



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

---

---

**“Evaluación de la combinación del ayuno intermitente  
con el ambiente enriquecido sobre la función  
cognitiva y el daño oxidativo en ratones en proceso  
de envejecimiento”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

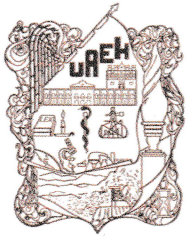
Presenta:

**L.N. DIANA GUADALUPE HIDALGO SILVA**

Director(a) de Tesis

**DRA. JEANNETT ALEJANDRA IZQUIERDO VEGA**

San Agustín Tlaxiaca Hgo., a 2 de agosto de 2022.



02/agosto/2022  
 AAM/MCBS/098/2022

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

**Diana Guadalupe Hidalgo Silva**  
**Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada “Evaluación de la combinación del ayuno intermitente con el ambiente enriquecido sobre la función cognitiva y el daño oxidativo en ratones en proceso de envejecimiento” con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez
- PRIMER VOCAL Dra. Jeannett Alejandra Izquierdo Vega
- SECRETARIO Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán
- SUPLENTE Dra. Araceli Hernández Zavala
- SUPLENTE Dr. Abel Lerma Talamantes

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente  
 “AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA  
 DIRECTOR



DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO  
 COORDINADORA DE POSGRADO ICESA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera  
 Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo,  
 México. C.P. 42160  
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308,2361,4346,4310  
 medicina@uaeh.edu.mx



Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 771953 y CVU 1077347.

Agradezco especialmente la oportunidad de estudiar el posgrado en la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud, continuando con mi formación académica y profesional.

Agradezco al CA de Toxicología Clínica el apoyo brindado de infraestructura y material en las instalaciones de los laboratorios de Toxicología e Inmunología, así como al Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, para la realización de esta investigación.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Jeannett Alejandra Izquierdo Vega por darme la oportunidad de realizar mi tesis de maestría bajo su dirección. Agradezco su orientación científica y su apoyo a lo largo de todos mis estudios de maestría. Gracias por la paciencia, el tiempo y los consejos durante todas las reuniones del avance de tesis.

También, agradezco al Dr. José Sócrates López Noguera por toda su ayuda, los conocimientos transmitidos y el ánimo para continuar adelante en mi desarrollo profesional. De igual manera, me gustaría agradecer por su valiosa aportación y asesoramiento a los doctores que formaron parte de mi Comité: el Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez, el Dr. Abel Lerma Talamantes, el Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán y la Dra. Araceli Hernández Zavala.

A mi padres y hermanos, gracias por su motivación y siempre estar a mi lado. A Guillermo, por su apoyo incondicional en todo momento, por siempre motivarme a pesar de las veces que el camino parecía complicado. Todo este proceso no hubiera sido lo mismo sin tu compañía. Y, a mi angelito Ubbe, que me acompaña siempre y hace mis días más felices. Este logro lo comparto con todos ustedes.

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>I INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
2.1 <i>Generalidades</i> .....	2
2.1.1 <i>Envejecimiento</i> .....	2
2.1.1.1 <i>Disfunción cognitiva en el envejecimiento</i> .....	3
2.1.1.2 <i>Epidemiología internacional y nacional</i> .....	4
2.1.1.3 <i>Etiologías</i> .....	7
2.1.1.3.1 <i>Daño de los telómeros</i> .....	7
2.1.1.3.2 <i>Desregulación metabólica</i> .....	8
2.1.1.3.3 <i>Autofagia</i> .....	9
2.1.1.4 <i>Vías de señalización</i> .....	9
2.1.2 <i>Ayuno intermitente</i> .....	11
2.1.2.1 <i>Beneficios del ayuno intermitente</i> .....	11
2.1.2.2 <i>Efecto del ayuno intermitente en el envejecimiento</i> .....	14
2.1.3 <i>Ambiente enriquecido</i> .....	15
2.1.3.1 <i>Beneficios del ambiente enriquecido</i> .....	16
2.1.3.2 <i>Efecto del ambiente enriquecido en el envejecimiento</i> .....	18
2.1.4 <i>Ejercicio regular</i> .....	18
2.1.4.1 <i>Efecto del ejercicio regular en el envejecimiento</i> .....	19
2.1.5 <i>Estrés oxidativo</i> .....	19
2.1.5.1 <i>Estrés y daño oxidativo en el envejecimiento</i> .....	19
2.2 <i>Antecedentes del problema</i> .....	21
2.2.1 <i>Vinculación del estrés y daño oxidativo en el envejecimiento</i> .....	21

2.2.2	<i>Efecto del AI sobre el estrés y daño oxidativo en el envejecimiento</i> .....	21
2.2.3	<i>Medición de la función cognitiva en roedores</i> .....	22
2.2.3.1	<i>Regiones cerebrales involucradas en el aprendizaje y memoria</i> .....	23
2.2.4	<i>Efecto del AE sobre la función cognitiva en el envejecimiento</i> .....	24
2.3	<i>Planteamiento del problema</i> .....	25
<b>III</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>IV</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>V</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
5.1	<i>General</i> .....	27
5.1.1	<i>Específicos</i> .....	27
<b>VI</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
6.1	<i>Tipo y diseño de estudio</i> .....	28
6.2	<i>Selección de la población, criterios de inclusión y exclusión</i> .....	28
6.3	<i>Tamaño de muestra y muestreo</i> .....	28
6.4	<i>Definición de variables dependientes e independientes</i> .....	30
6.5	<i>Diagrama de diseño experimental</i> .....	32
6.6	<i>Evaluación de la función cognitiva</i> .....	33
6.6.1	<i>Campo abierto</i> .....	33
6.6.2	<i>Reconocimiento del objeto novedoso</i> .....	35
6.6.3	<i>Laberinto de agua de Morris</i> .....	37
6.7	<i>Evaluación del estrés oxidativo</i> .....	40
6.7.1	<i>Homogeneización de las muestras</i> .....	40
6.7.2	<i>Cuantificación de antioxidantes totales</i> .....	41
6.8	<i>Evaluación del daño oxidativo</i> .....	42
6.8.1	<i>Cuantificación de malondialdehído (MDA)</i> .....	42
6.9	<i>Análisis estadístico</i> .....	43
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
7.1	<i>Determinación de la función cognitiva</i> .....	44
7.1.1	<i>Prueba de campo abierto</i> .....	44
7.1.2	<i>Prueba de reconocimiento del objeto novedoso (RON)</i> .....	46
7.1.3	<i>Prueba del laberinto de agua de Morris (LAM)</i> .....	47

7.2	<i>Determinación de la capacidad antioxidante total</i> .....	50
7.3	<i>Determinación del daño oxidativo</i> .....	50
<b>VIII</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
8.1	<i>Impacto del AI y su combinación con AE-EV en la función cognitiva</i> .....	51
8.2	<i>Efecto de la combinación del AI con el AE-EV sobre la capacidad antioxidante y el daño oxidativo en tejidos</i> .....	55
<b>IX</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>X</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>59</b>
<b>XI</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>60</b>
<b>XII</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>72</b>
12.1	<i>Reactivos</i> .....	72
12.2	<i>Preparación de soluciones</i> .....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proporción de personas de 60 años o más, por país, en 2015. ....	5
Figura 2. Proporción de personas de 60 años o más, por país, proyecciones para 2050. ....	5
Figura 3. Periodo previsto para que el porcentaje de la población de 60 años o más aumente del 10% al 20%. ....	6
Figura 4. Pirámides poblacionales, por sexo y grupo de edad, 1990 y 2030. ....	7
Figura 5. Diseño experimental. ....	32
Figura 6. Representación gráfica de prueba de campo abierto. ....	34
Figura 7. Representación gráfica de prueba de reconocimiento de objeto novedoso. ....	36
Figura 8. Representación gráfica de prueba del laberinto de agua de Morris. ....	39
Figura 9. Efecto de la combinación de AI + AE-EV en la prueba de campo abierto sobre la actividad locomotora y el comportamiento similar a la ansiedad, en ratones en proceso de envejecimiento. ....	45
Figura 10. Efecto de la combinación de AI + AE-EV en la prueba de RON, sobre la memoria de reconocimiento en ratones en proceso de envejecimiento. ....	46
Figura 11. Efecto de la combinación de AI + AE-EV en la prueba de LAM sobre el aprendizaje y la memoria espacial, y la función motora en ratones en proceso de envejecimiento. ....	49
Figura 12. Efecto de la combinación de AI + AE-EV sobre la capacidad antioxidante total en cerebro e hígado, en ratones en proceso de envejecimiento. ....	50
Figura 13. Efecto de la combinación de AI + AE-EV sobre el daño oxidativo (MDA) en cerebro e hígado, en ratones en proceso de envejecimiento. ....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos experimentales ....	29
Tabla 2. Definición de variables (dependientes e independientes) ....	30
Tabla 3. Ensayos durante la fase de entrenamiento. ....	40
Tabla 4. Preparación estándar de curva de calibración de antioxidantes totales ....	42
Tabla 5. Reactivos ....	72



## **ABREVIATURAS**

4HNE - 4-hidroxi-2-nonenal

ADN - ácido desoxirribonucleico

AE - ambiente enriquecido

AE-EV - ambiente enriquecido y ejercicio voluntario

ADA - ayuno en días alternados

AI - ayuno intermitente

AIRT - ayuno intermitente con restricción de tiempo

ATP - adenosín trifosfato

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazina

EROs - especies reactivas de oxígeno

MDA - malondialdehído

mTOR - mammalian target of rapamycin

LAM - laberinto de agua de Morris

RON - reconocimiento del objeto novedoso

RC - restricción calórica

SOD - superóxido dismutasa

## RESUMEN

El envejecimiento es un proceso de deterioro multifactorial que ocurre en la vida de un organismo, el cual se ha relacionado con el estrés oxidativo. Existen terapias no farmacológicas que se han propuesto como coadyuvantes en el tratamiento del envejecimiento. El ayuno intermitente (AI) ha mostrado en modelos animales que disminuye los niveles de estrés oxidativo en el organismo. Asimismo, el ambiente enriquecido combinado con ejercicio voluntario (AE-EV), ha evidenciado tener efectos protectores en la función cognitiva. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto crónico de una terapia combinada con AI+AE-EV sobre la función cognitiva, el estrés y daño oxidativo, en ratones C57BL/6J en proceso de envejecimiento. Los ratones ayunaron en días alternados en proporción 5:2 (5 días no restrictivos alternados con 2 días de ayuno de 24 horas). Después de 8 meses de tratamiento, se evaluó la capacidad cognitiva mediante un comportamiento similar a la ansiedad, el aprendizaje espacial, la memoria de reconocimiento y la memoria espacial, mediante las pruebas conductuales del campo abierto, el reconocimiento del objeto novedoso (RON) y el laberinto de agua de Morris (LAM). Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se realizó la evaluación de la capacidad antioxidante total y el daño oxidativo, mediante la cuantificación de malondialdehído (MDA) y la capacidad antioxidante total en diferentes tejidos. Con respecto a la evaluación de la función cognitiva: en la prueba de campo abierto, todos los grupos experimentales se comportaron muy similar al grupo control, sin mostrar diferencias significativas en la distancia, la velocidad, las entradas centrales, el tiempo en el centro y en la periferia. En tanto, en el grupo combinado de AI+AE-EV incrementó significativamente el comportamiento de levantamientos ( $p=0.025$ ); indicando mayor locomoción, exploración y un menor nivel de ansiedad. En la prueba de RON, ningún grupo presentó un aumento en la memoria de reconocimiento. En la prueba del LAM, se observaron latencias de escape significativas gradualmente menores conforme al transcurso de los días en el grupo de AI, el grupo de AE-EV y el grupo control ( $p < 0.0001$ ), lo que indicó que los tratamientos crónicos de AI y de AE-EV tuvieron un aumento significativo en el aprendizaje espacial. También en esta prueba, el grupo de AE-EV mejoró la memoria espacial a largo plazo al permanecer más tiempo en el cuadrante blanco ( $p < 0.05$ ). Con respecto a la evaluación de la capacidad antioxidante, después de un tratamiento con AI o un tratamiento combinado de AI+AE-EV la capacidad antioxidante aumenta a nivel hepático ( $p < 0.05$ ), sin presencia de daño oxidativo en hígado, cerebro y músculo. Estos resultados muestran que la combinación de AI+AE-EV tuvo un efecto positivo en la capacidad antioxidante y el daño oxidativo, sin mejorar la función cognitiva.

**Palabras clave:** Envejecimiento, estrés oxidativo, daño oxidativo, ambiente enriquecido, ayuno intermitente.

## ABSTRACT

Aging is a multifactorial deterioration process that occurs in the life of an organism, which has been related to oxidative stress. There are non-pharmacological therapies that have been proposed as adjuvants in the treatment of aging. Intermittent fasting (IF) has been shown in animal models to decrease levels of oxidative stress in the body. Likewise, the enriched environment with voluntary exercise (EE-VE), has shown to have protective effects on cognitive function. The objective of this research was to evaluate the chronic effect of a combined therapy with IF + EE-VE on cognitive function, stress and oxidative damage, in aging C57BL/6J mice. Mice fasted on alternate days in a 5:2 ratio (5 non-restrictive days alternated with two days of 24-hour fasting). After eight months of treatment, cognitive ability was assessed according to anxiety-like behavior, spatial learning, recognition memory, and spatial memory, using open-field behavioral tests, novel object recognition (NOR) and the Morris Water Maze (MWM). Subsequently, the animals were sacrificed and the total antioxidant capacity and oxidative damage were evaluated by quantifying malondialdehyde (MDA) and the total antioxidant capacity in different tissues. Regarding the evaluation of cognitive function: in the open field test, all the experimental groups behaved very similarly to the control group, showing no significant differences in distance, speed, central inputs, time in the center and in the periphery. Meanwhile, in the combined IF+EE-VE group, rearing behavior increased significantly ( $p=0.025$ ); indicating greater locomotion, exploration and a lower level of anxiety. In the NOR test, neither group showed an increase in recognition memory. In the MWM test, gradually lower significant escape latencies were observed over the course of days in the IF group, the EE-VE group, and the control group ( $p<0.0001$ ), which indicated that chronic IF and EE-VE had a significant increase in spatial learning. Also in this test, the EE-VE group improved long-term spatial memory by spending more time in the target quadrant ( $p < 0.05$ ). Regarding the antioxidant capacity, after treatment with IF or a combined treatment of IF+EE-VE, the antioxidant capacity increases at hepatic level ( $p < 0.05$ ), without the presence of oxidative damage in the liver, brain and muscle. The results showed that the combination of IF+EE-VE had a positive effect on antioxidant capacity and oxidative damage, without improving cognitive function.

**Keywords:** Aging, oxidative stress, oxidative damage, enriched environment, intermittent fasting.

## I INTRODUCCIÓN

El presente documento se describe a través de tres secciones. En la primera sección se muestran los antecedentes teóricos que sustentan esta investigación. En la cual se describen los conceptos de envejecimiento, ayuno intermitente (AI), ambiente enriquecido (AE) y ejercicio voluntario (EV). El envejecimiento es un proceso de deterioro multifactorial en la vida de un organismo, que implica múltiples alteraciones en diferentes vías moleculares, y está relacionado con el estrés oxidativo (1), el cual se refiere a un desequilibrio de la función redox, al aumentar las especies reactivas de oxígeno (EROs) y disminuir la capacidad antioxidante (2). Además, el envejecimiento se ha relacionado con la disminución de la función cognitiva. Entre las terapias no farmacológicas que han demostrado tener un efecto benéfico en el envejecimiento, se destaca el ayuno (3–7), el ambiente enriquecido que se refiere a la estimulación de la función cognitiva y física, (8,9) y el ejercicio (10). El AI es un esquema de alimentación con escasa o nula ingesta de energía y periodos intermedios de ingesta normal de alimentos, de forma periódica (11). Existen diversas versiones de llevar a cabo el AI, pero hay dos tipos de AI que se han practicado más comúnmente; el ayuno en días alternados (ADA) y el ayuno intermitente con restricción de tiempo (AIRT). El ADA consiste en un ayuno de 24 horas en el cual únicamente se proporciona agua *ad libitum* seguido de un periodo de alimentación de 24 horas, el cual se puede realizar varias veces a la semana, por ejemplo, un ADA en proporción 5:2, es cuando hay 2 días de ayuno con 5 días no restrictivos (12). En cuanto al AIRT, comprende lapsos determinados de abstinencia alternados con lapsos de alimentación, en el cual la abstinencia puede ser por lapsos de 8/16 horas o más (13,14). Estudios en humanos y en modelos animales, han evidenciado que el AI reduce el estrés y daño oxidativo, aumenta la capacidad antioxidante total (15–17), mejora los biomarcadores metabólicos (18–22) y la capacidad cognitiva (23). Asimismo, en modelos envejecidos y personas de edad avanzada, el AI muestra efectos beneficiosos, sobre el estrés y daño oxidativo (4,7). Por otra parte, el AE es una técnica de alojamiento que se aplica en estudios experimentales en animales de laboratorio, en donde se incorporan objetos, lo que estimula la función sensorial, cognitiva y física (24,25). Estudios en modelos animales con AE, han mostrado efectos benéficos sobre el estrés y daño oxidativo (26,27), la función

cognitiva (8,28) o ambos (29). Especialmente, estudios en modelos animales envejecidos que tuvieron AE, han presentado efectos benéficos sobre la función cognitiva (9). De igual manera, el EV, se define como cualquier movimiento voluntario realizado por los músculos y que implica cierto gasto energético, de acuerdo a la duración y tipo de ejercicio que se realice, ha mostrado efectos benéficos en la morfología y capacidad cognitiva en el envejecimiento (10).

Una segunda sección, se concentra en describir la metodología y los fundamentos de las pruebas utilizadas para el desarrollo de este trabajo. En este proyecto se evaluaron los efectos que presenta la terapia crónica-combinada de AI con AE-EV, sobre el estrés oxidativo mediante la capacidad antioxidante total (CAT), y sobre el daño oxidativo mediante el nivel de malondialdehído (MDA), en diferentes tejidos. Con respecto a la función cognitiva se realizaron las pruebas de campo abierto (CA), reconocimiento del objeto novedoso (RON) y el laberinto acuático de Morris (LAM), en un modelo murino en proceso de envejecimiento. Finalmente, en la tercera sección se presentan los resultados, discusión, conclusiones, referencias y anexos.

## **II ANTECEDENTES**

### *2.1 Generalidades*

#### *2.1.1 Envejecimiento*

El envejecimiento es un proceso degenerativo a nivel celular, en el que ocurren diferentes cambios biológicos y moleculares, que se refleja en la disminución de la función física y fisiológica, y se correlaciona con el transcurso de la vida y el aumento de la edad en un organismo. Por consiguiente, al referirse a la senectud se habla de la última etapa de la vida de un organismo que se caracteriza por el envejecimiento biológico. Mientras que, la senescencia, se refiere únicamente al fenómeno degenerativo a nivel biológico (30). La senescencia celular es un estado permanente de detención del ciclo celular, que promueve la remodelación tisular durante y después del desarrollo de una lesión, aunque también contribuye a la disminución del potencial regenerativo y la función de los tejidos, a la

inflamación y a la tumorigénesis en organismos envejecidos (31). La senescencia celular va acompañada de distintas alteraciones fenotípicas, que incluyen remodelación de la cromatina, reprogramación metabólica, aumento de la autofagia y la implementación de un secretoma proinflamatorio complejo (32). En los mamíferos, la senescencia se produce de forma heterogénea en múltiples sistemas de órganos, lo que provoca un deterioro progresivo que eventualmente resulta en disfunción tisular (32). Específicamente, en el envejecimiento humano, hay un aumento en la prevalencia de enfermedades crónicas degenerativas, como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, musculoesqueléticas y neurodegenerativas, lo cual afecta negativamente la calidad de vida (33).

#### *2.1.1.1 Disfunción cognitiva en el envejecimiento*

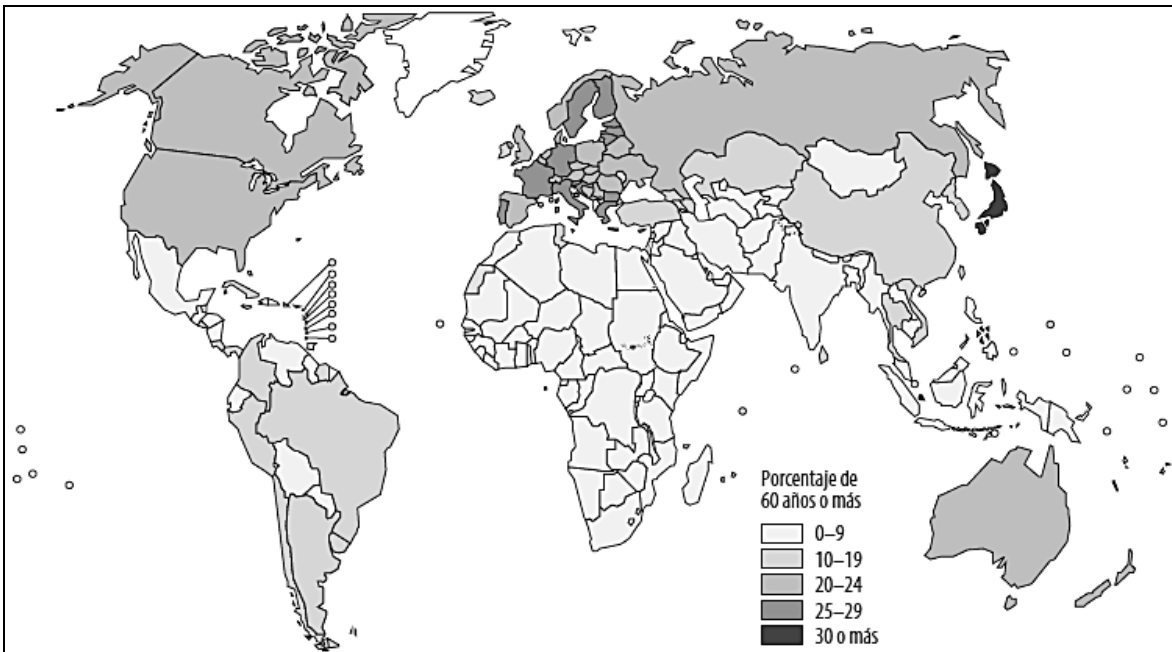
Los cambios biológicos que ocurren durante la senescencia afectan todos los órganos del cuerpo, entre ellos, el cerebro. Se ha demostrado que el estrés oxidativo, la función mitocondrial reducida, la neuroinflamación y la función inmunológica disminuida contribuyen a los cambios cerebrales estructurales y funcionales asociados con la edad. También se ha demostrado que los factores epigenéticos afectan estos procesos, incluida la metilación, los aumentos en las deleciones de ADN dependientes de la edad y la reducción de la capacidad de reparación del ADN. Entre las características más comunes del envejecimiento, ciertas funciones cognitivas se ven afectadas y tienden a disminuir a medida en que avanza la edad, sin embargo, en algunas personas estos cambios pueden ser sutiles (34). Un envejecimiento exitoso o el control de una enfermedad neurodegenerativa depende de la capacidad para preservar la función cognitiva y de la velocidad de deterioro del cerebro, lo cual puede determinarse por medio de la reserva cerebral y la reserva cognitiva que cada persona tenga. La reserva cerebral (RCe), es considerada un modelo de resiliencia al daño cerebral, hace referencia a la arquitectura del cerebro, al tamaño del tejido cerebral, número de neuronas y sinapsis, cuanto más tejido cerebral exista, más daño cerebral debe de haber para cruzar el umbral que provocaría la aparición de deficiencia cognitiva. Mientras que, la reserva cognitiva (RCo) es el funcionamiento cerebral a lo largo de la vida, por ejemplo, la RCo se evalúa de forma indirecta mediante variables como la educación, el nivel de ocupación, las actividades de ocio mental y físico (35,36). Por lo

cual, diferentes estudios han demostrado que ambos factores de reserva tienen un papel neuroprotector, y las estrategias de intervención que implican una mayor estimulación cognitiva y actividad física es poco probable que tengan efectos secundarios negativos (24,37).

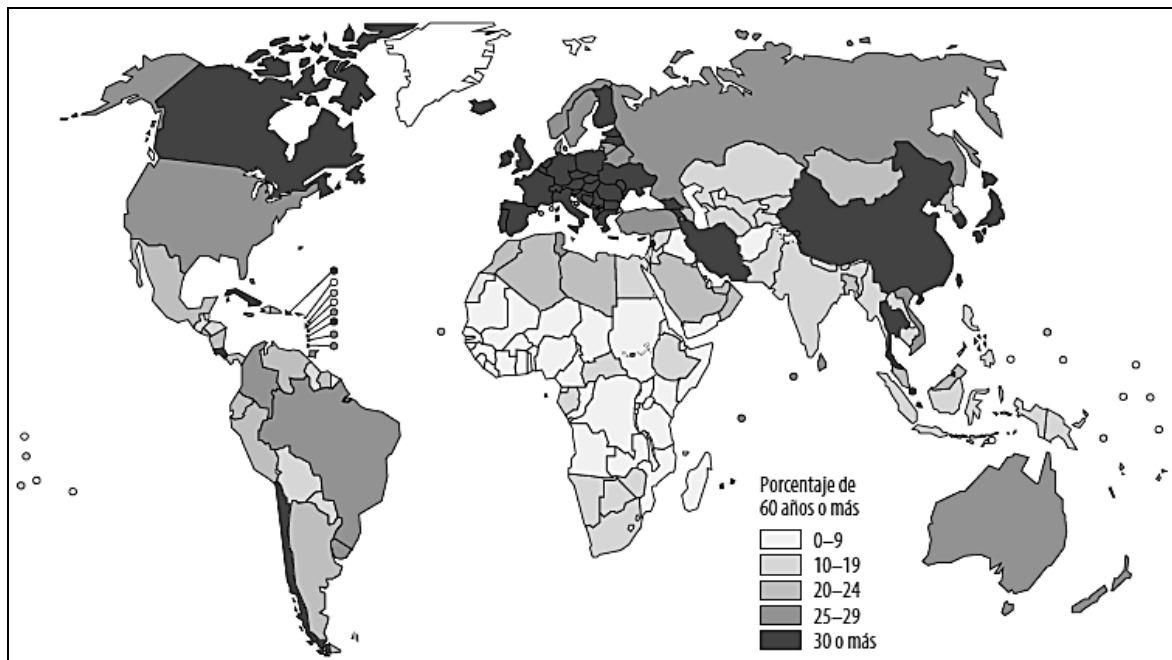
#### 2.1.1.2 *Epidemiología internacional y nacional*

En demografía se utiliza la edad cronológica para determinar a la población envejecida o adulta mayor; la Organización de las Naciones Unidas (ONU) establece la edad de 60 años para considerar que una persona es adulta mayor. El envejecimiento se ha convertido en un problema de salud pública, debido al aumento en la población de adultos mayores en varios países. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre 2020 y 2030, el porcentaje de habitantes del planeta mayores de 60 años aumentará un 34%.

En el 2015, de acuerdo con la proporción por país de personas de 60 años o más, Japón tuvo una proporción superior al 30%, siendo el país con la proporción más alta (figura 1). Sin embargo, en las proyecciones para 2050, varios países tendrán una proporción similar. En general, países de Europa y América del Norte, y específicamente, Chile, China, Rusia, Corea del Sur, Irán, Tailandia y Vietnam (figura 2) (38). En los países en desarrollo, la proporción de personas mayores de 60 años y la esperanza de vida enfrentan efectos adversos de la pobreza, por ejemplo, una mala calidad de vida y atención médica limitada (34).



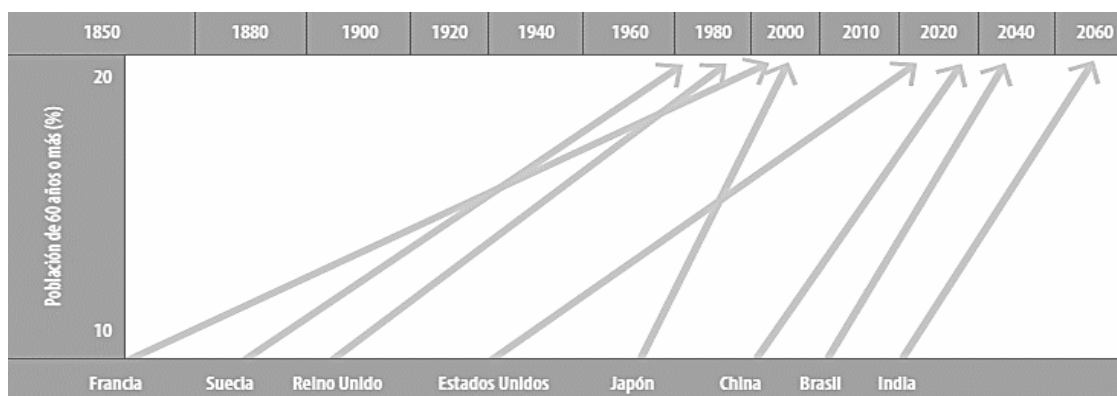
**Figura 1. Proporción de personas de 60 años o más, por país, en 2015.** Fuente: Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud. Organización Mundial de la Salud, 2015. Cap 3 (38).



**Figura 2. Proporción de personas de 60 años o más, por país, proyecciones para 2050.** Fuente: Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud. Organización Mundial de la Salud, 2015. Cap 3 (38).



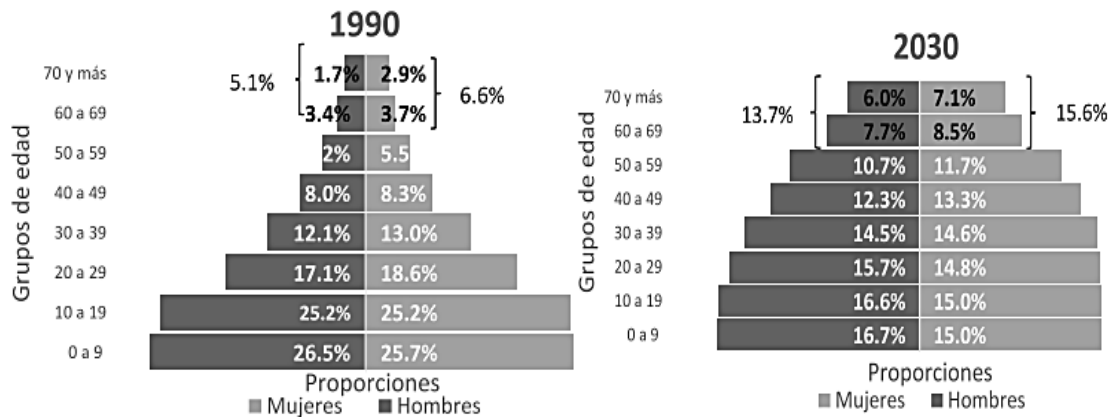
En la actualidad, la velocidad en que aumenta la proporción de la población mayor de 60 años es más rápida que en el pasado. Francia dispuso de 150 años para adaptarse al aumento del 10% al 20% en la proporción de la población mayor de 60 años, mientras que Brasil, China e India tendrán solamente un poco más de 20 años para hacer la misma adaptación (figura 3) (38).



**Figura 3. Periodo previsto para que el porcentaje de la población de 60 años o más aumente del 10% al 20%.** Fuente: Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud. Organización Mundial de la Salud, 2015. Cap 3 (38).

En México, de acuerdo al Consejo Nacional de Población (CONAPO), la proporción de mujeres y hombres  $\geq 60$  años, con respecto al total de la población en 1990 era de 6.6% y 5.1% respectivamente, mientras que en 2030 se proyecta que la proporción de mujeres y hombres  $\geq 60$  años, con respecto al total de la población será de 15.6% y 13.7%, respectivamente (39). Asimismo, para el 2050 las mujeres de  $\geq 60$  años, representarán 23.3% del total de población de las mujeres y los hombres de  $\geq 60$  años constituirán 19.5% del total de los hombres (40). Por lo cual, las anteriores cifras reflejan que la pirámide poblacional de México presenta una cúspide cada vez más ancha (figura 4).

Actualmente, México se encuentra en un proceso de envejecimiento acelerado, y el país no está preparado para este cambio demográfico hacia el envejecimiento de la población. Los sistemas de seguridad social y de salud vigentes se encuentran en desventaja para enfrentar el reto de una demanda en aumento (41).



**Figura 4. Pirámides poblacionales, por sexo y grupo de edad, 1990 y 2030.** Fuente: Dirección General de Análisis y Prospectiva con información de la muestra del Censo de Población y Vivienda 1990, y las Proyecciones de Población para 2030 del CONAPO (39).

### 2.1.1.3 Etiologías

#### 2.1.1.3.1 Daño de los telómeros

El daño de los telómeros conduce a la senescencia en el envejecimiento. Una de las cosas que desarrolla senescencia es el daño de los telómeros, estructuras de ácido desoxirribonucleico (ADN) altamente repetitivas ubicadas al final de los cromosomas. Los telómeros están protegidos por un complejo multiproteico conocido como shelterina o refugio. Al recubrir el telómero, la shelterina previene la activación de una respuesta al daño del ADN, evitando así fusiones cromosómicas de un extremo a otro que resultarían en una crisis de los telómeros (42). Además, las células que carecen de componentes de la proteína, como POT1 o TRF2, sufren una respuesta aberrante al daño del ADN y una inducción prematura de la senescencia (43). El problema de la replicación final es una consecuencia de la incapacidad de las ADN-polimerasas para sintetizar ADN sin una plantilla, lo que ocurre en los telómeros. Esto da como resultado telómeros que se acortan progresivamente con cada división del ciclo celular. Los tejidos embrionarios evitan la erosión al expresar telomerasa, un complejo de ribonucleoproteína que sirve para concatenar el ADN en los extremos de los cromosomas, proporcionando así una plantilla para la síntesis de ADN. Sin embargo, la división celular repetida en tejidos adultos que

carecen de telomerasa da como resultado una erosión progresiva del ADN, reducción de la unión a la Shelterina y por consiguiente la senescencia. A medida que un organismo envejece, las células acumulan más divisiones. Esto da como resultado una mayor erosión y senescencia de los telómeros. Aún se desconoce hasta qué punto la erosión de los telómeros impulsa la senescencia durante el envejecimiento y contribuye al proceso de envejecimiento en sí (32).

#### 2.1.1.3.2 *Desregulación metabólica*

El metabolismo también proporciona mecanismos para la conversión de nutrientes en ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos, los componentes básicos necesarios para el crecimiento y reparación de tejidos, y para la eliminación de productos de desecho, sin embargo, la disfunción metabólica se relaciona con el envejecimiento a nivel orgánico y molecular (34).

Molecularmente, mTOR (mammalian target of rapamycin, por su nombre en inglés) es una de las vías que ajustan la regulación metabólica. Específicamente, mTORC1 interviene en la detección de energía, nutrientes, insulina y señales de crecimiento intracelularmente, lo que lo conduce a coordinar la síntesis de proteínas y lípidos (44), la autofagia (45), el crecimiento celular, la proliferación, apoptosis e inflamación. La señalización de mTOR y la insulina se ha relacionado con la esperanza de vida (46,47), la longevidad y el envejecimiento (48), mientras que, en lesiones tisulares también se activa mTOR y su desregulación está involucrada con el cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y epilepsia (44). mTOR es capaz de regular el fenotipo secretor asociado a la senescencia (FSAS) y la detención del crecimiento senescente (32). El FSAS es la característica de las células senescentes sobre la producción y secreción compleja de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas y EROs. Asimismo, las hormonas también median la autofagia, por ejemplo, la insulina inhibe la autofagia mientras que el glucagón la estimula (49).

Las sirtuinas constituyen otro vínculo molecular entre el metabolismo y la senescencia. Las sirtuinas son ribosiltransferasas con una amplia gama de funciones, como la regulación del

metabolismo y la reparación del ADN (50). Su papel en la senescencia es antagónico; SIRT1 desacetila p53, promueve su degradación y facilita la derivación de la senescencia, mientras que SIRT6 desacetila H3K18 para prevenir errores mitóticos y suprimir la senescencia (32).

#### 2.1.1.3.3 *Autofagia*

La autofagia es una vía de degradación intracelular dependiente de lisosomas, que regula la adaptación celular tras el agotamiento de nutrientes y oxígeno, así como en el estrés oxidativo (51). No obstante, la autofagia que mantiene la homeostasis y los componentes oxidativos celulares, es proporcionalmente inversa al aumento de la edad (52). Hoy en día, estudios han demostrado que la autofagia está involucrada en los procesos del envejecimiento y a la vez puede presentar efectos benéficos para la longevidad humana (53). En ratas, la estimulación de la autofagia retarda los procesos del envejecimiento mientras que la inhibición acelera los procesos del envejecimiento (53). La disminución de la autofagia en animales mayores podría explicar la acumulación de orgánulos alterados y el mal funcionamiento en el envejecimiento celular, aumentando las EROs (54).

La conexión entre autofagia y senescencia es compleja; aunque hay un aumento en la autofagia durante la senescencia que sirve para regular la producción de FSAS, la inhibición de la autofagia puede inducir la senescencia a través de disfunción metabólica y proteostática, enfatizando aún más la intrincada conexión entre el estrés metabólico y la senescencia en el envejecimiento (32).

#### 2.1.1.4 *Vías de señalización*

La detención permanente del crecimiento o ciclo celular es una característica principal de la senescencia, y fundamental para detener la propagación de células disfuncionales. Dos vías supresoras de tumores, p53 y p16/Rb, son responsables de la inducción de esta detención del crecimiento (32) y, a la vez, ambas vías supresoras de tumores deben anularse para evitar la senescencia (55).

p53 induce la transcripción del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p21CIP1. A su vez, p21CIP1 bloquea la actividad de CDK4/6, lo que da como resultado una Rb hipofosforilada y la salida del ciclo celular. Aunque los aumentos transitorios en los niveles de p53 pueden promulgar un estado inactivo y activar los procesos de reparación del ADN, durante la senescencia, hay una inducción sostenida de p53 (32).

Esto es el resultado del daño que ocurre en las regiones resistentes a la reparación del genoma conocidas como segmentos de ADN con alteraciones de la cromatina que refuerzan la senescencia. También, p53 es regulado mediante la inducción de ARF, un producto del locus INK4/ARF, que secuestra la ubiquitina ligasa MDM2 contribuyendo al aumento de los niveles de p53. Se ha demostrado que la interacción entre la proteína de caja Forkhead O4 (FOXO4) y p53 juega un papel importante en la modulación de la localización de p53 y la actividad transcripcional durante la senescencia (32).

#### *2.1.1.5 Tratamiento no farmacológico*

El envejecimiento puede ser visto como una enfermedad en donde las implicaciones son complejas y entrelazadas. En general, existen estudios para prolongar la vida útil de una variedad de organismos, desde nematodos hasta ratones, teniendo como proyección a futuro prolongar la vida humana saludable. Como se sabe, el envejecimiento es un proceso de deterioro multiorgánico, por lo cual existen tratamientos no farmacológicos en estudio como posible cura o terapia paliativa, con la finalidad de evitar el sufrimiento en los adultos mayores (30). En la actualidad, no existe un tratamiento específico para el envejecimiento dado a que puede ir acompañado de diversas enfermedades degenerativas, que no toda la población adulta mayor presenta. Por lo tanto, la recomendación en general es fomentar la adopción de hábitos saludables, entre los cuales se pueden considerar:

- Actividad física incluyendo la aeróbica, de equilibrio, de fortalecimiento muscular y de flexibilidad; por ejemplo, realizar al menos 30 minutos de actividad física aeróbica al día, en sesiones de al menos 10 minutos (OMS, 2015).
- Alimentación saludable de acuerdo con las guías alimentarias para la población mexicana de la Academia Nacional de Medicina (ANM, 2015).

### 2.1.2 *Ayuno intermitente*

El ayuno considerado como la restricción de alimentos y bebidas en un periodo de tiempo determinado, se ha practicado a lo largo de la existencia humana en algunas culturas (11). Se considera al ayuno intermitente (AI), como un patrón de alimentación con escasa o nula ingesta de energía con periodos intermedios de ingesta normal de alimentos, de forma recurrente. Hay dos tipos generales de ayuno intermitente, el ayuno en días alternados (ADA) y el ayuno intermitente con restricción de tiempo (AIRT). El primero consiste en ayunos de 24 horas en el cual únicamente se proporciona agua ad libitum seguidos de un periodo de alimentación de 24 horas que se puede realizar varias veces a la semana, como una estrategia 5:2, cuando hay 2 días de ayuno con 5 días no restrictivos (12). El ayuno con restricción de tiempo comprende lapsos determinados de abstinencia alternados con lapsos de alimentación, en el cual el tiempo de la abstinencia puede variar, por ejemplo, lapsos de 8/16 horas (13,14).

#### 2.1.2.1 *Beneficios del ayuno intermitente*

El ayuno intermitente proporciona múltiples beneficios a la salud, como respuesta adaptativa frente a ambientes precarios a los que son sometidos los organismos. Estudios en modelos animales han evidenciado que el AI reduce el estrés y daño oxidativo, la inflamación, promueve la autofagia y la reparación de ADN, mejora el metabolismo energético (14,56,57) y se relaciona con el control de enfermedades que se desarrollan con mayor frecuencia en el envejecimiento (58). Además, estudios en humanos con regímenes de AI han presentado efectos significativos en ciertas enfermedades (56), disminuyendo la obesidad, hipertensión, asma y artritis reumatoide.

El organismo humano, después de 12 a 24 horas de ayuno resulta en una disminución de glucosa sérica y el agotamiento de depósito de glucógeno hepático, acompañado de la activación de la gluconeogénesis; que es la utilización de metabolitos no glucídicos por medio de la cetogénesis derivada de las grasas o por medio de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) como fuentes de energía. La mayoría de los órganos excepto el cerebro, pueden utilizar ácidos grasos para obtener energía, no obstante,

el 3-hidroxiacetil-CoA se convierte en Acetil-CoA para que pueda ser utilizado en el cerebro como fuente de energía durante períodos prolongados de ayuno (11). Varios estudios en seres humanos han evidenciado diversos beneficios del AI sobre el metabolismo. En pacientes con obesidad que tuvieron un ADA durante 8 semanas, disminuyeron el peso corporal, grasa corporal, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés) y colesterol total, por otra parte, las lipoproteínas de alta densidad (HDL por sus siglas en inglés), la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca permanecieron sin alteraciones (21). Recientemente, un análisis proteómico en plasma de mujeres de 35-70 años con sobrepeso u obesidad, tras haber tenido un ADA de 8 semanas, se observó el aumento de la apolipoproteína A4 (APOA4) y la disminución de la apolipoproteína C2 (APOC2) y C3 (APOC3), lo cual tuvo correlación con la disminución significativa de los triglicéridos séricos, sugiriendo que el AI favorece un efecto positivo en el metabolismo de lípidos (20). Asimismo, un ayuno prolongado de 13 días resultó en una presión arterial sistólica por debajo de 120 en el 82% de los sujetos con hipertensión limítrofe con una reducción media de 20 mm de Hg en la presión arterial (18). Un estudio de Stekovic *et al.* (2019) evaluaron a sujetos sin obesidad con ADA durante 4 semanas, reduciendo la grasa corporal y LDL, incrementando el 3-hidroxiacetil-CoA, ácidos grasos poliinsaturados, mejorando la salud cardiovascular (22).

También, algunos estudios en seres humanos con AI han encontrado efectos benéficos sobre el estrés y daño oxidativo. Un estudio en jóvenes sin obesidad de 29-30 años con ayuno prolongado de 58 horas, evaluaron la metabolómica en sangre. Después de las 58 horas de ayuno, presentaron concentraciones muy altas de 2- y 3-Hidroxiacetil-CoA, y aumento de varios antioxidantes (ácido fólico, ergotioneína, carnosina, urato y xantina). Durante el ayuno, los niveles de glutatión reducido (GSH por sus siglas en inglés), NADP<sup>+</sup> y adenosín trifosfato (ATP por sus siglas en inglés) permanecieron constantes, y aumentaron considerablemente tres de los nueve metabolitos que disminuyen en el envejecimiento (ácido fólico, leucina e isoleucina) (17). También, un estudio realizado por Karsen *et al.* (2019), evaluó a sujetos que tuvieron un ayuno prolongado durante 15 días, y los resultados séricos mostraron un nivel mayor en la capacidad antioxidante total, niveles menores del estado oxidante total y del índice de estrés oxidativo (15). Y,

conjuntamente, sujetos con AI de 10 días y consumo calórico de 250 kcal/día, mejoraron los biomarcadores metabólicos (disminución de glucosa en sangre, insulina, hemoglobina glicosilada, colesterol total, LDL y triglicéridos, además del incremento de HDL), disminuyó el indicador de daño oxidativo (MDA), y aumentó la capacidad antioxidante total (19).

En roedores, el AI también presenta efectos benéficos para mejorar los biomarcadores metabólicos (14). En un estudio en ratones con ADA, redujeron los niveles séricos de glucosa e insulina y aumentaron los niveles de 3-hidroxiacetil-CoA, en comparación con el grupo alimentado ad libitum y el grupo con restricción calórica (RC) al 40% (59). Wan *et al.* (2003) evaluaron durante 24 semanas a ratas con un régimen de ADA, resultando en una disminución de la glucosa e insulina en ayunas, el ritmo cardíaco y la presión sanguínea (60). En un estudio de Gotthardt *et al.* (2016), en ratones con obesidad, que tuvieron ADA durante 4 semanas, redujeron el peso, la grasa corporal, los niveles de glucosa e insulina en comparación con el grupo alimentado ad libitum (61). Mager *et al.* (2006) evaluaron a ratas con ADA durante 16 semanas, resultando en una disminución del peso corporal, los niveles de glucosa en sangre y un aumento en los niveles de corticosterona en plasma lo cual se relaciona con sensibilidad a la insulina, además, presentaron una disminución significativa de la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea (62). La disminución de los aminoácidos de cadena ramificada reduce la adiposidad y mejora la tolerancia a la glucosa en ratones (63), posee propiedades geroprotectoras extendiendo la vida útil de ratones progeroides (64).

Igualmente, estudios en roedores con AI han evidenciado beneficios sobre el estrés y daño oxidativo. Stankovic *et al.* (2013) evaluaron a ratas Wistar macho frente a dosis altas de restricción calórica y ayuno agudo, los resultados mostraron que los grupos con RC  $\leq 40\%$  de la ingesta diaria recomendada (IDR) y el grupo de ayuno agudo tuvieron una disminución en la capacidad antioxidante y un aumento del daño oxidativo (niveles más bajos de GSH que el grupo control), mientras que los grupos con RC  $\geq 70\%$  de la IDR disminuyen el daño oxidativo y aumentaron la capacidad antioxidante. Por lo que, una restricción calórica leve a moderada o un ayuno no agudo disminuye el estrés oxidativo,



mientras que en esquemas severos puede ser perjudicial para la salud e inducir al estrés y daño oxidativo (16).

Además, el AI también ha presentado efectos benéficos sobre la función cognitiva en modelos animales junto con efectos benéficos sobre el estrés y daño oxidativo. Un estudio con ratones CD-1 de mediana edad, que tuvieron ADA durante 11 meses, no presentaron alteraciones en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) maduro en la corteza cerebral y el hipocampo, disminuyeron significativamente los niveles de glutatión disulfuro en la corteza cerebral lo que resultó en un aumento significativo en la relación de glutatión/glutatión disulfuro, disminuyeron los niveles de 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE) y nitrotirosina en proteínas en la corteza cerebral, los cuales son dos indicadores del estrés oxidativo. En cuanto a la función cognitiva, tuvieron un mejor aprendizaje y memoria mediante el laberinto de Barnes y el condicionamiento del miedo, una capa de células piramidales CA1 más gruesa, una mayor expresión de drebrina, una proteína dendrítica. Por lo que, el AI puede reducir el estrés oxidativo en el cerebro y mejorar las funciones y estructuras cerebrales (23).

#### 2.1.2.2 *Efecto del ayuno intermitente en el envejecimiento*

Debido a que el envejecimiento se describe como un proceso multifactorial que involucra interacciones complejas entre mecanismos biológicos y moleculares, algunos de los factores involucrados son: el daño oxidativo a proteínas, ADN y lípidos, inflamación, acumulación de proteínas y orgánulos disfuncionales, niveles elevados de glucosa e insulina (65,66). En los últimos años se han realizado intervenciones en diferentes modelos de estudio, para evaluar los efectos del AI sobre el envejecimiento en los marcadores metabólicos, marcadores de estrés y daño oxidativo, la capacidad antioxidante y la longevidad.

Desde tiempo atrás al AI se le ha atribuido la longevidad, Carlson *et al.* (1946) realizaron un estudio en roedores jóvenes que tuvieron ADA en proporción 5:3, resultando en un aumento en el promedio de vida del 20% en machos y 15% en hembras en comparación con los roedores con ADA en proporción 5:2 y 5:4 (3). Posteriormente, en 1973, se realizó

otro estudio en roedores adultos de la cepa PVG/h, con ADA de dos veces por semana, los cuales presentaron una mayor longevidad (904.72 días), en comparación con los roedores que no tuvieron ayuno (770.39 días) (6). Goodrick *et al.* (1982) realizaron un estudio en ratas jóvenes con ADA, las cuales vivieron casi el doble que las ratas con dieta ad libitum (5). En relación a la dimensión de los efectos benéficos del AI sobre la longevidad varía dependiendo del patrón de abstinencia, del modelo de estudio y la edad en la que inició el tratamiento (67,68).

En cuanto a la disfunción metabólica característica del envejecimiento, un estudio en ratones viejos con régimen de ayuno prolongado de 24 horas mostró que la presencia del gen mTORC1 se correlaciona con envejecimiento hepático y a defectos en la cetogénesis, mientras que la inhibición del gen mTORC1 es necesaria para la activación de PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$ , por su nombre en inglés), que activa los genes de la cetogénesis, sugiriendo que la inhibición de mTORC1 podría aumentar la longevidad de diversos organismos (69).

### 2.1.3 Ambiente enriquecido

El ambiente enriquecido (AE), descrito por primera vez por Hebb en 1947, es una manipulación ambiental que consiste en la adición de ejercicio voluntario, objetos novedosos, e interacción social con otros animales dentro de la caja de alojamiento y, por medio de la estimulación motora, cognitiva, visual y somatosensorial causa un aumento en las habilidades cognitivas: como la resolución de problemas, el aprendizaje espacial y la memoria. Esta técnica se aplica en estudios en animales de laboratorio, en la cual el alojamiento puede ser durante períodos específicos, o a lo largo de la vida del animal. En los roedores, los objetos de enriquecimiento incluyen artículos de diferentes formas, tamaños, colores, texturas y olores, así como objetos para realizar actividad física, como túneles, escaleras, cuerdas y ruedas, incluso algunas veces la localización de la comida también se cambia con el fin de preservar la novedad de exploración (24,25). Por tanto, el no enriquecimiento del ambiente, se conoce como un ambiente estándar, el cual no incluye objetos dentro de la jaula, lo que podría considerarse como una privación sensoriomotora (24).

### 2.1.3.1 *Beneficios del ambiente enriquecido*

En relación a los efectos benéficos sobre la disfunción cognitiva, tras una terapia de AE: un estudio en ratas Wistar recién nacidas, evaluó los cambios en la conectividad funcional cerebral por el AE previo a un estrés físico inducido por la separación materna (SM), los resultados mostraron que la SM prolongada durante todo el período de destete no causó ningún efecto perjudicial en el aprendizaje espacial y la memoria, incluido el comportamiento similar a la depresión evaluado mediante la prueba del laberinto de agua de Morris (LAM) y la disminución del comportamiento similar a la ansiedad. Sin embargo, el AE alteró los comportamientos similares a la ansiedad y la depresión tanto en los grupos de control como en los de SM, pero mejoró la memoria espacial en los últimos grupos. Por lo que, el AE tuvo efectos diferentes sobre la cognición y el comportamiento emocional independientemente de la exposición a la SM (28).

En cuanto a los efectos benéficos sobre el estrés y daño oxidativo, tras una terapia de AE: un estudio con ratas Sprague-Dawley, que durante la edad adolescente tuvieron estrés crónico predecible (ECP) de 15 min/día de estrés por inmovilización durante cuatro semanas, o un AE de 1 hora/día en cajas durante cuatro semanas. El ECP es un modelo de estrés físico y mental, y provoca un alto nivel de ansiedad, pero a diferencia del estrés crónico impredecible, se ha informado que el ECP tiene efectos positivos en el aprendizaje y la memoria. Los resultados mostraron que los niveles séricos de corticosterona no cambiaron en ambos grupos, en comparación con el grupo control. Mientras que la prueba de LAM, mostró que la memoria espacial mejoró en el grupo ECP y el AE. Asimismo, en ambos grupos el BDNF, aumentó en la parte izquierda y derecha del hipocampo, y el óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) aumentó en la circunvolución dentada y en la región CA1 del lado derecho del hipocampo. Lo que cabe destacar que el BDNF y el nNOS, están involucrados en la plasticidad sináptica. Y los niveles de MDA aumentaron, mientras que los niveles de proteínas carbonilo disminuyeron en el hipocampo derecho en ambos grupos, y la enzima SOD no cambió en ambos lados del hipocampo. Lo que indicó que el MDA podría estar relacionado con la memoria espacial en el hipocampo derecho, en el entendido de que los productos de la peroxidación de lípidos en bajos niveles pueden tener efectos

benéficos, pero a niveles excesivos pueden provocar trastornos patológicos y enfermedades. Y, en cuanto tanto al AE y el ECP, mostraron que son coadyuvantes para disminuir el daño oxidativo en proteínas (26). Otro estudio en ratas Fischer con hipertensión renovascular, evaluó el efecto del AE durante 4 semanas sobre el estrés oxidativo en la médula ventrolateral, el corazón y riñones. Los animales se dividieron en cuatro grupos: condición estándar normotensa (Sham-St), ambiente enriquecido normotenso (Sham-AE), condición estándar hipertensa (2K1C-St) y ambiente enriquecido hipertenso (2K1C-AE). Lo que resultó en una mayor presión arterial media (mmHg) en el grupo 2K1C-St, en comparación con Sham-St y Sham-EE. La médula ventrolateral del grupo 2K1C-AE tuvo una mayor actividad de SOD y catalasa, en comparación con el grupo 2K1C-St. Asimismo, el grupo 2K1C-AE presentó menor oxidación de lípidos que el grupo 2K1C-St en la médula ventrolateral. Además, los riñones de los animales 2K1C-AE presentaron mayor actividad de SOD que los de los animales 2K1C-St. Por lo que el AE tuvo un efecto antioxidante en la médula ventrolateral y los riñones que contribuye a reducir el daño oxidativo en ratas hipertensas (27).

Conjuntamente, un estudio en roedores con AE mostró efectos benéficos sobre la función cognitiva, el estrés y daño oxidativo: el estudio evaluó a ratas Wistar que tuvieron un tratamiento de AE, ejercicio físico anaeróbico (EFA) o enriquecimiento social (ES) durante 8 semanas, y posteriormente, una cirugía con infusión de péptidos beta amiloide ( $\beta$ A) en el hipocampo dorsal, con el fin de crear un modelo de enfermedad de Alzheimer (EA) con formación de placas  $\beta$ A. La infusión de  $\beta$ A resultó en déficits de memoria y daño oxidativo del hipocampo. Los resultados mostraron que el AE y el EFA previnieron los déficits de memoria a corto plazo en las pruebas de reconocimiento de objeto novedoso (RON) y reconocimiento social (RS), asimismo, evitaron la peroxidación lipídica mediante la prueba de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés). Mientras que, el ES previno solo los déficits de memoria y la disminución de la capacidad antioxidante total mediante la prueba del poder antioxidante/reductor férrico (FRAP por sus siglas en inglés). Por lo que, el AE y el EFA tienen mejores efectos neuroprotectores que el RS en los déficits de memoria relacionados con la neurotoxicidad de  $A\beta$  en el modelo de EA evaluado (29).

### 2.1.3.2 *Efecto del ambiente enriquecido en el envejecimiento*

Con respecto a que, en el envejecimiento se presentan diversas alteraciones orgánicas, tales como, la disfunción cognitiva, el estrés y daño oxidativo. El AE ha mostrado que mediante la estimulación sensorial, cognitiva y motora, causa cambios celulares y moleculares benéficos, y aumenta la actividad neuronal en una variedad de sistemas centrales y periféricos, por lo cual funciona como modelo de reserva cerebral y cognitiva (24), para el tratamiento de la deficiencia cognitiva y de la memoria, en diferentes modelos animales de lesión o enfermedad cerebral (29). Y, de igual manera, ha mostrado efectos benéficos sobre el estrés y daño oxidativo en modelos de roedores de estudio.

Un estudio, en ratones hembra NMRI que tuvieron un AE y una dieta con un 6 % de nueces (DN) a partir de los 12 meses de edad durante 24 semanas. Los resultados mostraron que, el grupo con DN sin AE, mejoró la memoria espacial en la prueba de alternancia del laberinto en Y ( $p < 0.05$ ). Aunque, el grupo DN con AE, aumentó la significancia. En el cerebro, el grupo con DN con AE, redujeron los niveles de oxilipina a base de ácido araquidónico (ARA) ( $p < 0,05$ ), pero los efectos de los lípidos de la nuez no se relacionaron con la función mitocondrial, ya que la producción de ATP, el potencial de la membrana y la respiración mitocondriales no se vieron afectados en el grupo control. Por lo que, las nueces modifican el perfil de oxilipina en el hígado y el cerebro, lo que podría tener efectos beneficiosos para un envejecimiento saludable, un efecto que puede mejorar aún más con un estilo de vida activo, como lo es en el caso de los roedores, el AE (8).

### 2.1.4 *Ejercicio regular*

El ejercicio tiene una poderosa acción sobre el metabolismo, la adaptación del cuerpo debido a los cambios inducidos por el ejercicio es fundamental para poder aportar la energía necesaria para la contracción muscular y fisiológica. En el ejercicio se distinguen dos tipos: el ejercicio aeróbico y anaeróbico, que se diferencian por la distinta vía metabólica que utilizan para obtener energía mediante la disponibilidad de ATP (70), además, por la intensidad y duración del ejercicio (71).

#### *2.1.4.1 Efecto del ejercicio regular en el envejecimiento*

La actividad física regular es esencial para un envejecimiento saludable y apoya la salud mental positiva. En los adultos mayores, puede ayudar a retrasar, prevenir o controlar muchas enfermedades crónicas que enfrentan, reduce el riesgo de limitaciones funcionales moderadas o graves y el riesgo de muerte prematura (10). En estudios en modelos animales jóvenes, el ejercicio aumenta la neurogénesis del hipocampo y mejora el aprendizaje. Por lo tanto, el ejercicio voluntario mejora algunas de las consecuencias morfológicas y conductuales deletéreas del envejecimiento (10).

De este modo, la actividad física debe ser parte del plan de atención en los adultos mayores, excepto en los casos en que esté contraindicado, y considerando un nivel de esfuerzo para la actividad física adecuado, es decir, debe ser relativo al nivel de condición física y habilidad del adulto mayor (10). En particular, el entrenamiento físico puede mejorar la sensibilidad a la insulina muscular y se considera una herramienta clave en la prevención y el tratamiento de los trastornos metabólicos (71).

#### *2.1.5 Estrés oxidativo*

El estrés oxidativo es el desequilibrio que se da en las células cuando hay un aumento en las EROs y la disminución de la capacidad para reparar el daño resultante por medio de moléculas antioxidantes. Normalmente, existe una función celular redox que regula la actividad oxidativa y la capacidad de defensa antioxidante (funcionalidad positiva), pero algunas veces este balance se encuentra alterado y hay una mayor producción de subproductos de la oxidación (funcionalidad negativa), conocidos como EROs, lo que causa envejecimiento y apoptosis celular (2,72).

##### *2.1.5.1 Estrés y daño oxidativo en el envejecimiento*

El envejecimiento está asociado con la disfunción mitocondrial y se considera que la producción de EROs por las mitocondrias a menudo es la principal causa del estrés oxidativo (72). Aunque, de igual manera, el estrés oxidativo es un factor que contribuye al envejecimiento y a la progresión de múltiples enfermedades neurodegenerativas

relacionadas con el envejecimiento (73). En el sistema nervioso central, las EROs desempeñan una función importante, pero se conoce que su acumulación aumenta la sensibilidad a que surja un daño en el tejido cerebral (74). Cuando existe una falta de oxígeno en el cerebro, se ocasiona una falla en la señalización redox, que resulta en un estado de estrés oxidativo y reducción de la defensa antioxidante (73). Por lo cual, se ve afectado el ADN nuclear y mitocondrial, lípidos, proteínas, homeostasis del calcio y del metal, tráfico de receptores, endocitosis, y homeostasis energética, lo que afecta directamente la actividad sináptica y la neurotransmisión en las neuronas, que lleva a la disfunción cognitiva.

De este modo, la disfunción mitocondrial altera la cadena de transporte de electrones (cadena respiratoria mitocondrial), lo cual provoca una mayor generación de las EROs (75) y causa peroxidación lipídica dado a que interactúan con los ácidos grasos poliinsaturados. Además, aumentan las proteínas carboniladas y hay una reducción en la defensa antioxidante, en relación a las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutarredoxina, tiorredoxina y catalasa (2,73,76). Por lo tanto, cuando hay un constante estrés oxidativo en el cerebro las funciones involucradas para reparar la falla se ven alteradas, y origina una serie de reacciones en cadena (73), que conducen a un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (a través de la activación de las metaloproteinasas) y a alteraciones de la morfología cerebral (neuroinflamación), que conducirán a apoptosis neuronal (72). Durante el proceso natural del envejecimiento se puede experimentar disminución de la capacidad cognitiva y funcional que van desde disminuciones leves en ciertas funciones cognitivas con el tiempo, hasta demencia severa entre las personas con enfermedades neurodegenerativas, aunque estas características clínicas no siempre se presentan, y algunos adultos mayores continúan conservando la mayoría de las capacidades cognitivas a lo largo de su vida (34).

## *2.2 Antecedentes del problema*

### *2.2.1 Vinculación del estrés y daño oxidativo en el envejecimiento*

En la investigación, se han realizado diferentes estudios para evaluar la relación del estrés y daño oxidativo con el envejecimiento biológico mismo. Un estudio en ratas macho Sprague-Dawley, evaluó las funciones cognitivas y locomotoras, y los niveles de estrés oxidativo a los 14, 18, 23 y 27 meses de edad, es decir, de mediana a avanzada edad. Los resultados de las pruebas de campo abierto, RON y LAM mostraron que las ratas de 27 meses tuvieron menos actividad exploratoria, un aprendizaje espacial y memoria más deficiente que las ratas de 14 meses. En cuanto al nivel de MDA, el contenido de carbonilo de proteínas y la actividad enzimática antioxidante sérica, las ratas de 27 meses presentaron un aumento de MDA y una menor actividad de GPx. Por lo que la presencia de daño oxidativo y el deterioro de las funciones cognitivas está relacionado con la edad avanzada (77).

En humanos, un estudio en individuos sanos de mediana y avanzada edad analizó doce regiones cerebrales, los niveles de aducción de proteínas por la peroxidación lipídica, neurocetales y MDA, como marcadores de daño oxidativo de proteínas, los niveles de ciclooxigenasa-2 (COX-2), como marcador de inflamación, y el citocromo P450 2J2 (CYP2J2), responsable de la generación de productos neuroprotectores. Los resultados mostraron productos finales de la peroxidación lipídica dependientes de la región, COX-2 y cambios en CYP2J2 en el cerebro humano envejecido, sin embargo, no se estableció una relación clara entre los niveles de neurocetales, MDA, COX-2 y CYP2J2 y la vulnerabilidad regional a la neurodegeneración en la vejez (78).

### *2.2.2 Efecto del AI sobre el estrés y daño oxidativo en el envejecimiento*

Existen diversas estrategias que se han desarrollado para combatir el estrés y daño oxidativo en el envejecimiento y el envejecimiento mismo, de las cuales algunas son el ayuno intermitente, el ejercicio físico y la ingesta de antioxidantes (79). En las ratas el envejecimiento incrementa el daño oxidativo y la fibrosis en el corazón. Un estudio en ratas Sprague-Dawley, que tuvieron ADA desde un inicio temprano (2 meses de edad) hasta su



envejecimiento (24 meses), redujeron el nivel de inflamación, los niveles de glutatión oxidado, 4HNE y proteínas carbonilo, y aumentaron los niveles de glutatión reducido en el corazón, protegiéndolos contra la fibrosis cardiaca que está relacionada con la edad (4). En humanos, un estudio en adultos mayores con AI (2 veces/semana), durante 36 meses, disminuyeron los marcadores de daño oxidativo (MDA, proteína C reactiva y daño en ADN), aumentó la actividad de SOD, mejoraron los marcadores metabólicos séricos (aumentó el nivel de HDL, disminuyó el nivel de LDL, triglicéridos, colesterol total, insulina y glucosa en sangre en ayunas, y el peso corporal) y la función cognitiva (7).

### *2.2.3 Medición de la función cognitiva en roedores*

Los modelos de roedores han sido importantes para dilucidar los procesos normales y patológicos que influyen en el aprendizaje y la memoria. Una prueba frecuentemente utilizada, es la prueba de campo abierto, la cual evalúa la locomoción y la ansiedad, aunque es necesario realizar más pruebas que evalúen la ansiedad (80,81). Esta prueba fue creada por Hall en 1934, la cual se ha modificado con el paso del tiempo en nuevas versiones mediante el cambio del tamaño y la forma de la caja (circular o cuadrada), la iluminación, la presencia de objetos y la duración de la prueba (82). La prueba de campo abierto se ha descrito como un modelo adecuado para medir la ansiedad normal a la que se enfrentan los animales cuando están en una situación estresante o amenazante, pero no como un modelo de ansiedad patológica (83). Los animales con un comportamiento similar a la ansiedad, permanecen cerca de las paredes o la periferia, presentando tigmotaxis, el cual es un mecanismo conductual que utilizan los roedores para la orientación espacial en respuesta al estímulo táctil con algo sólido. En cambio, los ratones con un comportamiento no ansioso, tienden a pasar más tiempo en el área central abierta de la caja (84). Asimismo, la prueba de reconocimiento del objeto novedoso evalúa la memoria de reconocimiento, y se usa frecuentemente en modelos de estudio de enfermedades cerebrales y en estudios de envejecimiento (81). Otro método ampliamente utilizado para evaluar estos procesos cognitivos en ratones es el laberinto acuático de Morris, una prueba clásica para examinar el aprendizaje espacial y la memoria (85).

### 2.2.3.1 *Regiones cerebrales involucradas en el aprendizaje y memoria*

El cerebro tiene numerosos sistemas para realizar las funciones relacionadas con las sensaciones, las acciones y las emociones; cada sistema está formado por millones de neuronas con un número inmenso de interconexiones. El aprendizaje y la memoria son adaptaciones de los circuitos cerebrales al entorno. El aprendizaje es la adquisición de nueva información o conocimiento mientras que, la memoria es la retención de la información aprendida. Sin embargo, no toda la información aprendida o recordada es procesada por las mismas estructuras neuronales. No existe una sola estructura cerebral o mecanismo celular para una determinada ejecución cognitiva, lo que da lugar a diferentes tipos de aprendizaje y de memoria. La memoria no declarativa (implícita: hábitos, comportamientos) es el resultado de una experiencia directa, y la memoria declarativa (explícita: hechos y acontecimientos) es el resultado de un esfuerzo más consciente. Otra distinción es que las memorias declarativas a menudo son fáciles de formar y fáciles de olvidar. Por el contrario, la creación de la memoria no declarativa tiende a exigir repetición y práctica durante mucho tiempo, pero después es más difícil de olvidar. La adquisición de la memoria a corto plazo o aprendizaje, tiene lugar mediante una modificación física del cerebro causada por la información sensorial entrante. Los recuerdos se mantienen durante algún tiempo, sin necesidad de ningún refuerzo, pero se consideran de corta duración porque se olvidarán a menos que se consoliden en la memoria a largo plazo. La adquisición de la memoria, tiene lugar al modificarse la transmisión sináptica entre neuronas y la consolidación sináptica de la memoria a largo plazo requiere, además, una nueva expresión genética y síntesis de proteínas (86).

La porción medial del lóbulo temporal contiene la corteza temporal, que puede ser un lugar de almacenamiento de la memoria a largo plazo, y un grupo de estructuras interconectadas con la neocorteza que son fundamentales para la formación de los recuerdos declarativos. La formación de la memoria, la retención y la recuperación implican a un sistema de áreas cerebrales conectadas entre sí. El lóbulo temporal medial es importante para la memoria declarativa, y dentro de esta región del cerebro el hipocampo forma parte esencial. En roedores, el hipocampo es importante para la memoria espacial. El hipocampo es una

región cerebral involucrada en los procesos de la memoria. Está formado por dos láminas finas de neuronas plegadas una sobre otra. Una de las láminas se denomina circunvolución dentada, y la otra recibe el nombre de asta de Ammon (CA). De las cuatro divisiones de la asta de Ammon, las divisiones CA3 y CA1 están vinculadas con conexiones importantes. Una aferencia (entrada) importante al hipocampo es la corteza entorrinal. Esta corteza envía información al hipocampo a través de un haz de axones denominado vía perforante; estos axones establecen sinapsis con neuronas de la circunvolución dentada que emiten axones (denominados fibras musgosas) que establecen sinapsis con células de CA3. Estas células emiten axones que se ramifican. Una de las ramas deja el hipocampo a través del fórnix; la otra rama, denominada colateral de Schaffer, establece sinapsis con las neuronas de CA1 (86).

#### *2.2.4 Efecto del AE sobre la función cognitiva en el envejecimiento*

Un estudio en ratas Sprague-Dawley envejecidas de 20 meses de edad, evaluó los efectos del AE durante 60 días, sobre la actividad motora, la exploración y el rendimiento cognitivo. Los animales fueron evaluados mediante el LAM, la prueba de evitación pasiva, prueba de campo abierto y tareas de coordinación sensoriomotora (prueba de puentes y escalas de Marshall). Después, los animales fueron sacrificados para las determinaciones del contenido de glutatión y la actividad específica de la colina acetiltransferasa (ChAT por sus siglas en inglés) en el cerebro, la cual es una enzima involucrada en la síntesis del neurotransmisor acetilcolina y relacionada con la memoria. Los resultados después de la primera evaluación antes del AE, mostraron que las ratas envejecidas tuvieron heterogeneidad en los patrones de comportamiento como la observada en humanos. Mientras que, el AE modificó la actividad de exploración, la cognición, las funciones motoras y los marcadores bioquímicos del glutatión y la actividad específica de ChAT en el cerebro, en las ratas envejecidas y no envejecidas, pero los cambios alcanzaron una relevancia significativa para el último grupo. Por lo que, el AE en un cerebro envejecido puede causar plasticidad y el control de los niveles de estrés oxidativo, tras una estimulación ambiental adecuada (9).

### *2.3 Planteamiento del problema*

El envejecimiento es un proceso degenerativo que desencadena múltiples enfermedades relacionadas con el avance de la edad y una mala calidad de vida en los individuos. La OMS estima que entre 2020 y 2030, el porcentaje de habitantes del planeta mayores de 60 años aumentará un 34%. En México, el CONAPO estima una incidencia de 15.6% mujeres y 13.7% hombres mayores de sesenta años con respecto a la población total, lo que sitúa al país frente a un problema de salud pública que debe atenderse (39).

En el envejecimiento existe un desequilibrio de la función redox en las células e induce al aumento de las EROs, lo que causa estrés y daño oxidativo. Hoy en día, se han propuesto algunas terapias no farmacológicas para retardar o inhibir el proceso del envejecimiento, sin embargo, no existe un tratamiento oficial para el manejo del envejecimiento. Algunas de las terapias que se encuentran en estudio, se enfocan en la disminución de la progresión del estrés y daño oxidativo en el organismo, y el deterioro cognitivo, por ejemplo, el AI y el AE.

En relación al AE con ejercicio aeróbico, en ratas Wistar, ha mostrado que disminuye el MDA en el hipocampo y evade la deficiencia de memoria a corto y largo plazo (29). En ratas Sprague-Dawley envejecidas de 20 meses de edad, que tuvieron AE durante 60 días, disminuyeron el nivel de glutatión y la actividad específica de ChAT en el cerebro, mejoró la actividad de exploración, la cognición y las funciones motoras (9). En cuanto al AI, un estudio con ratones CD-1 de mediana edad que tuvieron ADA durante 11 meses, disminuyeron significativamente los niveles de glutatión disulfuro, 4HNE y nitrotirosina en proteínas, en la corteza cerebral. Mayor aprendizaje y memoria, una capa de células piramidales CA1 más gruesa, mayor expresión de drebrina (proteína dendrítica) (23). Otro estudio en ratas Sprague-Dawley, que tuvieron ADA desde los 2 meses hasta los 24 meses de edad, redujeron el nivel de inflamación, los niveles de glutatión oxidado, 4HNE y proteínas carbonilo, y aumentaron los niveles de glutatión reducido en el corazón (4). Por lo cual, es importante valorar si estas terapias de AI y de AE en conjunto, promueven la defensa antioxidante específicamente en órganos mayormente relacionados con el estrés y daño oxidativo, como el hígado, cerebro y músculo.

Por consiguiente, el problema que aborda este estudio es conocer si el tratamiento no farmacológico combinado de AI y AE con ejercicio voluntario, aumenta mayormente la defensa antioxidante, reduce el estrés y daño oxidativo en el cerebro, hígado y músculo, y mejora la función cognitiva en ratones en proceso de envejecimiento, en comparación de ambos tratamientos por separado, con el fin de encontrar un tratamiento con mayor éxito para la disminución de la progresión o incluso la inhibición del envejecimiento.

### **III JUSTIFICACIÓN**

A nivel mundial, la población adulta mayor en los últimos años ha presentado un aumento descontrolado en comparación con otros grupos de edad, lo que es un creciente problema de salud mundial con grandes implicaciones a nivel individual y en la sociedad.

Los tratamientos alternativos no farmacológicos que puedan coadyuvar en el tratamiento del envejecimiento y mejorar la calidad de vida de los individuos, es un tema de investigación de gran relevancia. Actualmente, el AI y el AE con ejercicio regular han demostrado efectos benéficos para reducir los niveles del estrés y daño oxidativo en el organismo, ya que disminuyen los productos de la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas (proteínas carboniladas), y aumentan la producción de enzimas antioxidantes. Asimismo, el AE con ejercicio voluntario, ha demostrado efectos benéficos para disminuir la progresión del daño cognitivo en el envejecimiento, mediante la mejora de la memoria espacial y el aprendizaje. No obstante, son pocos los protocolos a largo plazo de AI y AE que se han realizado en roedores, por lo cual un tratamiento crónico de AI en combinación con un AE-EV es importante para continuar investigando los beneficios de ambos tratamientos. Por tal motivo, este proyecto propone evaluar el efecto del tratamiento no farmacológico crónico combinado de AI y AE con ejercicio regular voluntario, sobre el estrés y daño oxidativo, y la función cognitiva, en ratones en proceso de envejecimiento.

## **IV HIPÓTESIS**

El tratamiento crónico-combinado de AI más AE-EV, disminuyen el estrés y daño oxidativo y mejora la función cognitiva en ratones en proceso de envejecimiento.

## **V OBJETIVOS**

### *5.1 General*

Evaluar el efecto del tratamiento crónico-combinado de AI con AE-EV, sobre el estrés y daño oxidativo y la función cognitiva en ratones en proceso de envejecimiento.

#### *5.1.1 Específicos*

1. Evaluar la función cognitiva mediante las pruebas de campo abierto, reconocimiento del objeto novedoso y el laberinto de agua de Morris, en ratones en proceso de envejecimiento en condiciones de AI combinado con un AE y ejercicio voluntario.
2. Evaluar el estrés oxidativo mediante la cuantificación de antioxidantes totales en cerebro e hígado, en ratones en proceso de envejecimiento en condiciones de AI combinado con un AE y ejercicio voluntario.
3. Evaluar el daño oxidativo mediante la concentración de MDA en cerebro, hígado y músculo, en ratones en proceso de envejecimiento en condiciones de AI combinado con un AE y ejercicio voluntario.

## VI MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Tipo y diseño de estudio

El protocolo de este estudio fue previamente aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). El presente estudio es de tipo experimental.

### 6.2 Selección de la población, criterios de inclusión y exclusión

- Criterios de inclusión: Ratones de cepa C57BL/6J con 3 meses de edad (adultos).
- Criterios de exclusión: Ratones de cepa C57BL/6J que enfermaron repentinamente.

### 6.3 Tamaño de muestra y muestreo

Se utilizaron 20 ratones macho y hembras de la cepa C57BL/6J adquiridos en el bioterio de The Jackson Laboratory®. Los animales se mantuvieron en cuartos con una temperatura de 18-23 °C, una humedad relativa de 40-70%, un ciclo de luz oscuridad de 12h, con libre acceso a agua y alimento, de acuerdo al CICUAL. Se formaron 4 grupos; control; AI; AE-EV; AI+AE-EV en forma aleatoria. La duración de los tratamientos fue de 8 meses a partir de los 3 meses de edad, considerados como ratones adultos maduros de acuerdo a las especificaciones del proveedor (87). Para el grupo de AI, los ratones tuvieron una dieta estándar *ad libitum* con ayuno alternado de 24 horas cada 2-3 días: lunes (ayuno a partir de las 10 am), martes (alimentación *ad libitum* a partir de las 10 am), miércoles (alimentación *ad libitum*), jueves (ayuno a partir de las 10 am), viernes, sábado y domingo (alimentación *ad libitum*). En cuanto al grupo de AE-EV, los ratones tuvieron una dieta estándar *ad libitum* y fueron alojados en cajas (3 ratones del mismo sexo por caja) con túnel y rueda (Tabla 1).

---

**Tabla 1. Grupos experimentales**

---

Grupo	Tratamiento	
	Dieta	Alojamiento
Control	Estándar (alimentación <i>ad libitum</i> )	caja estándar
AI	Estándar + AI 24h alternado con alimentación <i>ad libitum</i>	caja estándar
AE - EV	Estándar (alimentación <i>ad libitum</i> )	caja con túnel y rueda
AI + AE - EV	Estándar + AI 24h alternado con alimentación <i>ad libitum</i>	caja con túnel y rueda

---

Al término del tratamiento se realizaron diferentes pruebas conductuales, por cada ratón de cada grupo; la prueba de campo abierto con duración de 5 minutos, la prueba de RON la cual se llevó a cabo en dos días con duración de 5 minutos y la prueba del LAM realizada en dos fases: la fase de entrenamiento durante 5 días, y la fase final realizada en el sexto día durante 1 minuto. Posteriormente, al término de las pruebas conductuales los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se extrajeron diferentes tejidos (cerebro, hígado y músculo), mismos que fueron almacenados a -80 °C. Posteriormente, se evaluó el estrés oxidativo mediante la prueba de la capacidad antioxidante total en cerebro e hígado, y se evaluó el daño oxidativo mediante la concentración de MDA en cerebro, hígado y músculo.



#### 6.4 Definición de variables dependientes e independientes

**Tabla 2. Definición de variables (dependientes e independientes)**

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medida
Dependientes			
Capacidad antioxidante total	Los antioxidantes protegen a las células de los daños causados por las ERO que se producen en la oxidación celular (88).	Marcador del nivel y estado redox en la muestra.	μM
Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (MDA)	La peroxidación lipídica es una reacción cuando existe estrés oxidativo. El MDA, es producto de la peroxidación lipídica y principal sustancia que reacciona al ácido tiobarbitúrico (TBA) (89).	Marcador para determinar el daño oxidativo en la muestra.	Nmol/mg de proteína
Campo abierto	Marcador para evaluar la función cognitiva. Técnica empleada en roedores para evaluar la locomoción y el comportamiento similar a la ansiedad, de acuerdo a la preferencia o no del roedor por explorar el entorno (80).	Tiempo en segundos durante el cual el ratón se encuentre en la zona centro o periferia. Número de entradas en la zona centro. Velocidad total en cm/s durante toda la prueba. Distancia recorrida en cm durante toda la prueba. Número de levantamientos durante toda la prueba.	Tiempo (s) Distancia (cm) Velocidad (cm/s) Número de entradas Número de levantamientos
Reconocimiento del objeto novedoso	Marcador para evaluar la función cognitiva. Técnica empleada en roedores para evaluar la memoria, se basa en la preferencia innata del roedor de explorar el objeto nuevo en lugar del familiar (81).	Tiempo en segundos durante el cual el ratón se encuentre entre el objeto 1 y 2.	Tiempo (s)
Laberinto de agua de Morris	Marcador para evaluar la función cognitiva. Técnica empleada en roedores para evaluar las habilidades de memoria de referencia espacial (90).	Tiempo en segundos durante el cual el ratón recorra la piscina hasta encontrar la plataforma. Distancia recorrida en cm durante el cual el	Tiempo (s) Distancia (cm) Velocidad (cm/s)

ratón recorra la piscina hasta encontrar la plataforma. Tiempo en segundos durante el cual el ratón se encuentre nadando en alguno de los cuadrantes. Velocidad total en cm/s durante toda la prueba.

---

Independientes

---

Ayuno intermitente	Marcador de inhibición del daño oxidativo. Periodo en el que se alternan periodos de ayuno y alimentación (14).	Calendarización del ayuno intermitente medido en periodos de 24 horas, en una proporción 5:2 (5 días de alimentación <i>ad libitum</i> intercalados con 2 días de ayuno).	Tiempo (h)
Ambiente enriquecido con ejercicio voluntario	Marcador de inhibición del daño oxidativo. Condición de alojamiento. Técnica de acondicionamiento aplicada en animales de laboratorio para la estimulación sensorial, cognitiva y motora (24).	Calendarización del ambiente enriquecido con ejercicio voluntario medido en días, durante un periodo de 8 meses.	Tiempo (días)

---

### 6.5 Diagrama de diseño experimental

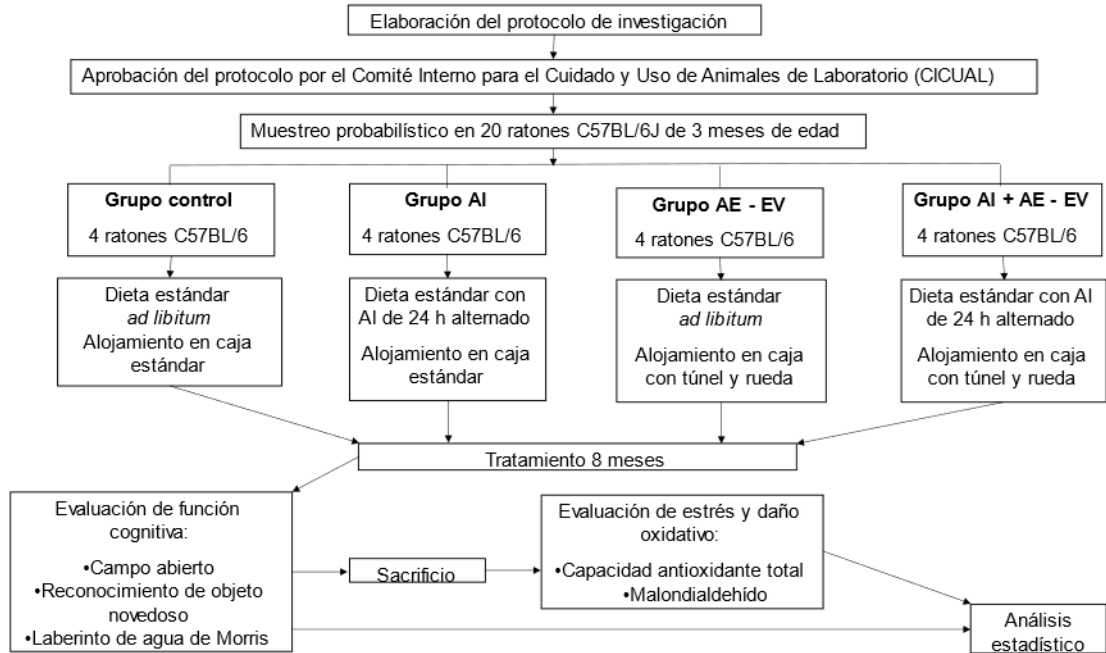


Figura 5. Diseño experimental.

## 6.6 Evaluación de la función cognitiva

### 6.6.1 Campo abierto

#### PRINCIPIO

El patrón de locomoción son manifestaciones indicativas de alteraciones en procesos neurológicos indicando una función cerebral anormal. Un laberinto de campo abierto consiste en un área lo suficientemente grande, rodeada de paredes que tienen la altura adecuada para evitar que el sujeto escape. Los roedores por naturaleza muestran distintas aversiones a entornos grandes, bien iluminados, abiertos y desconocidos, por lo que dichas características se incorporan en la prueba de campo abierto con el fin de evaluar la actividad exploratoria y el comportamiento similar a la ansiedad. Los roedores que manifiestan signos de comportamiento parecido a la ansiedad presentan tigmotaxis, permaneciendo más cerca de las paredes de la periferia. La prueba se lleva a cabo en el mismo día, el animal se coloca en una caja durante 5 minutos y se le permite explorar el espacio, libre de distractores y objetos. La prueba se basa en evaluar el tiempo que pasa el roedor en la periferia o el centro de la caja, y el número de levantamientos (80,84,91).

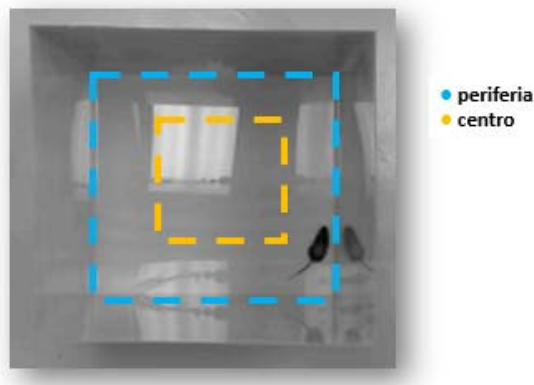
#### MATERIALES

1. Caja de campo abierto, de plástico gris (50 cm x 50 cm x 50 cm).
2. Cámara digital (USB 2.0 VGA UVC WebCam) montada con un soporte propio de la cámara, enfocada en dirección hacia el piso y sobre la caja de campo abierto.
3. Software ANY-maze video tracking system versión 6.34

#### PROCEDIMIENTO

1. Antes de la prueba, se mantuvieron a los ratones durante 15 minutos en la sala de pruebas para su aclimatación.

2. La prueba se realizó de forma individual, por cada ratón. Al inicio de cada prueba, se limpió la caja de campo abierto con un paño y etanol al 70%, con la finalidad de eliminar orina, heces y olores del ratón anterior.
3. Se conectó la cámara a la computadora a través de un cable USB, con el fin de sincronizar la cámara con el software.
4. Con el software ANY-maze, se recopilaron diversos datos de la grabación de la actividad locomotora de cada ratón, en relación al tiempo y entradas en la periferia y el centro, la distancia recorrida total, el número de levantamientos y diagramas representativos del camino recorrido durante la prueba de campo abierto.
5. Al mismo tiempo de colocar al ratón en la caja de campo abierto se activó la grabación y se permitió que el ratón explorara su entorno durante 5 minutos. Durante el tiempo de grabación el operador se apartó de la sala de prueba.
6. Después de los 5 minutos de grabación la prueba automáticamente finalizó y el ratón fue retirado de la caja de campo abierto.
7. Para finalizar, el ratón se colocó nuevamente en su respectiva caja de alojamiento.



**Figura 6. Representación gráfica de prueba de campo abierto.**

### 6.6.2 Reconocimiento del objeto novedoso

#### PRINCIPIO

El reconocimiento del objeto novedoso se utiliza para evaluar el comportamiento de los roedores sobre la memoria de reconocimiento. La prueba se divide en dos fases: en el primer día (sesión de exploración), al ratón se le presentan dos objetos iguales, mientras que, en el segundo día (reacción a un objeto novedoso), uno de los objetos es reemplazado por un objeto nuevo. La prueba se basa en la preferencia innata del roedor de explorar un objeto novedoso en lugar de uno familiar. Por lo tanto, un roedor que recuerda el objeto familiar pasará más tiempo explorando el objeto nuevo. La exploración del objeto se definió de acuerdo al número de entradas (29,81).

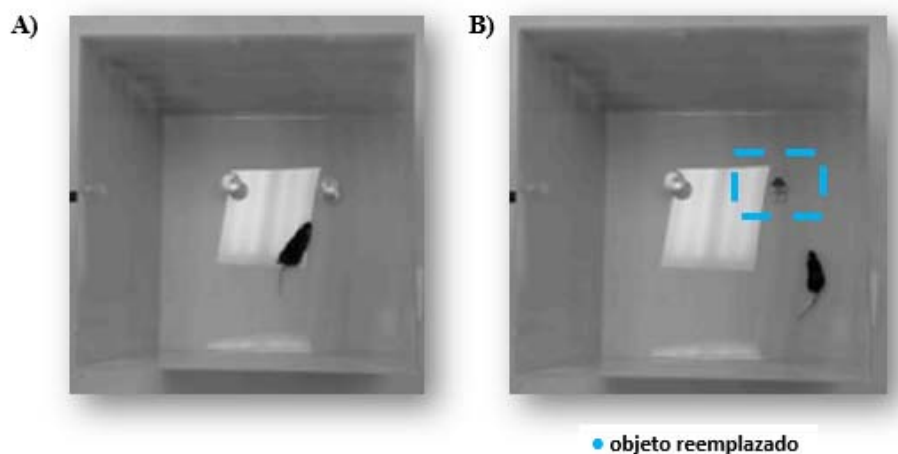
#### MATERIALES

1. Caja de campo abierto, de plástico gris (50 cm x 50 cm x 50 cm).
2. Objetos iguales: dos vasos tequileros, objeto novedoso: muñeco de lego pequeño.
3. Cámara digital (USB 2.0 VGA UVC WebCam) montada con un soporte propio de la cámara, enfocada en dirección hacia el piso y sobre la caja de campo abierto.
4. Software ANY-maze video tracking system versión 6.34.

#### PROCEDIMIENTO

1. La prueba de reconocimiento de objeto novedoso se realizó 24 horas después de la prueba de campo abierto. Se realizó la prueba en la misma caja de la prueba de campo abierto.
2. Se conectó la cámara a la computadora a través de un cable USB, con el fin de sincronizar la cámara con el software ANY-maze.
3. Con el Software, se recopilaban datos de la grabación sobre la actividad locomotora de cada ratón, en relación al tiempo que pasó entre el objeto 1 y 2, en ambos días.

4. Antes de la prueba, se mantuvieron a los ratones durante 15 minutos en la sala de pruebas para su aclimatación.
5. La prueba se realizó de forma individual, por cada ratón. Al inicio de cada prueba, se limpió la caja de campo abierto y los objetos con un paño y etanol al 70%, con el fin de eliminar orina, heces y olores del ratón anterior.
6. En el primer día, se realizó la sesión de exploración, en donde se colocó al ratón en la caja con dos objetos iguales y se permitió que explorara su entorno durante 5 minutos (figura 7.A).
7. Al mismo tiempo de colocar al ratón en la caja se activó la grabación con la cámara. Durante el tiempo de grabación el operador se apartó de la sala de prueba. Después de 5 minutos la prueba automáticamente finalizó y el ratón fue retirado de la caja de prueba, y se colocó nuevamente en su respectiva caja de alojamiento.
8. Después de 24 horas, se realizó la sesión de prueba, en donde el objeto familiar izquierdo fue reemplazado por un objeto nuevo, y se colocó nuevamente al ratón en la caja de campo abierto durante 5 minutos (figura 7.B).



**Figura 7. Representación gráfica de prueba de reconocimiento de objeto novedoso. A)** Primer día. Sesión de exploración, con colocación de dos objetos iguales. **B)** Segundo día. Sesión de prueba, con colocación de un objeto familiar y uno nuevo.

### 6.6.3 *Laberinto de agua de Morris*

#### PRINCIPIO

El aprendizaje y la memoria espacial se evaluó con la prueba del laberinto de agua de Morris, la cual consta de dos fases: a) fase de entrenamiento llevada a cabo en 5 días; y b) fase de prueba final realizada al sexto día. En la fase de entrenamiento, se oculta debajo del agua una plataforma en el cuadrante blanco, por día se realizan 4 ensayos, y en cada ensayo se coloca al ratón en un cuadrante distinto. En la segunda fase, se realiza la prueba final en donde la plataforma es retirada de la piscina y el ratón se coloca en la piscina durante 1 minuto. En principio, el animal podría escapar del agua nadando al azar o siguiendo rutas de búsqueda no sistemáticas a lo largo de la piscina; pero en la práctica, los animales sanos aprenden rápidamente a nadar hacia la plataforma desde cualquier posición inicial en la circunferencia de la piscina. La direccionalidad precisa de su comportamiento de escape (y otras medidas de rendimiento) proporcionan evidencia de que los animales escapan aprendiendo la posición espacial de la plataforma en relación con las señales distales (90).

#### MATERIALES

1. Cámara digital (USB 2.0 VGA UVC WebCam) montada con un soporte propio de la cámara, enfocada en dirección hacia el piso y sobre la caja de campo abierto.
2. Software ANY-maze video tracking system versión 6.34.
3. Piscina circular inflable de 110 cm de diámetro.
4. Plataforma circular de plástico de 10 cm de diámetro.
5. Pintura textil blanca no tóxica (PintArt ®)
6. Señales proximales elaboradas con papel cartulina, y señales distales elaboradas con tela tipo lona.
7. Lámpara de calor.

#### PROCEDIMIENTO

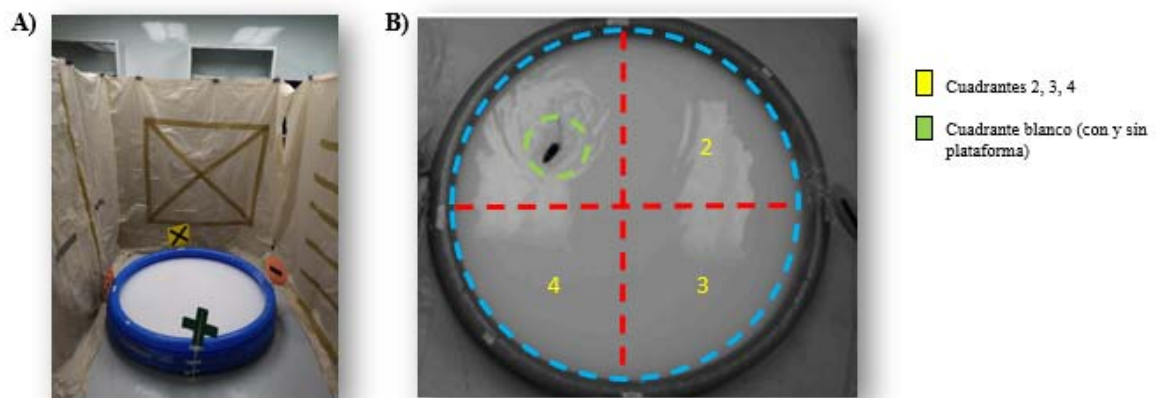
1. La piscina se llenó con agua del grifo. Al agregar una pintura blanca no tóxica, el agua se hizo opaca y se mantuvo en 20°C durante todos los días de prueba. Se



añadieron señales proximales sobre el contorno de la piscina, y las señales distales se colocaron como paredes alrededor de la piscina (figura 8.A).

2. Antes del inicio de cada día de prueba, se mantuvieron a los ratones durante 15 minutos en la sala de prueba para su aclimatación. Durante todo el período de prueba, se mantuvo a los ratones frente a una lámpara de calor entre los diferentes ensayos para prevenir hipotermia después de haber sido retirados del agua.
3. Se conectó la cámara a la computadora a través de un cable USB, con el fin de sincronizar la cámara con el software.
4. Con el software de video ANY-Maze, se dividió la piscina en cuatro cuadrantes virtuales: cuadrante 1 (cuadrante blanco), cuadrante 2, cuadrante 3 y cuadrante 4 (figura 8.B). Se registró la latencia de escape, la velocidad de nado, la distancia recorrida y el tiempo en cuadrantes.
5. Cada ratón tuvo 5 días de entrenamiento en la piscina, por día recibió 4 ensayos con un intervalo de descanso de 10 minutos entre cada ensayo. Posteriormente, 24 horas después del último ensayo de entrenamiento, se realizó la prueba final.
6. En la fase de entrenamiento, se sumergió la plataforma dejando 2 cm entre la superficie del agua, de manera que la plataforma se ocultó. Mientras que, en la fase de la prueba final la plataforma fue retirada.
7. En cada ensayo el ratón se introdujo de frente a la pared de la piscina, desde una posición diferente (NE, noreste; S, sur; SO, suroeste; E, este). Mientras que, la ubicación de la plataforma se mantuvo en el cuadrante blanco (posición NO, noroeste) en todos los ensayos (tabla 3).
8. Al momento de colocar al ratón en la piscina se activó la grabación de la cámara. Durante el tiempo de grabación el operador se apartó de la sala de prueba. Finalizado el tiempo de prueba, la grabación automáticamente se detuvo y el ratón fue retirado de la piscina con ayuda de una rejilla. Luego, se colocó nuevamente en su respectiva caja de alojamiento bajo el calor de la lámpara.

9. En el día uno de entrenamiento, en el primer ensayo se dio un lapso de un minuto para que el ratón encontrara la plataforma. Si no encontraba la plataforma al minuto, se recogía al ratón con la rejilla y se colocaba sobre la plataforma por unos segundos antes de sacarlo. En los siguientes ensayos de entrenamiento, se dejó nadar al ratón por un lapso máximo de un minuto hasta encontrar la plataforma. Si el ratón encontraba la plataforma antes del minuto la prueba finalizaba automáticamente, o si al pasar el minuto no hallaba la plataforma únicamente se retiraba de la piscina.
10. Finalmente, en el día de la prueba final, el ratón nadó durante un minuto y posteriormente fue retirado de la piscina con la rejilla.



**Figura 8. Representación gráfica de prueba del laberinto de agua de Morris. A) Adecuación de piscina, con señales y pintura. B) Ejecución de la prueba.**

**Tabla 3. Ensayos durante la fase de entrenamiento**

Día de prueba	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Ensayo 4	
	Posición inicial	Posición meta	Posición inicial	Posición meta	Posición inicial	Posición meta	Posición inicial	Posición meta
1	NE	NO	E	NO	S	NO	SO	NO
2	S	NO	NE	NO	SO	NO	E	NO
3	SO	NO	S	NO	E	NO	NE	NO
4	E	NO	SO	NO	NE	NO	S	NO
5	SO	NO	NE	NO	S	NO	E	NO
Prueba final	SE	removida						

### *6.7 Evaluación del estrés oxidativo*

#### *6.7.1 Homogeneización de las muestras*

Para el homogeneizado de las muestras de tejido se realizó lo siguiente:

1. Los tejidos previamente pesados se colocaron en tubos Falcon de 50 ml.
2. Se agregó solución PBS 1X pH 7.4 en proporción (1.5 g de peso – 2.25 ml).
3. Se homogeneizaron las muestras utilizando un homogeneizador (WiseTis HG-15D), y se mantuvieron en hielo previo a su evaluación.

### 6.7.2 *Cuantificación de antioxidantes totales*

#### PRINCIPIO

La determinación de la capacidad antioxidante total mide cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante, aunque también se pueden basar en la cuantificación de los productos formados de la acción antioxidante. El kit de capacidad antioxidante total (Sigma-Aldrich MAK334), mide la capacidad del antioxidante para reducir el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ . El  $\text{Cu}^+$  resultante forma un complejo que se lee a 570 nm. La intensidad de coloración es proporcional a la capacidad antioxidante total en la muestra. El kit utiliza 20  $\mu\text{L}$  de muestra y tiene un rango de detección lineal de 1,5 a 1000  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox (88).

#### PROCEDIMIENTO

1. Preparación de los reactivos: Se nivelaron todos los componentes a temperatura ambiente. Se centrifugaron brevemente el reactivo B y el estándar antes de abrirlos.
2. Preparación de la mezcla de reacción: Por cada pocillo de muestra y estándar, se mezcló: 100  $\mu\text{L}$  de Reactivo A y 8  $\mu\text{L}$  de Reactivo B.
3. Preparación de los estándares de Trolox: Se prepararon 250  $\mu\text{L}$  de un estándar Trolox de 1 mM combinando 5  $\mu\text{L}$  de estándar con 245  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura. Se diluyeron los estándares en tubos de centrifuga de 1,5 ml como se describe:

**Tabla 4. Preparación estándar de curva de calibración de antioxidantes totales**

<b>Tubo</b>	<b>Estándar Trolox 1 mM</b>	<b>Agua ultrapura</b>	<b>Trolox <math>\mu</math>M</b>
1	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1000
2	60 $\mu$ L	40 $\mu$ L	600
3	30 $\mu$ L	70 $\mu$ L	300
4	0 $\mu$ L	100 $\mu$ L	0

4. Preparación de la reacción de ensayo: Los tubos con el homogeneizado inicial se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm a 7 °C. Luego, se transfirieron 20  $\mu$ L del sobrenadante por muestra en los pocillos de la microplaca, por duplicado.
5. Posteriormente, se transfirieron 20  $\mu$ L de estándar diluido a la microplaca. Y, a todos los pocillos con muestra o estándar se añadieron 100  $\mu$ L de mezcla de reacción.
6. Por último, se golpeó ligeramente la placa para mezclar y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar, se midió la absorbancia a 570 nm.

#### *6.8 Evaluación del daño oxidativo*

##### *6.8.1 Cuantificación de malondialdehído (MDA)*

#### PRINCIPIO

La interacción de ácidos grasos poliinsaturados con EROs, resulta en peroxidación lipídica. Esta técnica es una herramienta conveniente para la detección de subproductos de la

peroxidación lipídica como el MDA y el 4-HNE. El MDA en la muestra reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés) en presencia de calor, cada mol de MDA reacciona con dos moles de TBA para generar un aducto MDA-TBA, el cual produce un compuesto de coloración roja, cuantificable espectrofotométricamente a 532 nm de absorbancia (89,92).

## PROCEDIMIENTO

En tubos de 1.5 ml se colocaron 50  $\mu$ L del homogenizado y 100  $\mu$ L de solución TBA (pesar para 5 mL: 0.025 g de TBA, 0.8 de TCA y 100  $\mu$ L de HCl concentrado) por duplicado, para el blanco se colocaron 50  $\mu$ L de agua desionizada, en lugar del homogenizado. A todas las muestras y a los blancos se les agregó 2.5  $\mu$ L de solución de BHT (pesar para 1 mL: 0.006 g de BHT, 1 mL de metanol). Las mezclas se homogeneizaron con la ayuda del vórtex y se colocaron en baño María a 90 °C durante 40 minutos. Una vez concluido el tiempo se colocaron en hielo para detener la reacción y en seguida se centrifugaron a 5000 RPM durante 10 minutos a 3 °C. Por último, se colocaron 80  $\mu$ L de muestra en la microplaca y se leyeron inmediatamente a 532 nm.

### *6.9 Análisis estadístico*

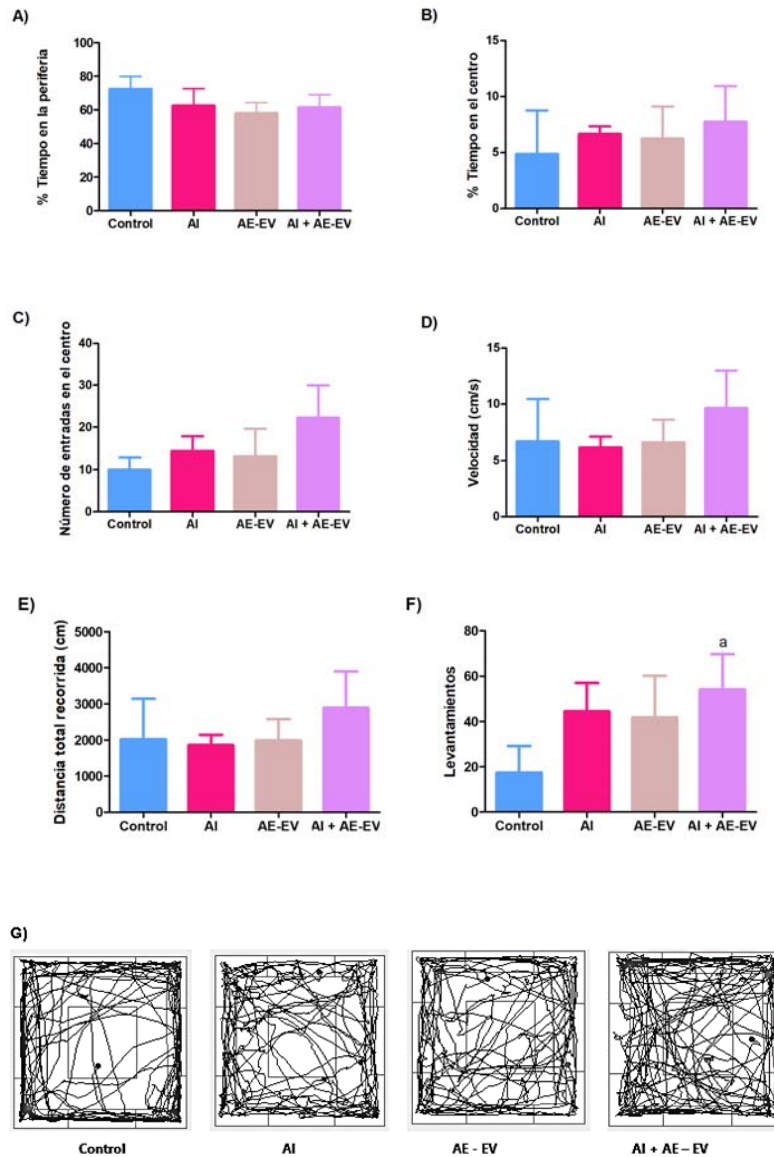
Para el análisis estadístico de los datos, las medias de los grupos fueron comparadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, con el paquete estadístico GraphPad Prism 5 versión 5.01, seguido de una prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ). Para el análisis estadístico de los datos de la prueba de reconocimiento del objeto novedoso, las medias de los grupos del objeto conocido y novedoso fueron comparadas con una prueba T de Student para cada grupo.

## VII RESULTADOS

### *7.1 Determinación de la función cognitiva*

#### *7.1.1 Prueba de campo abierto*

La prueba de campo abierto fue realizada para determinar un comportamiento similar a la ansiedad y la actividad locomotora considerando la velocidad y la distancia en los diferentes grupos de ratones (figura 9). De acuerdo a la prueba de campo abierto, la ansiedad en los roedores se puede medir colocando al animal en un espacio abierto y desconocido durante cierto tiempo, cuando un ratón presenta un comportamiento similar a la ansiedad particularmente pasará más tiempo en la periferia, por el contrario, cuando un ratón no presenta ansiedad su habilidad de exploración no se ve afectada y pasa tiempo en el centro (84). En cuanto a los resultados de esta prueba, en el panel G de la figura 9, se muestra un ejemplo representativo de la trayectoria de un ratón por cada grupo; los tratamientos no-farmacológicos mostraron una tendencia a disminuir el tiempo en la periferia, incrementando el tiempo y las entradas en el centro, aunque no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (figura 9 A-C). La velocidad y la distancia total recorrida fue similar en el tratamiento de AI y en el tratamiento de AE-EV, a excepción de la combinación de ambos tratamientos AI + AE-EV que presentó una tendencia al aumento, aunque ningún grupo mostró diferencias estadísticamente significativas (figura 9 D-E). Finalmente, los ratones con terapia combinada de AI + AE-EV presentaron un incremento en el número de levantamientos 3.1 veces más en comparación con el grupo control ( $p = 0.025$ ).

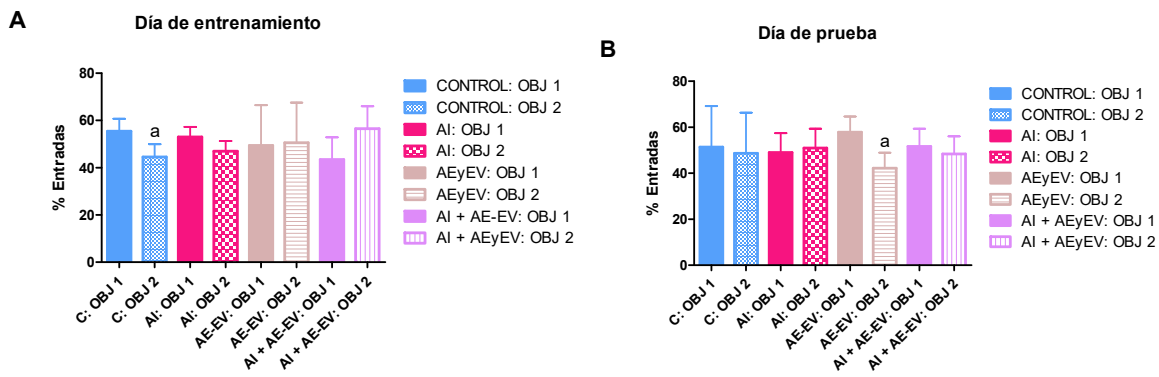


**Figura 9. Efecto de la combinación de AI + AE-EV en la prueba de campo abierto sobre la actividad locomotora y el comportamiento similar a la ansiedad, en ratones en proceso de envejecimiento.** La prueba de campo abierto fue realizada para evaluar la ansiedad de los ratones de los diferentes grupos. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  DE (n=4), se realizó la prueba estadística de ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni. Se representa en el panel **A)** El porcentaje del tiempo en la periferia; en el **B)** El porcentaje del tiempo en el centro; en el panel **C)** El número de entradas en el centro; en el panel **D)** La velocidad durante la prueba, en el panel **E)** La distancia total recorrida; en el panel **F)** El número de levantamientos, en donde  $p < 0.05$  en el grupo AI + AE-EV vs control, y en el panel **G)** Trayectos representativos recorridos por los ratones durante la prueba de campo abierto de acuerdo al grupo de tratamiento.



### 7.1.2 Prueba de reconocimiento del objeto novedoso (RON)

En los roedores, la memoria a corto plazo se puede medir mediante el reconocimiento de objetos, cuando el animal no presenta déficit de memoria a corto plazo muestra preferencia por explorar un objeto nuevo en lugar de un lugar previamente explorado (81). Como se muestra en la figura 10 A, en el día de entrenamiento, el grupo control tuvo 1.24 veces menos número de entradas en el objeto dos vs objeto uno ( $p = 0.0289$ ). En tanto, el día de prueba presentado en la figura 10 B, se observa que el grupo de AE-EV disminuyó significativamente 1.37 veces el número de entradas de exploración en el objeto 2 vs el objeto uno ( $p = 0.0174$ ). El resto de los grupos no presentaron diferencias significativas en el reconocimiento del objeto novedoso.



**Figura 10. Efecto de la combinación de AI + AE-EV en la prueba de RON, sobre la memoria de reconocimiento en ratones en proceso de envejecimiento.** Los resultados se expresaron como media  $\pm$  DE ( $n=4$ ), se realizaron Pruebas T de Student, no pareadas. Se puede observar **A)** Día de entrenamiento: valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control obj 2 vs obj 1 **B)** Día de prueba: valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: AE-EV obj 2 vs obj 1.

### 7.1.3 Prueba del laberinto de agua de Morris (LAM)

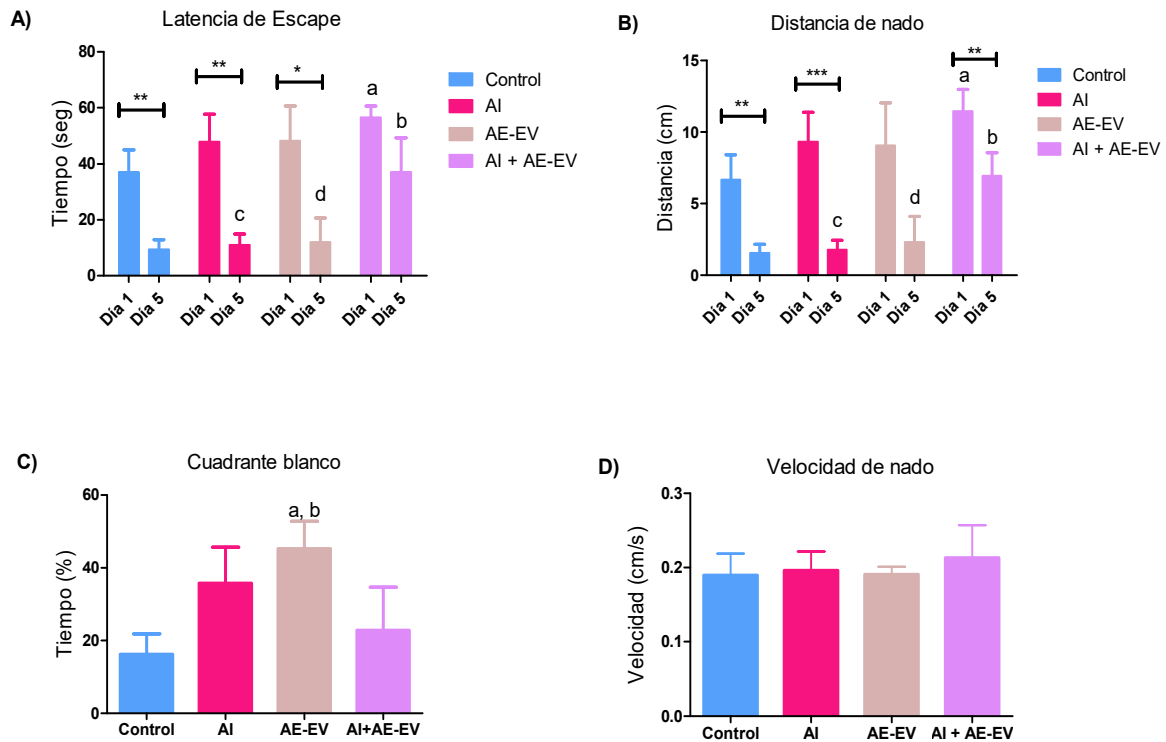
La prueba del laberinto de agua de Morris se utilizó para examinar el rendimiento de la memoria de referencia espacial a largo plazo en los cuatro grupos experimentales (90). En la fase de entrenamiento de cinco días sobre la latencia de escape (figura 11 A), se evaluó el aprendizaje espacial de acuerdo al tiempo para encontrar la plataforma oculta, utilizando señales proximales y distales: en donde se observaron latencias de escape significativas gradualmente menores conforme al transcurso de los días en el grupo de AI, el grupo de AE-EV y el grupo control ( $p < 0.0001$ ). El grupo de AI en el día 5, tuvo una latencia de escape significativa 4.34 veces menor respecto al día 1 ( $p < 0.05$ ) en el mismo grupo; el grupo de AE-EV en el día 5, tuvo una latencia de escape significativa 3.98 veces menor respecto al día 1 ( $p < 0.05$ ), mientras que el grupo de AI + AE-EV no disminuyó el tiempo de escape al comparar el día 1 vs día 5 respectivamente; el grupo control en el día 5, tuvo una latencia de escape significativa 3.96 veces menor respecto al día 1 ( $p < 0.05$ ).

Al comparar las latencias de escape entre los diferentes grupos; el grupo combinado de AI + AE-EV en el día 1, tuvo un incremento significativo en la latencia de escape 1.52 veces mayor vs el día 1 del grupo control ( $p < 0.01$ ), en el día 5 tuvo una latencia de escape significativa 3.95 veces mayor respecto al día 5 del grupo control ( $p < 0.001$ ). El grupo de AI en el día 5, tuvo una latencia de escape significativa 3.35 veces menor respecto al mismo día del grupo combinado AI + AE-EV ( $p < 0.001$ ). El grupo control de AE-EV en el día 5, tuvo una latencia de escape significativa 3.06 veces menor respecto al día 5 del grupo AI + AE-EV ( $p < 0.001$ ).

Continuando con la fase de la prueba final, se retiró la plataforma y se permitió a los ratones nadar libremente en la piscina durante 60 segundos para evaluar la memoria de referencia espacial a largo plazo. De acuerdo al tiempo que pasaron los ratones en el cuadrante blanco (figura 11 C) se observa que el grupo de AE-EV pasó 2.77 veces más tiempo en el cuadrante blanco vs el grupo control ( $p < 0.05$ ), y 1.98 veces más vs el grupo combinado de AI + AE-EV ( $p < 0.05$ ).

Al evaluar la distancia de nado en la fase de entrenamiento, se observaron gradualmente distancias menores conforme al transcurso de los días (figura 11 B), el grupo de AI disminuyó 4.34 veces la distancia de nado en el día 5 respecto vs el día 1 ( $p < 0.05$ ). El tratamiento combinado AI + AE-EV disminuyó 1.64 veces la distancia de nado en el día 5, respecto al día 1 ( $p < 0.05$ ). Mientras que, el grupo AE-EV no presentó diferencias significativas entre los días. Y, el control disminuyó 3.96 veces la distancia de nado en el día 5, respecto al día 1 ( $p < 0.05$ ).

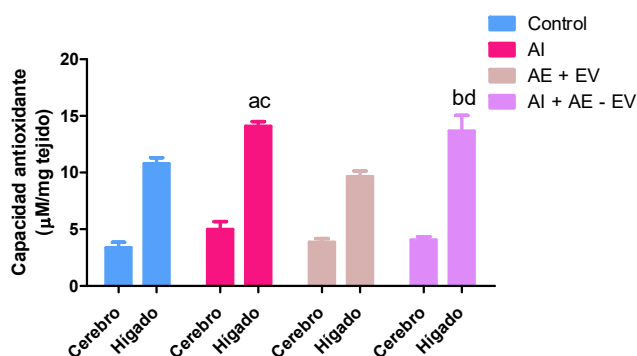
Al comparar las distancias de nado entre los diferentes grupos; el grupo de AI + AE-EV en el día 1 tuvo una distancia de nado significativa, 1.71 veces mayor respecto al día 1 del grupo control ( $p < 0.01$ ), en el día 5 tuvo una distancia de nado significativa 4.48 veces mayor respecto al día 5 del grupo control ( $p < 0.001$ ). El grupo de AI en el día 5 tuvo una distancia de nado significativa 3.91 veces menor respecto al día 5 del grupo AI + AE-EV ( $p < 0.001$ ). En el grupo de AE-EV en el día 5 tuvo una distancia de nado significativa 3.00 veces menor respecto al día 5 del grupo AI + AE-EV ( $p < 0.01$ ). Finalmente, la velocidad de nado en la fase de prueba final, no mostró diferencias significativas entre los grupos (figura D).



**Figura 11. Efecto de la combinación de AI + AE-EV en la prueba de LAM sobre el aprendizaje y la memoria espacial, y la función motora en ratones en proceso de envejecimiento.** Los resultados se expresaron como media  $\pm$  DE (n=4), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías, seguido de una prueba Bonferroni para el análisis de latencia de escape, distancia y velocidad. Para el análisis de tiempo en cuadrantes, se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía para cada grupo, seguido de una prueba de comparación múltiple Tukey. Se observa **A)** Latencias de escape. Entre los grupos por día, los valores de  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  fueron considerados estadísticamente significativos, y se describen en las siguientes comparaciones: a: AI+AE-EV día 1 vs control día 1, b: AI+AE-EV día 5 vs control día 5, c: AI día 5 vs AI+AE-EV día 5, d: AE-EV día 5 vs AI+AE-EV día 5. **B)** Distancia de nado. Entre los grupos por día, los valores de  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: AI+AE-EV día 1 vs control día 1, b: AI+AE-EV día 5 vs control día 5, c: AI día 5 vs AI+AE-EV día 5, d: AE-EV día 5 vs AI+AE-EV día 5. **C)** Cuadrante blanco. Entre los grupos, los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos comparando: a: AE-EV vs control, b: AE-EV vs AI+AE-EV. **D)** Velocidad de nado. El número de asteriscos indican el nivel de significancia, entre los días por grupo.

### 7.2 Determinación de la capacidad antioxidante total

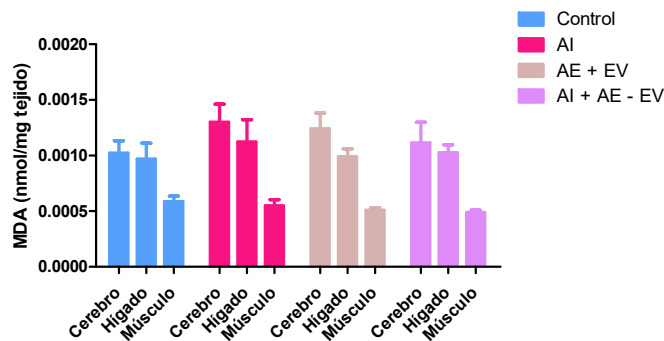
Los antioxidantes protegen a las células de los daños causados por especies reactivas de oxígeno que se producen en reacciones de oxidación en la célula. La capacidad antioxidante total mide la capacidad que tiene el antioxidante de reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  en diferentes tejidos. En la figura 12 se observa la capacidad antioxidante total en cerebro e hígado. De acuerdo a nuestros resultados, no hubo diferencias significativas a nivel cerebral pero sí a nivel hepático. El grupo de AI aumentó 1.30 veces la capacidad antioxidante a nivel hepático vs el grupo control ( $p < 0.01$ ), y 1.46 veces vs el grupo AE ( $p < 0.001$ ). Asimismo, el grupo de AI+AE-EV aumentó 1.26 veces la capacidad antioxidante a nivel hepático vs el grupo control ( $p < 0.01$ ), y 1.41 veces vs el grupo AE ( $p < 0.001$ ).



**Figura 12. Efecto de la combinación de AI + AE-EV sobre la capacidad antioxidante total en cerebro e hígado, en ratones en proceso de envejecimiento.** Los resultados se expresaron como media  $\pm$  DE ( $n=6-4$ ), se realizó una prueba estadística de ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni. No hubo diferencias significativas en cerebro, pero sí en hígado. En hígado, los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: Control vs AI, b: Control vs AI + AE-EV, c: AE-EV vs AI, d: AE-EV vs AI + AE-EV.

### 7.3 Determinación del daño oxidativo

La evaluación del daño oxidativo en tejidos se puede realizar mediante la detección de los subproductos de la peroxidación lipídica, por medio de la concentración de MDA. De acuerdo a nuestros resultados en las muestras de cerebro, hígado y músculo (figura 13) se observa que no hubo un aumento significativo de MDA en los diferentes tejidos. Lo que indica que ninguno de los tratamientos ocasionó daño oxidativo a estos tejidos.



**Figura 13. Efecto de la combinación de AI + AE-EV sobre el daño oxidativo (MDA) en cerebro e hígado, en ratones en proceso de envejecimiento.** Los resultados se expresaron como media  $\pm$  DE (n=6-4), se realizó una prueba estadística de ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni. La presencia de MDA en tejidos (nmol/mg) no presentó diferencias estadísticamente significativas.

## VIII DISCUSIÓN

En el presente estudio, se trabajó con ratones de la cepa C57BL/6J a partir de los 3 meses de edad, tratados con las terapias no farmacológicas de AI y AE-EV, y su combinación, durante 8 meses, evaluando al final del tratamiento la función cognitiva, la capacidad antioxidante y el daño oxidativo, en animales en proceso de envejecimiento a los 11 meses de edad.

### *8.1 Impacto del AI y su combinación con AE-EV en la función cognitiva*

El proceso normal de envejecimiento está vinculado con la disminución de habilidades cognitivas, como la velocidad de procesamiento, la pérdida de la memoria y las funciones ejecutivas (93). En este trabajo se evaluó la función cognitiva a través de tres pruebas: prueba de campo abierto, prueba de RON y prueba de LAM. Con base en la tendencia natural en los roedores de presentar aversión a los espacios abiertos, se realizó la prueba de campo abierto para evaluar la actividad locomotora, exploratoria y el comportamiento similar a la ansiedad (80,84). Los roedores que ingresan con mayor frecuencia al centro y

menor frecuencia en la periferia se consideran menos ansiosos (80,94). En nuestros resultados, todos los grupos experimentales se comportaron muy similar al grupo control, sin mostrar diferencias significativas en la distancia, la velocidad, las entradas centrales, el tiempo en el centro y en la periferia. En tanto, el comportamiento de levantamientos incrementó significativamente en el grupo combinado de AI+AE-EV; este parámetro es indicativo de una mayor locomoción, exploración y un menor nivel de ansiedad (83,95), mostrando además que este grupo mantuvo una buena condición motora de los ratones a los 11 meses de edad, equivalente a 38 a 47 años en humanos. Aunque los grupos control de AI y AE-EV no mostraron diferencias significativas, el comportamiento del grupo combinado podría explicarse debido a que en roedores el AI ocasiona la deficiencia energética que induce un efecto ansiolítico (96) dependiente del tiempo, sugiriendo la participación de las neuronas hipotalámicas que expresan el péptido relacionado con agutí (AgRP) y que son fundamentales en el comportamiento de la alimentación (97,98) y otras regiones del cerebro involucradas en la disminución de la ansiedad incluyendo al hipocampo ventral y la amígdala (99). Igualmente, es de mencionar que el incremento de la actividad motora relacionada a los levantamientos observados en el grupo combinado (AI+AE-EV), se ha encontrado en roedores con ayuno agudo de 9 h (100), acompañado con la disminución de la temperatura corporal, sugiriendo que podría relacionarse con la termogénesis muscular (101), y la utilización de las reservas proteicas del organismo (102). Además, un ayuno agudo de 48 h disminuye la expresión de óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) en el núcleo paraventricular hipotalámico en ratas (103,104). El aumento de la actividad de nNOS en el hipocampo durante el envejecimiento en roedores está relacionado con la neuroinflamación, sin embargo, este efecto es revertido por un ADA durante 30 días disminuyendo la neuroinflamación (105). Asimismo, la disminución de ansiedad presentada en este grupo combinado también pudiera tener la contribución del AE que ha mostrado en ratones de edad avanzada una disminución del comportamiento similar a la ansiedad y los niveles de expresión de nNOS en el cerebelo y el hipocampo (106). El sistema óxido nítrico está relacionado con la regulación de la memoria y el comportamiento similar a la ansiedad (107), durante el envejecimiento, la producción de NO y su precursor

L-arginina disminuye (108), y los niveles de expresión del nNOS aumentan en el hipocampo y el cerebelo en roedores de edad avanzada (106).

El grupo de AE-EV con una duración de 8 meses no presentó diferencia significativa en la prueba de campo abierto. En contraste se ha reconocido que en roedores el AE-EV con una duración de 2-8 semanas está relacionado con la disminución de la ansiedad (109,110); por tanto, se considera que el tiempo de exposición crónico de AE-EV no permitió observar el efecto esperado en la prueba de campo abierto. En el mismo sentido, estudios previos han mostrado que el AE con ejercicio voluntario modula las regiones límbicas, regulando la hiperactividad de la amígdala basolateral, e incrementando la activación de la corteza prefrontal medial (111), sitios en donde se modula la ansiedad (112).

Continuando con la evaluación de la función cognitiva, se realizó la prueba de RON. Los roedores presentan una tendencia innata a explorar más tiempo un objeto novedoso que uno familiar, por lo que la capacidad de discernir entre un objeto nuevo y uno conocido se utiliza como referencia para evaluar la memoria de reconocimiento (81), esta capacidad de reconocimiento de objetos depende de la integridad del lóbulo temporal medial en el cerebro: específicamente del hipocampo y de la corteza perirrinal adyacente (113). En nuestro estudio con ratones C57BL/6J adultos de mediana edad, el tratamiento de AE-EV mostró una deficiencia significativa en la memoria de reconocimiento, mientras que el resto de las intervenciones no mejoraron esta memoria; lo cual pudo ser ocasionado por la duración de las intervenciones durante 8 meses, ya que podría haber alterado el comportamiento de exploración y en consecuencia la memoria de reconocimiento en esta prueba, debido a que la mayoría de los estudios que muestran un efecto benéfico en la memoria de reconocimiento tuvieron el AE de 4-8 semanas y sin modificaciones en la exploración (29,114). Se reconoce que, en roedores el AE puede causar cambios en el comportamiento de exploración, lo que obstaculiza la medición de la memoria (9,115,116), también, los efectos benéficos del AE sobre la memoria de reconocimiento podrían variar debido a las diferencias en los protocolos respecto a los objetos utilizados, la duración de la intervención, las cepas y la edad de los roedores (117).



Finalmente, se realizó la prueba del LAM, la cual es una prueba ampliamente utilizada para valorar trastornos neurológicos que incluyen el envejecimiento, midiendo el aprendizaje espacial y la memoria espacial mediante la latencia de escape y el tiempo en el cuadrante blanco respectivamente, lo que está vinculado con la plasticidad sináptica en el hipocampo y en el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), un receptor ionotrópico del glutamato vinculado a los procesos de memoria, aprendizaje y plasticidad sináptica, teniendo el calcio un papel clave en estos procesos (118).

El envejecimiento en los roedores disminuye el aprendizaje espacial mostrando latencias de escape menores en la prueba de LAM (77). En la fase de entrenamiento se incluyen cuatro ensayos por día durante 5 días consecutivos para evaluar la capacidad del animal de obtener elementos espaciales, que posteriormente son utilizados para localizar la plataforma en la prueba final (119,120). En el presente estudio, los grupos controles de AI y de AE-EV mostraron latencias de escape menores a los cinco días de evaluación comparados con su mismo grupo en días anteriores, lo que indica que los tratamientos crónicos de AI y de AE-EV tuvieron un aumento significativo en el aprendizaje espacial. Además, el grupo de AE-EV mejoró la memoria espacial a largo plazo al permanecer más tiempo en el cuadrante blanco en comparación con el resto de los grupos. Este mismo resultado es acorde con ratones de edad similar después de 6 meses de AE (8), resaltando que esta mejoría en la memoria espacial está acompañada por una disminución de la capacidad oxidativa en el cerebro mediante la actividad de la citocromo c oxidasa, sugiriendo que el AE ocasiona un incremento de la eficiencia metabólica con menor demanda de energía reduciendo las necesidades metabólicas neuronales en el núcleo accumbens y el hipocampo dorsal, las cuales están involucradas en el proceso de memoria espacial (28,109) y asociadas al aprendizaje (121). Además se ha mostrado que el AE acompañado con actividad física favorece la plasticidad sináptica y el aprendizaje espacial en roedores (122), incluso la intensidad del ejercicio modula la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), una neurotrofina expresada en la corteza cerebral y el hipocampo, relacionada con la sinapsis neuronal (123), igualmente, el ejercicio modula la expresión del receptor tirosina cinasa B (TrkB) que al formar un complejo con BDNF-TrkB favorece el aprendizaje, la memoria espacial y el crecimiento neuronal (124,125).

En nuestro estudio el grupo de AI durante 8 meses en ratones de mediana edad mostró mejoría en el aprendizaje, pero no mostró mejoría en la memoria espacial en la prueba de LAM. En contraste con nuestros resultados, hay efectos positivos en el aprendizaje y la memoria espacial en ratones con esquemas de ADA durante 3-11 meses (23,126).

Los roedores con tratamiento combinado de AI+AE-EV durante 8 meses, no mostraron mejoría significativa en el aprendizaje y la memoria espacial. En este caso, aunque el control de AE-EV tuvo un efecto benéfico en la función cognitiva consideramos que el grupo de AI modificó el efecto sobre el aprendizaje y la memoria espacial; esto podría explicarse debido a que la función cognitiva con el ADA combinado con el ejercicio (tanto el voluntario como el forzado) durante 6 semanas no mejora la memoria espacial ni los niveles de BDNF en el hipocampo en ratas Wistar; además el ejercicio tanto voluntario como forzado mejora la función cognitiva y la memoria espacial (127,128).

#### *8.2 Efecto de la combinación del AI con el AE-EV sobre la capacidad antioxidante y el daño oxidativo en tejidos*

El envejecimiento involucra mecanismos vinculados a deterioro de la defensa antioxidante y la sobreproducción de EROs, lo que conlleva a un estado de estrés y daño oxidativo en el organismo (72–74). Las EROs causan peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, y disminuye la defensa antioxidante enzimática y no enzimática (2,73,75,76); en roedores con envejecimiento aumenta el nivel de MDA, proteínas carbonilo, disminuye la actividad de glutatión peroxidasa, que han asociado con una disminución de la función cognitiva (77). En este estudio, se evaluó la capacidad antioxidante en diferentes tejidos, observando un aumento de esta a nivel hepático después de ocho meses de AI y con la combinación de AI+AE-EV. En el AI, la disminución de insulina y el incremento de cuerpos cetónicos induce estrés oxidativo favoreciendo una respuesta adaptativa que aumenta la defensa antioxidante y la activación de los reguladores del mecanismo de protección celular como el factor nuclear eritroide similar al factor 2 (Nrf2), sirtuinas, y cinasas activada por AMP (129). Múltiples estudios han demostrado el papel del ayuno como mecanismo de

protección contra el estrés oxidativo al inducir diferentes vías moleculares que incluyen Nrf2 (130). En modelos *in vivo* e *in vitro* el AI durante 24 h favorece la respuesta antioxidante a nivel muscular a través de la inducción de genes dependientes de Nrf2 (glutación sintetasa, transferasa, peroxidasa) (131). Asimismo, el ADA durante 22 meses protege del daño oxidativo y la inflamación en el corazón (4) de ratones envejecidos. Similares estudios concuerdan con lo descrito anteriormente respecto al aumento antioxidante en hígado en condiciones de restricción calórica a largo plazo (mayor a 20 meses) (132), sin la presencia de marcadores de daño en este órgano (16). Por otro lado, en nuestro estudio, no se observaron diferencias en la capacidad antioxidante en el cerebro de los roedores en ninguno de los grupos. En contraste estudios experimentales muestran que el ADA durante 4 semanas aumenta los niveles de glutación, mejorando la alteración de memoria inducida por dieta alta en grasas en ratas (126). La actividad antioxidante en el cerebro está influenciada por la actividad metabólica y mitocondrial de las neuronas, los astrocitos y la vía astrocítica Nrf2, los cuales son reguladores homeostáticos que modulan la defensa antioxidante (133).

En nuestro estudio no observamos diferencias en la actividad antioxidante en el grupo de AE+EV con respecto al grupo control, en contraste se ha evidenciado que el AE durante 1-2 meses aumenta la capacidad antioxidante en cerebro (9,134) aunque los mecanismos aún se desconocen.

El estrés oxidativo puede inducir la peroxidación lipídica mediante el malondialdehído, un marcador importante para evaluar la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, el cual cuantificamos en este estudio mediante una técnica espectrofotométrica en donde observamos que ninguno de los tratamientos de AI, AE, o su combinación (AI+EV-EV) ocasionan daño oxidativo en cerebro, hígado y músculo, sugiriendo que el AI durante ocho meses protege del daño oxidativo en estos tejidos. Investigaciones previas concuerdan con lo observado en este trabajo, el AI durante siete semanas protege del daño oxidativo en el cerebro en ratas con demencia vascular inducida por cirugía (135). Notablemente, el efecto de protección de daño oxidativo se ha acompañado del mantenimiento de la función cognitiva (135), o la mejoría en el aprendizaje y la memoria espacial (23). De igual manera,

un entorno de AE disminuye los niveles de MDA y SOD, y reduce la expresión del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en el cerebelo en ratas obesas con neuroinflamación y estrés oxidativo elevado (136). Aunque se ha sugerido que la evasión de la peroxidación lipídica en el cerebro mejora la función cognitiva respecto a la memoria de reconocimiento en ratas (29,126), en nuestro estudio no observamos una asociación entre las variables de aprendizaje y memoria espacial probablemente por la cantidad de animales en cada grupo.

## **IX CONCLUSIONES**

El tratamiento de AI+AE-EV durante 8 meses en ratones adultos de mediana edad de la cepa C57BL/6J en proceso de envejecimiento, mostró una disminución del comportamiento de ansiedad. Además, en este grupo se observó un incremento en la capacidad antioxidante en hígado sin ocasionar daño oxidativo en cerebro, hígado y músculo.

El grupo de AI mejora el aprendizaje. También aumenta la capacidad antioxidante a nivel hepático y no causa daño oxidativo en el organismo.

Finalmente, el grupo de AE-EV, mejora el aprendizaje y la memoria espacial. Además, no aumenta la capacidad antioxidante y no genera daño oxidativo en cerebro, hígado y músculo.

## **X RECOMENDACIONES**

A partir de los resultados obtenidos, las recomendaciones para futuras investigaciones siguiendo con la misma línea de investigación y cepa de ratones C57BL/6J, se sugiere considerar la evaluación de la combinación de AI con el AE con los siguientes aspectos.

- Valorar el efecto de la terapia en ratones envejecidos (24 meses).
- Evaluar la combinación de diferentes edades: desde la mediana edad (10 a 14 meses de edad), hasta edades más avanzadas con envejecimiento (18-24 meses de edad).
- Explorar otros instrumentos de medición con mayor sensibilidad o afinar los instrumentos de medición modificando los puntos de corte para dos condiciones conjuntas.
- Incluir una prueba específica para valorar ansiedad, por ejemplo, mediante la prueba de la caja de dos compartimientos en blanco-negro, el laberinto elevado en cruz y/o la prueba del tablero con agujeros grupo control con niveles de ansiedad elevados o con trastornos de ansiedad.

## XI REFERENCIAS

1. Costa JP da, Vitorino R, Silva GM, Vogel C, Duarte AC, Rocha-Santos T. A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev.* 2016;29:90–112.
2. Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Neurosci Bull.* 2014;30(2):271–81.
3. Carlson AJ, Hoelzel F. Apparent prolongation of the life span of rats by intermittent fasting. *J Nutr.* 1946;31(February):363–75.
4. Castello L, Froio T, Maina M, Cavallini G, Biasi F, Leonarduzzi G, et al. Alternate-day fasting protects the rat heart against age-induced inflammation and fibrosis by inhibiting oxidative damage and NF-kB activation. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(1):47–54.
5. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider NL. Effects of intermittent feeding upon growth and life span in rats. *Gerontology.* 1982;28(4):233–41.
6. Kendrick DC. The effects of infantile stimulation and intermittent fasting and feeding on life span in the black-hooded rat. *Dev Psychobiol.* 1973;6(3):225–34.
7. Ooi TC, Meramat A, Rajab NF, Shahar S, Ismail IS, Azam AA, et al. Intermittent fasting enhanced the cognitive function in older adults with mild cognitive impairment by inducing biochemical and metabolic changes: A 3-year progressive study. *Nutrients.* 2020;12(9):1–20.
8. Esselun C, Dilberger B, Silaidos CV, Koch E, Schebb NH, Eckert GP. A Walnut Diet in Combination with Enriched Environment Improves Cognitive Function and Affects Lipid Metabolites in Brain and Liver of Aged NMRI Mice. *NeuroMolecular Med.* 2020;23(1):140–60.
9. Fernández CI, Collazo J, Bauza Y, Castellanos MR, López O. Environmental enrichment-behavior-oxidative stress interactions in the aged rat: Issues for a therapeutic approach in human aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1019:53–7.
10. Mora JC, Valencia WM. Exercise and Older Adults. *Clin Geriatr Med.* 2018;34(1):145–62.
11. Kondoh H, Teruya T, Yanagida M. Metabolomics of human fasting: new insights about old questions. *Open Biol.* 2020;10(9):1–5.
12. Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:7–13.

13. Dong TA, Sanderesa PB, Dhindsa DS, Mehta A, Arneson LC, Dollar AL, et al. Intermittent Fasting: A Heart Healthy Dietary Pattern? *Am J Med.* 2020;133(8):901–7.
14. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev.* 2017;39:46–58.
15. Karsen H, Güler EA, Binici İ, Taşkıran H, Yıldırım S, Koyuncu İ. Oxidant and antioxidant parameters in people who fast during Ramadan, and those who do not. *Afr Health Sci.* 2019;19(3):2713–7.
16. Stankovic M, Mladenovic D, Ninkovic M, Vucevic D, Tomasevic T, Radosavljevic T. Effects of caloric restriction on oxidative stress parameters. *Gen Physiol Biophys.* 2013;32:277–83.
17. Teruya T, Chaleckis R, Takada J, Yanagida M, Kondoh H. Diverse metabolic reactions activated during 58-hr fasting are revealed by non-targeted metabolomic analysis of human blood. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–11.
18. Goldhamer AC, Lisle DJ, Sultana P, Anderson SV, Parpia B, Hughes B, et al. Medically supervised water-only fasting in the treatment of borderline hypertension. *J Altern Complement Med.* 2002;8(5):643–50.
19. Grundler F, Mesnage R, Goutzourelas N, Tekos F. Interplay between oxidative damage , the redox status , and metabolic biomarkers during long-term fasting. 2020;(January).
20. Harney DJ, Hutchison AT, Hatchwell L, Humphrey SJ, James DE, Hocking S, et al. Proteomic Analysis of Human Plasma during Intermittent Fasting. *J Proteome Res.* 2019;18(5):2228–40.
21. Klempel MC, Kroeger CM, Varady KA. Alternate day fasting (ADF) with a high-fat diet produces similar weight loss and cardio-protection as ADF with a low-fat diet. *Metabolism.* 2013;62(1):137–43.
22. Stekovic S, Hofer SJ, Tripolt N, Aon MA, Royer P, Pein L, et al. Alternate Day Fasting Improves Physiological and Molecular Markers of Aging in Healthy, Non-obese Humans. *Cell Metab.* 2019;30(3):462-476.e5.
23. Li L, Wang Z, Zuo Z. Chronic Intermittent Fasting improves cognitive functions and brain structures in mice. *PLoS ONE.* 2013;8(6):e66069.
24. Hannan AJ. Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(1):13–25.



25. Praag HV, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1(3):191–8.
26. Kaptan Z, Dar KA, Kapucu A, Bulut H, Üzümlü G. Effect of enriched environment and predictable chronic stress on spatial memory in adolescent rats: Predominant expression of BDNF, nNOS, and interestingly malondialdehyde in the right hippocampus. *Brain Res.* 2019;1721(July).
27. Sousa LE, Favero IFD, Bezerra FS, Souza ABF de, Alzamora AC. Environmental enrichment promotes antioxidant effect in the ventrolateral medulla and kidney of renovascular hypertensive rats. *Arq Bras Cardiol.* 2019;113(5):905–12.
28. González-Pardo H, Arias JL, Vallejo G, Conejo NM. Environmental enrichment effects after early stress on behavior and functional brain networks in adult rats. *PLoS ONE.* 2019;14(12):1–22.
29. Lima MGP, Schimidt HL, Garcia A, Daré LR, Carpes FP, Izquierdo I, et al. Environmental enrichment and exercise are better than social enrichment to reduce memory deficits in amyloid beta neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(10):E2403–9.
30. De Winter G. Aging as Disease. *Med Health Care Philos.* mayo de 2015;18(2):237–43.
31. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* junio de 2018;28(6):436–53.
32. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol.* el 2 de enero de 2018;217(1):65–77.
33. Kritsilis M, Rizou S, Koutsoudaki P, Evangelou K, Gorgoulis V, Papadopoulos D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int J Mol Sci.* el 27 de septiembre de 2018;19(10):2937.
34. Cohen RA, Marsiske MM, Smith GE. Neuropsychology of aging [Internet]. 1a ed. Vol. 167, *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2019. 149–180 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00010-8>
35. Capogna E, Manca R, Marco MD, Hall A, Soininen H, Venneri A. Understanding the effect of cognitive/brain reserve and depression on regional atrophy in early Alzheimer’s disease. *Postgrad Med.* 2019;131(7):533–8.
36. Stern Y, Barnes CA, Grady C, Jones RN, Raz N. Brain reserve, cognitive reserve, compensation, and maintenance: operationalization, validity, and mechanisms of cognitive resilience. *Neurobiol Aging.* 2019;83:124–9.

37. Xu H, Gelyana E, Rajsombath M, Yang T, Li S, Selkoe D. Environmental Enrichment potently prevents microglia-mediated neuroinflammation by human Amyloid  $\beta$ -Protein oligomers. *J Neurosci*. 2016;36(35):9041–56.
38. Carvalho IA de, Beard J, Chatterji S, Jordan JE, Harvey A, Keating N, et al. Informe mundial sobre el Envejecimiento y la Salud. Organización Mundial de la Salud; 2015 p. 267.
39. Prospectiva DG de A y, SEDESOL. Análisis prospectivo de la población de 60 años de edad en adelante. Secretaria de Desarrollo Social (SEDESOL); 2017 p. 1–20.
40. Rojas PAR, Ruiz AM, Robledo LMG. Género y Salud en Cifras. *Rev Cent Nac Equidad Género Salud Reprod*. 2017;15(2):3–44.
41. Población CN de. Cuadernillos estatales de las Proyecciones de la Población de México y de las Entidades Federativas, 2016-2050. 2016 p. 1–68.
42. Palm W, de Lange T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annu Rev Genet*. el 1 de diciembre de 2008;42(1):301–34.
43. Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*. agosto de 2007;448(7157):1068–71.
44. Wei X, Luo L, Chen J. Roles of mTOR Signaling in Tissue Regeneration. *Cells*. 2019;8(9).
45. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. marzo de 2017;168(6):960–76.
46. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. julio de 2009;460(7253):392–5.
47. Selman C, Lingard S, Choudhury AI, Batterham RL, Claret M, Clements M, et al. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J*. marzo de 2008;22(3):807–18.
48. Weichhart T. MTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*. 2017;64(2):127–34.
49. Blommaert EFC, Luiken JJFP, Meijer AJ. Autophagic proteolysis: Control and specificity. *Histochem J*. 1997;29(5):365–85.
50. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol*. abril de 2012;13(4):225–38.

51. Packer M. Autophagy-dependent and -independent modulation of oxidative and organellar stress in the diabetic heart by glucose-lowering drugs. *Cardiovasc Diabetol.* 2020;19(1):1–11.
52. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions. *J Cell Sci.* 2005;118(1):7–18.
53. Cavallini G, Donati A, Gori Z, Bergamini E. Towards an Understanding of the Anti-Aging Mechanism of Caloric Restriction. *Curr Aging Sci.* 2008;1(1):4–9.
54. Cavallini G, Donati A, Taddei M, Bergamini E. Evidence for selective mitochondrial autophagy and failure in aging. *Autophagy.* 2007;3(1):26–7.
55. Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* el 15 de enero de 2014;28(2):99–114.
56. Patterson RE, Sears DD. Metabolic effects of Intermittent Fasting. *Annu Rev Nutr.* 2017;37:371–93.
57. Stockman MC, Thomas D, Burke J, Apovian CM. Intermittent Fasting: Is the Wait Worth the Weight? *Curr Obes Rep.* 2018;7(2):172–85.
58. Longo VD, Mattson MP. Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Natl Inst Health.* 2014;19(2):181–92.
59. Anson RM, Guo Z, Cabo R de, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):6216–20.
60. Wan R, Camandola S, Mattson MP. Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats. *J Nutr.* 2003;133(6):1921–9.
61. Gotthardt JD, Verpeut JL, Yeomans BL, Yang JA, Yasrebi A, Roepke TA, et al. Intermittent fasting promotes fat loss with lean mass retention, increased hypothalamic norepinephrine content, and increased neuropeptide Y gene expression in diet-induced obese male mice. *Endocrinology.* 2016;157(2):679–91.
62. Mager DE, Wan R, Brown M, Cheng A, Wareski P, Abernethy DR, et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. *FASEB J.* 2006;20(6):631–7.
63. Fontana L, Cummings NE, Apelo SIA, Neuman JC, Kasza I, Schmidt BA, et al. Decreased Consumption of Branched-Chain Amino Acids Improves Metabolic Health. *Cell Rep.* 2016;16(2):520–30.

64. Richardson NE, Konon EN, Schuster HS, Mitchell AT, Boyle C, Rodgers AC, et al. Lifelong restriction of dietary branched-chain amino acids has sex-specific benefits for frailty and life span in mice. *Nat Aging*. 2021;1(1):73–86.
65. Bishop NA, Lu T, Yankner BA. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 2010;464(7288):529–35.
66. Fontana L, Klein S. Aging, adiposity, and calorie restriction. *J Am Med Assoc*. 2007;297(9):986–94.
67. Arum O, Bonkowski MS, Rocha JS, Bartke A. The growth hormone receptor gene-disrupted mouse fails to respond to an intermittent fasting diet. *Aging Cell*. 2009;8(6):756–60.
68. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider N. Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mech Ageing Dev*. 1990;55(1):69–87.
69. Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S, Sabatini DM. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature*. 2010;468(7327):1100–6.
70. Young J, Angevaren M, Rusted J, Tabet N. Aerobic exercise to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(4):1–145.
71. Moghetti P, Bacchi E, Brangani C, Donà S, Negri C. Metabolic effects of exercise. *Front Horm Res*. 2016;47:44–57.
72. Schiavone S, Jaquet V, Trabace L, Krause KH. Severe life stress and oxidative stress in the brain: From animal models to human pathology. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(12):1475–90.
73. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1105–21.
74. Campese VM, Ye S, Zhong H, Yanamadala V, Ye Z, Chiu J. Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(2):H695-703.
75. Maciejczyk M, Żebrowska E, Zalewska A, Chabowski A. Redox balance, antioxidant defense, and oxidative damage in the hypothalamus and cerebral cortex of rats with high fat diet-induced insulin resistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:6940515.
76. Cogley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol*. 2018;15:490–503.

77. Hamezah HS, Durani LW, Ibrahim NF, Yanagisawa D, Kato T, Shiino A, et al. Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions. *Exp Gerontol.* 2017;99:69–79.
78. Domínguez-González M, Puigpinós M, Jové M, Naudi A, Portero-Otín M, Pamplona R, et al. Regional vulnerability to lipoxidative damage and inflammation in normal human brain aging. *Exp Gerontol.* 2018;111(June):218–28.
79. Shetty AK, Kodali M, Upadhy R, Madhu LN. Emerging Anti-Aging Strategies - Scientific Basis and Efficacy. *Aging Dis.* 2018;9(6):1165.
80. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. En: Guest PC, editor. *Pre-Clinical Models* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [citado el 4 de marzo de 2022]. p. 99–103. (Methods in Molecular Biology; vol. 1916). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_9](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8994-2_9)
81. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. *Nat Protoc.* 2013;8(12):2531–7.
82. Polanco LA. Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica.* 2011;18(2):8.
83. Zimecikova E, Simko J, Karesova I, Kremlacek J, Malakova J. Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open-field test? *Seizure.* noviembre de 2017;52:35–40.
84. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J Vis Exp.* el 6 de febrero de 2015;(96):52434.
85. Barnhart CD, Yang D, Lein PJ. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice. *PLoS ONE.* 2015;10(4):1–16.
86. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociencia. La exploración del cerebro.* 4ta edición. Wolters Kluwer; 2016.
87. The Jackson Laboratory. Aged C57BL/6J mice for research studies. Considerations, applications, and best practices. [Internet]. 2020. Disponible en: [resources.jax.org/white-papers/whitepaper-aged-b6](https://resources.jax.org/white-papers/whitepaper-aged-b6)
88. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 1993;14(3):303–11.
89. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302–10.

90. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11(1):47–60.
91. Hall CS. Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol*. 1934;18:385–403.
92. Londoño JL. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Corp Univ Lasallista*. 2012;129–62.
93. Harada CN, Natelson Love MC, Triebel KL. Normal Cognitive Aging. *Clin Geriatr Med*. noviembre de 2013;29(4):737–52.
94. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol*. el 1 de septiembre de 2013;6(3):126–35.
95. Sturman O, Germain PL, Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*. el 3 de septiembre de 2018;21(5):443–52.
96. Parikh I, Guo J, Chuang KH, Zhong Y, Rempe RG, Hoffman JD, et al. Caloric restriction preserves memory and reduces anxiety of aging mice with early enhancement of neurovascular functions. *Aging*. el 8 de noviembre de 2016;8(11):2814–26.
97. Li C, Hou Y, Zhang J, Sui G, Du X, Licinio J, et al. AGRP neurons modulate fasting-induced anxiolytic effects. *Transl Psychiatry*. diciembre de 2019;9(1):111.
98. Towers AE, Oelschlager ML, Patel J, Gainey SJ, McCusker RH, Freund GG. Acute fasting inhibits central caspase-1 activity reducing anxiety-like behavior and increasing novel object and object location recognition. *Metabolism*. junio de 2017;71:70–82.
99. Betley JN, Cao ZFH, Ritola KD, Sternson SM. Parallel, Redundant Circuit Organization for Homeostatic Control of Feeding Behavior. *Cell*. diciembre de 2013;155(6):1337–50.
100. Zheng H, Ton H, Yang L, Liufu N, Dong Y, Zhang Y, et al. Acute Fasting Does Not Induce Cognitive Impairment in Mice. *Front Neurosci*. el 26 de agosto de 2019;13:896.
101. Kanizsai P, Garami A, Solymár M, Szolcsányi J, Szelényi Z. Energetics of fasting heterothermia in TRPV1-KO and wild type mice. *Physiol Behav*. enero de 2009;96(1):149–54.

102. Koubi HE, Robin JP, Dewasmes G, Le Maho Y, Frutoso J, Minaire Y. Fasting-induced rise in locomotor activity in rats coincides with increased protein utilization. *Physiol Behav.* agosto de 1991;50(2):337–43.
103. Jahng JW, Lee JY, Yoo SB, Kim YM, Ryu V, Kang DW, et al. Refeeding-induced expression of neuronal nitric oxide synthase in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res.* junio de 2005;1048(1–2):185–92.
104. Mi Kim Y, Young Lee J, Ho Choi S, Goo Kim D, Won Jahng J. RU486 blocks fasting-induced decrease of neuronal nitric oxide synthase in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res.* agosto de 2004;1018(2):221–6.
105. Vasconcelos AR, Kinoshita PF, Yshii LM, Marques Orellana AM, Böhmer AE, de Sá Lima L, et al. Effects of intermittent fasting on age-related changes on Na,K-ATPase activity and oxidative status induced by lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Neurobiol Aging.* mayo de 2015;36(5):1914–23.
106. Tomiga Y, Ito A, Sudo M, Ando S, Maruyama A, Nakashima S, et al. Effects of environmental enrichment in aged mice on anxiety-like behaviors and neuronal nitric oxide synthase expression in the brain. *Biochem Biophys Res Commun.* agosto de 2016;476(4):635–40.
107. Taheri P, Mohammadi F, Nazeri M, Zarei MR, Chamani G, Esfahlani MA, et al. Nitric oxide role in anxiety-like behavior, memory and cognitive impairments in animal model of chronic migraine. *Heliyon.* diciembre de 2020;6(12):e05654.
108. Reckelhoff JF, Kellum JA, Blanchard EJ, Bacon EE, Wesley AJ, Kruckeberg WC. Changes in nitric oxide precursor, L-arginine, and metabolites, nitrate and nitrite, with aging. *Life Sci.* 1994;55(24):1895–902.
109. Sampedro-Piquero P, Zancada-Menendez C, Begega A, Rubio S, Arias JL. Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. *Brain Res Bull.* septiembre de 2013;98:1–9.
110. Sampedro-Piquero P, Álvarez-Suárez P, Moreno-Fernández RD, García-Castro G, Cuesta M, Begega A. Environmental Enrichment Results in Both Brain Connectivity Efficiency and Selective Improvement in Different Behavioral Tasks. *Neuroscience.* septiembre de 2018;388:374–83.
111. Watanasriyakul WT, Normann MC, Akinbo OI, Colburn W, Dagner A, Grippo AJ. Protective neuroendocrine effects of environmental enrichment and voluntary exercise against social isolation: evidence for mediation by limbic structures. *Stress.* el 3 de septiembre de 2019;22(5):603–18.
112. Felix-Ortiz AC, Burgos-Robles A, Bhagat ND, Leppla CA, Tye KM. Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience.* mayo de 2016;321:197–209.

113. Squire LR, Wixted JT, Clark RE. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci.* noviembre de 2007;8(11):872–83.
114. Mesa-Gresa P, Pérez-Martinez A, Redolat R. Environmental Enrichment Improves Novel Object Recognition and Enhances Agonistic Behavior in Male Mice: Environmental Enrichment. *Aggress Behav.* julio de 2013;39(4):269–79.
115. Van Waas M, Soffié M. Differential environmental modulations on locomotor activity, exploration and spatial behaviour in young and old rats. *Physiol Behav.* febrero de 1996;59(2):265–71.
116. Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry.* mayo de 2000;47(10):864–73.
117. Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res.* septiembre de 2011;222(1):246–64.
118. Scatton B. The NMDA receptor complex. *Fundam Clin Pharmacol.* noviembre de 1993;7(8):389–400.
119. Deng-Bryant Y, Leung LY, Caudle K, Tortella F, Shear D. Cognitive Evaluation Using Morris Water Maze in Neurotrauma. En: Kobeissy FH, Dixon CE, Hayes RL, Mondello S, editores. *Injury Models of the Central Nervous System* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2016 [citado el 3 de abril de 2022]. p. 539–51. (Methods in Molecular Biology; vol. 1462). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3816-2\\_29](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3816-2_29)
120. Salimi A, Pourahmad J. Animal Tests for Evaluation of Cognitive Impairment in Neonatal Mouse. En: Félix L, editor. *Teratogenicity Testing* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [citado el 3 de abril de 2022]. p. 545–54. (Methods in Molecular Biology; vol. 1797). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7883-0\\_32](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7883-0_32)
121. Hawley DF, Morch K, Christie BR, Leasure JL. Differential Response of Hippocampal Subregions to Stress and Learning. Schmidt U, editor. *PLoS ONE.* el 28 de diciembre de 2012;7(12):e53126.
122. Benito E, Kerimoglu C, Ramachandran B, Pena-Centeno T, Jain G, Stilling RM, et al. RNA-Dependent Intergenerational Inheritance of Enhanced Synaptic Plasticity after Environmental Enrichment. *Cell Rep.* abril de 2018;23(2):546–54.
123. Xu L, Zhu L, Zhu L, Chen D, Cai K, Liu Z, et al. Moderate Exercise Combined with Enriched Environment Enhances Learning and Memory through BDNF/TrkB Signaling Pathway in Rats. *Int J Environ Res Public Health.* el 5 de agosto de 2021;18(16):8283.



124. Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci.* el 21 de octubre de 2020;21(20):7777.
125. Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. En: Lewin GR, Carter BD, editores. *Neurotrophic Factors* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [citado el 3 de junio de 2022]. p. 223–50. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 220). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-45106-5\\_9](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-45106-5_9)
126. Hazzaa SM, Eldaim MAA, Fouda AA, Mohamed ASED, Soliman MM, Elgizawy EI. Intermittent Fasting Ameliorated High-Fat Diet-Induced Memory Impairment in Rats via Reducing Oxidative Stress and Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Brain. *Nutrients.* 2020;13(1).
127. Khabour OF, Alzoubi KH, Alomari MA, Alzubi MA. Changes in spatial memory and BDNF expression to concurrent dietary restriction and voluntary exercise. *Hippocampus.* 2009;NA-NA.
128. Khabour OF, Alzoubi KH, Alomari MA, Alzubi MA. Changes in spatial memory and BDNF expression to simultaneous dietary restriction and forced exercise. *Brain Res Bull.* enero de 2013;90:19–24.
129. Kolb H, Kempf K, Röhling M, Lenzen-Schulte M, Schloot NC, Martin S. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC Med.* diciembre de 2021;19(1):313.
130. Hidalgo-Silva D, López-Noguerola JS, Sánchez-Gutiérrez M, Madrigal-Santillán EO, Izquierdo-Vega JA. Intermittent fasting: a strategy to counteract aging linked to oxidative stress. *Mex J Med Res ICSA.* el 5 de julio de 2022;10(20):16–24.
131. Lettieri-Barbato D, Minopoli G, Caggiano R, Izzo R, Santillo M, Aquilano K, et al. Fasting drives nrf2-related antioxidant response in skeletal muscle. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):1–12.
132. Walsh ME, Shi Y, Van Remmen H. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. *Free Radic Biol Med.* 2014;66:88–99.
133. Baxter PS, Hardingham GE. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radic Biol Med.* 2016;100:147–52.
134. Mármol F, Rodríguez CA, Sánchez J, Chamizo VD. Anti-oxidative effects produced by environmental enrichment in the hippocampus and cerebral cortex of male and female rats. *Brain Res.* 2015;1613:120–9.

135. Hu Y, Zhang M, Chen Y, Yang Y, Zhang JJ. Postoperative intermittent fasting prevents hippocampal oxidative stress and memory deficits in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Eur J Nutr.* 2019;58(1):423–32.
136. Ebrahim HA, El-Gamal R, Sherif RN. Intermittent Fasting Attenuates High-Fat Diet-Induced Cerebellar Changes in Rats: Involvement of TNF- $\alpha$ , Autophagy, and Oxidative Stress. *Cells Tissues Organs.* 2021;210((5-6)):351–67.

## XII ANEXOS

### 12.1 Reactivos

**Tabla 5. Reactivos**

<b>Reactivos</b>	<b>Código de catálogo</b>
Guantes de exploración (100 pzas)	Biologix® 97-6111
Estuche de disección (con 13 piezas)	Luzeren® PRO1003200
Pipeta esterilizable en autoclave 20-200 µL (BioPette Plus)	Labnet® P3960-200A
Pipeta esterilizable en autoclave 0.5-10 µL (BioPette Plus)	Labnet® P3960-10A
Pipeta esterilizable en autoclave 100-1,000 µL (BioPette Plus)	Labnet® P3960-100A
Puntas de pipeta empaquetadas a granel de microvolumen 0,2-10 µL	Corning Incorporated® 4840
Puntas de pipeta empaquetadas a granel de microvolumen 0,1-10 µL	Eppendorf® 0030073207
Puntas de pipeta empaquetadas a granel de microvolumen 2-200 µL	Kartell® 979
Puntas de pipeta empaquetadas a granel de microvolumen universal 100-1000 µl	Kartell® 961
EtOH al 70%	Sigma-Aldrich® 1.00983
Cloruro de Sodio (solución 0.9%) 500 ml	Pisa® CS-500 ml
Cajas de cartón premium para congelador (5 pzas)	Biologix® 90-1200
Tubos para microcentrífuga 1.5 ml (500 tubos)	Biologix® 80-1500
Gradilla para tubos de microcentrífuga, 5 pzas (c/u para 80 pozos)	Sigma-Aldrich® Z756482
Tubos Falcon de 50 ml	Sigma-Aldrich® CLS430828
Cloruro de sodio cristal	J.T. Baker® 3624-01
Fosfato de sodio dibásico, 8-hidrato cristal	J.T. Baker® 3824-01

Cloruro de potasio cristal	J.T. Baker® 3040-01
Fosfato de sodio monobásico cristal	J.T. Baker® 3246-01
Kit de ensayo antioxidante (100 pruebas colorimétricas)	Sigma-Aldrich® MAK334
Microplaca (96 pozos)	Sigma-Aldrich® BR781782
Ácido clorhídrico de 1 L	J.T. Baker® 9535-02
Ácido tiobarbitúrico de 25 g	Applichem® A4670
Ácido tricloroacético	Fermont® 03702
Butilhidroxitolueno (BHT)	Sigma-Aldrich® B1378
Metanol	J.T. Baker® 9093-02
Sulfato de estreptomicina	Fluka® 85884
2,4-dinitrofenilhidrazina 100 g	Sigma-Aldrich® D199303
Acetato de etilo 99.8%	Sigma-Aldrich® 270989-1L
Etanol ≥99.5%	Sigma-Aldrich® 459836-1L
Clorhidrato de guanidina 500 g	Sigma-Aldrich® G4505

## 12.2 Preparación de soluciones

### A. Solución PBS 10X

Para preparar 500 mL:

Pesar 40 g de NaCl

Pesar 1 g de KCl

Pesar 7.2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Pesar 1.2 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Agregar agua desionizada y agitar hasta disolver

Primero se agrega el NaCl y después el resto de las soluciones

Aforar a 500 mL

Ajustar a pH 7.4

Para preparar PBS 1X:

Tomar 100 mL de la solución PBS 10X

Aforar a 1000 mL

## **B. Solución TBA**

Para preparar 5 mL:

Pesar 0.025 g de TBA

Pesar 0.8 g de TCA

100  $\mu$ L de HCl concentrado

Se debe preparar al instante

Cuidar el volumen del TCA

## **C. Sulfato de estreptomicina 10 % p/v**

Para preparar 1 mL:

Pesar 0.1 g de sulfato de estreptomicina

Disolver

Aforar a 1 mL

## **D. Dinitrofenilhidrazina (DNPH 10 mM)**

Para preparar 12 mL:

Pesar 0.02377 g de DNPH

Agregar HCl 2.5 M y agitar hasta disolver

Aforar a 12 mL

## **E. HCl 2.5 M**

Para preparar 100 mL de solución:

Tomar 21.097 mL de HCl al 36.5%

Aforar a 100 mL

**F. Ácido tricloroacético (TCA 20%)**

Para preparar 25 mL:

Pesar 5 g de TCA

Disolver

Aforar a 25 mL

**G. Solución Butilhidroxitolueno (BHT)**

Para preparar 1 mL:

Pesar 0.006 g de BHT

Tomar 1 ml de Metanol

Disolver

**H. Solución Clorhidrato de guanidina 6 M (GndCl)**

Para preparar 17 mL:

Pesar 9.741 g de GndCl

Disolver

Aforar a 17 mL

**I. Solución Acetato de etilo - Etanol (1:1)**

Para preparar 100 mL:

Tomar 50 ml de acetato de etilo

Tomar 50 ml de etanol

Mezclar