, 2001; Calzada *et al.*, 2008). Dentro del ARC, existen dos importantes grupos neuronales que desempeñan un papel crítico en el control de la ingesta de alimentos (Varela y Horvath, 2012). Estos grupos son funcionalmente distintos con respecto a la inducción del apetito y saciedad, debido a que expresan diferentes neuropéptidos (Chang *et al.*, 2005).

El Neuropéptido Y (NPY) y la Proteína relacionada con Agutí (AgPR) promueven la ingesta de alimentos (Neuronas NPY/AgPR) (Hahn *et al.*, 1998), mientras que la expresión de proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) (Neuronas POMC/CART) inhiben la ingesta de alimentos (Cowley *et al.*, 2003).

La expresión y secreción de estos neuropéptidos es inducida por señales que se producen fuera del SNC, en su mayoría hormonas peptídicas que regulan la alimentación (Kim *et al.*, 2014; Schwartz y Morton, 2002). Estas hormonas pueden ser clasificadas en dos grupos, las de regulación lenta que controlan la estabilidad de los depósitos grasos, como leptina e insulina y las de regulación rápida, que controlan el acto de comer, como la grelina (Schwartz y Morton, 2002).

La grelina actúa como una hormona orexigénica secretada por el estómago en condiciones de ayuno. Una vez en el ARC, la grelina se une a su receptor (GHSR1-a) (López *et al.*, 2008). El GHSR-1a es un receptor acoplado a proteínas G integrado por 366 aminoácidos y estructuralmente contiene 7 dominios transmembranales, es comúnmente expresado en SNC (Howard *et al.*, 1996; Cong *et al.*, 2010). La interacción de la grelina al GHSR-1a induce la disociación de la subunidad  $\alpha_q$  de la proteína G ubicada en el dominio transmembranal de GHSR1-a, esto permite la activación de la fosfolipasa-C, generando 2 productos: 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (López *et al.*, 2008). El IP3 desencadena la liberación de  $Ca^{2+}$  de depósitos intracelulares, mientras que el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC). El aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  provoca la activación de la proteína denominada calcio calmodulina cinasa  $\beta$  (CamKK $\beta$ ), ésta fosforila a la cinasa dependiente de AMP (AMPK) permitiendo su activación. AMPK tiene por blanco fosforilar a Foxo 1 favoreciendo su activación e importación al núcleo donde regula la transcripción de NPY/AgRP (Varela *et al.*, 2011). Por lo cual GHSR-1a cumple un papel importante en la regulación de la ingesta de alimentos debido a la activación de cascadas de señalización que llevan a la promoción de neuropéptidos que favorecen el apetito en condiciones fisiológicas (Nakazato *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha reportado que en una condición patológica como la DM posiblemente la expresión del GHSR-1a se encuentre incrementada, debido a los niveles altos de secreción de grelina que una persona puede presentar debido a una conducta hiperfágica. Estas evidencias han demostrado que el nivel de expresión de la proteína GHSR-1a y el RNAm en el ARC aumenta con niveles mayores de grelina. (Ishii *et al.*, 2002; Nogueiras *et al.*, 2004; Bresciani *et al.*, 2004; Yildirim *et al.*, 2016).

Otro de los factores relacionados a la desregulación de estas señales orexigénicas es el estrés oxidativo (Leloup *et al.*,2006).

El estrés oxidativo es un evento a nivel celular presente en la DM, debido a que los niveles altos de glucosa (hiperglicemia) que ingresan a la célula favorecen un aumento en la activación de la glicólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, dando como resultado un aumento en la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo que las defensas antioxidantes no son suficientes para neutralizar los niveles altos de ROS, generándose estrés oxidativo en la célula. Durante el estrés oxidativo, las ROS pueden unirse y dañar componentes celulares como lípidos, proteínas y DNA, alterando el funcionamiento de tejidos y órganos (Rolo y Palmeira, 2006; Xhang *et al.*, 2008). Cabe destacar que cerca del ARC se encuentra una zona denominada eminencia media, la cual presenta una barrera semi-permeable que permite fácilmente el paso de moléculas de la periferia al SNC (Rodríguez *et al.*,2010). Por lo tanto, posiblemente en una condición diabética al presentarse concentraciones altas de glucosa en sangre, la mayor parte de glucosa tendrá un acceso libre hacia el SNC principalmente hacia el ARC (Leloup *et al.*,2006). Esta situación genera que el ARC sea una zona hipotalámica susceptible a presentar estrés oxidativo.

En respuesta al estrés oxidativo se activan cinasas y factores de transcripción como JNK y IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B, p38 MAPK o PKC  $\delta$  y  $\epsilon$ , que pueden alterar la señalización de insulina y leptina, las cuales son hormonas que contribuyen a ejercer un efecto anorexigénico (Serrano y Cascales, 2015; Ha *et al.*, 2001). Estudios han reportado que la activación de PKC y JNK pueden desensibilizar al receptor de insulina (INSR) e inactivar factores de transcripción relacionados con la expresión del gen INSR (Bhattacharya *et al.*, 2007). Mientras que la activación de NF- $\kappa$ B puede favorecer la expresión de SOCS3, un supresor de la vía de JAK-STAT repercutiendo en la señalización de leptina (Xhang *et al.*, 2008).

Por lo tanto, posiblemente en una condición hiperfágica como la que ocurre en la DM, las señales anorexigénicas se vean afectadas, alterado su regulación.

Esta situación favorece que los niveles de expresión de grelina y su receptor GHSR-1a aumenten y por ende exista una alta promoción de neuropéptidos orexigénicos (Aysegul *et al.*, 2016).

En los últimos años se ha previsto de la obtención y empleo de compuestos de origen natural que tienen función antioxidante en el tratamiento de enfermedades crónicas. Uno de estos compuestos que ha sido ampliamente estudiado es el resveratrol (Jing *et al.*, 2013; Kuhad y Chopra, 2007). El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), es un compuesto fenólico particularmente abundante en las uvas, donde se produce en respuesta a condiciones de estrés ambiental (Trejo *et al.*, 2015). Este compuesto contiene en su estructura dos anillos fenólicos enlazados por un doble enlace estireno (Aggarwal *et al.*, 2004), en donde el grupo 4' del hidroxilo se reporta que es más reactivo que los grupos 3 y 5-hidroxilos, siendo la posición de los sustituyentes hidroxilo de importancia en su mecanismo de acción para inhibir la producción de ROS (Pirola y Frójido, 2008).

Se ha comprobado que el resveratrol puede atravesar la barrera hematoencefálica (Sasaki y Kitamura, 2010) y ocasionar el aumento de los niveles de enzimas antioxidantes y disminuir marcadores de estrés oxidativo en cerebro (Ates *et al.*, 2007), así como también disminuir la ingesta de alimentos en modelos experimentales *in vivo* (Kim *et al.*, 2010).

En un estudio experimental en ratas Wistar diabéticas inducidas con STZ, el tratamiento vía oral con resveratrol, disminuyó los niveles de malondialdehído (MDA), xantina oxidasa (XO) y óxido nítrico (NO) en el hipocampo, cerebelo, tronco encefálico y médula espinal. Curiosamente, los niveles de glutatión en esas zonas aumentaron en comparación con ratas diabéticas no tratadas con resveratrol (Ates *et al.*, 2007). También se ha reportado que el resveratrol es un activador de la proteína deacetilasa dependiente de NAD + Sirtuina (SIRT1), y que se expresa en núcleos hipotalámicos. SIRT1 es nutricionalmente regulada, ya que su expresión aumenta durante la restricción calórica y el ayuno. SIRT1 proporciona un vínculo entre la disponibilidad de nutrientes y el balance energético (Knight *et al.*, 2011).

En una investigación experimental se observó que la sobreactivación de SIRT1 en hipotálamo suprime la actividad de FOXO1, y la inhibición de la transcripción de AgPR, favoreciendo de esta manera la disminución en el consumo de alimentos (Tsutomu *et al.*, 2010).

Por lo anterior, se propone que el resveratrol pudiera favorecer la regulación de señales relacionadas con el apetito (Vásquez *et al.*, 2010; Calzada *et al.*, 2008).

Los mecanismos por los cuales el resveratrol, puede tener un efecto en la regulación de la ingesta de alimentos en modelos *in vivo* e *in vitro* son poco conocidos.

También se desconoce si el resveratrol puede regular la expresión de proteínas como GHSR-1a que podrían contribuir a mejorar la hiperfagia en la DM. Pese a que los mecanismos por los cuales el resveratrol puede tener un efecto en la regulación del apetito son poco esclarecidos, los estudios experimentales anteriormente descritos proponen al resveratrol como un compuesto natural prometedor que podría regular el estrés oxidativo y tener un efecto en la ingesta de alimentos. Por lo anterior, en el presente estudio examinamos el efecto del resveratrol sobre la expresión del GHSR-1a en hipotálamo y la hiperfagia en un modelo de ratas diabéticas inducidas con STZ en edad neonatal y tratadas con agua azucarada al 10%.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Modelo experimental**

Se utilizaron ratas Wistar machos de 2 días de edad, las cuales fueron expuestas a un ayuno de 8 h. Posteriormente se les aplicó una dosis de 70 mg/kg de estreptozotocina (STZ) (Sigma Aldrich; Cat. S0130) disuelta en 25  $\mu$ l de amortiguador de citrato de sodio 0.1 M pH de 4.5 vía intraperitoneal. Las ratas fueron destetadas a la tercera semana de edad y puestas en acceso libre de agua azucarada al 10% y alimentadas con una dieta estándar para roedores (Dieta comercial estándar, Chow 5001 de PURINA Rodent Lab) durante 4.5 semanas. Como control del experimento se emplearon ratas Wistar machos de 2 días de edad no inyectadas con STZ, tratadas con agua natural purificada y alimentadas con la dieta estándar. Los animales fueron tratados con base a la NOM-062-ZOO-1999 (especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) y mantenidos bajo condiciones estándar de laboratorio, sobre ciclos de 12 h luz/12 h oscuridad.

### **Monitoreo del peso corporal, consumo de alimento y agua.**

A las 8 semanas de edad, las ratas fueron separadas en jaulas individuales. Se registró el peso corporal y se calculó la cantidad de alimento y agua consumidos de cada rata diariamente.

### **Concentración de glucosa sanguínea en ayuno para confirmar la diabetes**

Se determinaron los niveles de glucosa sanguínea a la semana 10 de edad, mediante el uso del kit OneTouch® Ultra™ (Novamedical). Las ratas inyectadas con STZ y controles fueron sometidas a un ayuno de 8 h y después de este tiempo se les realizó una punción en la cola para la obtención de la muestra sanguínea la cual fue leída en un glucómetro mediante el uso de tiras reactivas. Se confirmaron como ratas diabéticas, aquellas con una concentración de glucosa de  $\geq 200$  mg/dl.

### **Curva de tolerancia a la glucosa oral**

Las ratas con nivel de glucosa  $\geq 200$  mg/dl en ayuno son descartadas para esta prueba. Previamente las ratas no descartadas fueron sometidas a un ayuno de 8 h. Se tomó una primera muestra sanguínea en la cola de la rata mediante el kit OneTouch® Ultra™. En seguida se administró 2 g de glucosa por kg de peso corporal (SIGMA-Aldrich, San Luis; USA No. Cat. G8270) vía oral. Se tomaron muestras sanguíneas a los 30, 60 y 120 min después de la administración oral de glucosa. Las ratas que presentaron una concentración  $\geq 200$  mg/dL de glucosa después de 120 min fueron consideradas como intolerantes a la glucosa, un parámetro característico de la DM.

### **Curva de tolerancia a la insulina**

Se determinó si las ratas eran resistentes a la insulina, tomando en cuenta la eficiencia del uso de insulina exógena por el organismo. Previamente, las ratas inyectadas con STZ y los controles fueron puestas en ayuno de 8 h y se determinó la concentración de glucosa mediante el kit OneTouch® Ultra™. En seguida se administraron 0.5 UI de insulina por kg de peso corporal (Insulina Recombinante Humana, Humulin R) vía intraperitoneal y se determinaron las concentraciones de glucosa a los 30, 60 y 120 min después de la administración de insulina.

### **Programa de tratamiento**

Después de confirmar que las ratas son diabéticas, se clasificaron en 5 grupos de 3 ratas de manera aleatoria: 1) ratas no diabéticas (**Control**), 2) ratas diabéticas sin tratamiento (**DM ST**), 3) ratas diabéticas tratadas con metformina (**DM+Met**), 4) ratas diabéticas tratadas con resveratrol (**DM+Rsv**) y 5) ratas diabéticas con alimentación controlada (**DM+PF**). Se administraron los tratamientos a los grupos correspondientes por vía oral, diariamente durante un periodo de 28 días: metformina (SIGMA Aldrich, Cat. D150959) 100 mg/kg (Roehrs *et al.*, 2014) y resveratrol (SIGMA Aldrich, Cat. R5010 de) 2.25 mg/kg (Jing *et al.*, 2013).

El grupo DM+PF es un grupo de alimentación controlada, al cual se le ajustó la cantidad de alimento óptima con base a la cantidad de alimento que consume una rata control por cada 100 g de peso corporal. Durante el periodo de tratamiento se monitoreo el peso corporal, consumo de alimento y agua.

### **Perfusión intracardiaca**

Después de 28 días de tratamiento, las ratas fueron anestesiadas con 65 mg/kg de pentobarbital sódico (Cheminova, Bogotá; Colombia) vía intraperitoneal. Las ratas fueron perfundidas transcardiacamente con 200-300 ml de buffer de fosfatos 0.1 M y pH 7.4, seguido de 150-300 ml de paraformaldehído (SIGMA Aldrich; No. de Cat. P6148 San Luis; USA) al 4% para la fijación del cerebro.

### **Extracción del cerebro**

Se realizó la disección del cerebro y se postfijó en solución de paraformaldehído al 4% durante 24 h. El órgano se sometió a deshidratación en buffer de fosfatos al 0.1 M con sacarosa al 15% durante 24 h, y posteriormente al 30% durante 24 h a 4°C.

### **Cortes histológicos**

En un criostato se realizaron los cortes cerebrales de 35  $\mu$ m de grosor de la zona hipotalámica ARC. Los cortes fueron puestos en solución crioprotectora (sacarosa al 30%, polietilenglicol al 30% y glicerol al 30%, disueltos en PBS 1x) y almacenados a -20°C hasta su uso.

### **Determinación de la expresión del GHSR-1a en núcleo arcuato del hipotálamo por inmunofluorescencia de libre flotación**

Para determinar la expresión del receptor hormonal GHSR-1a, en núcleo arcuato del hipotálamo, se utilizó el anticuerpo primario anti-GHSR-1a (Rabbit polyclonal antibody, cat. ab95250, Abcam CA, USA).



Los tejidos fueron lavados con buffer PBS 0.1M pH 7.4 a temperatura ambiente durante 10 min y bloqueados con BSA al 0.3%, suero normal de cabra al 10% y PBST (tween-20 0.1% + glicina 0.3 M en PBS 0.1 M) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario (1:200) en solución de bloqueo toda la noche a 4°C en agitación. Se realizaron 4 lavados con PBS 0.1 M por 10 min a temperatura ambiente y los tejidos se incubaron durante 2 h con un anticuerpo secundario (1:500) Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 568 No. de Cat. A-11036 de Invitrogen CA, USA) en solución de bloqueo. Se realizaron lavados con PBS 0.1M por 10 min a temperatura ambiente para retirar el exceso de anticuerpo secundario. Los tejidos se tiñeron con DAPI (1:1000) durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con agua bidestilada durante 10 min y las secciones fueron montadas con DABCO. Las secciones fueron evaluadas en un microscopio Zeiss (Axio Visión) y fotografiadas con una cámara digital AxioCam (Carl Zeiss). Las imágenes capturadas fueron analizadas con el software ImageJ por análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia.

### **Análisis estadístico**

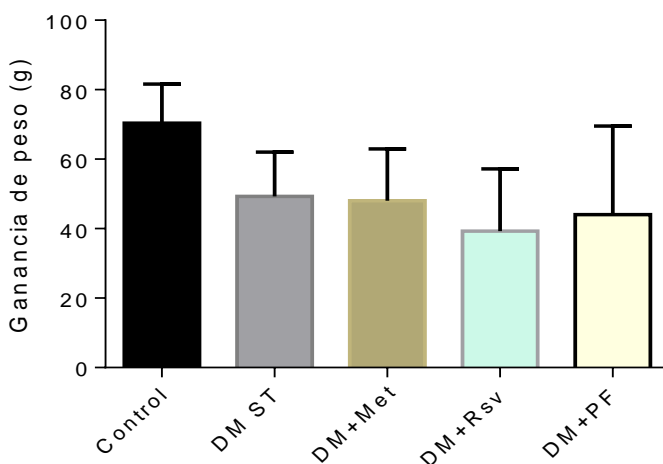
Los datos fueron expresados como media  $\pm$  EE. La variación entre grupos fue medida por análisis de varianza de una vía o dos vías (ANOVA) seguido por la prueba de Bonferroni. El análisis estadístico fue realizado usando el Software Graphad Prism v5.0. La significancia estadística fue considerada con un valor de  $p < 0.05$ .

### III. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó el efecto del resveratrol durante 28 días sobre la hiperfagia y expresión GHSR-1a en hipotálamo de un modelo de ratas diabéticas ya establecido por nuestro grupo de trabajo (Barragán, 2018). El modelo consistió en la inyección vía intraperitoneal de STZ 70 mg/kg de peso en edad neonatal y suplementación de agua azucarada 10% en edad adulta. Una vez obtenidos los animales diabéticos e hiperfágicos se incluyeron aleatoriamente en grupos de 3 contemplando un grupo control; 1) Control, 2) DM ST, 3) DM+Met, 4) DM+Rsv y 5) DM+PF.

#### Efecto del resveratrol sobre la ganancia de peso corporal en ratas diabéticas

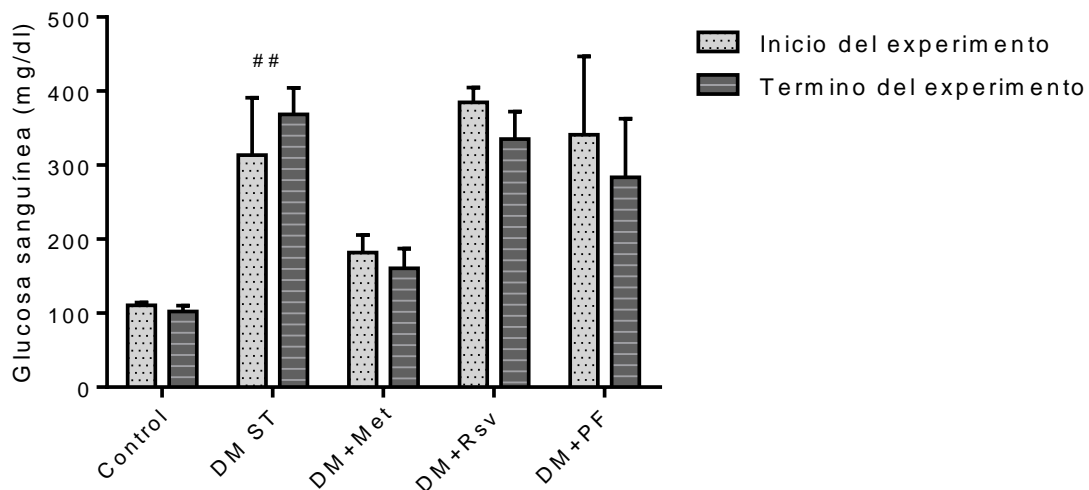
Para determinar el efecto del resveratrol sobre la ganancia de peso corporal en los animales diabéticos se calculó la diferencia promedio de peso corporal en los últimos 2 días de tratamiento contra la diferencia promedio de los 2 primeros días de tratamiento. No se encontraron diferencias significativas en los grupos diabéticos (DM ST, DM+Met, DM+Rsv y DM+PF) sin embargo se observó que mostraron una menor ganancia de peso corporal en comparación al grupo control (Figura1). Esto sugiere que el resveratrol no recupera la ganancia de peso corporal en ratas diabéticas.



**Figura 1. Efecto del resveratrol sobre la ganancia de peso corporal (g).** Control- ratas no diabéticas; DM ST- ratas diabéticas sin tratamiento; DM+Met- ratas diabéticas tratadas con Metformina; DM+Rsv- ratas diabéticas tratadas con resveratrol; DM+PF- ratas diabéticas con alimentación controlada; durante 28 días de tratamiento. Los datos son expresados como medias  $\pm$  SEM y las diferencias entre los dos grupos se analizaron con la prueba de ANOVA de una vía seguido de Bonferoni # $p < 0.05$  vs Control \*  $p < 0.05$  vs DM ST.

### Efecto del resveratrol sobre la concentración de glucosa sanguínea en ayuno.

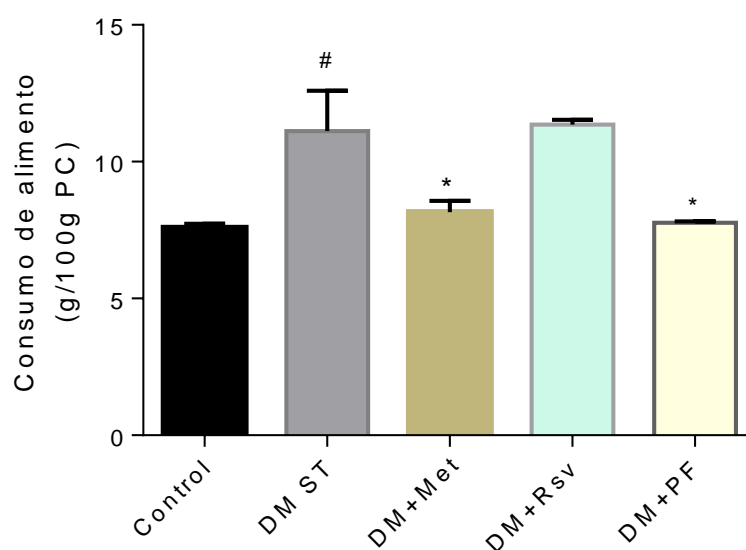
Se compararon los niveles de glucosa sanguínea en ayuno al inicio del experimento (1 día antes de iniciar los tratamientos) respecto al término del experimento (último día de tratamientos) en los diferentes grupos experimentales. Después de 28 días de tratamiento se observó que las ratas del grupo DM ST mostraron un aumento significativo en los niveles de glucosa sanguínea en comparación con el grupo control ( $p < 0.05$ ) (Figura 2). No hubo cambios significativos en los niveles de glucosa en los grupos DM+Met, DM+Rsv y DM+PF respecto al grupo DM ST. Sin embargo, se mostró una ligera disminución en los niveles de glucosa al término del experimento en el grupo DM Rsv y DM PF sin diferencias significativas.



**Figura 2. Efecto del resveratrol sobre la concentración de glucosa sanguínea después de 28 días de tratamiento.** Control- ratas no diabéticas; DM ST- ratas diabéticas sin tratamiento; DM+Met- ratas diabéticas tratadas con Metformina; DM+Rsv- ratas diabéticas tratadas con resveratrol; DM+PF- ratas diabéticas con alimentación controlada ; durante 28 días de tratamiento. Los datos son expresados como medias  $\pm$  SEM y las diferencias entre los dos grupos se analizaron con la prueba de ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni <sup>##</sup>  $p < 0.01$  vs grupo control, <sup>\*</sup>  $p < 0.05$  vs DM ST.

### Efecto del resveratrol sobre la ingesta de alimento

Para determinar si el resveratrol mostraba un efecto sobre la ingesta de alimento, se registró la cantidad de alimento consumido diariamente, se calculó el promedio y fue ajustado al peso corporal de las ratas. Las ratas control consumieron en promedio 7g de alimento por cada 100 g de peso corporal por día, sin embargo, las ratas DM ST y DM+Rsv consumieron en promedio 11 g/100 g de PC/día, 4 gramos más que las ratas control, mientras que las ratas DM+Met y DM+PF consumieron 8 g/100 g de PC y 7g/100 g PC respectivamente. El grupo DM ST mostro diferencias significativas respecto al control, lo que indica que la hiperfagia en ratas DM ST se agrava, por otra parte, el grupo DM+Met y DM+PF mostraron diferencias significativas respecto al grupo DM ST (Figura 3). Estos resultados sugieren que el resveratrol no disminuye la hiperfagia en las ratas diabéticas.

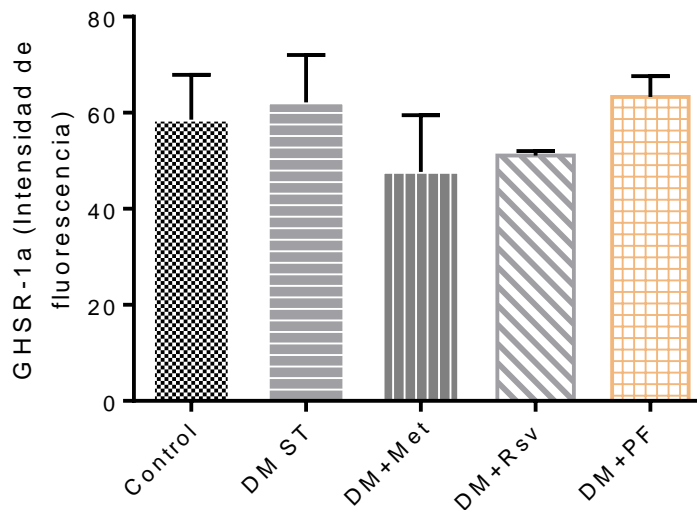


**Figura 3. Efecto del resveratrol sobre la ingesta de alimento durante 28 días de tratamiento.**

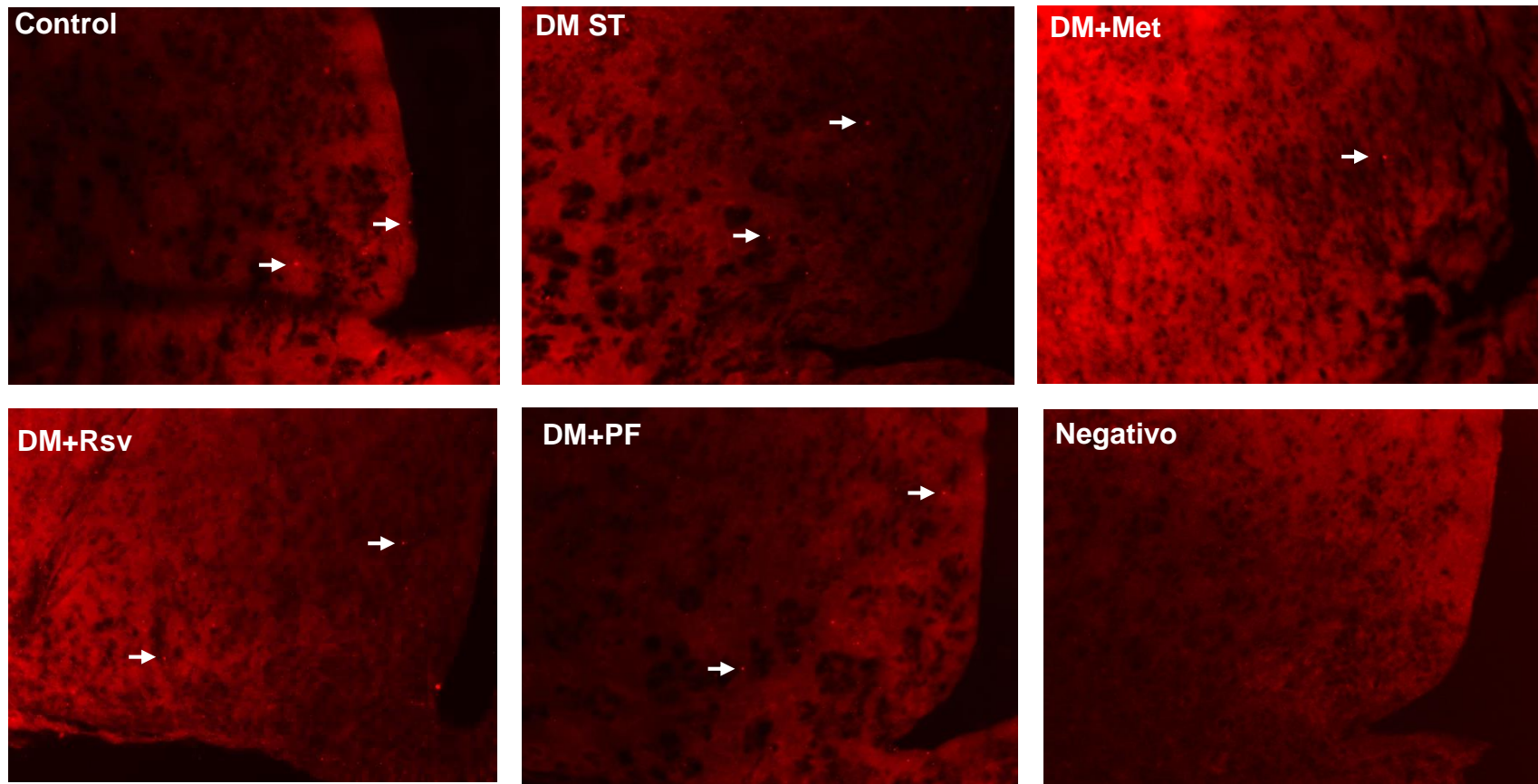
Se muestra el promedio del consumo de alimento diario ajustado al peso corporal (g/100g de peso corporal/día) en ratas Control- ratas no diabéticas; DM ST- ratas diabéticas sin tratamiento; DM+Met- ratas diabéticas tratadas con Metformina; DM+Rsv- ratas diabéticas tratadas con resveratrol ; DM+PF- ratas diabéticas con alimentación controlada durante 28 días de tratamiento. Los datos son expresados como medias  $\pm$  SEM y las diferencias entre los dos grupos se analizaron con la prueba de ANOVA de una vía seguido de Bonferroni #  $p < 0.05$  vs control, \*  $p < 0.05$  vs DM ST.

### Efecto del resveratrol sobre la expresión del GHSR-1a en núcleo arcuato en ratas diabéticas.

Para evaluar el efecto del resveratrol sobre la expresión del GHSR-1a en núcleo arcuato del hipotálamo se analizó la expresión del GHSR-1a por inmunofluorescencia en tejido cerebral de ratas de los diferentes grupos experimentales. No se encontraron cambios significativos con respecto a la expresión del GHSR-1a en los diferentes grupos experimentales, sin embargo, se pudo observar que la expresión del GHSR-1a en el grupo DM ST es ligeramente mayor respecto al Control, DM+Met y DM+Rsv, mientras que el nivel de expresión en ratas DM+PF es similar a las ratas DM ST (Figura 4 y 5). Esto sugiere que a pesar de que las ratas son sometidas a una alimentación controlada mantienen el mismo nivel de expresión del GHSR-1a que una rata diabética sin tratamiento. Las ratas DM+Rsv mostraron un nivel de expresión menor que en ratas DM ST sin cambios significativos (Figura 4 y 5). Estos resultados indican que el resveratrol no induce un efecto significativo en la modificación de la expresión del GHSR-1a en núcleo arcuato.



**Figura 4. Análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia del GHSR-1a en ARC.** Se utilizó el software de ImageJ para el análisis de intensidad de fluorescencia del GHSR-1a en los grupos Control- ratas no diabéticas; DM ST- ratas diabéticas sin tratamiento; DM+Met- ratas diabéticas tratadas con Metformina; DM+Rsv- ratas diabéticas tratadas con resveratrol; DM+PF- ratas diabéticas con alimentación controlada. Los datos son expresados como medias  $\pm$  SEM y las diferencias entre los dos grupos se analizaron con la prueba de ANOVA de una vía seguido de Bonferroni #  $p < 0.05$  vs control, \* $p < 0.05$  vs DM ST.



**Figura 5. Inmunoreactividad del GHSR-1a en ARC en los grupos experimentales.** Se muestran las fotografías de la expresión del GHSR-1a (1:200) en ARC, las marcas puntiformes brillosas corresponden al patrón de expresión del GHSR-1a, teñidas con el anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 568 (1:500). Las secciones corresponden a zona ARC del hipotálamo en los grupos Control- ratas no diabéticas; DM ST- ratas diabéticas sin tratamiento; DM+Met- ratas diabéticas tratadas con Metformina; DM+Rsv- ratas diabéticas tratadas con resveratrol; DM+PF- ratas diabéticas con alimentación controlada.

#### IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La DM inducida por STZ es un modelo ya establecido en ratas. En el presente estudio se indujo la DM mediante la inyección vía intraperitoneal de 70 mg/kg de peso de STZ y la administración de agua azucarada al 10%. La inducción de DM por este método se relacionó con una disminución en el peso corporal, hiperfagia e hiperglucemia en ayuno en comparación con el grupo de ratas control. La reducción en el peso corporal, hiperfagia e hiperglicemia en ayuno son síntomas comunes en los pacientes diabéticos. Al igual que en los humanos, también se observó una reducción significativa en el peso corporal y aumento significativo del consumo de alimento y niveles de glucosa en el grupo DM ST. En otro estudio de nuestro grupo de trabajo empleando dosis de 70 mg/kg de peso de STZ en edad neonatal y suplementación de agua azucarada al 10%, mostraron resultados similares con respecto a la pérdida de peso, hiperfagia e hiperglicemia en edad adulta (Barragán *et al.*, 2019). Otras investigaciones empleando diferentes dosis de STZ (50 y 60 mg/kg) en ratas Sprague-Dawley adultas, también han demostrado una reducción del peso corporal, aumento en la ingesta de alimento y niveles altos de glucosa en ayuno (Kaur *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2006).

La administración oral de resveratrol no tuvo efectos en los cambios de peso corporal en los diferentes grupos experimentales. Pero se observó que todos los grupos de ratas diabéticas (DM ST, DM+Met, DM+ Rsv y DM+PF) tuvieron una menor ganancia de peso corporal respecto al grupo control. El grupo DM+Rsv fue el que mostró una menor ganancia de peso durante el periodo de tratamiento, por lo cual se sugiere que el resveratrol no mejoró la ganancia de peso en ratas diabéticas. Estos resultados son similares a los reportados por Barragán, 2019 (datos no publicados) empleando la misma dosis de resveratrol durante 28 días en un modelo de ratas diabéticas inducidas con 70 mg/kg de STZ en edad neonatal. Otro estudio similar donde el resveratrol no mostro un efecto en la mejora de peso corporal fue el de Iman *et al.*,2015 en un modelo diabético de ratas Wistar inducido con 55 mg/kg de peso de STZ a la 15 semana de edad.

En cuanto al efecto del resveratrol sobre los niveles de glucosa sanguínea, no se encontraron diferencias significativas, pero se observó que existe una ligera atenuación de los niveles de glucosa después del periodo de tratamiento. El efecto del resveratrol como un hipoglucemiante ya ha sido reportado en otros estudios (Iman *et al.*,2015;Rouse *et al.*,2014).

Por otra parte, el tratamiento con resveratrol no mostró efectos significativos en la hiperfagia de los animales diabéticos. Estos resultados fueron similares a los reportados por Kaur *et al.*, 2016 en ratas macho Sprague-Dawley en las que la DM fue inducida con dosis de 50 mg/kg de peso de STZ. Probablemente la ineficiencia del resveratrol para ejercer un efecto sobre la hiperfagia está relacionada con su baja biodisponibilidad en el organismo. Estudios han reportado que el resveratrol se metaboliza eficientemente en el hígado y el intestino, lo que resulta en menos del 1% de biodisponibilidad del resveratrol administrado por vía oral (Walle *et al.*,2011; Das *et al.*, 2008). Sin embargo, Se ha reportado que debido a la naturaleza lipofílica del resveratrol, es capaz de penetrar en la membrana celular mediante difusión simple. Así mismo se ha comprobado que el resveratrol puede cruzar la barrera hematoencefálica para ejercer actividades neuroprotectoras (Wang *et al.*,2002). No obstante, todavía se desconocen sus efectos directos sobre la señalización hipotalámica, específicamente en la zona del ARC que está involucrada en la regulación del apetito a través de la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos.

La metformina mostro cambios significativos en atenuar la condición hiperfágica. Esto probablemente explica el posible papel que puede tener la metformina en inducir efectos anorexigénicos, que se ha reportado en otros estudios (Duan *et al.*,2013; Nakano & Inui 2012). Pese a que los mecanismos no son conocidos, los estudios reportan que el efecto de la metformina sobre el apetito está relacionado con la disminución de la expresión del gen de Neuropeptido Y, considerado un neuropeptido que induce el apetito en el organismo tras una cascada de señalizaciones en neuronas de segundo orden mediante la unión a sus receptores Y1, Y5 (Day *et al.*,2005).



El nivel de expresión del GHSR1-a en el ARC no mostro cambios significativos en los grupos de estudio. Sin embargo, el grupo diabético tratado con resveratrol mostro una tendencia no significativa en la disminución de la expresión del GHSR-1a en comparación con el grupo diabético sin tratamiento. Probablemente, lo anterior se explica debido a que en primera instancia el GHSR-1a se expresa en neuronas NPY/AgRP, este tipo de neuronas son menos susceptibles a daño por estrés oxidativo debido a que expresan proteínas desacoplantes denominadas UCP2, las cuales amortiguan la formación de ROS y de este modo pueden evitar daño por estrés oxidativo en este tipo de neuronas, que beneficia la integridad de componentes celulares, como la membrana celular, proteínas y DNA (Brand *et al.*,2004) En conjunto estos hallazgos llevan a la resistencia de los mecanismos orexigénicos al estrés celular (Andrews *et al.*, 2008).

Caso contrario con lo que podría pasar con otros receptores hormonales clave en la producción de neuropéptidos anorexigénicos como el receptor de insulina y leptina donde su expresión podría ser alterada por cinasas como PKC, JNK y factores de transcripción como NF-Kb las cuales son activadas en respuesta al estrés oxidativo (Bhattacharya *et al.*; 2007 Frühebeck, 2006) Cabe destacar que estos receptores se ubican en las neuronas POMC las cuales no presentan UCP2, por lo que estas neuronas son más vulnerables al daño inducido por ROS y por consecuente a la degeneración progresiva, y puede tener relevancia para la persistencia de la hiperfagia (Andrews *et al.*, 2008).

Los efectos del resveratrol sobre la ingesta de alimentos y la modificación de la expresión del GHSR-1a con la dosis utilizada en el presente estudio, parece ser prometedor y merece una mayor investigación como un tratamiento alternativo para la prevención y tratamiento de la DM.

En conjunto estos resultados demuestran que las ratas diabéticas sin ningún tratamiento sus síntomas como la pérdida de peso, la conducta hiperfágica y la hiperglicemia en ayuno se van agravando progresivamente. Por otra parte, también se demuestra que el resveratrol no mejora la ganancia de peso corporal y la hiperfagia en los animales diabéticos.

La metformina mostro cambios significativos en el consumo de alimentos. Sin embargo, existe una tendencia de que el resveratrol y una alimentación controlada pueden mejorar los niveles de glucosa en ayuno. Pese a que el resveratrol no modifica significativamente la expresión del GHSR-1a en el ARC, si muestra una tendencia en disminuir sus niveles de expresión. Los hallazgos de este trabajo sugieren que el tratamiento con resveratrol podría mejorar los síntomas diabéticos de manera parcial. Se propone que el resveratrol pudiera tener un efecto benéfico en una condición diabética si se aumenta el número de animales de estudio, la dosis de resveratrol y el periodo de tratamiento se prolonga.

## V. REFERENCIAS

- Aggarwal, B., Bhardwaj, A., Ggarwal, R., Seeram, N., Shishodia, S., Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 24 ,2783-840.
- American Diabetes Association (2013). Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 36, Supplement1,U.S.A. 64-74.
- Andrews, B., Liu, W., Wallingford, N., Erion, M., Borok, E., Friedman, M., *et al.* (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*, 454(7206), 846–851
- Ates, O., Cayli, R., Yucel, N., Altinoz, E., Kocak, A., Durak, M., *et al.* (2007). Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Clin Neurosci*, (3), 256-60.
- Barragán, M.I. (2019). Efecto de los antioxidantes sobre la expresión de moléculas que regulan la conducta alimentaria en ratas diabéticas. (Tesis de Doctorado). Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.
- Barragán, M.I., Mendoza, J.M., Aguilera, P., Parra, I., Illades, B., Ramírez, M., *et al.*, (2019). "Combined Administration of Streptozotocin and Sucrose Accelerates the Appearance of Type 2 Diabetes Symptoms in Rats," *Journal of Diabetes Research*, vol. 2019,12 pages
- Bhattacharya, S., Dey, D., Roy, S. (2007). Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci*,32(2), 405-13.
- Brand,D, *et al.* (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol. Med*, 37,755–767.
- Bresciani, E., Nass, R., Torsello, A., Gaylinn, B., Avallone, R., Locatelli, V., *et al.* (2004). Hexarelin modulates the expression of growth hormone secretagogue receptor type 1a mRNA at hypothalamic and pituitary sites. *Neuroendocrinology*, 80: 52–59.
- Calzada, L., Altamirano, O., Ruiz, R. (2008). Reguladores neuroendocrinos y gastrointestinales del apetito y la saciedad. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 65(6), pp. 468-487.
- Cervantes, R. y Presno, J. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células  $\beta$  pancreáticas. *Endocrinología y Nutrición*. 21, (3), 98-106.
- Chang, Q., Karatayev, O., Davydova, Z., Wortley, K., Leibowitz, F. (2005). Glucose injection reduces neuropeptide Y and agouti-related protein expression in the arcuate nucleus:

- A possible physiological role in eating behavior. *Molecular Brain Research* 135, 69 – 80.
- Cong, N., Golden, E., Pantaleo, N., White, M., Maudsley, S., Martin, B. (2010). Ghrelin receptor signaling: a promising therapeutic target for metabolic syndrome and cognitive dysfunction. *CNS & neurological disorders drug targets*. 9(5), 557–563.
- Cowley, A., Smith, G., Diano S. *et al.* (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 37,649-61.
- Das, S., Lin, S., Ho, C., Ng, Y. (2008). The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharm Res*, 25. 2593–2600.
- Day, E., Keen, E., Bartness, J. (2005) Role of NPY and its receptor subtypes in foraging, food hoarding, and food intake by Siberian hamsters. *Am. J. Physiol*, 289,R29–R36.
- Duan, Y., Zhang, R., Zhang, M., Sun, L., Dong, S., Wang, G., *et al.* (2013). Metformin inhibits food intake and neuropeptide Y gene expression in the hypothalamus. *Neural regeneration research*, 8(25), 2379–2388.
- Endocrine Society, 2017. (Enfermedades y condiciones, Diabetes).
- Frühebeck, G. (2006). Intracellular signaling pathways activated by leptin. *Biochem J*, 393:7-20.
- Ha, H., Yu, R., Choi, J., Lee, B. (2001). Activation of protein kinase c-delta and c-epsilon by oxidative stress in early diabetic rat kidney. *Am J Kidney Dis*, 4, 204-7.
- Howard, D., Feighner D., Cully, F., *et al.* (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273,974-7.
- Iman, F., Heba, A., Narayana, Kilarkaje.(2015). Resveratrol alleviates diabetes-induced testicular dysfunction by inhibiting oxidative stress and c-Jun N-terminal kinase signaling in rats. *Elsevier*, 13499,13.
- International Diabetes Federation, Diabetes Atlas (2012). <http://www.diabetesatlas.org>
- Ishii, S., Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Sugihara, H., & Oikawa, S. (2002). Role of Ghrelin in Streptozotocin-Induced Diabetic Hyperphagia. *Endocrinology*, 143(12), 4934–4937.
- Jing, H., Chen, K., Kuo, C., Pao, C., Chen, K. (2013). Neurodegeneration in Streptozotocin-induced diabetic rats is attenuated by treatment with resveratrol. *Neuroendocrinolog*, 98, 116-127.

- Kaur, G., Padiya, R., Adela, R. *et al.* (2016). Garlic and Resveratrol Attenuate Diabetic Complications, Loss of  $\beta$ -Cells, Pancreatic and Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Front Pharmacol*, 7:360.
- Kim, D., Leyva, S., Diano, S. (2014). Regulación hormonal del sistema hipotalámico de melanocortina. *Frontiers in Physiology* , 5 , 480.
- Kim, J., Lee, H *et al.* (2010) Resveratrol, purified from the stem of *Vitis coignetiae* Pulliat, inhibits food intake in C57BL/6 J Mice. *Arch Pharm Res*, 33(5),775–780
- Knight, M., Gutiérrez R., Lam, T., Arrieta, I., Huang, L., Schwartz, G., *et al.* (2011). Mediobasal Hypothalamic SIRT1 Is Essential for Resveratrol's Effects on Insulin Action in Rats. *Diabetes*, 60(11), 2691–2700.
- Kuhad, A. y Chopra, K., (2007). Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: Behavioral and biochemical evidences. *European Journal of Pharmacology*, 576,34-42.
- Leloup C., Magnan C., Benani A., Bonnet E., Alquier T., Offer G., *et al.*(2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes*,55, 2084–2090.
- López, M., Lage, R., Saha, K., Pérez, D., Vázquez, J., Varela, L. *et al.* (2008) Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metabolism*, 7 ,389-399.
- Nakano, M., & Inui, A. (2012). Metformin and incretin-based therapies up-regulate central and peripheral Adenosine monophosphate-activated protein affecting appetite and metabolism. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 16(Suppl 3), S529–S531.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K. *et al.* (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409(6817),194–198.
- Nogueiras, R., Tovar, S., Mitchell, E., Rayner, V., Archer, A., Dieguez, C. *et al.* (2004). Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes* ,53, 2552–2558.
- Pirola, L., & Fröjdö, S. (2008). Resveratrol: One molecule, many targets. *IUBMB Life*, 60(5), 323–332.
- Procaccini, C., De Rosa, V., Galgani, M., Carbone, F., Cassano, S., Greco, D. *et al.* (2012). Leptin-induced mTOR activation defines a specific molecular and transcriptional signature controlling CD4effector T cell responses. *J Immunol*,189, 2941–2953.
- Rodríguez, E.M., Blázquez, J.L., Guerra, M. (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private

milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*, 31(4), 757–776.

- Roehrs, M., Figueiredo, C. G., Zanchi, M. M., Bochi, G. V., Moresco, R. N., Quatrin, A., *et al.* (2014). Bixin and Norbixin Have Opposite Effects on Glycemia, Lipidemia, and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Endocrinology*, 2014, 1–10.
- Rolo, A. y Palmeira, C. (2006). Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 212, 167-178.
- Rouse, M., Younés, A., Egan, M. (2014). Resveratrol and curcumin enhance pancreatic  $\beta$ -cell function by inhibiting phosphodiesterase activity. *The Journal of endocrinology*, 223(2), 107-117.
- Sasaki, T., Kitamura, T. (2010). Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake. *Endocr J*, 57(11), 939–946.
- Schwartz, W. and Morton, J. (2002). Keeping hunger at bay. *Nature*, 418, 595-7.
- Serrano, M. y Cascales, M. (2015). Segundo curso avanzado sobre la obesidad. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia. Resistencia de la insulina, inflamación y obesidad; 374-403.
- Shinya, I., Jun, K., Hideki, T., Takako, S., Hitoshi, S., Shinichi, O. (2002). Role of Ghrelin in Streptozotocin-Induced Diabetic Hyperphagia. *Endocrinology*, 143, 4934–4937.
- Song, Q., Ying-Kui, Y., Ji-Yao, L., Qun, Z., Ira, G. (2001). Agouti-related protein is a mediator of diabetic hyperphagia. *Regulatory Peptides*, 98, 69–75.
- Su, C., Hung, M., Cheng, K. (2006). Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, 290, 1339–1346.
- Trejo, L., Chirino, G., Palomar, M. (2015). Capacidad antiteratogénica del Resveratrol en diabetes inducida por Estreptozotocina en ratas. *Peru Med Exp Salud Publica*, 32(3), 457-63.
- Tsutomu, S., Hye-Jin, K., Masaki, K., Yukari-Ido, K., Hiromi, H., Tetsuya S. (2010). Induction of Hypothalamic Sirt1 Leads to Cessation of Feeding via Agouti-Related Peptide. *Endocrinology*, 151, 6, 2556–2566.
- Varela, L., and Horvath T. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep*, 13, 1079-86
- Varela, L., Vázquez, J., Córdido, F., Nogueiras, R., Vidal, A., Diéguez, C. *et al.* (2011). Ghrelin and lipid metabolism: key partners in energy balance. *J Mol Endocrinol*, 46, R43-R6.

- Vásquez, M., & Ulate M.G. (2010). Regulación del peso corporal y del apetito. *Acta Médica Costarricense*, 52(2), 79-89.
- Walle, T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 9–15.
- Wang, Q., Xu, J., Rottinghaus, E., Simonyi, A., Lubahn, D., Sun, Y. *et al.* (2002). Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Research*, 958(2), 439–447.
- Williams, G., Bing, G., Cai, J., Harrold, A., King, J., Liu, H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits, different purposes. *Physiology & Behavior*. 74, 683–701.
- Xhang X., Xhang G., Zhang H., Karin M., Bai H., Cai D.(2008). Hypothalamic ikkbeta/nf-kappab and er stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*, 135:61–73.
- Yildirim, A., Burcin, K., Derya, D., Munis, U., Hasan, B., Sonmez, M. (2016). Expression of Ghrelin and GHSR-1a in Long Term Diabetic Rat's Kidney. *Archives of Biology and Technology*, 59, e150312.