

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



TÍTULO.

**EVALUACIÓN DE LA MEJORA COGNITIVA CON RESVERATROL A
TRAVÉS DE RECEPTORES α 7-NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA EN
UN MODELO DE RATA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN NUTRICIÓN

PRESENTA:

ALMA ESMERALDA SANTUARIO LOERA

**DIRECTOR DE TESIS
Dra. Estefanía Ochoa Ruíz**

**CO-DIRECTOR
Dra. Aracely Serrano Medina**

TIJUANA, B.C., MÉXICO

DICIEMBRE, 2022

Votos aprobatorios

Tijuana, Baja California, a 25 de noviembre del 2022.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Director de la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA MEJORA COGNITIVA CON RESVERATROL A TRAVÉS DE RECEPTORES A7-NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA EN UN MODELO DE RATA”**, elaborada por **ALMA ESMERALDA SANTUARIO LOERA**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



DRA. ESTEFANÍA OCHOA RUÍZ
Director de Tesis

C.c.p. Archivo

Tijuana, Baja California, a 25 de noviembre del 2022.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal de la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA MEJORA COGNITIVA CON RESVERATROL A TRAVÉS DE RECEPTORES A7-NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA EN UN MODELO DE RATA”**, elaborada por **ALMA ESMERALDA SANTUARIO LOERA**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE


DRA. ARACELY SERRANO MEDINA
Co-director

C.c.p. Archivo

Tijuana, Baja California, a 25 de noviembre del 2022.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal de la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA MEJORA COGNITIVA CON RESVERATROL A TRAVÉS DE RECEPTORES A7-NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA EN UN MODELO DE RATA”**, elaborada por **ALMA ESMERALDA SANTUARIO LOERA**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



DRA. ANA LAURA MARTÍNEZ MARTÍNEZ
Sinodal

C.c.p. Archivo

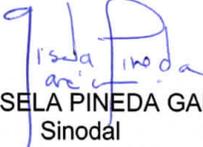
Tijuana, Baja California, a 25 de noviembre del 2022.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal de la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA MEJORA COGNITIVA CON RESVERATROL A TRAVÉS DE RECEPTORES A7-NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA EN UN MODELO DE RATA”**, elaborada por **ALMA ESMERALDA SANTUARIO LOERA**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE


DRA. GISELA PINEDA GARCÍA
Sinodal

C.c.p. Archivo

Tijuana, Baja California, a 25 de noviembre del 2022.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal de la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA MEJORA COGNITIVA CON RESVERATROL A TRAVÉS DE RECEPTORES A7-NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA EN UN MODELO DE RATA”**, elaborada por **ALMA ESMERALDA SANTUARIO LOERA**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



DRA. ADRIANA GARCÍA GURROLA
Sinodal

C.c.p. Archivo

Dedicatorias

Para mi **Padre**, que se encuentra en el cielo y que al igual que mi familia y yo estaba muy entusiasmado por querer compartir este logro juntos, sé que ya no está físicamente, pero su espíritu permanece con nosotros. Fue un padre que siempre me impulso a lograr y perseguir mis sueños, y sé que lo sigue haciendo desde otro ámbito, su más grande edificación en mi vida fue formar a un ser humano lleno de valores, amor y perseverancia.

Madre, quien me dio la vida y es un pilar muy grande en mi vida, con su amor incondicional me demuestra todos los días que puedo salir adelante ante cualquier situación.

Hermanos Nancy Yesenia Loera Ramírez, José Manuel Santuario Loera y Dayanna Sujey Santuario Loera, les agradezco con todo mi corazón por su amor y apoyo en todo momento, quienes siempre me motivan a seguir adelante, los que me esperan ver triunfar en todas las áreas de mi vida.

Mi familia es un gran motor y pilar en mi vida, agradezco a cada uno por amarme y motivarme siempre a ser una mejor persona y quienes quieren verme feliz y plena en todas las etapas de mi vida, los amo.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a **Dios** por permitirme seguir con mi propósito en la tierra, y poder continuar con mis metas, gracias por la sabiduría y por este logro que es muy significativo para mí.

Dra. Aracely Serrano Medina, por su apoyo incondicional dentro y fuera del programa, por ser un pilar en la investigación e inculcar la importancia de la investigación.

Dra. Estefanía Ochoa Ruíz, por ser tan paciente y empática conmigo, por su disposición en todo momento y su enseñanza en este caminar.

Dra. Ana Laura Martínez Martínez, la cual fue apoyo fundamental en la fase experimental, con la manipulación de los roedores, laboratorio y dudas que surgieran mostrando disposición.

Dr. Manuel Cornejo Bravo, gracias por su sabiduría y fungir de gran apoyo en cierta fase de la investigación.

MC. José Román Chávez Meléndez, quien ha edificado tanto en mi vida, aportando tanto en mi rendimiento académico como personal, y es como un padre que me guía siempre por el buen camino y desea verme triunfar en todos los aspectos de mi vida.

Comité de tesis, quienes mostraban atención, apoyo y retroalimentación en cada una de mis evaluaciones, con la intención de mejorar en dicha investigación.

Agradezco con mucho aprecio y cariño a mis compañeras y colegas, **Michelle Bojórquez Cuevas y Bibiana Cota Ramírez**, siempre mostraron hacia mí su amor, empatía y amistad leal, fueron de mis pilares como fuerza y apoyo durante la investigación. Siempre mostraron su disposición en la fase experimental del estudio, gracias por que pasábamos días de muchas horas de trabajo juntas en el laboratorio, aprendiendo y siempre siendo responsables con la investigación y la ciencia, les agradezco de todo corazón.

A mis alumnos prestadores de servicio profesional; **Carolina Espinoza Gutiérrez, Alondra Zamudio Molina, Rosa Isela Nevárez Molina, Gerardo Moreno Del Valle, Omar Noriega Vázquez, Vladimir Adal Madera Leyva**, los cuales siempre mostraron mucho compromiso, responsabilidad e interés por la investigación, gracias por su apoyo en la fase experimental del estudio y su apoyo en todo momento.

Agradezco a mi mejor amigo **Adriel Valdez Morales**, quien más que mi mejor amigo, lo puedo llamar hermano, sin duda es uno de mis motores y pilares para seguir adelante en cualquier ámbito de mi vida.

A **Carlos David Rentería Bojórquez**, le doy gracias por mostrarme su apoyo incondicional, por ser un gran compañero y por impulsarme a sacar lo mejor de mí con amor y paciencia.

A **todos mis amigos**, que gracias a Dios me siento tan afortunada, bendecida y agradecida por permitirme tener tan bonitas amistades, que siempre están dispuestas a escucharme, brindarme su apoyo a medida de lo posible y quienes estuvieron muy presentes durante este estudio, recuerdo mucho que en cualquier oportunidad que se presentara en alguna reunión les hablaba sobre resveratrol y la importancia tanto del estudio como la investigación, y me daba tanto gusto que atentamente me escuchaban, gracias por ser pilares en mi vida.

Con sinceridad y de corazón muchas gracias a todos quienes forman parte de mi vida y me muestran su amor de muchas maneras.

Agradecimientos institucionales

Agradezco a la **Universidad Autónoma de Baja California**, por permitirme realizar mis estudios de posgrado y por su gran trabajo que a pesar de estar en pandemia brindo siempre sus mejores posibilidades para continuar estudiando y estar salvaguardando a su población tanto estudiantil como docente y administrativos.

A la **Facultad de Medicina y Psicología UABC, Campus Tijuana**, por todo su apoyo con relación a sus instalaciones, equipo, laboratorios y salas de investigación. Con especial agradecimiento al laboratorio y todo su personal de Farmacología, Neurociencias y Zooterio.

Finalmente quiero dar gracias al **Sistema de Becas Nacional CONACYT, No. de beca: 779885**, por brindarme apoyo financiero para lograr que este proyecto de investigación fuera posible ser realizado y finalizado.

Vita área de estudio

Alma Esmeralda Santuario Loera, nació en Tijuana Baja California., en donde radica desde su nacimiento, el 06 de junio de 1992. Hija del Sr. Jesús Manuel Santuario Mota (finado) y la Sra. Josefina Loera Ramírez.

Finalizó sus estudios de nivel media superior en la preparatoria Maestro “Rubén Vizcaino Valencia” COBACH, obteniendo título de técnico en Administración.

Ingreso a sus estudios de educación superior en 2012, a la carrera de Químico Farmacobiólogo en la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, Campus Tijuana. En su estancia como estudiante de licenciatura participó en el Segundo Encuentro de Jóvenes Investigadores BC, con una participación en presentación oral con el título de “Epidemiología Molecular y Farmacoresistencia del VIH en Tijuana”, llevado a cabo en Tijuana B.C., en el 2014; también realizó una participación en el proyecto de investigación de “Epidemiología Molecular y Farmacoresistencia del VIH en Tijuana”. Facultad de Medicina y Psicología, Campus Tijuana en 2014; participo en el programa, “Evaluación del uso de Nanopartículas de plata en úlcera de pie diabético”, en Facultad de Medicina y Psicología UABC Campus Tijuana en el 2015; asistió como oyente al XXIV Congreso Estatal de Química Clínica y expolab Tijuana, “Quim. María de la Luz Ibarra Arias, llevado a cabo en Tijuana B.C., en el 2015; realizó sus practicas profesionales en la Industria Farmacéutica SBL Pharmaceuticals, como practicante en el departamento de Desarrollo

Farmacéutico, ubicada en Parque Industrial Pacífico III Sección, en Tijuana B.C. México, C.P. 22644, en el 2016. Egreso de la carrera de licenciatura en el 2016, obteniendo título y cédula como Química Farmacobióloga.

Contacto: santuario.alma@uabc.edu.mx

Áreas de estudio: Farmacología, neurociencias, manipulación de roedores, neuroquímica, toxicología.

Resumen

Introducción: El resveratrol es uno de los nutraceuticos más populares debido a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, neuroprotectoras, entre otras. A pesar de esto, no se conoce con exactitud la dosis recomendada para la población. Además, aún no existe suficiente evidencia fundamentada para prescribir este suplemento para mejorar la función cognitiva. **Objetivo general:** Evaluar el efecto *in vivo* de resveratrol a diferentes dosis, sobre el sistema nervioso de ratas con déficit de memoria y su influencia en la mejora de la cognición a través de $\alpha 7$ nAChRs. **Métodos:** En un modelo de ratas Wistar, se probó el efecto de resveratrol a diferentes dosis, bajo la influencia amnésica de escopolamina usando las pruebas: Laberinto Y modificado y prueba de reconocimiento de objetos novedosos (ORT). Se utilizó un antagonista selectivo del $\alpha 7$ nAChR metilcaconitina (MLA) para monitorear el recobro de la memoria después del tratamiento en las pruebas de comportamiento; se administró tacrina, un inhibidor de Acetilcolinesterasa y PNU282987, agonistas de $\alpha 7$ nAChR, como estándar de referencia administrados 60 minutos antes de los experimentos de comportamiento. Se utilizaron los análisis estadísticos ANOVA de una vía, seguido del test LSD de Fisher y la prueba t-Student. **Resultados:** Para verificar que el mecanismo de acción del resveratrol en la mejora cognitiva es mediado a través de los receptores $\alpha 7$ -nAChRs, PNU-282987 (3mg/kg) y resveratrol a dosis de 0.56, 1 y 3.2 mg/kg respectivamente fueron evaluados usando Metilcaconitina (MLA) un antagonista selectivo de los receptores $\alpha 7$ -nAChRs. La prueba de ORT en ratas con pérdida de la memoria, fue usada como modelo de estudio. Los tiempos de exploración entre los dos objetos idénticos en las dos fases de exposición

y la fase de prueba en ratas recibiendo MLA no fueron diferentes significativamente, obteniendo un patrón similar al del grupo vehículo. Esto indica que el MLA no mejora la memoria episódica, ($P > 0.05$). En cuanto al tiempo el tiempo de exploración entre el objeto novedoso y el familiar si mostro una diferencia significativa ($P < 0.001$) en todos los grupos tratados. La suplementación con resveratrol mejora la cognición con el mismo patrón que el PNU-282987, con un aumento en el índice de discriminación. Las ratas que recibieron resveratrol a dosis de 1 y 3.2 mg/kg exhibieron una mejora en la cognición ($P < 0.001$) vs. grupo control; comparación de ANOVA una vía con Fisher's LSD post-hoc). Los resultados indican que resveratrol a dosis de 3.2 mg/kg previene los efectos de la administración de MLA produciendo una mejora en la memoria episódica mediada por los receptores $\alpha 7$ -nAChRs. **Conclusiones:** La dosis mínima de resveratrol fue la de 3.2 mg/kg la cual nos arrojó resultados contundentes logrando así compensar los déficits colinérgicos en la memoria, sugiriendo tambien un resultado "hormesis" que se presenta por una estimulación en dosis bajas y una inhibición para dosis altas, que resulta en una curva de respuesta a nuevas dosis y se puede observar en forma de J o de U ivertida.

Palabras clave: *Deterioro cognitivo leve; memoria; PNU; resveratrol; receptores $\alpha 7$ -nicotínicos de acetilcolina.*

Abstract

Introduction: Resveratrol is one of the most popular nutraceuticals due to its anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective properties, among others. Despite this, the recommended dose for the population is not exactly known. Also, there is not yet enough substantiated evidence to prescribe this supplement to improve cognitive function. **General objective:** To evaluate the in vivo effect of resveratrol at different doses on the nervous system of rats with memory deficits and its influence on the improvement of cognition through $\alpha 7$ nAChRs. **Methods:** In a Wistar rat model, the effect of resveratrol at different doses under the amnesic influence of scopolamine was tested using the modified Y-maze and novel object recognition test (ORT). A selective $\alpha 7$ nAChR antagonist methylcaconitine (MLA) was used to monitor memory recovery after treatment in behavioral tests; Tacrine, an Acetylcholinesterase inhibitor, and PNU282987, $\alpha 7$ nAChR agonists, were administered as reference standard administered 60 min before behavioral experiments. One-way ANOVA statistical analyzes were used, followed by Fisher's LSD test and Student's t-test. **Results:** To verify that the mechanism of action of resveratrol in cognitive enhancement is mediated through $\alpha 7$ -nAChRs, PNU-282987 (3mg/kg) and resveratrol at doses of 0.56, 1, and 3.2 mg/kg, respectively, were evaluated using Meticaconitine (MLA) a selective antagonist of receptors $\alpha 7$ -nAChRs. The ORT test in rats with memory loss was used as a study model. The exploration times between the two identical objects in the two exposure phases and the test phase in rats receiving MLA were not significantly different, obtaining a pattern similar to that of the vehicle group. This indicates that MLA does not improve episodic memory, ($P > 0.05$). Regarding the time,

the exploration time between the novel object and the familiar one did show a significant difference ($P < 0.001$) in all the treated groups. Resveratrol supplementation improves cognition in the same pattern as PNU-282987, with an increase in the discrimination index. The rats that received resveratrol at doses of 1 and 3.2 mg/kg exhibited an improvement in cognition ($P < 0.001$) vs. control group; comparison of one-way ANOVA with Fisher's LSD post-hoc). The results indicate that resveratrol at a dose of 3.2 mg/kg prevents the effects of MLA administration, producing an improvement in episodic memory mediated by $\alpha 7$ -nAChR receptors. **Conclusions:** The minimum dose of resveratrol was 3.2 mg/kg, which gave us convincing results, thus compensating for cholinergic deficits in memory, suggesting a "hormesis" result that occurs due to stimulation at low doses and inhibition at high doses, which results in a response curve to new doses and can be observed in the form of a J or an inverted U.

Keywords: Mild cognitive impairment; memory; PNU; resveratrol; $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors.

ÍNDICE

Portada	
Votos aprobatorios	1
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Agradecimientos institucionales	10
Vita área de estudio	11
Resumen	13
Abstract	15
Lista de tablas	19
Lista de figuras	20
Abreviaturas	21

CAPÍTULO I

1. Introducción	24
1.1 Antecedentes	24
1.1.1 Evaluación del efecto de resveratrol en estudios clínicos	30
1.1.2 Evaluación del efecto de resveratrol, estudios en modelos murinos	30
1.1.3 Evaluación de los efectos de resveratrol en los receptores $\alpha 7$ hAChR's	31
1.1.4 Evaluación de la toxicidad de resveratrol en modelos murinos	34
1.1.5 Evaluación de resveratrol con dosis efectivas y toleradas en modelos murinos sobre la memoria	37
1.2 Planteamiento del problema	41
1.3 Justificación	42

1.4 Pregunta de investigación	44
1.5 Hipótesis	44
1.6 Objetivos	45
1.1.6.1 <i>Objetivo general</i>	45
1.1.6.2 <i>Objetivos específicos</i>	45
CAPÍTULO II	
2. Metodología	46
2.1 <i>Modelos conductuales para evaluar la memoria en animales</i>	46
2.2 <i>Tipo de estudio</i>	47
2.3 <i>Población/ muestra</i>	47
2.4 <i>Criterios de inclusión</i>	47
2.5 <i>Variables</i>	49
2.6 <i>Equipo y materiales</i>	52
2.7 <i>Procedimiento</i>	53
2.8 <i>Análisis de datos</i>	59
2.9 <i>Consideraciones bioéticas</i>	60
CAPÍTULO III	
3. Resultados	61
4. Discusión	70
5. Conclusiones	74
6. Recomendaciones	74
7. Referencias	75

Lista de tablas

Tabla 1. Dosis de resveratrol evaluadas con efecto benéfico en la memoria	38
Tabla 2. Descripción de la variable dependiente (memoria)	49
Tabla 3. Descripción de la variable independiente (resveratrol)	50
Tabla 3.1. Descripción de la variable independiente (escopolamina)	50
Tabla 3.2. Descripción de la variable independiente (PNU-282987)	51
Tabla 3.3. Descripción de la variable independiente (MLA)	51
Tabla 3.4. Descripción de la variable independiente (Tacrina)	51
Tabla 4. Descripción de la operacionalización de las variables independientes y dependiente	52
Tabla 5. Distribución de grupos de experimentación y prueba (fármaco y dosis de compuestos y suplemento). N= 5-7 ratas por grupo	55
Tabla 6. Distribución de dosis de suplementación de resveratrol para cada grupo de prueba. N=5-7 ratas por grupo	55

Lista de figuras

Figura 1. Actividad locomotora	62
Figura 2. Laberinto en Y modificado	64
Figura 3. Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (ORT)	65
Figura 4. Índice de discriminación	66
Figura 5. Tiempos de exploración para objetos idénticos (Fo y F)	68
Figura 6. Índice de discriminación	69

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AChE	Acetilcolinesterasa
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin Trifosfato
A β	beta-amiloide
α 7hAChR's	Receptores α 7 de acetilcolina
BHE	Barrera hematoencefálica
BUN	Niveles de nitrógeno ureico
Ca ²⁺	Alta permeabilidad de calcio
CAS	Sitio aniónico catalítico
ChE	Actividad inhibidora de la colinesterasa
DI	Índice de discriminación
DCL	Deterioro cognitivo leve
EA	Enfermedad de Alzheimer
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
i.p	Vía intraperitoneal

kg	Kilogramo
LBD	Trastorno de cuerpos de Lewy
mg	Miligramo
MAO	Monoamino oxidasa
MAO-B	Monoamino oxidasa B
MLA	Metilcaconitina
NPC	Células progenitoras neurales
NTPDasa	Nucleótidos tri y difosfohidrolasas
NOM	Norma Oficial Mexicana
ORT	Prueba de reconocimiento de objetos novedosos
<i>P</i>	Significancia
PAS	Sitio aniónico periférico
PolyQ-Htt	Proteína polyQ Huntingtina
PNU282987	Agonistas de $\alpha 7$ -nAChR
RCV	Respuesta cerebrovascular
SC	Escopolamina
SD	Desviación estándar
SS	Solución salina
SGZ	Zona subgranular del giro

STZ	Estreptozotocina
TLR	Receptores tipo toll
TN	Tiempo novedoso
TF	Tiempo familiar
μM	Micromolar
UUO	Obstrucción ureteral unilateral

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El deterioro cognitivo leve (DCL) se caracteriza por un daño en la memoria, la atención y las funciones ejecutivas (Eshkoo et al., 2015). El DCL se presenta generalmente en la vejez; Sin embargo, esta patología cerebral comienza su desarrollo desde edades tempranas, por lo cual, el tratamiento del DCL va encaminado por un lado a prevenir su aparición, y por el otro, a retrasar el desarrollo de la demencia, afectando de manera positiva a la salud pública (Domínguez & Barbagallo, 2018).

El DCL puede evolucionar a demencia, la cual es una forma más grave de deterioro cognitivo, esto se da en una tasa aproximada de 10% cada año, es decir 10 de cada 100 personas que sufren DCL desarrollarán demencia cada año, y esto aumenta entre un 80% a un 90% después de aproximadamente 6 años de padecer DLC (Eshkoo et al., 2015). Lo anterior es relevante ya que, la expectativa de vida a nivel mundial supera los 60 años (Beard et al., 2016), de hecho, en los países con más esperanza de vida se prevé que los niños nacidos desde el 2010 superen los 100 años de vida (Domínguez & Barbagallo, 2018). Lo anterior va de la mano con el aumento de la prevalencia de DCL, que aumentará exponencialmente en paralelo con el envejecimiento de la población mundial, esto implica una notable carga financiera y humana debido a que la demencia es una de las principales causas de discapacidad en la población geriátrica (Prince et al., 2015).

Cabe destacar, que no existe cura para el DCL y la demencia, debido a que las causas del DCL y su progresión a demencia no se han esclarecido completamente, por lo que se requiere mayor investigación en este tema (Eshkoo et al., 2015). En este sentido, el impacto de la dieta y la nutrición en el deterioro cognitivo asociado a la edad se está convirtiendo en un campo en crecimiento como potencial contribuyente modificable (Domínguez & Barbagallo, 2018).

En particular, la memoria es una de las funciones más importantes de la esfera cognitiva, su pérdida es de las principales afecciones en el DCL y tiene serias consecuencias en la calidad de vida de las personas, produciendo preocupación y estrés en los pacientes y la familia, por lo cual, las estrategias preventivas tienen un interés especial en prevenir su deterioro (Stites et al., 2018; Zlotnik & Vansintjan, 2019).

La memoria se define como la facultad de codificar, almacenar y recuperar información, en esta función cognitiva el estudio del sistema colinérgico central es de gran interés, ya que juega un papel crucial en las funciones de aprendizaje y memoria para humanos y animales. Según la hipótesis colinérgica, la disfunción de la memoria de los ancianos se debe a la pérdida de neuronas colinérgicas centrales y a la disminución de los niveles de acetilcolina cerebral, por lo que juega un papel importante en el desarrollo de DCL (Rahimzadegan & Soodi, 2018).

Por lo tanto, este sistema colinérgico es un blanco terapéutico para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, en particular los receptores $\alpha 7$ nicotínicos de acetilcolina (7hAChR's), los cuales son canales iónicos activados por ligandos permeables a cationes que se expresan abundantemente en el cerebro de los mamíferos

con una alta permeabilidad al calcio (Ca^{2+}). Los $\alpha 7\text{nAChR}$ son péptidos monoméricos constituidos por cinco subunidades idénticas dispuestas en forma de barril y que mantienen en su centro el poro iónico. Estos receptores se han implicado en la modulación de funciones cognitivas como la atención y la memoria episódica (van Goethem et al., 2019).

Por otro lado, los nutraceuticos se refieren a cualquier partícula de alimento (entero) o una parte del alimento (producto alimenticio purificado) que brinda beneficios médicos o para la salud, incluida la prevención y el tratamiento de enfermedades (Venkatakrishnan et al., 2019). Sin embargo, recientemente los nutraceuticos se han redefinido cómo un producto alimenticio o sus metabolitos secundarios que podrían brindar beneficios para la salud (para prevenir o tratar enfermedades) en el ámbito clínico (Daliu et al., 2018; Santini et al., 2018). Numerosos estudios han indicado el efecto neuroprotector de los nutraceuticos (medicina complementaria) contra varios trastornos neurodegenerativos mediante la regulación del metabolismo energético, el estrés neurooxidativo, la neuroinflamación y la mejora de la neurogénesis (mejora la proliferación de células progenitoras neurales (NPC)), factor de crecimiento, neurotrofinas a través de diversas vías de señalización (Pandareesh et al., 2018; Dadhania et al., 2016).

Los procesos oxidativos son factores importantes en la neurodegeneración, por lo que parece racional que los antioxidantes sean beneficiosos en el tratamiento y la prevención de los daños en la memoria, evitando la transición de DCL a demencia (Veurink et al., 2020). Los antioxidantes bloquean el proceso de oxidación al neutralizar los radicales libres, al hacerlo, los antioxidantes se oxidan así mismos (Atta et al., 2017). El término

se usa a menudo para describir inhibidores de la peroxidación de lípidos, ya que los radicales libres además de la peroxidación lipídica también dañan las proteínas, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y casi cualquier tipo de biomolécula (Veurink et al., 2020).

El resveratrol (trans-3,4,5-trihidroxiestilbeno), es un nutracéutico con varias propiedades promotoras a la salud debido a su actividad antiinflamatoria, antidiabética, anticancerígena, antioxidante, antihiperlipidémica, así como a sus propiedades cardioprotectoras y neuroprotectoras (Pourhanifeh et al., 2019; Berman et al., 2017). Una de las mayores desventajas del resveratrol es la escasa biodisponibilidad debido a la alta tasa de metabolización (inestabilidad), la escasa propiedad lipofílica y, por lo tanto, las presentaciones donde está esterificado (matriz alimentaria) con piperina o quercetina, así como por encapsulación liposomal mejoran su biodisponibilidad (Chiu et al., 2020).

El resveratrol tiene una vida media corta, aproximadamente 0.5 horas en ratas y es metabolizado rápidamente y de manera similar por microsomas de hígado de rata y humano. Circula como conjugados a concentraciones más altas que la forma original. Al igual que con las hormonas esteroideas, la forma sulfatada puede servir como sustrato para las sulfatasas tisulares que podrían producir concentraciones tisulares locales más altas (Crowell et al., 2004).

El resveratrol es un polifenol natural que se encuentra en el vino tinto, el ruibarbo y frutas como los arándanos, muchas variedades de uvas rojas y los cacahuets por nombrar algunos ejemplos (Pennisi et al., 2017). Existen dos isoformas para el resveratrol, como molécula importante en el vino tinto, trans- resveratrol y cis- resveratrol, solo el primero se asocia principalmente con beneficios para la salud (Wang & Chatterjee, 2017).

Debido a sus beneficios para la salud, el resveratrol es uno de los polifenoles naturales más investigados. Los beneficios para la salud del resveratrol se destacaron por primera vez a principios de la década de 1990 en el estudio de la paradoja francesa, que abrió una extensa actividad de investigación sobre este compuesto. Desde entonces, se atribuyeron al resveratrol varias actividades farmacológicas que incluyen propiedades antioxidantes, antienvjecimiento, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas, cardioprotectoras y neuroprotectoras, esta última es de gran interés en la actualidad (Colica et al., 2018; Pannu et al., 2019; Andrade et al., 2018; Xiao et al., 2019).

La principal propiedad neuroprotectora del resveratrol es prevenir la antiagregación/plegamiento incorrecto de proteínas o anti amiloidogénica (anti amiloidogénesis) al abolir los ovillos de proteína tau neurofibrilar o la formación y deposición de la proteína beta-amiloide ($A\beta$) (hiperfosforilación) y así mejorar la función cognitiva. Además, restaura los niveles de ATG4 por lo que, facilita la degradación de la agregación de la proteína polyQ Huntingtina (PolyQ-Htt) (restablece la actividad de la autofagia) y, por lo tanto, protege a las neuronas de la toxicidad por dopamina (Vidoni et al., 2018).

Cada vez hay más pruebas que sugieren que la neuroinflamación es el origen de la enfermedad de Alzheimer (EA). Las proteínas agregadas y mal plegadas (p. ej., proteína beta-amiloide) se unen a los receptores tipo toll (TLR) de la microglía y las células CD4, iniciando respuestas inmunitarias innatas con la producción de mediadores inflamatorios (Heneka et al., 2015). La neuroinflamación es un mecanismo de protección clave; sin embargo, cuando no se controla y es crónico, puede volverse dañino por la liberación incesante de radicales libres, enzimas proteolíticas, óxido nítrico, factores

complementarios, citocinas o aminoácidos excitadores (Domínguez & Barbagallo, 2018). La acreción de beta-amiloide induce neuroinflamación, que produce consecutivamente más beta-amiloide, propagando la lesión. Se ha demostrado un aumento de la neuroinflamación en pacientes con DCL y EA en comparación con los controles sanos utilizando tomografía por emisión de positrones e imágenes con radioligando C-11-DAA1106 (Domínguez & Barbagallo, 2018). La beta-amiloide puede conducir a una preponderancia de células M1 frente a M2 (células antiinflamatorias) y a la pérdida de la capacidad de cambiar de fenotipo y disminuir la destrucción. El óxido nítrico en exceso puede inducir señales inflamatorias, que son actores clave en las enfermedades neurodegenerativas con la consiguiente muerte neuronal (Yuste et al., 2015). Los estudios en modelos animales de EA han demostrado una reducción de la neurodegeneración del hipocampo y un aumento de rendimiento de la memoria cuando se suplementa con resveratrol (Domínguez & Barbagallo, 2018).

A pesar de que se ha estudiado ampliamente el efecto del resveratrol en la salud, cabe destacar que las dosis recomendadas no están bien definidas, ya que existe una enorme variabilidad en el efecto que tiene el resveratrol dependiendo del modelo que se esté estudiando y de la vía de administración, en particular, las dosis óptimas de resveratrol capaces de maximizar los beneficios para la salud sin aumentar los problemas de toxicidad aún no se ha dilucidado y es un área de investigación extensa (Mankowski et al., 2020). A continuación se describirán diferentes estudios en los que se evaluó si la suplementación con resveratrol demuestra ser segura, bien tolerada y con efectos benéficos, así como los casos en los que el resveratrol ha mostrado tener efectos adversos.

1.1.1 Evaluación del efecto de resveratrol en estudios clínicos

Los ensayos clínicos en humanos donde se evalúa el efecto de resveratrol sobre la cognición son limitados. Un estudio pequeño que incluyó a 23 personas con sobrepeso, de 50 a 75 años, que recibieron resveratrol (200 mg / día) durante 26 semanas frente a un grupo que recibió placebo, informó un mejor rendimiento de la memoria y una mayor conectividad funcional del hipocampo en la neuroimagen (Domínguez & Barbagallo, 2018).

Así mismo, Evans et al. (2017), realizaron un ensayo clínico aleatorizado con placebo controlado, concluyendo que el consumo regular de 150 mg de *trans*-resveratrol durante 14 semanas provocó una elevación del 17% en la capacidad de respuesta cerebrovascular (RCV) y la memoria verbal, así como el estado de ánimo en comparación con el placebo en mujeres posmenopáusicas.

1.1.2 Evaluación del efecto de resveratrol, estudios en modelos murinos

Shibu et al. (2017) realizó un estudio en ratones hembra BALB/c de 2 meses de edad, a los cuales se les administró antígeno de *Brucella abortus* para inducir fatiga crónica, lo que redujo la proliferación celular en la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo (SGZ, por sus siglas en inglés) del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de DG y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), en relación con los controles. El tratamiento posterior con resveratrol (40 mg por kg⁻¹ por día⁻¹) durante 1 mes atenuó completamente la reducción de la proliferación celular y regresó

a sus niveles normales las cantidades de ARNm del BDNF del hipocampo, en relación con los controles de vehículo.

Kumar et al. (2016), con la finalidad de evaluar los efectos biológicos del resveratrol en la neurogénesis, estudiaron la suplementación con el compuesto sobre la proliferación y supervivencia de las células progenitoras neurales (NPC, por sus siglas en inglés) en cultivo y en el hipocampo de ratas envejecidas. El resveratrol ejerce efectos bifásicos sobre los NPC; concentraciones bajas (10 μ M) estimularon la proliferación celular mediada por un aumento de la fosforilación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y cinasas p38, mientras que las concentraciones altas (>20 μ M) exhibieron efectos inhibidores. La administración de resveratrol (20 mg/kg de peso corporal) a ratas adultas aumentó significativamente el número de células recién generadas en el hipocampo, con una regulación positiva de las proteínas p-CREB y SIRT1 implicadas en la supervivencia neuronal y la extensión de la vida útil, respectivamente. Los estudios han demostrado que el resveratrol exhibe discrepancias dependientes de la dosis y en una concentración más baja puede tener un impacto positivo en la proliferación, la supervivencia de los NPC y la neurogénesis del hipocampo de ratas envejecidas, lo que implica su potencial como candidato para terapias restaurativas contra los trastornos relacionados con la edad.

1.1.3 Evaluación de los efectos de resveratrol en los receptores α 7hAChR's

Existe una gran cantidad de investigaciones publicadas que muestran efectos beneficiosos del resveratrol en la salud. En particular nos enfocaremos en cómo el

resveratrol actúa a través de los receptores $\alpha 7$ hAChR's, que como se mencionó previamente son relevantes para el funcionamiento de la memoria.

Yang et al., (2017) diseñaron, sintetizaron y evaluaron una serie de derivados de base de Mannich híbridos de piridoxina-resveratrol como agentes multifuncionales para determinar la actividad inhibidora de la colinesterasa (ChE) y la monoamino oxidasa (MAO). Para explorar más a fondo las propiedades multifuncionales de los nuevos derivados, también probaron sus actividades antioxidantes y propiedades quelantes de metales. Los resultados mostraron que la mayoría de estos compuestos podrían inhibir selectivamente la acetilcolinesterasa (AChE) y monoamino oxidasa B (MAO-B). Entre ellos, los compuestos 7d y 8b exhibieron la mayor potencia para la inhibición de AChE con concentraciones de 2.11 μ M y 1.56 μ M, respectivamente, y el compuesto 7e exhibió la mayor inhibición de MAO-B con una concentración de 2.68 μ M. El análisis cinético de inhibición les reveló que el compuesto 7d mostró una inhibición de tipo mixto, uniéndose simultáneamente al sitio aniónico catalítico (CAS, por sus siglas en inglés) y sitio aniónico periférico (PAS, por sus siglas en inglés) de la AChE. También, realizaron un estudio de modelado molecular para investigar el modo de unión de estos híbridos con MAO-B. Además, todos los compuestos mostraron buenas propiedades antioxidantes y quelantes de metales. En conjunto, detallan que estos hallazgos preliminares pueden ser un nuevo punto de partida para un mayor desarrollo de agentes multifuncionales para la enfermedad de Alzheimer.

Por otra parte, en la investigación de Schmatz et al., (2009), el objetivo fue investigar los efectos del resveratrol, sobre las actividades de los nucleótidos tri y difosfohidrolasas (NTPDasa), 5'-nucleotidasa y acetilcolinesterasa (AChE) en los sinaptosomas de la

corteza cerebral de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ). Los resultados demostraron que las actividades de NTPDasa y 5'-nucleotidasa aumentaron significativamente en el grupo de animales diabéticos/solución salina ($p < 0,05$) en comparación con el grupo de control/solución salina. El tratamiento con resveratrol aumentó significativamente las actividades de NTPDasa, 5'-nucleotidasa en los grupos de diabéticos/resveratrol 10 mg/kg y diabéticos/resveratrol 20 mg/kg ($P < 0,05$) en comparación con el grupo de diabéticos/solución salina. También es importante mencionar que resveratrol per se a una dosis de 20 mg/kg fue capaz de inhibir significativamente la actividad AChE en los sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas diabéticas. Cuando se administró resveratrol per se también hubo un aumento en las actividades de estas enzimas en los grupos control/resveratrol 10 mg/kg y control/resveratrol 20 mg/kg ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control/solución salina. La actividad de AChE aumentó significativamente en el grupo de diabéticos/solución salina ($p < 0,05$) en comparación con el grupo de control/solución salina. El tratamiento con resveratrol previno este aumento en los grupos de diabéticos/resveratrol 10 mg/kg y diabéticos/resveratrol 20 mg/kg. En conclusión, este estudio demostró que el resveratrol interfiere con la neurotransmisión purinérgica y colinérgica al alterar las actividades de NTPDasa, 5'-nucleotidasa y AChE en los sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas diabéticas. En este contexto, sugirieron que el resveratrol debe ser considerado como potencial terapéutico y herramienta científica para ser investigado en los trastornos cerebrales asociados con la diabetes.

Jang et al., 2008 en el curso del cribado de inhibidores de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa de productos naturales como el resveratrol mediante un método llamado Ellman *in vitro*, utilizando un extracto de las raíces de *Vitis amurensis* Rupr. (Vitaceae) mostró una actividad inhibidora significativa de la colinesterasa. Empleando un método de HPLC ligado a bioensayo, seguido de un método de HPLC semipreparativo, aislaron y caracterizaron dos compuestos de interés como vitisina A y heyneanol A. Ambos compuestos inhibieron eficazmente tanto la acetilcolinesterasa como la butirilcolinesterasa de una manera dependiente de la dosis y exhibieron una mayor actividad contra butirilcolinesterasa en comparación con la de galantamina, un control positivo. Además, la agregación de beta-amiloide se evaluó *in vitro* utilizando un ensayo de fluorescencia de tioflavina T para expandir su perfil de actividad.

1.1.4 Evaluación de la toxicidad de resveratrol en modelos murinos

Se han reportado efectos tóxicos del resveratrol a dosis altas en modelos animales experimentales. Por ejemplo, el resveratrol puede provocar la muerte debido a inflamación cardíaca, dilatación de los túbulos renales, necrosis de la papila, inflamación aguda en el área pélvica y nefropatía severa. Además, las dosis elevadas de resveratrol podrían provocar un aumento significativo de los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y de creatinina, así como de las enzimas hepáticas (Crowell et al., 2004); (Shaito et al. 2020).

El rango de dosis de resveratrol *in vivo* aún no se ha determinado, es importante diferenciar la toxicidad *in vitro* (por ejemplo, concentraciones superiores a 25 μ M) de lo que puede ser la dosis tóxica de resveratrol *in vivo* (Shaito et al., 2020).

En un estudio en el que se evaluó el efecto cardioprotector del resveratrol en paralelo con otra formulación que contiene resveratrol (Longevinex), se administraron tres dosis diferentes de resveratrol y Longevinex (2,5 mg/kg, 25 mg/kg y 100 mg/kg) a un grupo de ratas durante 30 días, mientras que el grupo control recibió placebo. Los datos mostraron una respuesta hormonal para resveratrol puro, que proporcionó cardioprotección a dosis más bajas y efectos perjudiciales a dosis más altas. El resveratrol redujo significativamente el tamaño del infarto de miocardio y la apoptosis de los cardiomiocitos a dosis de 2.5 mg/kg y 25 mg/kg. Sin embargo, por encima de 50 mg/kg (datos no mostrados a 50 mg/kg), el tamaño del infarto de miocardio y el número de cardiomiocitos apoptóticos aumentaron significativamente, lo que indica daño celular. Curiosamente, Longevinex no mostró ninguna acción hormonal, permaneciendo cardioprotector incluso a 100 mg/100 g de peso corporal, una dosis que indujo un 100% de muerte cardíaca cuando se probó con resveratrol puro (Juhasz et al., 2010).

Por otra parte, se estudió en ratones el papel de resveratrol en la fibrosis renal *in vivo*, la administración de resveratrol en dosis bajas (≤ 25 mg / kg) mejoró parcialmente la función renal en ratones con daño renal causado por obstrucción uretral unilateral (UUO); la administración de dosis altas de resveratrol (≥ 50 mg/kg) producen la pérdida de su efecto antifibrótico, agravando en su lugar la fibrosis renal. Cabe destacar que los ratones con

daño renal causado por UO fueron más susceptibles a la lesión renal inducida por resveratrol en dosis altas que los ratones normales (Liu et al., 2019).

Así mismo, en un estudio realizado por James et al., (2004), se evaluó la toxicidad potencial del resveratrol, se administró a las ratas por sonda nasogástrica 0 (solo vehículo), 300, 1000 y 3000 mg de *trans*-resveratrol por kilogramo de peso corporal por día durante 4 semanas. Semanalmente se realizaron mediciones de peso corporal, cálculos de consumo de alimentos y exámenes físicos. Todos los animales fueron observados diariamente para detectar signos clínicos de toxicidad. No indujeron efectos adversos hasta la administración de resveratrol de los 300 mg/kg/día, y con respecto a las dosis de 1000 y 3000 mg/kg/día, indujeron toxicidad renal. La mayoría de los eventos adversos ocurrieron en las ratas a las que se les administró 3000 mg por kilogramo de peso corporal por día. La administración de 1000 o 300 mg de resveratrol/kg de peso corporal/día no produjo hallazgos nefrotóxicos. Se produjo anemia en las hembras tratadas con el grupo de dosis de 3000 mg/kg de peso corporal/día. La anemia puede haber estado relacionada con la lesión renal, ya que se habría producido una reducción de la síntesis de eritropoyetina en los riñones. En este estudio los autores demostraron que se pueden lograr en ensayos *in vivo*, concentraciones de resveratrol que son tóxicas. Sin embargo, las mediciones plasmáticas no se optimizaron para medir las concentraciones máximas de resveratrol y sus metabolitos, y estos últimos probablemente alcanzaron concentraciones significativamente superiores a 1-3 µg/ml. Por lo tanto, se necesitan estudios adicionales para definir el índice terapéutico del resveratrol y sus metabolitos.

1.1.5 Evaluación de resveratrol con dosis efectivas y toleradas en modelos murinos sobre la memoria

Sánchez-Melgar et al. (2020), propuso un experimento de señalización con adenosina y glutamato, observaron que a una dosis de 160 mg/kg por vía oral, el resveratrol muestra efecto neuroprotector. Se observó que los ratones que habían consumido resveratrol no presentaron los mismos efectos de degeneración que los ratones controles, logrando por el consumo de resveratrol revertir el efecto de la degeneración en el envejecimiento acelerado.

Por otra parte, en una revisión de literatura realizada por Shaito et al. (2020) se muestra que el resveratrol es muy bien tolerado en modelos experimentales sin efectos adversos importantes a dosis de 200 mg/kg/día en ratas y 600 mg/kg/día en perros durante 90 días, por administración oral.

La suplementación de resveratrol para la mejora de la memoria se ha evaluado a diferentes dosis y vías de administración. En la (tabla 1) se muestran algunos de los estudios en modelos murinos y los resultados obtenidos.

Tabla 1. Dosis de resveratrol evaluadas con efecto benéfico en la memoria

ARTICULO/ TITULO	AUTORES	DOSIS/VÍA DE ADMINISTRACIÓN	TIEMPO	RESULTADOS OBTENIDOS
<i>Effect of Chronic Administration of Resveratrol on Cognitive Performance during Aging Process in Rats</i>	Navarro-Cruz et. al., (2017)	2.5, 5, 10, 20, y 50 mg/kg/día, p.o., en etanol	8 meses	El resveratrol tuvo efectos antioxidantes a partir de la dosis de 2.5 mg/kg/día. Sin embargo, se optó por la dosis de 10 mg/kg/día para evaluar el efecto en la memoria, la cual fue utilizada en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos, y se probó efectiva.
<i>Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats</i>	Sharma et al., (2002)	10 y 20 mg/kg, i.p.	21 días	El resveratrol revirtió el efecto de la estreptozotocina en la cognición a partir de la dosis de 10 mg/kg, no se encontraron diferencias significativas entre la dosis de 10 y 20 mg/kg.
<i>Resveratrol ameliorates spatial learning memory impairment induced by Aβ₁₋₄₂ in rats</i>	Rui Wang et. al., (2017)	0.005, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.22 y 0.44 nmo/Inyectado directamente en el hipocampo/Disuelto en DMSO	-	La concentración más baja que mostró neuroprotección fue la de 0.025 nmol. Las concentraciones de 0.005 y 0.0125 nmol, no resultaron efectivas.
<i>Beneficial effects of resveratrol on scopolamine but not mecamylamine induced memory impairment in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats.</i>	Nejat Gacar et. al., (2011)	12.5, 25 y 50 mg/kg, i.p.	30 minutos previos	La dosis de 12.5 mg/kg logró revertir el efecto amnesico por escopolamina hasta en un 75%, las dosis de 25 mg/kg tuvo un mayor efecto, pero no fue estadísticamente significativos, en cuanto a la dosis de 50 mg/kg, ésta logró llegar a niveles muy similares al control.
<i>Protections against toxicity in the brain of rats with chronic fluorosis and primary neurons exposed to fluoride by resveratrol involve nicotinic acetylcholine receptors.</i>	Xiao-Xiao et.al., (2020)	50 mg/kg/día, p.o.	7 meses	El resveratrol aumenta la expresión de 7hAChR's

Resveratrol Attenuates Behavioral Impairments and Reduces Cortical and Hippocampal Loss in a Rat Controlled Cortical Impact Model of Traumatic Brain Injury

Singleton et al., (2010)

10 mg/kg y 100 mg/kg, i.p.

5 minutos previos

El resveratrol previno el efecto del daño en el hipocampo en la dosis de 100 mg/kg. Mientras que a la dosis de 10 mg/kg no proporciono una protección conductual significativa en ratas que sufren impacto cortical controlado.

Resveratrol improves cognition in rats affected by carotid artery stenosis through the cholinergic system

Liu et. al., (2017)

20 ml/kg/día

5 días

El resveratrol previno los efectos en la memoria de la estenosis de la arteria carótida.

Resveratrol improves cognition and reduces oxidative stress in rats with vascular dementia

Xingrong et. al., (2013)

25 mg/kg/día, p.o disuelto en metilcelulosa

12 semanas

El resveratrol mejoró el desempeño en el laberinto de agua.

Las dosis que se han probado varían ampliamente, la mayor parte de estudios usaron dosis de entre 2.5 a 100 mg/kg de peso. De la misma manera, la forma de administración es muy variada, se encontraron estudios que usaron la vía i.p., p.o., así como la inyección directa al hipocampo. Debido a la variedad de metodologías, los resultados obtenidos fueron muy variados, en algunos estudios fue suficiente con dosis de 10 mg/kg, en otros desde 12.5 mg/kg y en algunos casos fue la dosis de 100 mg/kg la que resultó efectiva. Por lo cual, en esta investigación se evaluará la suplementación con resveratrol a diferentes dosis, se determinará y analizará la dosis recomendable mínima para una mejora en la memoria. Tacrina un inhibidor central de la acetilcolinesterasa activa y PNU-282.987 un agonista del receptor 7hAChR's serán empleados como fármacos de referencia. Dos pruebas de comportamiento; laberinto Y modificado, y prueba de reconocimiento de objetos novedosos (ORT, por sus siglas en inglés) serán utilizados en ratas amnésicas inducidas con escopolamina. La escopolamina induce déficit colinérgico ya que éste es un antagonista selectivo del receptor muscarínicos, y en dosis altas bloquea el receptor nicotínico, este compuesto es utilizado para producir amnesia en mamíferos al bloquear la neurotransmisión colinérgica. Se determinará la mejora de la memoria mediada por 7hAChR's mediante su bloqueo después del pretratamiento con metilcaconitina (MLA) un antagonista selectivo de 7hAChR's (Delgado-Hernandez et al., 2020).

1.2 Planteamiento del problema

El cerebro es muy propenso al estrés oxidativo debido al alto contenido de ácidos grasos (especialmente ácidos grasos poliinsaturados, que contribuyen al 10% del peso total del cerebro seco), alto consumo de oxígeno y señalización redox (alrededor del 20% de oxígeno basal para la producción de Adenosin Trifosfato (ATP)), aunado a un bajo contenido de antioxidantes con mayor auto-oxidación de neurotransmisores (Cobley et al., 2018). Lo anterior está muy asociado a los daños en la función cognitiva observados con el envejecimiento, por lo que actualmente se recomiendan antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y antioxidantes para aliviar los síntomas y retrasar la progresión de varias enfermedades neurodegenerativas. Con respecto a los antioxidantes, los requisitos que deben de cumplir para ser nutraceuticos eficaces en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas es que pueda atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y que tenga una actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiagregación proteica o antiapoptótica, entre otros (Pourhanifeh et al., 2019; Xing et al., 2019).

Debido al efecto antioxidante y antiinflamatorio que posee resveratrol, los estudios en modelos animales han demostrado una reducción de la neurodegeneración del hipocampo y un aumento del rendimiento de la memoria.

Se ha evaluado el efecto de resveratrol en la memoria, se conoce que este actúa a través del sistema colinérgico central, en particular los receptores 7hAChR's. Éstos juegan un papel muy relevante en el aprendizaje y la memoria, en este sentido, uno de los modelos *in vivo* para evaluar los efectos sobre la memoria de diversos agentes biológicos es a

través de la inhibición de los 7hAChR's por sustancias como la escopolamina y la metilcaconitina (MLA). Sin embargo, algunos autores señalan que en la actualidad no hay datos sobre la toxicidad de la suplementación crónica con resveratrol y que no existe evidencia suficientemente fundamentada para prescribir este suplemento para mejorar la función cognitiva (Domínguez & Barbagallo, 2018). Cabe destacar que a dosis elevadas el resveratrol es tóxico, por ejemplo; (Juhász et al., 2010); (Shaito et al., 2020). Se han reportado casos de efectos adversos tales como; náuseas, diarrea, pérdida de peso en humanos, (Gambini et al., 2013).

Las dosis de resveratrol que se han estudiado en modelos animales de diversas patologías y en estudios en humanos son muy variables y con resultados diversos y en ocasiones contradictorios. Por esta razón, es necesario conocer cuáles son las dosis mínimas efectivas y seguras para posteriormente probar el efecto de resveratrol en ensayos clínicos, ya que actualmente no se conoce con exactitud la dosis que consume la población (Chiu et al., 2020).

1.3 Justificación

La posibilidad de influir favorablemente en la mejora cognitiva y en particular la memoria es un área de gran interés para las ciencias de la salud, por lo cual, en los últimos años se ha incrementado las investigaciones en este tema, especialmente debido a que el DCL puede aumentar el riesgo de desarrollar demencia (Eshkoor et al., 2015). Lo anterior resalta la importancia de conocer estrategias para la prevención y tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, a través de la nutrición, es por esto que la relación entre los hábitos nutricionales y la salud cognitiva ha atraído una atención especial

(Canevelli et al., 2016). En este sentido, los diversos nutraceuticos están despertando el interés de los investigadores como estrategias de tratamiento y prevención, entre los más estudiados se encuentra el resveratrol, el cual ha demostrado tener propiedades promotoras a la salud, como son su actividad antiinflamatoria, antioxidante, neuroprotectora, entre otras (Chui et al., 2020).

A pesar de la importancia que tienen los nutraceuticos en la salud y de la amplia investigación que se ha realizado con el resveratrol, no se conoce con exactitud la cantidad que consume la población de este compuesto, ya que la fuente dietética de mayor importancia en humanos proviene de las uvas y el vino tinto y el consumo de ambos varía ampliamente entre las personas (Chiu et al., 2020). A lo anterior se le suma que, a pesar de los beneficios potenciales del resveratrol en la memoria y en la prevención de enfermedades neurodegenerativas, aún no hay evidencia suficientemente fundamentada para prescribir este suplemento para mejorar la función cognitiva (Dominguez & Barbagallo et al., 2018). Lo que hace complicado hacer una recomendación de la ingesta diaria recomendada de resveratrol como suplemento. Por lo cual, es de suma importancia estudiar las dosis seguras y las mínimas efectivas de resveratrol, que garanticen efectos promotores a la salud sin causar daños a la misma, ya que se ha demostrado que la suplementación de resveratrol a dosis altas tiene efectos tóxicos principalmente en riñón, estas deben de estudiarse primero en modelos animales para más tarde evaluar sus efectos en población humana.

El impacto social de este proyecto es contribuir en el conocimiento acerca de cuáles son las dosis suplementadas más adecuadas de resveratrol para favorecer la mejora cognitiva en particular, para un efecto benéfico en la memoria.

Respecto al impacto económico se podría reducir costos en cuestión de los medicamentos, si la suplementación de resveratrol a dosis mínimas logra reducir los síntomas relacionados con el DCL. El gasto público pudiera reducirse ya que se utilizarían un menor consumo de medicamentos. Así mismo, en este grupo de población una de las causas de la progresión del DCL es que, debido a su condición las personas dejan de trabajar o se jubilan de manera anticipada. Otro beneficio sería que las personas pudieran tener una vida laboral activa más prolongada.

Determinar una dosis mínima efectiva diaria de resveratrol puede contribuir a futuras investigaciones que partan de esta investigación, para evaluar interacciones farmacológicas y nutrimentales, así como patologías distintas al DLC.

1.4 Pregunta de investigación

¿Cuál es la dosis mínima efectiva de resveratrol para revertir el efecto amnésico inducido por escopolamina en un modelo de ratas wistar? ¿Los $\alpha 7$ hAChR's participan en el efecto de resveratrol?

1.5 Hipótesis

La suplementación a dosis bajas con resveratrol a mediano plazo puede revertir el efecto amnésico en ratas a través de los $\alpha 7$ hAChR's.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto *in vivo* de resveratrol en ratas con déficit de memoria, así como la participación de los $\alpha 7$ nAChRs.

1.6.2 Objetivos específicos

- I. Determinar el efecto de diferentes dosis de resveratrol en la actividad locomotora mediante el laberinto en Y.
- II. Determinar la dosis mínima efectiva de resveratrol, evaluando la mejoría del déficit cognitivo inducido por escopolamina mediante la prueba del laberinto Y modificado.
- III. Determinar la dosis mínima efectiva de resveratrol, evaluando la mejoría del déficit cognitivo inducido por escopolamina mediante la prueba de reconocimiento a objetos nuevos (ORT).
- IV. Determinar la participación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ mediante la administración del antagonista metilcaconitina (MLA) utilizando la prueba ORT.

2. METODOLOGÍA

2.1 Modelos conductuales para evaluar la memoria en animales

Como base metodológica del estudio del resveratrol sobre la memoria se usó la investigación de Delgado-Hernandez et al., (2020), del cual obtuvimos la distribución de grupos de experimentación y controles, así como la administración de dosis de los fármacos. Para inducir la amnesia, se hizo la administración de escopolamina, un antagonista muscarínico no selectivo. Para que la escopolamina produzca el bloqueo de los receptores nicotínicos se requieren dosis altas; este receptor es el blanco principal reconocido para el tratamiento de la demencia asociado con la edad y el desarrollo de ciertos desórdenes neurodegenerativos en humanos, así como en modelos animales con los roedores.

Se implementó el uso del laberinto Y modificado y la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (ORT) como pruebas de comportamiento bajo la influencia amnésica de escopolamina en donde se estudió el efecto de la suplementación de resveratrol durante 6 semanas de diferentes dosis de resveratrol en ratas sometidas a un ciclo de 12 horas de luz y de oscuridad al día, respectivamente. Se utilizó un antagonista selectivo del $\alpha 7$ -nAChR metilcaconitina (MLA) 3 mg/kg disuelto en solución salina por vía intraperitoneal (i.p.). Para monitorear el recobro de la memoria después del tratamiento en las pruebas de comportamiento; se administró tacrina 1 mg/kg, un inhibidor de acetilcolinesterasa y PNU282987, un agonista del $\alpha 7$ -nAChR en 3 mg/kg i.p., como fármacos de referencia administrados 60 minutos antes de los experimentos de comportamiento, igualmente en

una concentración de 1 mg/kg i.p. se administró escopolamina como inductor del impedimento cognitivo en roedores.

2.2 Tipo de estudio

Experimental en un modelo animal.

2.3 Población (modelo animal)

Se utilizaron ratas Wistar de sexo indistinto de 8 semanas de edad al inicio del estudio, suministradas por el laboratorio de Neurociencias, de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California, campus Tijuana. Se agruparon 1 rata por jaula bajo ciclos de iluminación por periodos de 12 horas, con temperatura y humedad controlada.

2.4 Criterios de inclusión (selección o unidades de experimentación u observación)

Se utilizaron 65 ratas (aproximadamente +/-) dependiendo la prueba. El cálculo se determinó utilizando 5 ratas por grupo, el número de ratas se calculó utilizando la fórmula reportada por Arifin & Zahiruddin, (2017):

Comparación de grupos: ANOVA unidireccional

Para ANOVA unidireccional, el error entre sujetos DF (es decir, el DF intra-sujeto) se calcula como:

$$DF = N - k = kn - k = k(n - 1),$$

donde N = número total de sujetos, k = número de grupos y n = número de sujetos por grupo.

Al reordenar la fórmula, n se da como:

$$n = DF / k + 1$$

Con base en el rango aceptable del DF, los DF en las fórmulas se reemplazan con los DF mínimo (Festing, 2006) y máximo (20) para obtener el número mínimo y máximo de animales por grupo:

$$\text{Mínimo } n = 10 / k + 1$$

$$\text{Máximo } n = 20 / k + 1$$

En total, los números mínimo y máximo de animales requeridos son:

$$\text{Mínimo } N = \text{Mínimo } n \times k$$

$$\text{Máximo } N = \text{Máximo } n \times k$$

Lo cual nos resultó un número mínimo de 3 y máximo de 5 ratas, finalmente los grupos suplementados con resveratrol fueron de 5 ratas por cada uno.

Las dosis seleccionadas fueron revisadas en la literatura donde se observó (tabla 1) que la dosis de 20 mg es la dosis promedio utilizada en los estudios y se utilizó un logaritmo de 0.25 unidades de logaritmo para calcular las dosis inferiores a estudiar en esta investigación, las cuales serán las siguientes:

Fueron 5 grupos de prueba suplementados con resveratrol a diferentes concentraciones (Tabla 6).

Grupo control con solución salina 5 mg/kg, grupo escopolamina 1 mg/kg, grupo tacrina 1 mg/kg, grupo PNU-282987 3 mg/kg y dosis en mg/kg de los grupos de prueba suplementados con resveratrol.

2.5 Tipo de variables

2.5.1 Variable dependiente.

- Memoria de trabajo espacial y episódica.

Tabla 2. Descripción de la variable dependiente (memoria)

Memoria espacial, de trabajo y episódica	
<i>Definición conceptual</i>	<p>La memoria espacial se refiere a la capacidad que permite recordar rutas para abrirse paso a través de un entorno en constante cambio, así como la ubicación de los elementos dentro de este entorno dinámico (Beard, 2019).</p> <p>En los roedores, la memoria de trabajo es una representación de un objeto, estímulo o ubicación espacial que se usa típicamente dentro de una sesión de prueba, pero no entre sesiones, para guiar el comportamiento (Bratch et al., 2016).</p> <p>Memoria episódica, está implicada en los recuerdos de hechos concretos que tienen lugar en el espacio y tiempo, así como en los procesos cognitivos subyacentes y los mecanismos neuronales que participan en el recuerdo de estos eventos, responde a las preguntas «¿qué?», «¿cuándo?» y «¿dónde?» de un acontecimiento determinado en la vida del individuo (Martínez et al., 2014).</p>
<i>Tipo</i>	Cuantitativa.
<i>Instrumento de medida</i>	<p>- Laberinto en Y modificado.</p> <p>- Prueba de reconocimiento a objetos nuevos (ORT).</p> <p>-Laberinto en Y modificado. El porcentaje de exploración al brazo desconocido se calculará con la siguiente ecuación:</p>
<i>Cálculo</i>	<p>Porcentaje de exploración al brazo desconocido =</p> $\frac{\text{Número de entradas al brazo desconocido}}{\text{Número de entradas a todos los brazos}} \times 100$ <p>-Prueba de reconocimiento a objetos nuevos (ORT). El índice de discriminación (DI), por sus siglas en inglés (Discrimination Index) será calculado con el tiempo de exploración de los nuevos objetos (TN) mas el tiempo de exploración de los objetos familiares (TF); $DI = (TN - TF) / (TN + TF)$.</p>

2.5.2 Variable independiente.

- Suplementación con resveratrol y administración de compuestos.

Tabla 3. Descripción de la variable independiente (resveratrol)

Resveratrol	
<i>Definición conceptual</i>	El resveratrol (trans-3,4,5-trihidroxiestilbeno), es uno de los nutraceuticos populares, ya que muestra varias propiedades promotoras de la salud debido a su actividad antiinflamatoria, antidiabética, anticancerígena, antioxidante, antihiperlipidémica, así como a sus propiedades cardioprotectoras y neuroprotectoras (Pourhanifeh et al., 2019; Berman et al., 2017).
<i>Tipo</i>	Nominal
<i>Dosis</i>	Suplementación de resveratrol (Mega Resveratrol 99% Pure Trans-Resveratrol de 248 mg, grado farmacéutico) diluido en aceite de maíz, (1 cápsula /3 ml de aceite puro de maíz), durante 6 semanas a dosis de: A) 177.8 mg/kg, B) 100 mg/kg, C) 56.2 mg/kg, D) 31.6 mg/kg, E) 17.8 mg/kg, F) 10 mg/kg, G) 3.2 mg/kg, H) 1 mg/kg y I) 0.56 mg/kg, para cada grupo de prueba mezclado en el alimento.

Tabla 3.1. Descripción de la variable independiente (escopolamina)

Escopolamina	
<i>Definición conceptual</i>	La escopolamina induce déficit colinérgico ya que éste es un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos, y en dosis altas bloquea el receptor nicotínico, este compuesto es utilizado para producir amnesia en mamíferos al bloquear la neurotransmisión colinérgica. (Delgado-Hernandez et al., 2020).
<i>Tipo</i>	Nominal
<i>Dosis</i>	1 mg/kg

Tabla 3.2. Descripción de la variable independiente (PNU-282987)

PNU-282987

<i>Definición conceptual</i>	Agonista selectivo del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChRs$) (Delgado-Hernandez et al., 2020).
<i>Tipo</i>	Nominal
<i>Dosis</i>	3 mg/kg

Tabla 3.3. Descripción de la variable independiente (MLA)

Metilcaconitina (MLA)

<i>Definición conceptual</i>	Alcaloide diterpenoide con acción antagonista $\alpha 7$ nicotínico (Delgado-Hernandez et al., 2020).
<i>Tipo</i>	Nominal
<i>Dosis</i>	3 mg/kg

Tabla 3.4. Descripción de la variable independiente (Tacrina)

Tacrina

<i>Definición conceptual</i>	Anti-colinesterasa de acción central y un agonista colinérgico indirecto (Delgado-Hernandez et al., 2020).
<i>Tipo</i>	Nominal
<i>Dosis</i>	1 mg/kg

2.5.3 Operalización de variables

Tabla 4. Descripción de la operalización de las variables independientes y dependiente

Nombre de la variable	Tipo de la variable	Unidad de medida	Instrumento
(Suplementación del resveratrol)	Independiente	g/kg/peso de la rata	Báscula
Memoria	Dependiente	Tiempo	-Laberinto en Y modificado. -Prueba de reconocimientos de objetos (ORT).

2.6 Recursos humanos y materiales

2.6.1 Recursos humanos: Investigadores principales; Director, Co-Director, Comité de Tesis, Tesista de Maestría, Colaboradoras en Fase Experimental y Alumnos de Servicio Social.

2.6.2 Recursos materiales:

- Alimento Scratch común,
- Cápsulas de resveratrol (Mega resveratrol 99% Pure Trans-resveratrol de 248 mg, grado farmacéutico),
- Aceite puro de maíz,
- Fármacos (solución salina al 0.9%, escopolamina, tacrina, PNU-282987, MLA),
- Agua purificada,
- Aserrín,

- Equipo de laboratorio (Vortex, refrigerador),
- Material de laboratorio (pipetas, puntillas, gradilla, tubos para preparación de suplemento, tubos eppendorf para almacenaje de compuestos preparados, frascos para almacenaje de alimento con suplemento,
- Artículos de protección personal (guates de látex, guantes de carnaza, cubrecobas, lentes de seguridad),
- Recipientes de vidrio para alimento y botes para el agua,
- Jaulas individualizadas para cada rata y grupo, estantes y;
- Espacios físicos (Laboratorio de Farmacología y Bioterio).

2.7 Procedimiento

2.7.1 Dieta y suplementación con resveratrol

Las ratas fueron alimentadas después de 8 semanas de nacidas con Scratch regular, 12 g por día por un periodo de 6 semanas. La dieta de las ratas en los grupos suplementados consistió de alimento (Scratch común) que se administró con la mezcla de cápsulas de resveratrol (Mega resveratrol 99% Pure Trans-resveratrol de 248 mg, grado farmacéutico) diluido en aceite puro de maíz (1 cápsula de Mega resveratrol 99% Pure Trans-resveratrol de 248 mg /3 ml de aceite puro de maíz). La dieta control fue la misma de las ratas en suplementación (Scratch común) pero sin la mezcla de cápsulas de resveratrol. Las dietas se prepararon cada semana de acuerdo a las dosis experimentales y se almacenaron a 4°C para evitar la oxidación según directrices del

AIN-93 para roedores de laboratorio. Los grupos experimentales se conformaron de 5 ratas y fueron alimentadas con alimento suplementado de acuerdo a las dosis experimentales de resveratrol, (la información más detallada se encuentra en la tabla 6). Las ratas fueron suplementadas con resveratrol durante seis semanas.

2.7.2 Preparación y administración de los compuestos

La tacrina y el PNU-282987 se preparó como una suspensión utilizando tween 80 al 15% en agua destilada como vehículo. Los compuestos escopolamina y la MLA se prepararon como una solución disolviéndolos con solución salina (SS) al 0.9%. Todos los compuestos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) en volúmenes de 5 mg/kg, a excepción de la tacrina que serán 1mg/kg, 1 hora antes del experimento. El PNU-282987 3mg/kg fue inyectado 1 hora antes del experimento. La escopolamina 1mg/kg se administró 30 minutos antes del experimento. El MLA 3 mg/kg fue 1 hora antes de comenzar el experimento.

2.7.3 Determinación de mejora en el déficit de la memoria inducido por escopolamina

La amnesia fue inducida farmacológicamente en las ratas vía administración de escopolamina como dosis única 30 minutos antes de comenzar el experimento. Las ratas se dividieron en cinco grupos (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución de grupos de experimentación y prueba (fármaco y dosis de compuestos y suplemento). N= 5-7 ratas por grupo

Grupo experimental	Fármaco	Dosis (mg/kg)
<i>Vehículo (i)</i>	Solución salina al 0.9%	5
<i>Amnesia (ii)</i>	Escopolamina	1
<i>Control positivo estándar (iii)</i>	Tacrina	1
<i>Control positivo □7 (iv)</i>	PNU-282987	3
<i>Grupo de prueba (v)</i>	Resveratrol	Variable

Tabla 6. Distribución de dosis de suplementación de resveratrol para cada grupo de prueba. N=5-7 ratas por grupo

Grupo de prueba	Dosis (mg/kg) Resveratrol
<i>A</i>	177.8
<i>B</i>	100
<i>C</i>	56.2
<i>D</i>	31.6
<i>E</i>	17.8
<i>F</i>	10
<i>G</i>	3.2
<i>H</i>	1
<i>I</i>	0.56

Todas las ratas se aclimataron en el laboratorio al menos 30 minutos antes de los experimentos. Para realizar los experimentos de cognición, se utilizó el método realizado por (Arunrungvichian., et. al. 2015).

2.7.8 Prueba de actividad locomotora

La prueba de actividad locomotora se utilizó para garantizar que las ratas mantuvieran la coordinación motora y por ende su capacidad para explorar el laberinto, así mismo con esta prueba se puede asegurar que los tratamientos no producen ataxia o sedación.

Para realizar esta prueba de actividad locomotora se utilizó un laberinto en Y de 55 cm de largo, 10 cm de ancho en la parte inferior, 18 cm de ancho en la parte superior y 25 cm de alto en cada brazo, esta prueba se utilizó para estudiar la influencia de la presencia de resveratrol en la actividad locomotora. Las ratas fueron divididas en: grupo vehículo que recibieron 5ml/kg de solución salina, grupo de control positivo, administrado con el fármaco de referencia que recibió tacrina 1 mg/kg y grupo de prueba con resveratrol a diferentes dosis. Cada rata suplementada se colocó al final de un brazo y se le permitió moverse libremente en el laberinto en Y durante 5 minutos, 1 hora después de la administración de los tratamientos. El número de entradas en cada brazo se registró si la rata accede a un brazo al menos 10 cm de en medio del laberinto.

2.7.9 Prueba del laberinto Y modificado

La prueba de laberinto en Y modificado, consta de dos fases; la fase de muestra donde se administra el compuesto a estudiar y se permite explorar el laberinto en Y con los dos de los tres brazos por 5 minutos, cuantificando las entradas a cada brazo y la segunda fase la cual se realiza treinta minutos después, donde se le permite explorar los tres brazos por 5 minutos, cuantificando las entradas a cada uno, posteriormente se obtiene un índice de discriminación.

Esta prueba fue utilizada para evaluar la memoria espacial de las ratas. El laberinto en este experimento fue en Y, que se utilizó en la prueba de actividad locomotora excepto por el tabique negro utilizado para cerrar uno de los tres brazos de la Y (Laberinto Y modificado). Las ratas suplementadas con resveratrol fueron inyectadas con escopolamina 30 minutos antes de la fase de muestreo: en esta fase donde un brazo del laberinto Y se cerró con el tabique negro, cada rata se colocó al final de un brazo y se le permitió moverse a través de dos brazos durante 5 minutos para familiarizarse con los dos brazos abiertos. Después de 30 minutos de descanso, todos los brazos fueron abiertos y a la rata se le permitió moverse libremente a través de los tres brazos. El área del laberinto y el tabique se limpiaron con etanol al 70% entre cada experimento para remover señales olfativas. El número de entradas en cada brazo se contó visualmente siempre y cuando la rata acceda a cada brazo al menos 10 cm. El porcentaje de exploración al brazo desconocido se calculará con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de exploración al brazo desconocido} = \frac{\text{Número de entradas al brazo desconocido}}{\text{Número de entradas a todos los brazos}} \times 100$$

2.7.10 Prueba de reconocimiento a objetos novedosos (ORT)

La prueba de reconocimiento de objetos novedosos consta de tres fases; una fase de habituación donde se expone al animal a la caja donde se colocarán los objetos, 24 horas después inicia la fase de muestra, donde se administran los compuestos a estudiar y se colocan en la caja con dos objetos iguales por 5 minutos y la fase de prueba, que se realiza en el día tres, donde se cambia un objeto por uno nuevo y se permite explorar.

Se cuantifica el tiempo que permaneció en los dos objetos y se obtiene un índice de discriminación.

La evaluación de la memoria de trabajo en roedores se llevó a cabo utilizando la prueba ORT mencionada anteriormente. Para realizar esta prueba se utilizó una caja (60 × 60 × 48 cm³) y diferentes objetos. Los objetos que se utilizaron tienen diferentes formas y colores visuales para ser discriminados. Dentro de una caja negra, se colocó un objeto familiar y un objeto nuevo. Se colocaron a 10 cm desde la pared lateral de la caja de manera equilibrada. El área de la caja y de los objetos se limpiaron con etanol al 70% entre cada experimento para eliminar señales de olor. En el día 1 al inicio del experimento, se les permitió a las ratas explorar libremente la caja de campo abierto durante 5 minutos para que se habituaran con el área. En el día 2 se administró la escopolamina 30 minutos antes de la fase de muestra respectivamente (prueba de adquisición). Las ratas se colocaron en la caja para explorar dos objetos idénticos. Después de 10 minutos de la aclimatación en sus cajas, un objeto se cambió por un objeto nuevo, y a las ratas se les permitió que exploraran esos objetos por 5 minutos en la fase de prueba (prueba de retención). El tiempo de exploración de cada objeto fue registrado siempre y cuando la nariz de las ratas se aproximará a los objetos dentro de 3 cm o si lograban tocar los objetos. El índice de discriminación (DI por sus siglas en inglés) será calculado con el tiempo de exploración de los nuevos objetos (TN por sus siglas en inglés) más el tiempo de exploración de los objetos familiares (TF por sus siglas en inglés); $DI = (TN - TF) / (TN + TF)$.

2.7.11 Establecer la mejora en la memoria mediada a través de $\alpha 7hAChR$'s

El protocolo es el mismo como se ha mencionado anteriormente para ORT con la dosis

mínima efectiva determinada posteriormente, excepto por la administración de MLA, un antagonista selectivo $\alpha 7$ hAChR's. Se inyectó a las ratas 60 minutos antes de la prueba para bloquear la mejora de la cognición inducida por resveratrol. El tiempo de exploración de cada objeto se registró si la nariz de la rata llega a 3 cm o logra tocar los objetos. El índice de discriminación (DI) se calculó mediante el uso de la ecuación $(TN - TF) / (TN + TF)$; TN y TF representados como tiempo de exploración de objetos nuevos y conocidos, respectivamente.

2.7.12 Análisis estadístico

Todos los resultados se representan como promedios \pm desviación estándar (SD) para cada grupo de datos. Las diferencias de $P < 0,05$ se consideraron significativas. Los diferentes resultados del número de entradas para las pruebas de la actividad locomotora entre los grupos de compuestos de prueba y del vehículo se analizaron con ANOVA de una vía, seguido de la diferencia menos significativa con el test LSD de Fisher. Para la determinación de la mejora del déficit de memoria inducido por escopolamina en la prueba de laberinto en Y modificado y ORT, los resultados entre los grupos de prueba y el grupo de amnesia se analizaron con ANOVA de una vía, seguido del test LSD de Fisher, excepto para el tiempo de exploración entre la muestra y la fase de prueba en ORT, estos datos se analizaron mediante la prueba t-Student. Para la determinación de la mejora de la memoria a través de 7 hAChR's, se utilizó ANOVA, seguido del test LSD de Fisher para comparar el DI entre grupos de ensayo y del vehículo en el protocolo para la búsqueda de la dosis mínima efectiva y se compararon con y sin la administración de MLA para establecer un mecanismo de acción. Los tiempos de exploración entre la

muestra y la fase de prueba se analizaron mediante la prueba t-Student para datos apareados.

2.8 Consideraciones éticas

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

El protocolo fue registrado en el comité de bioética de la Facultad de Medicina y Psicología con número de registro CICUAL-FMP-EOR/ASM-2021-2.

3. RESULTADOS

3.1 Prueba de Actividad Locomotora

El resveratrol fue evaluado inicialmente para determinar sus efectos sobre la actividad locomotora en todas las dosis probadas. Las ratas fueron administradas i.p con vehículo (SS) y tacrina 1 h antes de permitirles moverse libremente en el laberinto en Y durante 5 min. Se registró el número de entradas en los 3 brazos del laberinto. Se uso ANOVA de una vía seguido de una comparación post-hoc LDS de Fisher para evaluar la diferencia entre los grupos y con el grupo del vehículo ($F_{8, 34} = 1.089$, $P = 0.3942$ $n = 5$ ratas/grupo), se puede observar que no hubo diferencias significativas (Figura 1). Con respecto a las dosis entre 56.2 y 0.56 mg/kg de resveratrol, no tuvo diferencias significativas ($P = 0.7366$), tampoco hubo diferencias entre las dosis de 17.8 y 3.2 mg/kg. ($P = 0.5687$). El efecto mínimo de la dieta sobre la actividad locomotora fue para la dosis de 17.8 mg/kg (15.20 ± 4.4 entradas), mientras que el efecto máximo de la dieta fue para 10 mg/kg (17.40 ± 2.2 entradas) ($P = 0.2988$) respectivamente, en comparación con el control (21.60 ± 4.4 entradas; $P > 0,05$).

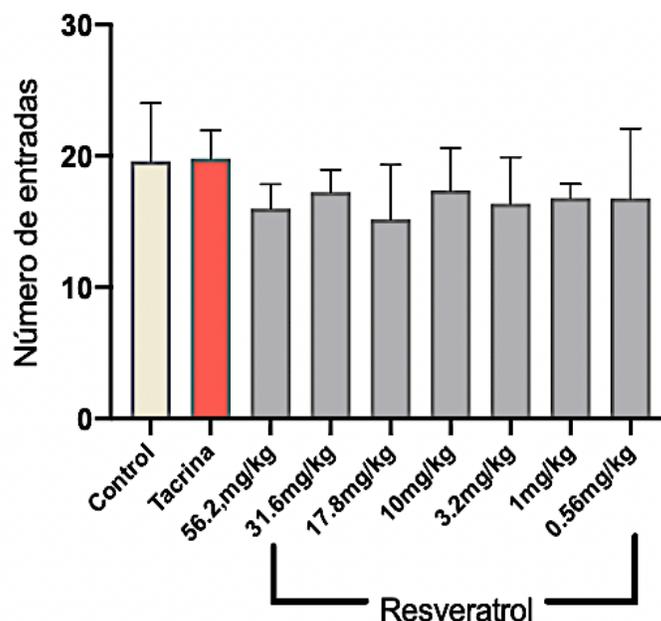


Figura 1. Prueba actividad locomotora. No se muestran diferencias significativas entre los grupos $F(8,34) = 1.089$, ($P = 0.394$), en comparación con el grupo del vehículo ($n = 5$ ratas/grupo), ANOVA de una vía.

3.2 Prueba del laberinto en Y modificado

Se realizó la prueba del laberinto en Y modificado para evaluar la memoria de trabajo espacial. Los resultados se muestran en (Figura 2). El experimento se dividió en trece sesiones: (i) vehículo (SS); (ii) grupo de amnesia recibiendo escopolamina (SC) 1 mg/kg; (iii) tacrina (TC) a una dosis de 1 mg/kg; PNU282987 a una dosis de 3 mg/kg; administración i.p. todas las anteriores; (a) resveratrol 177.8 mg/kg; (b) resveratrol 100 mg/kg; (c) resveratrol 56.2 mg/kg; (d) resveratrol 31.6 mg/kg; (e) resveratrol 17.8 mg/kg; (f) resveratrol 10 mg/kg; (g) resveratrol 3.2 mg/kg; (h) resveratrol 1 mg/kg; y (i) resveratrol dosis de 0.56 mg/kg, administración oral respectivamente. Los valores de medias entre los grupos de tratamiento, mostraron una diferencia estadísticamente significativa $F(12, 45) = 4.783$, $P < 0.001$, $n = 5$ rata/grupo) para los grupos tratados frente al grupo con escopolamina (SC). Hubo un aumento de la exploración al brazo desconocido

(novedoso), cuando se compara con el grupo tratado con escopolamina, indicando que tacrina, PNU-282987 y resveratrol a dosis bajas compensaron los déficits colinérgicos y mostraron una mejora en la memoria de trabajo espacial. En todas las sesiones, la exploración al brazo desconocido en el grupo control fue significativamente mayor que el del grupo tratado con escopolamina y, por lo tanto, las ratas estaban en estado amnésico. El déficit cognitivo inducido por la escopolamina aparentemente se revirtió en el grupo tratado con tacrina y con PNU-282987, como lo indica un porcentaje más alto en la exploración del brazo novedoso que en el grupo amnésico ($P < 0.01$), mientras que el tratamiento con resveratrol mejoró significativamente el déficit cognitivo a una dosis de 3.2 mg/kg ($P < 0.001$).

Se encontraron diferencias significativas cuando se comparan las dosis de 177.8 y 3.2 mg/kg ($P = 0.0280$), así como entre las dosis de 10 y 3.2 mg/kg ($P = 0.0247$). Mientras que no hay diferencia significativa entre la dosis de 3.2 y 0.56 mg/kg ($P = 0.9833$). La dosis en la que se observó el efecto máximo de la suplementación fue en 3.2 mg/kg ($47.61 \pm 4.0\%$), en comparación con el grupo tratado con escopolamina ($30.28 \pm 4.0\%$; $P = 0.001$). El grupo tratado con escopolamina muestra una diferencia significativa con los grupos tratados con las dosis de 0.56 mg/kg y 1 mg/kg ($P = < 0.005$); sin embargo, no se muestran diferencias estadísticamente significativas en comparación con los grupos tratados con tacrina y PNU ($P > 0.05$). La dosis mínima de resveratrol que compensó el déficit colinérgico y restaura la memoria espacial de trabajo y que supera los efectos de los fármacos de referencia tacrina y PNU fue la de 3.2 mg/kg.

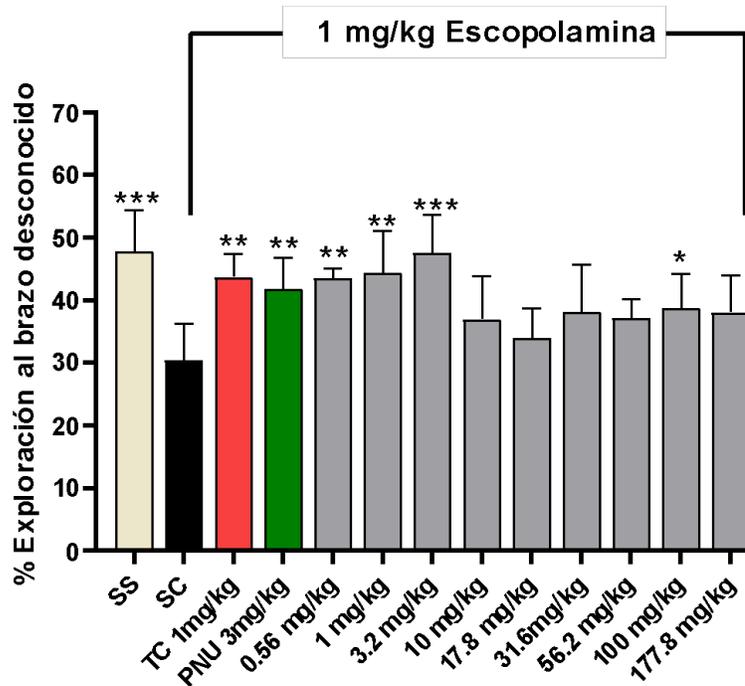


Figura 2. Prueba de laberinto en Y modificado. Mejora cognitiva en la amnesia inducida por escopolamina. Porcentaje de la exploración del brazo desconocido en el laberinto en Y modificado para el grupo vehículo (SS), escopolamina (SC), tacrina (TC), PNU-282987 y resveratrol (0.56-117.8 mg/kg, p.o.). Las barras representan las medias \pm error estándar (SE); n=5 ratas/grupo. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. el grupo tratado con escopolamina (SC), ANOVA una vía seguida de la prueba de Fisher LSD.

3.3 Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (ORT)

Los efectos de resveratrol en la mejora de la memoria episódica (no espacial) a corto plazo, que generalmente se ve afectada en pacientes con enfermedad de Alzheimer, fue evaluado por la prueba ORT basado en la preferencia innata de las ratas para explorar un objeto novedoso, en lugar que uno familiar. Primeramente, se realizó una prueba de preferencia para indicar que las ratas no preferían un objeto familiar en forma de cilindro azul a otra nueva forma triangular marrón. El tiempo de exploración entre dos objetos difirió significativamente para cada grupo (Figura 3); por lo tanto, hay una preferencia

entre objetos familiares y novedosos. Los diferentes tiempos de exploración de los dos objetos (familiares frente a novedosos) después del tratamiento indica la capacidad de las ratas para memorizar el objeto explorado. Las ratas con amnesia inducida por escopolamina gastaron una cantidad igual de tiempo explorando el novedoso y los objetos familiares ($P > 0.05$; prueba t de Student pareada), mientras que las ratas en el grupo vehículo o ratas amnésicas tratadas con tacrina exhibieron tiempos de exploración significativamente diferentes entre objetos, lo que refleja una mejora significativa del estado amnésico ($P = 0.003$ y $P < 0.001$, respectivamente; prueba t de Student pareada). En los conjuntos de datos, el índice de discriminación (DI) se calculó y se utilizó para evaluar la capacidad de las ratas para discriminar entre el objeto familiar y novedoso; los datos se presentan en la (Figura 3).

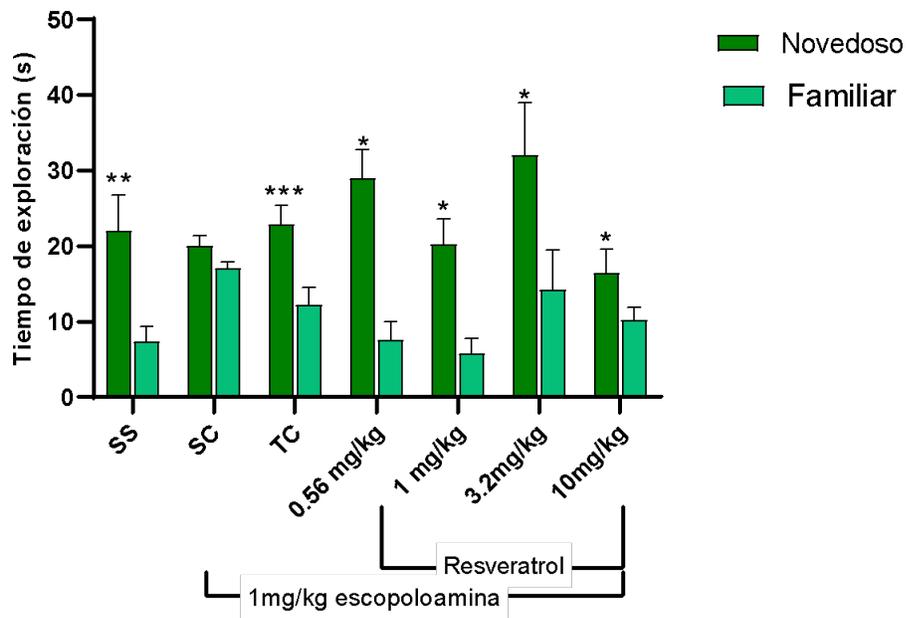


Figura 3. Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (ORT). Efecto de resveratrol en el déficit cognitivo inducido por escopolamina. Tiempos de exploración para el objeto familiar (F) y novedoso (N). Los datos se presentan como medias \pm SE; $n = 5$ ratas/grupo; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.0001$ vs. tiempo de exploración del objeto familiar. Prueba de Student pareada.

Con respecto al DI (Figura 4), se encontró una diferencia significativa entre los grupos (0.56, 1, 3.2 y 10 mg/kg, n = 7 ratas/grupo) frente al grupo tratado con escopolamina. El DI del grupo vehículo fue significativamente mayor que en el grupo tratado con escopolamina, lo que refleja su capacidad para discriminar entre objetos familiares y novedosos ($P < 0.001$). Tacrina a 1 mg/kg y las dosis de resveratrol de 1 y 0.52 mg/kg mejoraron significativamente la memoria episódica a corto plazo, según lo monitoreado por el aumento de DI en comparación con el grupo amnésico ($P=0.03$, $P < 0.001$, $P < 0.001$, respectivamente). En el caso de la dosis de 3.2 mg/kg para este análisis no resultó estadísticamente significativo ($P=0.07$). La dosis mínima que tuvo efectos significativos en la mejora de la memoria episódica (no espacial a corto plazo) fue la de 0.52 mg/kg (DI= 0.59), mientras que las dosis 3.2 mg/kg (DI = 0.35) y 10 mg/kg (DI= 0.22) en comparación con el grupo de escopolamina no tuvieron efectos significativos.

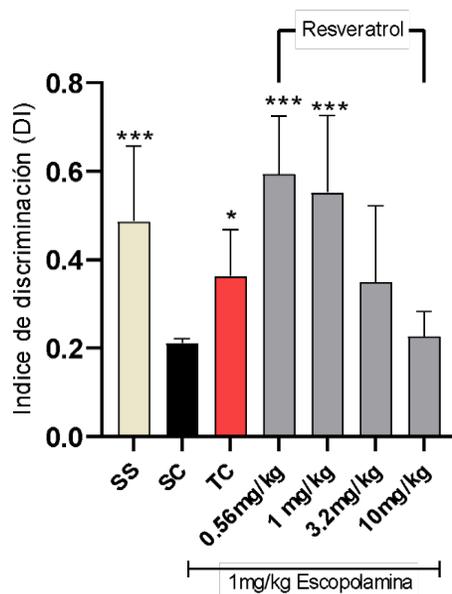


Figura 4. Índice de discriminación. $(TN - TF / TN + TF)$ en la fase de prueba de ORT. Los datos se presentan como media \pm SE; n = 5 ratas/grupo; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ frente al grupo tratado con escopolamina(SC), ANOVA de una vía seguida de la prueba de Fisher LSD.

3.4 Mejora en la cognición a través de los receptores $\alpha 7$ -nAChRs

Para verificar que el mecanismo de acción del resveratrol en la mejora cognitiva es mediado a través de los receptores $\alpha 7$ -nAChRs, PNU-282987 (3mg/kg) y resveratrol a dosis de 0.56, 1 y 3.2 mg/kg las ratas fueron pretratadas con metacaconitina (MLA) un antagonista selectivo de los receptores $\alpha 7$ -nAChRs. La prueba de ORT en ratas con pérdida de la memoria, como se describió anteriormente, fue usada como modelo de estudio. Los tiempos de exploración entre los dos objetos idénticos en las dos fases de exposición y la fase de prueba en ratas recibiendo MLA no fueron diferentes significativamente ($P > 0.05$), obteniendo un patrón similar al del grupo vehículo. Esto indica que el MLA no mejora la memoria episódica, como se muestra en la (Figura 5a) ($P > 0.05$). En cuanto al tiempo el tiempo de exploración entre el objeto novedoso y el familiar (prueba t de Student pareada) si mostro una diferencia significativa ($P < 0.001$) en todos los grupos tratados (Figura 5b). La suplementación con resveratrol mejora la cognición con el mismo patrón que el PNU-282987, con un aumento en el índice de discriminación. Las ratas que recibieron resveratrol a dosis de 1 y 3.2 mg/kg exhibieron una mejora en la cognición ($P < 0.001$) vs grupo control.

Los resultados indican que el efecto de resveratrol a dosis de 3.2 mg/kg no es afectado por la administración de MLA, lo que sugiere que la mejora en la memoria episódica producida por la suplementación con resveratrol es mediada por los receptores $\alpha 7$ -nAChRs. Con respecto a la evaluación para el DI (Figura 6a), las ratas cuando se pusieron en contacto con los dos objetos iguales (F, Fo) no mostraron diferencias significativas en el tiempo de exploraron en la fase de reconocimiento en ninguno de los grupos experiemntales (DI= -0.2180).

La suplementación con resveratrol a la dosis de 3.2 mg/kg previno el deterioro en la memoria producido por la MLA de manera similar e incluso ligeramente superior al efecto del PNU-282987, los índices de discriminación de estos dos grupos fueron significativamente mayores que el grupo control, indicando una mejora en la memoria del grupo tratado, como se muestra en la (Figura 6b).

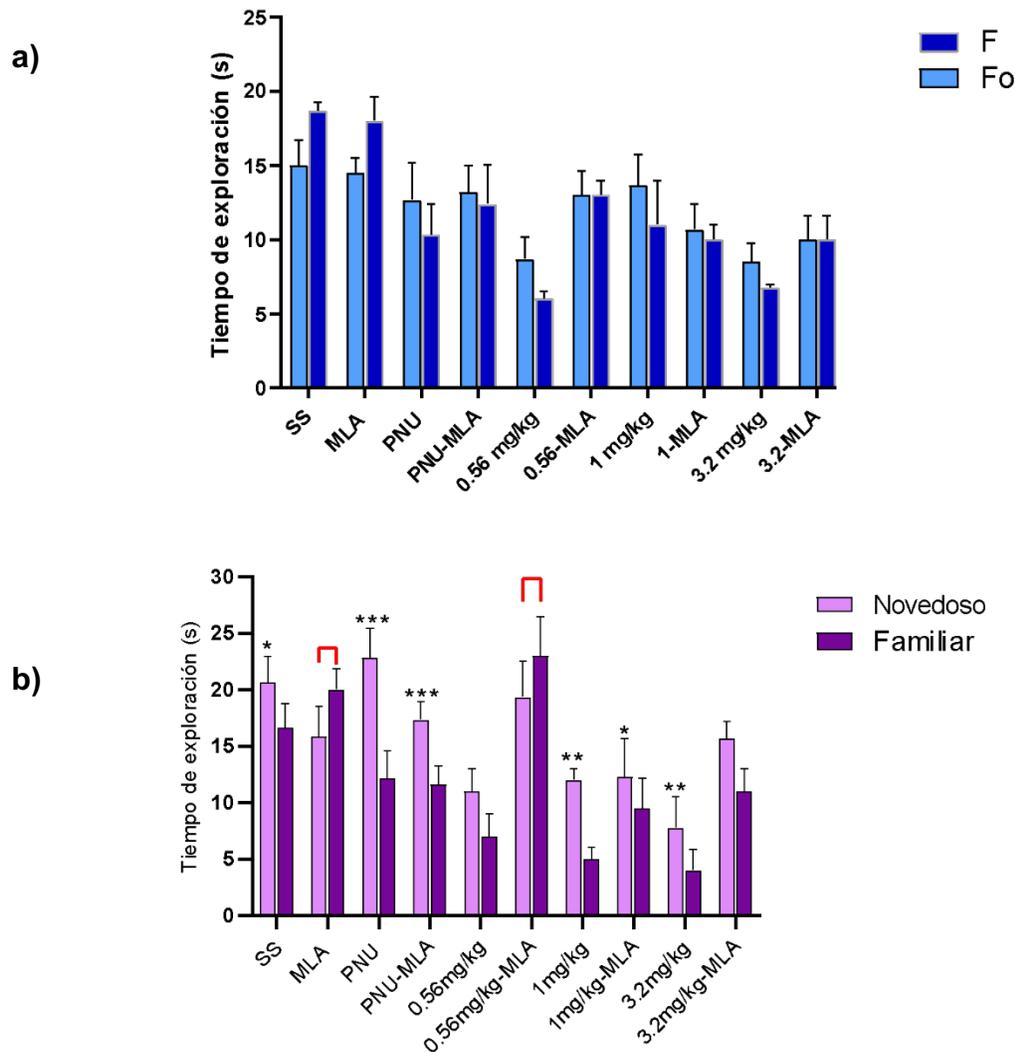


Figura 5. Tiempo de exploración para objetos idénticos (Fo y F) en la fase muestra (A) y familiar (F) y novedoso (N) en la fase de prueba (B). Prueba t de Student pareada. Los datos se presentan como media \pm SE; n = 7-10 ratas/grupo; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs tiempo de exploración de objeto familiar.

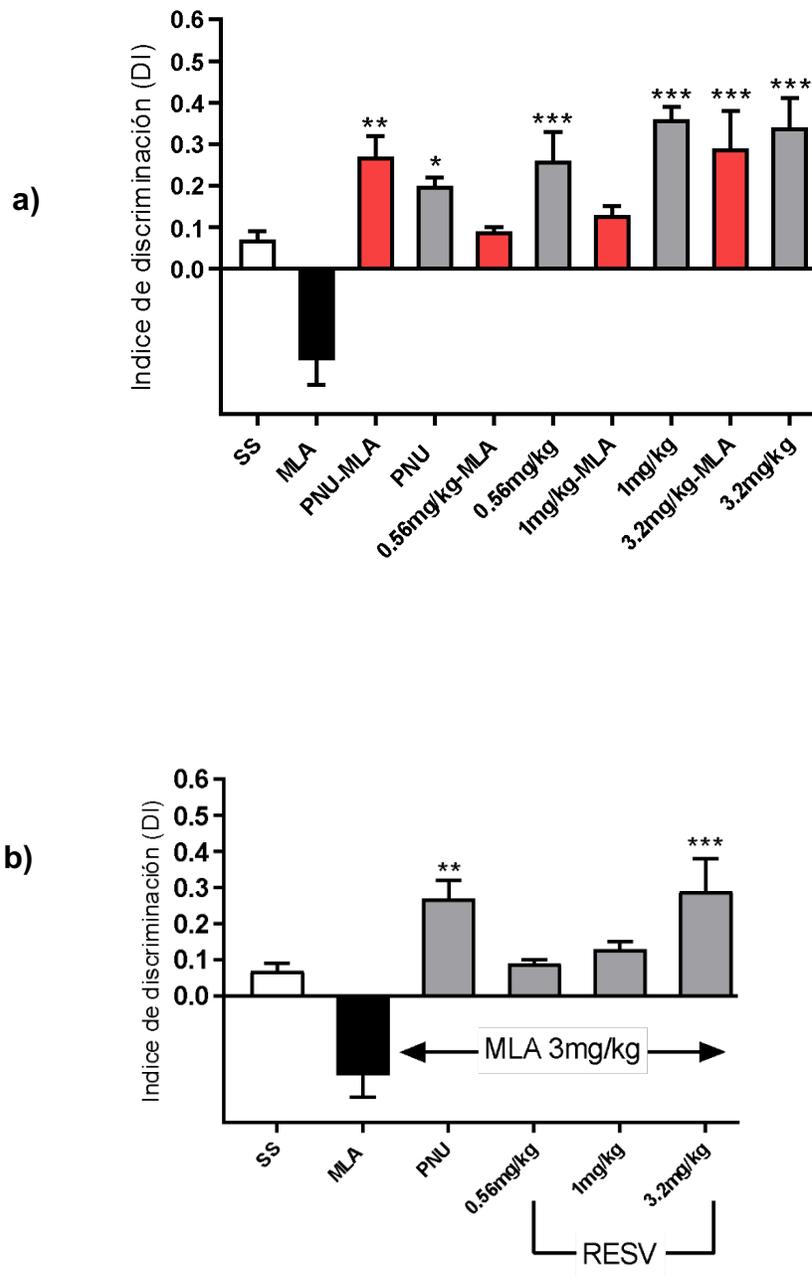


Figura 6. Índice de discriminación (TN-TF/TN + TF) de cada dosis de resveratrol en la fase de prueba de ORT para establecer la participación del receptor $\alpha 7$ -nACh. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ frente al grupo vehículo (SS). ANOVA de una vía. LSD de Fisher's, seguida de una comparación post-hoc.

4. DISCUSIÓN

Se analizaron diferentes dosis de resveratrol para la mejora cognitiva en un modelo de ratas con amnesia inducida farmacológicamente, se utilizaron dos pruebas de comportamiento: el laberinto en Y modificado y prueba de reconocimiento de objetos novedosos.

En estos dos modelos de comportamiento se examinaron diferentes dosis de resveratrol, inicialmente para descartar efectos sobre la actividad locomotora en todas las dosis probadas; como resultado de esto, no se observó ni un aumento ni reducción con relación a la actividad locomotora. Estas dos pruebas de comportamiento reflejan diferentes tipos de déficits de memoria para el análisis: en el laberinto Y modificado se analiza la memoria de trabajo espacial y en la prueba de ORT se analiza la memoria episódica a corto plazo. La memoria espacial se refiere a la capacidad que permite recordar rutas para abrirse paso a través de un entorno en constante cambio, así como la ubicación de los elementos dentro de este entorno dinámico (Beard, 2019). En los roedores, la memoria de trabajo espacial es una representación de un objeto, estímulo o ubicación espacial que se usa típicamente dentro de una sesión de prueba, pero no entre sesiones, para guiar el comportamiento (Bratch et al., 2016). La memoria episódica, está implicada en los recuerdos de hechos concretos que tienen lugar en el espacio y tiempo, así como en los procesos cognitivos subyacentes y los mecanismos neuronales que participan en el recuerdo de estos eventos, responde a las preguntas «¿qué?», «¿cuándo?» y «¿dónde?» de un acontecimiento determinado en la vida del individuo (Martínez et al., 2014). Estos dos modelos requieren interacciones a través de varias regiones diferentes del cerebro, como el hipocampo y corteza prefrontal.

La escopolamina, un antagonista muscarínico, se utilizó para alterar neurotransmisión colinérgica, que se ha demostrado tiene déficits en pacientes con EA. La escopolamina induce estados amnésicos en animales y sujetos humanos (Delgado-Hernández et al., 2020).

El PNU-282987 fue elegido como agonista de los $\alpha 7$ nAChR para la comparación de perfiles *in vivo*, ya que es un nuevo agonista selectivo y potente de los $\alpha 7$ -nAChR que mejora la actividad oscilatoria del hipocampo y que es sensible al antagonista selectivo $\alpha 7$ nAChR, metilcaconitina (MLA) y aumentaba la actividad sináptica GABAérgica. La dosis probada para PNU-282987 fue de 3 mg/kg, seleccionados del rango de dosis informado en estudios de comportamiento con agonistas del $\alpha 7$ -nAChR en modelos animales (3 y 10 mg/kg). La variación en los protocolos de prueba, especies animales y los regímenes de dosis empleados en tales, los estudios enfatizan la necesidad de múltiples habilidades cognitivas. Por lo tanto, PNU282987 se utilizó como fármaco de referencia para comparar la respuesta colinérgica en ratas suplementadas con resveratrol para la mejora cognitiva en los dos e modelos utilizados (Arunrungvichian et al., 2015).

MLA causa disfunción cognitiva, debido al bloqueo $\alpha 7$ -nAChR, comparable al antagonismo muscarínico inducido por escopolamina, como ha sido evaluado por una reducción en la alternancia espontánea de los roedores en un laberinto en Y. Se ha demostrado que la escopolamina induce la hiperexpresión de las citocinas proinflamatorias interleucina (IL)-1 β y -6 y la activación de astrocitos en el hipocampo. Se ha demostrado que MLA antagoniza los efectos antiinflamatorios de la nicotina, que se ha asociado con efectos neuroprotectores relevantes, principalmente a través

activación del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), ya que MLA es un agente proinflamatorio (Delgado-Hernández et al., 2020).

Como neuromodulador, el neurotransmisor acetilcolina juega un papel importante en las funciones cognitivas, del estado de ánimo, locomotoras, sueño/vigilia y olfativas. En la fisiopatología de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (AD) o el trastorno de cuerpos de Lewy (LBD), (Tiepol et al., 2022).

Los subtipos $\alpha 4\beta 2$ -, $\alpha 7$ -nAChR y mAChR (M1) están ampliamente distribuidas por todo el cerebro, la mayoría abundantemente en la corteza cerebral y el hipocampo. Dada su amplia distribución en el cerebro, la neurotransmisión colinérgica es responsable de modular importantes funciones neuronales. La acetilcolina endógena (ACh) es importante para la modulación de adquisición, codificación, consolidación, reconsolidación, extinción y recuperación de la memoria (Delgado-Hernández et al., 2020).

Nuestros resultados, muestran que resveratrol en dosis de 3.2 mg/kg bloqueó los efectos de MLA y, por lo tanto, el efecto benéfico de resveratrol en el sistema central colinérgico fue demostrado y sugieren que facilitaron la transmisión sináptica del hipocampo mediante la modulación de los $\alpha 7$ nAChR, mejorando así los trastornos inducidos por escopolamina en el aprendizaje y la memoria. Con estos datos, nuestros resultados son consistentes con el papel protector de la suplementación con resveratrol y la mejora cognitiva a través de $\alpha 7$ -nAChR.

Nuestra investigación nos ha arrojado resultados contundentes, y podemos demostrar que a dosis mínimas se encuentran resultados favorables.

Se ha reportado que resveratrol actúa de forma hormética, es decir, que se presenta por una estimulación en dosis bajas y una inhibición para dosis altas, que resulta en una curva de respuesta a nuevas dosis y se puede observar en forma de J o de U invertida, en numerosas líneas celulares de cáncer humano, que afectan a seis principales tipos de células tumorales: cáncer de mama, próstata, leucemia, colon, útero y pulmón (Edward et al., 2010).

En enfermedades tales como las afecciones cardiovasculares, Alzheimer, osteoporosis y úlceras gástricas, se demostró que una dosis baja de resveratrol confiere protección en modelos experimentales, mientras que a dosis más altas se observan efectos adversos. Estos hallazgos han sido particularmente convincentes con respecto al daño cardíaco debido a la isquemia-reperfusión en estudios con roedores (Edward et al., 2010).

Esto ha sido especialmente enfatizado para enfermedades como el Alzheimer y la osteoporosis (Calabrese E.J., 2008), condiciones médicas en las que resveratrol tiene un efecto modulador que se acerca a la respuesta de la dosis hormética.

Por lo tanto, estos autores proponen que la dosis óptima diaria que podría extrapolarse a la población en general corresponde a una sola copa de vino tinto por día (Edward et al., 2010; Dudley et al., 2009).

5. CONCLUSIÓN

Después de probar diferentes dosis de resveratrol, se llegó a la conclusión que la dosis mínima efectiva de resveratrol es de 3.2 mg/kg al día, esto mediante su suplementación oral durante 6 semanas en ratas Wistar, en las cuales se observó gracias a las pruebas de labetinto en Y modificado y prueba de reconocimientos de objetos novedosos, que este suplemento logró revertir los efectos amnesicos de la escopolamina y MLA. Lo cual nos arrojó resultados contundentes logrando así compensar los déficits colinérgicos en la memoria y sugiriendo también un efecto de “hormesis” en donde a dosis bajas se observa una estimulación favorable.

6. RECOMENDACIONES

Es recomendable analizar con roedores de aproximadamente 6 semanas de edad con un peso superior a los 70 gr. Con relación a la forma farmacéutica resveratrol, pudiera proponerse probar sus efectos en una forma farmacéutica de micela para lograr una mayor absorción del resveratrol y favorecer su llegada al sitio de acción. Por otra parte, determinar una dosis mínima efectiva diaria de resveratrol puede contribuir a futuras investigaciones que partan de esta investigación, para evaluar interacciones farmacológicas y nutrimentales, así como su efecto en patologías distintas al DLC.

7. REFERENCIAS

Andrade, S., Ramalho, M.J., Pereira, MDC., Loureiro, J.A. (2018). Resveratrol Brain Delivery para la prevención y el tratamiento de trastornos neurológicos. *Parte delantera. Pharm*, 9 , 1261. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01261>

Arifin, WN y Zahiruddin, WM (2017). Cálculo del tamaño de la muestra en estudios con animales utilizando el enfoque de ecuación de recursos. *La revista malaya de ciencias médicas: MJMS*, 24 (5), 101–105. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.11>

Arunrungvichian, K., Boonyarat, C., Fokin, V. y Taylor, P. (2015). Cognitive Improvements in a Mouse Model with Substituted 1,2,3-Triazole Agonists for Nicotinic Acetylcholine Receptors. *ACS Chemical Neuroscience*, 6, (1), 1331-1340.

Atta, EM., Mohamed, NH., y Abdelgawad, AM. (2017). Antioxidants: an overview on the natural and synthetic types. *Eur. Chem. Bull*, 6, (8), 365-375. DOI: 10.17628/ecb.2017.6.365-375

Beard, J. R., Officer, A., de Carvalho, I. A., Sadana, R., Pot, A. M., Michel, J. P., Lloyd-Sherlock, P., Epping-Jordan, J. E., Peeters, G., Mahanani, W. R., Thiyagarajan, J. A., & Chatterji, S. (2016). The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. *Lancet (London, England)*, 387(10033), 2145–2154. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00516-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00516-4)

Berman, A.Y., Motechin, R.A., Wiesenfeld, M.Y. & Holz, MK. (2019). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *npj Precision Onc* 1, 35. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0038-6>

Bratch, A., Kann, S., Cain, J. A., Wu, J. E., Rivera-Reyes, N., Dalecki, S., Arman, D., Dunn, A., Cooper, S., Corbin, H. E., Doyle, A. R., Pizzo, M. J., Smith, A. E., & Crystal, J. D. (2016). Working Memory Systems in the Rat. *Current biology: CB*, 26(3), 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.068>

Canevelli, M., Lucchini, F., Cuarata, F., Bruno, G., y Cesari, M. (2016). Nutrition and Dementia: Evidence for Preventive Approaches?. *Nutrients*, 8, 144. doi:10.3390/nu8030144

Cobley, J. N., Fiorello, M. L., & Bailey, D. M. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox biology*, 15, 490–503. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>

Calabrese EJ. Alzheimer's disease drugs: an application of the hormetic dose-response model. (2008) *Crit Rev Toxicol*; 38: 419–451.

Colica, C., Milanović, M., Milić, N., Aiello, V., De Lorenzo, A., & Abenavoli, L. (2018). A Systematic Review on Natural Antioxidant Properties of Resveratrol. *Natural Product Communications*. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300923>

Crowell, J. A., Korytko, P. J., Morrissey, R. L., Booth, T. D., & Levine, B. S. (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 82(2), 614–619. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh263>

Chiu, HF, Venkatakrisnan, K. y Wang, CK (2020). El papel de los nutraceuticos como terapia complementaria contra diversas enfermedades neurodegenerativas: una mini revisión. *Revista de medicina tradicional y complementaria*, 10 (5), 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.03.008>

Dadhania, V. P., Trivedi, P. P., Vikram, A., & Tripathi, D. N. (2016). Nutraceuticals against Neurodegeneration: A Mechanistic Insight. *Current neuropharmacology*, 14(6), 627–640. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666160104142223>

Daliu, P., Santini, A., & Novellino, E. (2018). A decade of nutraceutical patents: where are we now in 2018? *Expert opinion on therapeutic patents*, 28(12), 875–882. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1552260>

Delgado-Hernández, C., Cota-Ramírez BR., Ugalde A., Martínez AL., Soto KK., Cornejo-Bravo JM., Chavez A., Carrillo EG., Ochoa-Ruíz E & Serrano-Medina A. (2020): Cognitive improvements in a rat model with polyunsaturated fatty acids EPA and DHA through α 7-nicotinic acetylcholine receptors, *Nutritional Neuroscience*, DOI:10.1080/1028415X.2020.1809878

Dey A, Guha P, Chattopadhyay S, and Bandyopadhyay SK. (2009). Biphasic activity of resveratrol on indomethacininduced gastric ulcers. *Biochem Biophys Res Comm*; 381: 90–95.

Dominguez, L. J., & Barbagallo, M. (2018). Nutritional prevention of cognitive decline and dementia. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*, 89(2), 276–290. <https://doi.org/10.23750/abm.v89i2.7401>

Dudley J, Das S, Mukherjee S, and Das DK. (2009). Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose. *J Nutr Biochem*; 20: 443–452.

Edward J Calabrese, Mark P Mattson and Vittorio Calabrese. Resveratrol commonly displays hormesis: Occurrence and biomedical significance. *BELLE Articles*. (2010). 29(12) 980–1015. DOI: 10.1177/0960327110383625

Eshkoo, S. A., Hamid, T. A., Mun, C. Y., & Ng, C. K. (2015). Mild cognitive impairment and its management in older people. *Clinical interventions in aging*, 10, 687–693. <https://doi.org/10.2147/CIA.S73922>

Evans, H. M., Howe, P. R., & Wong, R. H. (2017). Effects of Resveratrol on Cognitive Performance, Mood and Cerebrovascular Function in Post-Menopausal Women; A 14-Week Randomised Placebo-Controlled Intervention Trial. *Nutrients*, 9(1), 27. <https://doi.org/10.3390/nu9010027>

Festing M. F. (2006). Design and statistical methods in studies using animal models of development. *ILAR journal*, 47(1), 5–14. <https://doi.org/10.1093/ilar.47.1.5>

Gacar, N., Mutlu, O., Utkan, T., Celikyurt, I.K., Gocmez, S.S., Ulak, G. Beneficial effects of resveratrol on scopolamine but not mecamylamine induced memory impairment in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats. (2011). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, volume 99, Issue 3. Pages 316-323, ISSN 0091-3057, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.05.017>

Gambini J., López-Gruoso R., Olaso-González G., Inglés M., Abdelazid ME., Bonet-Costa V., Borrás C. & Viña J. (2013). “Resveratrol: distribution, properties and perspectives”, *Geriatría y Gerontología*, 48:2, pp. 79-88. DOI: 10.1016/j.regg.2012.04.007.

Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)

Jang, M. H., Piao, X. L., Kim, J. M., Kwon, S. W., & Park, J. H. (2008). Inhibition of cholinesterase and amyloid-beta aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. *Phytotherapy research: PTR*, 22(4), 544–549. <https://doi.org/10.1002/ptr.2406>

Juhasz, B., Mukherjee, S., & Das, D. K. (2010). Hormetic response of resveratrol against cardioprotection. *Experimental and clinical cardiology*, 15(4), e134–e138.

Kumar, V., Pandey, A., Jahan, S., Shukla, RK, Kumar, D., Srivastava, A., Singh, S., Rajpurohit, CS, Yadav, S., Khanna, VK y Pant, AB (2016). Differential Trans-Resveratrol Responses on Neural Progenitor Cell Proliferation and Neurogenesis of the Aged Rat Hippocampus. *Scientific reports*, 6, 28142. <https://doi.org/10.1038/srep28142>

Liu, S.; Zhao, M.; Zhou, Y.; Wang, C.; Yuan, Y.; Li, L.; Bresette, W.; Chen, Y.; Cheng, J.; Lu, Y. Resveratrol exerts dose-dependent anti-fibrotic or pro-fibrotic effects in kidneys: A potential risk to individuals with impaired kidney function. *Phytomedicine* 2019, 57, 223–235.

Liu, B., Xu, L., Guo, M., Du, X., Yan, L., Wang, Q., Wang, J., Qin, C. (2017). Resveratrol improves cognition of rats impaired by carotid artery stenosis through the cholinergic system. *Biomedical Research*. ISSN: 0970-938X (Print) | 0976-1683 (Electronic).

Ma, X., Sun, Z., Liu, Y., Jia, Y., Zhang, B., & Zhang, J. (2013). Resveratrol improves cognition and reduces oxidative stress in rats with vascular dementia. *Neural regeneration research*, 8(22), 2050–2059. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.22.004>

Mankowski, RT; Tu yo.; Buford, TW; Leeuwenburgh, C.; Manini, TM; Schneider, S.; Qiu, P .; Anton, SD. (2020). Higher Resveratrol Dose Raised Levels of Cardiovascular Disease Risk Biomarkers in Overweight Older Adults: A Pilot Study. *Exp. Gerontol*, 131, 110821. doi.org/10.1016/j.exger.2019.110821

Navarro-Cruz, A.R., Ramírez, R., & Ayala, Ochoa-Velasco, C., Brambila, E., Avila-Sosa, R., Pérez-Fernández, S., Morales-Medina, J.C., & Aguilar-Alonso, P. (2017). Effect of Chronic Administration of Resveratrol on Cognitive Performance during Aging Process in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, Article ID 8510761, 8 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/8510761>

Pandareesh, M. D., Kandikattu, H. K., Razack, S., Amruta, N., Choudhari, R., Vikram, A., & Doddapattar, P. (2018). Nutrition and Nutraceuticals in Neuroinflammatory and Brain Metabolic Stress: Implications for Neurodegenerative Disorders. *CNS & neurological disorders drug targets*, 17(9), 680–688. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180625104753>

Pannu, N., & Bhatnagar, A. (2019). Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy* =

Biomedecine & *pharmacotherapie*, 109, 2237–2251.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.075>

Pennisi, M., Bertino, G., Gagliano, C., Malaguarnera, M., Bella, R., Borzì, A. M., Madeddu, R., Drago, F., & Malaguarnera, G. (2017). Resveratrol in Hepatitis C Patients Treated with Pegylated-Interferon- α -2b and Ribavirin Reduces Sleep Disturbance. *Nutrients*, 9(8), 897. <https://doi.org/10.3390/nu9080897>

Pourhanifeh, M. H., Shafabakhsh, R., Reiter, R. J., & Asemi, Z. (2019). The Effect of Resveratrol on Neurodegenerative Disorders: Possible Protective Actions Against Autophagy, Apoptosis, Inflammation and Oxidative Stress. *Current pharmaceutical design*, 25(19), 2178–2191. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190717110932>

Prince, M. J., Wu, F., Guo, Y., Gutierrez Robledo, L. M., O'Donnell, M., Sullivan, R., & Yusuf, S. (2015). The burden of disease in older people and implications for health policy and practice. *Lancet (London, England)*, 385(9967), 549–562. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61347-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61347-7)

Rahimzadegan, M., & Soodi, M. (2018). Comparison of Memory Impairment and Oxidative Stress Following Single or Repeated Doses Administration of Scopolamine in Rat Hippocampus. *Basic and clinical neuroscience*, 9(1), 5–14. <https://doi.org/10.29252/NIRP.BCN.9.1.5>

Sánchez-Melgar, A., Albasanz, J. L., Griñán-Ferré, C., Pallàs, M., & Martín, M. (2020). Adenosine and Metabotropic Glutamate Receptors Are Present in Blood Serum and Exosomes from SAMP8 Mice: Modulation by Aging and Resveratrol. *Cells*, 9(7), 1628. <https://doi.org/10.3390/cells9071628>

Singleton, R.H., Yan, H.Q., Fellows-Mayle, W. & Dixon, C.E. (2010). Resveratrol Attenuates Behavioral Impairments and Reduces Cortical and Hippocampal Loss in a Rat Controlled Cortical Impact Model of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, Volume: 27 Issue 6, 1091-1099. <http://doi.org/10.1089/neu.2010.1291>

Schmatz, R., Mazzanti, C. M., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierrez, J., Maldonado, P. A., Corrêa, M., da Rosa, C. S., Becker, L., Bagatini, M., Gonçalves, J. F., Jaques, J., Schetinger, M. R., & Morsch, V. M. (2009). Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. *Brain research bulletin*, 80(6), 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.08.019>

Shaito, A., Posadino, A. M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., Al-Mohannadi, A., Abdel-Rahman, W. M., Eid, A. H., Nasrallah, G. K., & Pintus, G. (2020). Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2084. <https://doi.org/10.3390/ijms21062084>

Sharma, M., Gupta, Y.K. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. (2002). *Life Sciences*, volume 71, Issue 21, pages 2489-2498. ISSN 0024-3205, [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02083-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02083-0)

Stites, S. D., Harkins, K., Rubright, J. D., & Karlawish, J. (2018). Relationships Between Cognitive Complaints and Quality of Life in Older Adults With Mild Cognitive Impairment, Mild Alzheimer Disease Dementia, and Normal Cognition. *Alzheimer disease and associated disorders*, 32(4), 276–283. <https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000262>

Shibu M Poulouse, Marshall G Miller, Tammy Scott, Barbara Shukitt-Hale, Nutritional Factors Affecting Adult Neurogenesis and Cognitive Function, *Advances in Nutrition*, Volume 8, Issue 6, November 2017, Pages 804–811, <https://doi.org/10.3945/an.117.016261>

Tiepolt, S., Meyer, P. M., Patt, M., Deuther-Conrad, W., Hesse, S., Barthel, H., & Sabri, O. (2022). PET Imaging of Cholinergic Neurotransmission in Neurodegenerative Disorders. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 63(Suppl 1), 33S–44S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.121.263198>

van Goethem NP., Paes D., Puzzo D., Fedele E., Rebosio C., Gulisano W., Palmeri A., Lawrence P., Wennogle, Peng Y., Bertrand D., Prickaerts J. (2019). Antagonizing $\alpha 7$ nicotinic receptors with methyllycaconitine (MLA) potentiates receptor activity and memory acquisition. *Cellular Signalling*. Volume 62,109338, ISSN 0898-6568. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.06.003>.

Venkatakrisnan K., Chiu HF, Wang CK. (2019). Popular functional foods and herbs for treating type 2 diabetes mellitus: a comprehensive review with special reference to clinical trials and their proposed mechanism. *J Funct Foods*. 57: 425-438. doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.039

Veurink G, Perry G, Singh SK. (2020). Role of antioxidants and a nutrient rich diet in Alzheimer's disease. *Open Biol*. 10: 200084. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.200084>

Vidoni, C., Secomandi, E., Castiglioni, A., Melone, M., & Isidoro, C. (2018). Resveratrol protects neuronal-like cells expressing mutant Huntingtin from dopamine toxicity by

rescuing ATG4-mediated autophagosome formation. *Neurochemistry international*, 117, 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.05.013>

Wang, F., & Chatterjee, S. (2017). Dominant Carbons in trans- and cis-Resveratrol Isomerization. *The journal of physical chemistry. B*, 121(18), 4745–4755. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.7b02115>

Wang, R., Zhang, Y., Li, J., Zhang, C. (2017). Resveratrol ameliorates spatial learning memory impairment induced by A β 1–42 in rats. *Neuroscience*, volume 344. Pages 39–47, ISSN 0306-4522, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.051>

Xiao, Q., Zhu, W., Feng, W., Lee, S. S., Leung, A. W., Shen, J., Gao, L., & Xu, C. (2019). A Review of Resveratrol as a Potent Chemoprotective and Synergistic Agent in Cancer Chemotherapy. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1534. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01534>

Xiao-Xiao, Z., Jie, D., Xiang, J., Yang-Ting, D., Cao, K., Xian-Hong, L., Chen, D., Long-Yan, R., Yang, Y., Zhi-Zhong, G. Protections against toxicity in the brains of rat with chronic fluorosis and primary neurons exposed to fluoride by resveratrol involves nicotinic acetylcholine receptors. (2020). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, volume 60,126475, ISSN 0946-672X, <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126475>

Xing, L., Zhang, H., Qi, R., Tsao, R., & Mine, Y. (2019). Recent Advances in the Understanding of the Health Benefits and Molecular Mechanisms Associated with Green Tea Polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(4), 1029–1043. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06146>

Yang, X., Qiang, X., Li, Y., Luo, L., Xu, R., Zheng, Y., Cao, Z., Tan, Z., Deng, Y. (2017). Pyridoxine-resveratrol hybrids Mannich base derivatives as novel dual inhibitors of AChE and MAO-B with antioxidant and metal-chelating properties for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry*, volume 71, pages 305-314, ISSN 0045-2068, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.02.016>.

Yuste, J. E., Tarragon, E., Campuzano, C. M., & Ros-Bernal, F. (2015). Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 322. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00322>

Zlotnik, G. and Vansintjan, A. (2019). Memory: An Extended Definition. *Front. Psychol.* 10:2523. doi: 10.3389/fpsyg.2019.02523

Beard, D. (2019). *Spatial memory in rodents and humans*. Recuperado el 20 de mayo del 2021, de Types of memory website: <https://conductscience.com/maze/spatial-memory-in-rodents-and-humans/>