



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

Título de la tesis:

Efecto de tres modelos de restricción calórica sobre BDNF, IGF-1, FGF-2 y pruebas de aprendizaje y memoria como indicadores de neurogénesis en rata macho de la cepa Wistar

Para obtener el título de:

Licenciada en Nutrición Clínica

Que presenta la alumna:

Arizeth Roa Ortega

Asesor interno de tesis:

Dra. Guadalupe Soto Rodríguez

Asesor externo de tesis:

Dra. Bertha Alicia León Chávez

Puebla, Pue.

2019



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA

Título de la tesis:

Efecto de tres modelos de restricción calórica sobre BDNF, IGF-1, FGF-2 y pruebas de aprendizaje y memoria como indicadores de neurogénesis en rata macho de la cepa Wistar

Para obtener el título de:

Licenciada en Nutrición Clínica

Que presenta la alumna:

pLNC Arizeth Roa Ortega

Asesor interno de tesis:

Dra. Guadalupe Soto Rodríguez

Asesor externo de tesis:

Dra. Bertha Alicia León Chávez

Puebla, Pue.

2019

Resumen

Antecedentes: En palabras de Neel, se entiende la restricción calórica como la disminución del 30 al 60% de la alimentación ad libitum sin que se produzca malnutrición aporta múltiples beneficios fisiológicos en los modelos que se ha probado. La dieta hipocalórica debe ser equilibrada y satisfacer todas las necesidades nutricionales, esto es incluir todos los macronutrientes, así vitaminas y elementos minerales necesarios para asegurar el correcto funcionamiento del organismo, cuyo principal objetivo es la disminución en la ingesta de alimentos para conseguir un balance energético benéfico para la salud.

La neurogénesis, entendida como la generación de nuevas neuronas es un fenómeno presente en muchas especies de mamíferos, incluyendo a los humanos, en cuyo cerebro existen dos nichos neurogénicos: la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Se ha demostrado que factores ambientales influyen sobre la neurogénesis hipocampal adulta, entre los cuales se encuentran el ejercicio, un ambiente enriquecido y la restricción calórica; mientras que el estrés y el envejecimiento tienen un efecto negativo. Por lo tanto la modulación de la neurogénesis adulta por la dieta emerge como un posible mecanismo por el cual la nutrición impacta sobre el estado de salud mental.

La restricción calórica en ratas incrementa su tiempo de vida, mejora sus capacidades cognitivas y memoria espacial, además crea un ambiente favorable para facilitar la plasticidad neuronal, mediante un aumento significativo en la expresión de factores de crecimiento entre ellos el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

Objetivo General: Evaluar el efecto de tres modelos de restricción calórica en rata macho de la cepa Wistar sobre los factores de crecimiento BDNF, IGF-1 y FGF-2, y pruebas de aprendizaje-memoria como indicadores del proceso de neurogénesis hipocampal adulta.

Metodología: Se trabajó con ratas macho de la cepa Wistar, en etapa adulta, las cuales fueron sometidas a tres modelos diferentes de restricción calórica, se evaluaron los niveles de factores de crecimiento involucrados en la neurogénesis como

IGF-1, FGF-2 y BDNF, al mismo tiempo se evaluó la capacidad cognitiva mediante pruebas conductuales.

1. Antecedentes

1.1 Antecedentes generales

1.2 Historia de la neurogénesis

Santiago Ramón y Cajal, a quien se considera el padre de las neurociencias, estableció que “Una vez que el desarrollo ha terminado, el número de neuronas que un humano posee es un número determinado e inmutable, todo puede morir, pero nada puede regenerarse”, esta aseveración prevaleció desde la década de los 20 como uno de los principales dogmas en las neurociencias.

Fue en los años 60, cuando se tuvieron los primeros indicios de cambio por el científico Joseph Altman, que en el año 1960 publica el artículo “*Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals?*” donde, mediante una inyección intracraneal de timidina-H en ratas, encontró que algunas neuronas y neuroblastos podían mostrar marca autorradiográfica llegando a la conclusión que había una probabilidad que existiera proliferación de neuronas en ratas adultas (1).

En una segunda investigación “*Autoradiographic Investigation of Cell Proliferation in the Brains of Rats and Cats*” en 1963, cuyo objetivo era determinar el marcaje de los núcleos celulares en el cerebro mediante timidina tritiada, que revela la regeneración del ADN y la proliferación celular en ratas y gatos adultos, determinó que algunas neuronas marcadas se localizaban en la neocorteza e identificó una región proliferativa de células granulares en el giro dentado del hipocampo (2). Finalmente, se llegó a la conclusión que sí había la posibilidad que las células gliales pudieran propagarse en el cerebro adulto (3,4). Sin embargo, estos estudios no fueron de gran interés para la ciencia.

En los años 90, se retomó este concepto con el trabajo de Lois y Álvarez-Buylla quienes en 1993 identificaron una zona donde las células *in vivo* proliferan en el cerebro de mamíferos adultos, y se reconoció como la zona subventricular, que contiene un gran número de células madre neurales y tiene la característica de diferenciarse en neuronas o glía después de haber completado su última división celular en el cerebro. Por tanto, se estableció como la zona que contenía a los

precursores neuronales en el cerebro adulto (5) demostrando finalmente la génesis neuronal en la etapa adulta.

Dicho evento se conoce como neurogénesis, según Ming y Song, es definida como un proceso de generación de neuronas funcionales a partir de precursores, tradicionalmente se consideraba que ocurría solo durante etapas embrionarias y perinatales en mamíferos (6). Es un fenómeno que está presente en muchas especies de mamíferos, incluyendo a los humanos, y sigue siendo un tema importante de investigación.

1.3 Nichos neurogénicos

En los últimos años los estudios de la neurogénesis postnatal se enfocan en reconocer y distinguir los nichos neurogénicos, que se definen como las zonas capaces de generar nuevas neuronas; se han localizado dos nichos neurogénicos principales en el cerebro tanto de roedores como de humanos: la zona subgranular (ZSG) en el giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales (Figura 1) (7).

El desarrollo cortical en todas las especies de mamíferos tiene una característica notable, que ninguna de las neuronas que la componen se forman dentro de su propia corteza. Si no que se originan en los nichos neurogénicos y después de su proliferación, migran hacia su posición final, siguiendo los ejes de una población transitoria de células gliales radiales (9).

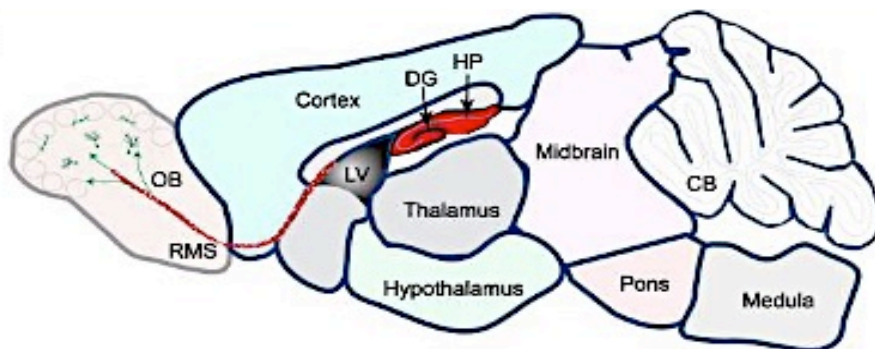


Figura 1. Esquema de un cerebro de roedor, donde se representan los dos nichos neurogénicos del cerebro adulto: ZONA SUBVENTRICULAR (ZSV) de los ventrículos laterales y la ZONA SUBGRANULAR (ZSG) en el giro dentado (DG) del hipocampo. Tomado de Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions (6).

En los nichos neurogénicos están presentes dos grupos de células; las células madre neurales (**CMNs**) y las células progenitoras neurales (**CPNs**), cuya proliferación es muy escasa y que posteriormente se diferencian en neuronas o glía (8).

Las CMNs son un tipo específico de células madre del sistema nervioso, presentan dos capacidades que las caracterizan: 1) capacidad de formar nuevas células madre

es decir la capacidad de autorrenovarse mediante ciclo celular y 2) capacidad de generar células precursoras neurales, mediante la diferenciación (6).

Pueden clasificarse según su capacidad de dar origen a diversos tipos celulares, en embrionarias o adultas:

- Células madre neuronales embrionarias: se caracterizan por ser células pluripotenciales, con la capacidad de originar distintos tipos de células.
- Células madre neuronales adultas: son células multipotenciales, originan cierto tipo de células específicos (10).

a) Zona subventricular

En la etapa del desarrollo del cerebro, se lleva a cabo la proliferación de células nerviosas a lo largo de los ventrículos laterales llamada zona ventricular, en la capa germinativa, posteriormente al desarrollo embrionario se siguen generando nuevas células nerviosas en la zona subventricular (11); el proceso neurogénico comienza con las células madre neurales para dar origen a los neuroblastos, estos progenitores neuronales se desplazarán por la vía migratoria rostral hasta llegar al bulbo olfatorio, sitio donde se realiza su diferenciación final hacia interneuronas granulares, o neuronas periglomerulares, lo que indica que la neurogénesis es valiosa para conservar la capacidad olfativa (12).

Noctor y colaboradores en 2004 demostraron que las células provenientes de la glía radial ventricular eran células progenitoras neuronales y que migrarían a la zona subventricular para proliferar y diferenciarse tanto a neuronas como a células de la glía. Además de que estas células progenitoras de la zona subventricular expresan a la proteína ácida gliofibrilar (*glial fibrillar acid protein*, GFAP⁺) un marcador de astrocitos, a diferencia de las que provienen de la zona ventricular que no lo expresan (14).

Doetsch definió que la zona subventricular tiene cuatro tipos diferentes de células, determinadas por su morfología, ultraestructura y marcadores moleculares. Estas células son:

- Neuronas jóvenes migrantes neuroblastos o células A
- Astrocitos o células tipo B
- Precursores esféricos o células tipo C
- Células endodimales o células tipo E

En el proceso de migración se ha visto que las células tipo A o las neuronas jóvenes forman cadenas, las cuales están cubiertas por astrocitos o células tipo B, los precursores esféricos forman grupos próximos a la cadena de células migrantes tipo A. La SVZ se encuentra separada por células endodimales o células tipo E de la cavidad del ventrículo (13).

b) Zona subgranular

Anteriormente no había evidencia concluyente sobre el linaje y el tipo de células madre existentes dentro del giro dentado. En estudios con ratones en los que fueron inducidos promotores de genes para GFAP⁺, Nestin⁺, Sox2⁺ y Mash⁺ permitieron examinar el linaje celular e identificar las células que expresaban estos marcadores, entre los cuales se encontraron células de la glía radial y células de glía no radial (15, 16,17). También se ha empleado timidina bromodeoxiuridina (BrdU), para identificar las nuevas neuronas mediante inmunohistoquímica, con lo que se pudo determinar el tipo (18). Con estos estudios se pudo determinar el tipo celular, pero no se llegó a una conclusión sobre cuando se llegan a sintetizar estas células, con qué frecuencia, y el número en el que emergen los astrocitos en el giro dentado (8).

En esta investigación nos centraremos en el hipocampo, así como sus elementos críticos.

l) Astrocitos

Es importante destacar la función que juegan los astrocitos para el microambiente neuronal, puesto que se ha visto que en co-cultivos con astrocitos que expresan proteína ácida gliofibrilar (GFAP) y vimentina, estos impulsan a la diferenciación de células progenitoras neuronales; mientras que los astrocitos que no expresan dichos marcadores regulan negativamente a la neurogénesis.

Los astrocitos que provienen del hipocampo adulto, pero no de la médula espinal, impulsan la diferenciación neuronal de células progenitoras neuronales en el co-cultivo por medio de factores solubles y el contacto celular; a diferencia de los astrocitos derivados del hipocampo y la corteza que impulsan la diferenciación neuronal. En conclusión, los que provienen del hipocampo son más efectivos, lo que sugiere que liberan factores neurogénicos más potentes (8). Esto indica que la región de la cual provengan los astrocitos también determina su papel en la neurogénesis.

Entre los elementos que son liberados por los astrocitos que intervienen en la neurogénesis están IL-1 β e IL-6, citocinas proinflamatorias, junto con una

glicoproteína, la molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y la proteína 10 inducida por interferón (IP-10), las cuales incrementan la diferenciación neuronal de los precursores neurales. Por otra parte, los astrocitos obtenidos de la médula espinal manifiestan otras proteínas como la decorina y encefalina, que pueden tener un efecto negativo en la neurogénesis (19).

II) Microglía

La microglía forma parte de las células neurogliales, es responsable de la respuesta inmune primaria cerebral, con capacidad de fagocitosis y de neuroprotección (8). Se halla distribuida a lo largo de la capa celular granular (20).

En humanos, aproximadamente el 5% de las células cerebrales son microglía (20). Estas células desempeñan una función importante en cuanto a la neurogénesis, ya que determinan los niveles de inflamación; por consiguiente, permite delimitar qué porcentaje de neuronas recién formadas podrán sobrevivir mediante la regulación de la apoptosis y/o fagocitosis (20).

La microglía secreta citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) permitiendo inhibir el proceso de génesis de neuronas, dado que inhiben a las células madre neurales y no permite que se diferencien hacia neuronas e inducen la diferenciación a favor de los astrocitos (20).

El entorno o microambiente neuronal es determinante para saber si las citocinas pueden llegar a ser inhibitorias o promover la neurogénesis (21). Por ejemplo, el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) tiene un papel dual, ya que es una citocina tanto proinflamatoria como antiinflamatoria, y una sobreproducción crónica de esta proteína afecta directamente la proliferación de células precursoras, antes de su diferenciación en neuronas o astrocitos (58).

Curiosamente, los niveles de TGF- β 1 se correlacionaron con la cantidad de neurogénesis detectada y el número de células microgliales en estadio 2 y 3. Además, el bloqueo de la actividad biológica de TGF- β 1 mediante la

administración de un anticuerpo anti-TGF- β tipo II disminuyó el porcentaje de células positivas para BrdU (59).

La neurogénesis en la zona subgranular del hipocampo adulto, genera nuevas neuronas que emanan de las células madre neuronales (CMNs) que residen en la capa subgranular. Las células progenitoras migran una corta distancia en la capa granular del giro dentado y se integran en los circuitos preexistentes del hipocampo (8-12).

1.4 Importancia del hipocampo como nicho neurogénico y en el proceso de aprendizaje y memoria.

Las zonas neurogénicas en el cerebro adulto participan en la génesis de neuronas en el hipocampo y se ha determinado que tienen una función en los procesos de aprendizaje y memoria en el adulto.

El hipocampo forma parte del lóbulo temporal, es una composición esencial para el almacenamiento de la memoria y forma parte del sistema límbico (22).

El hipocampo está formado por las siguientes estructuras:

- **Giro dentado:** Formado por una capa de somas pequeños, con un ancho de aproximadamente 10 μm y una altura de 18 μm (33) que se encuentran en columnas (*stratum granulare*), en donde radican las células granulares. La neurogénesis hipocampal adulta genera solo un tipo de neurona: células granulares del giro dentado (23). Dichas neuronas son de naturaleza glutamatérgica, en su estructura cuentan con axones basales designados como fibras musgosas. Las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares se localizan en la capa más cercana de la fisura hipocampal, además de las interneuronas y células gliales. El *hilus* se localiza en el giro dentado en la capa más profunda, se distingue por ser polimórfica, ya que está formada por una diversidad de tipos celulares. La capa subgranular, formada por precursores neurales que tienen una actividad neurogénica en la etapa adulta se localiza entre el *hilus* y el *stratum granulare* (24).
- **Cuerpo de Amon:** este se encuentra dividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3 (figura 2). La zona más proximal está constituida por CA2 y CA3, integrado por células piramidales de mayor tamaño, posteriormente CA1 es la zona más distal, formada por células piramidales pequeñas (24).
- **Corteza entorrinal:** es considerada como el inicio de las conexiones de la formación del hipocampo. Está formada por 6 capas, las capas II y III envían proyecciones al giro dentado del hipocampo. Las capas V y VI no son tan

significativas ya que envían sus proyecciones fuera del hipocampo. Las capas I y IV son acelulares (24).

El hipocampo acepta aferencia de tres vías:

1. **La vía perforante:** los axones de la corteza entorrinal pasan a las células granulares del giro dentado.
2. **La vía de las fibras musgosas:** proyecciones de las células granulares que se conducen a las células piramidales de la zona más proximal CA3 del hipocampo.
3. **La vía colateral de Schaffer:** depende de colaterales excitadoras en las células piramidales de la región CA3, que permiten viajar a la región CA1 (28).

La memoria es un proceso complejo, inicia en la corteza parahipocampal que recibe la información aferente después a la corteza perirrinal y posteriormente recibe la información la corteza entorrinal. Las células de la capa II y III de esta corteza mandan las ramificaciones de axones al giro dentado y al hipocampo, este proceso se realiza mediante una vía perforante que pasa al *subiculum* cuando las neuronas excitadoras del giro dentado (células granulares) reciben la sinapsis de la corteza entorrinal, la proyección axonal es transportada a lo largo del tracto de las fibras musgosas a la capa más proximal CA3 donde terminan en sinapsis e interneuronas (botones). Posteriormente estas fibras musgosas viajan a la región más distal del CA1 mediante los colaterales de Schaffer. Después CA1 proyecta de nuevo a la corteza entorrinal, cerrando el circuito hipocampal (26-27) (Figura 2).

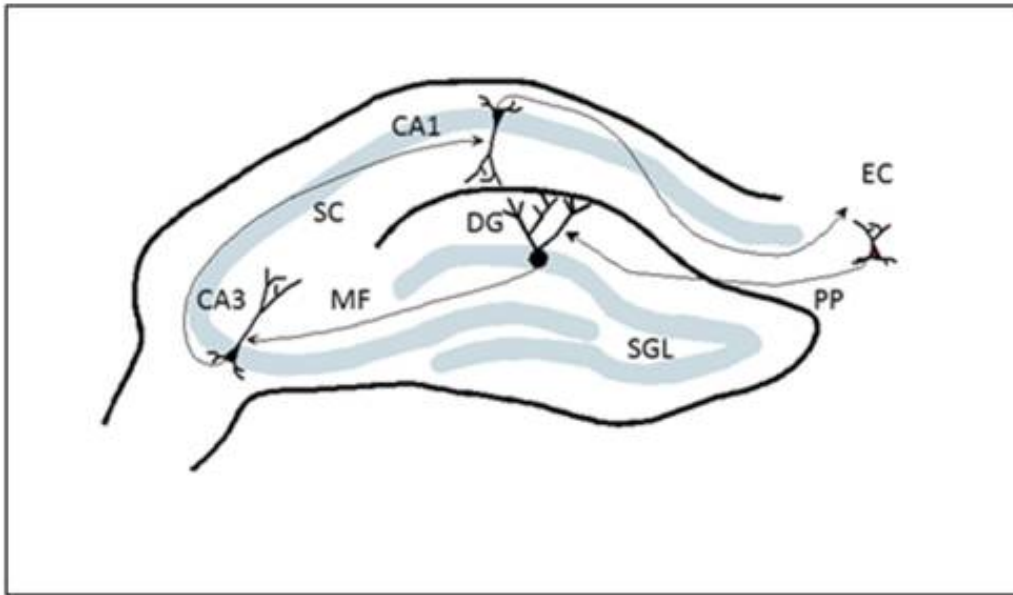


Figura 2. Diagrama de las principales áreas del hipocampo en roedores. Se muestra CA1, CA3, giro dentado (DG), Capa subgranular (SGL), Recorrido perforante (PP), Corteza entorrinal (CE), fibra musgosa (MF). Tomado de Aging, Neurogenesis and Caloric Restriction in Different Model Organisms (50).

El hipocampo está involucrado en los procesos de cognición y desempeña funciones en el conocimiento almacenado como la memoria explícita y el aprendizaje a través de los procesos que llevan a cabo dentro del giro dentado.

Es importante destacar que el procesamiento de la información de la memoria explícita llevado a cabo en el hipocampo es denominado circuito trisináptico (27).

Un aumento en el número de neuronas en el giro dentado favorece a la plasticidad cerebral, beneficiando los procesos de memoria y aprendizaje, por tanto, se ha establecido una relación positiva entre la neurogénesis y el aprendizaje; que conceptualmente son diferentes, pero están estrechamente relacionados el uno del otro.

El aprendizaje se refiere al conocimiento que se adquiere de las experiencias, proceso por el cual se logra el conocimiento sobre el mundo y se debe tener en cuenta ciertos puntos para tener un aprendizaje razonable: atención, memoria, motivación y comunicación (29), en cambio la memoria es un proceso que consta del

conocimiento codificado, almacenado, consolidado y recuperado (28), es decir, la información que adquirimos del aprendizaje se convierte en conocimiento y se almacena en la neocorteza para después ser utilizado.

1.5 Tipo de memorias

Se pueden clasificar de acuerdo al periodo en el que están presentes; memoria a corto plazo y memoria a largo plazo, que a su vez esta se subdivide dependiendo a lo que recuerdan: memoria implícita o no declarativa y memoria explícita o declarativa (29).

1 Memoria a corto plazo:

Esta memoria tiene una información limitada y es recordada por poco tiempo.

2 Memoria a largo plazo:

Este tipo de memoria guarda una amplia gama de información que se caracteriza por tener una duración ilimitada de la memoria.

2.1 Memoria implícita o no declarativa:

Suelen ser recuerdos adquiridos por actividades rutinarias como aprendizajes de hábitos o habilidades que llegan a ser automáticos e inconscientes.

2.2 Memoria no explícita o declarativa

Almacena hechos y eventos que requieren un recuerdo consciente del suceso. Son de carácter semánticas y episódicas (30).

Este tipo de memoria a largo plazo se forma y se codifica de la estructura del lóbulo temporal, donde el hipocampo juega un papel muy importante en su desarrollo.

En una investigación donde se utilizaron roedores con el objetivo de identificar el sabor de un alimento en un campo abierto, se obtuvo como resultado que los roedores desarrollaron una representación gráfica del área para aprender a encontrar

el alimento nuevo en el espacio. Este aprendizaje se le atribuye a la función del hipocampo para asimilar el nuevo sabor y el lugar dentro del espacio abierto (31).

En cuanto a la memoria espacial que es un subtipo de memoria episódica que está dentro de la memoria declarativa (espacial-tiempo), tiene un resultado positivo en la actividad neuronal del hipocampo (31).

Recientemente, el concepto de mapeo cognitivo ha dado un paso más para describir la función del hipocampo en la construcción de imágenes mentales. Ya que el comportamiento está impulsado por representaciones de memoria que están organizadas como un mapa cognitivo, constituyendo un espacio físico (32).

En conclusión, el hipocampo es una estructura crítica para procesar y recordar información espacial y contextual, es decir, está directamente relacionado con el aprendizaje y memoria espacial (32).

1.6 Neurogénesis en etapa adulta

La producción de nuevas neuronas está regulada por un conjunto de procesos: la fase proliferativa de una célula troncal, fase de diferenciación, migración e integración funcional (Figura 3). Este proceso está regulado por factores genéticos y epigenéticos, hormonas, factores de crecimiento, como es el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1 por sus siglas en *inglés insuline growth factor 1*), el factor de crecimiento de fibroblastos básico o tipo 2, (FGF-2 por sus siglas en *inglés Fibroblast growth factor 2*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en *inglés Brain-derived neurotrophic factor*), factores ambientales y estrés (36), al mismo tiempo se ha demostrado la participación de citocinas como CCL2 (llamada también MCP-1 o *monocyte chemoattractant protein-1*) (36).

En la fase proliferativa, se reproducen las células madre neurales, esto ocurre en la ZSG en donde en el estadio uno, la primera clase de células son las células madre neuronales (células tipo 1) que se distinguen por expresar la Proteína ácida fibrilar glial (GFAP⁺) y Nestina y están presentes en la SGZ hacia la capa molecular. Estas células tienen una tasa de proliferación aproximadamente del 1% por lo que se

clasifican como progenitores neurales quiescentes (QNP) (15) al tener una división asimétrica dan origen a la segunda clase de células progenitoras neuronales (células tipo 2) (37), que morfológicamente se distinguen por ser células redondas u ovaladas y pierden la capacidad de expresar GFAP, pero siguen siendo positivas para el marcador Nestina y no expresan la doblecortina (DCX) (38), están ubicadas en la ZSG. Además de ser altamente proliferativas del 10-20% y se establecen como progenitores neuronales amplificadores (ANP) (15).

Después de que los ANP se diferencian, dan origen a la siguiente clase de células: los precursores neuronales postmitóticos, llamados neuroblastos tipo 1 (NB1). Estas células ya no expresan Nestina y empiezan a expresar Dcx, Molécula de adhesión de células neurales polisialiladas (PSA-NCAM), Prospero homeobox 1 (Prox-1) y β III-tubulina, pero no expresan proteína nuclear neuronal (NeuN); morfológicamente suelen ser semejantes a las ANP y se ubican en la ZSG (15).

Los NB1 darán procedencia a los neuroblastos tipo 2 (NB2) que llegan a ser más grandes que las NB1 y siguen perteneciendo a la ZSG, estas células son positivas para los marcadores DCX, PSA-NCAM, Prox-1, β III-tubulina y NeuN (38).

La siguiente clase de células que surgirán son las neuronas inmaduras (NI), estas llegan a tener un tamaño más grande que los NB2 y su morfología cambia, ya que toman una forma similar a las células granulares maduras del giro dentado y su soma llega a ser ovalado o redondo. Están ubicadas en la ZSG y en la capa granular, se mantiene expresando Dcx, PSA-NCAM, Prox-1, β III-tubulina y NeuN (38).

Después de las NI se presentan las neuronas granulares diferenciadas, que en su estructura están formadas por dendritas apicales y axones que forman la fibra musgosa. A diferencia de todas las células anteriores, expresan marcadores de neuronas granulares maduras, como lo es la calbindina (38).

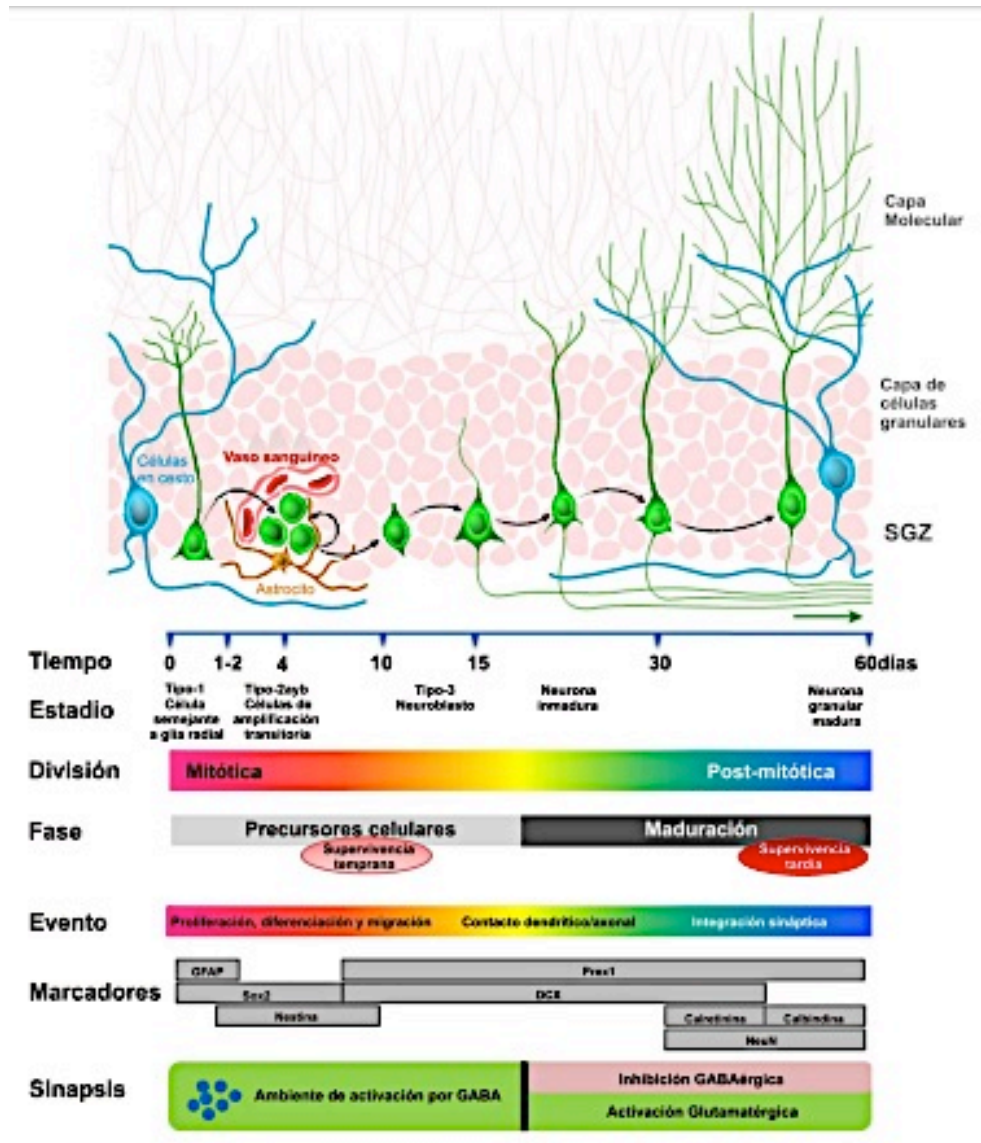


Figura 3. Esquema de la neurogénesis en el cerebro adulto del ratón. Se muestran el tiempo, la morfología de las diferentes células de acuerdo al estadio, y los marcadores que se expresan en cada estadio. Tomada de Papel de la neurogénesis Hipocampal adulta en los procesos Cognitivos que dependen del Hipocampo. Suárez, I., 2015.

1.7 Restricción calórica

Para Need la restricción calórica, se define como “la disminución del 30 al 60% de la alimentación *ad libitum* sin producir una malnutrición” (41) atribuyéndole beneficios metabólicos y fisiológicos en los modelos que se ha probado.

La dieta hipocalórica debe ser equilibrada y satisfacer todas las necesidades nutricionales, aportando todos los macronutrientes, así como vitaminas y elementos minerales para asegurar un correcto funcionamiento del organismo y evitando el deterioro del estado nutricional (42).

Los efectos que se le han atribuido a la restricción calórica son pérdida de peso, prevención de la obesidad, longevidad, mejor sensibilidad de la insulina, control de niveles plasmáticos de glucosa y colesterol, tensión arterial en parámetros normales y retrasa las enfermedades neurodegenerativas (43,44).

El efecto de la restricción calórica en las células no se ha definido claramente, aunque se han propuesto mecanismos en los que se ve involucrada.

La restricción calórica se ve implicada en la disminución de los procesos del estrés oxidativo por el bajo consumo de oxígeno (Figura 4), en donde tiene efecto sobre la modulación en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante cambios en el potencial de membrana mitocondrial y regulación de la tasa de los electrones que recorren la cadena transportadora de electrones, disminuyendo la interacción con el oxígeno y la producción del radical superóxido (41).

El potencial de membrana está regulado por el equilibrio de dos procesos: la tasa en que los protones son bombeados de la matriz hacia la membrana interna y la tasa de retorno de los protones a la matriz, este proceso se lleva a cabo mediante la vía de la ATP sintasa, que es permeable a los protones o a difundirse por medio de canales de la membrana desacopladores de síntesis de ATP; uno de los principales canales son las proteínas desacoplantes (UCP) que ayudan a transportar los protones hacia la matriz externa. También las proteínas de membrana protonofórica como la adenina nucleótido translocasa (ANT), tienen funciones para regresar protones a la

Asimismo, hay una disminución de los niveles de la hormona T3 y de la actividad simpática que induce a disminución de la temperatura corporal y del gasto energético de reposo, reducción de los niveles de citocinas inflamatorias y aumento modesto del nivel de cortisol, con disminución de la inflamación sistémica; protección contra el deterioro de la función inmunitaria asociado con el envejecimiento, e incremento de la expresión de factores neurotróficos (45).

2. Antecedentes específicos

2.1 Restricción calórica y neurogénesis

La restricción calórica ha presentado un efecto importante sobre la salud mental, el aprendizaje y la memoria, esto ha sido evidenciado en diferentes estudios comparando roedores alimentados *ad libitum* y con restricción calórica, demostrando que la restricción calórica favorece la resistencia de las neuronas a la degeneración, dando como resultado un mejor comportamiento en los modelos animales (47).

2.2 Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

Se ha informado recientemente que la restricción calórica favorece el aumento de los niveles de neurotrofinas en el hipocampo. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la neurotrofina-3 (NT-3) que favorecen la neurogénesis en adultos (48).

Las neurotrofinas son parte de la familia de los factores neurotróficos; que se clasifican en cuatro tipos: el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4/5 (NT 4/5). Tienen una función sobre el sistema nervioso, favoreciendo en el crecimiento de los axones, arborización de las dendritas, la plasticidad sináptica y la supervivencia neuronal (49). Realizan sus funciones al unirse con sus receptores transmembranales; los Trks, son receptores con actividad intracelular de tirosin cinasa, en mamíferos se expresan tres diferentes: Trk-A, Trk-B y Trk-C, desencadenan la cascada de fosforilación intracelular que lleva a la sobrevivencia celular (49).

Por lo tanto, en estudios previos con ratas en restricción calórica, se encontró que hubo un incremento en la expresión de BDNF y TrkB en las neuronas piramidales de CA1 y CA3 del hipocampo y en las células granulares dentadas. En cuanto a la expresión de NT-3 solo se observó en las células granulares dentadas y en menor porción en neuronas piramidales en la capa CA2, en cuanto al receptor TrkC se expresó en las células granulares dentadas y en todas las regiones de las neuronas piramidales (48).

2.2 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son una familia de proteínas de secreción capaces de impulsar la proliferación y diferenciación de distintos tipos de células, además de que pueden activar diferentes vías de señalización de manera autócrina o parácrina. Para llevar a cabo los procesos los de proliferación, migración y diferenciación celular, los factores se unen a receptores específicos en la superficie celular, la especificidad varía del tipo de factor de crecimiento (56).

En este trabajo de tesis se consideran dos factores de crecimiento: el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1).

I. Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1)

En el envejecimiento, se ha relacionado una reducción en los niveles del IGF-1, una hormona polipeptídica, que se asocia al efecto neurotrófico y a la prevención del deterioro cognitivo generado por la edad, mejora la memoria espacial y aumenta la neurogénesis en el hipocampo en el cerebro de animales seniles y se asocia también en la regulación de los receptores de glutamato (50).

El gen que codifica para IGF-I se encuentra en el cromosoma 12q32.2 en el humano y en el 7q12-q13 en la rata, se presentan 4 isoformas en donde, las isoformas 1 y 3 contienen 7 exones y 4 intrones, mientras que las isoformas 2 y 4 contienen 6 exones y 3 intrones; todas las isoformas generan una proteína de 195 aminoácidos, en su región promotora contiene sitios de unión para promotores de transcripción como SAT, SRF y C/EBP (56).

IGF-I se ve involucrado sobre el equilibrio en la actividad cerebral de los principales sistemas neurotransmisores, ya que inhibe la liberación del ácido gamma-aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés, *gamma-Aminobutyric acid*) y aumenta la liberación de glutamato, es así que la excitación-inhibición en el hipocampo es baja cuando son bajos los niveles séricos de IGF-I. Es un regulador metabólico pues coordina respuestas ante los cambios ambientales, regula el metabolismo de

carbohidratos, grasas y proteínas, además los niveles se ven aumentados al aumentar la masa muscular por el ejercicio. En cuanto a las funciones en el SNC, promueve el desarrollo, la excitabilidad neuronal, síntesis de mielina, sobrevivencia neuronal, proliferación, diferenciación y sinaptogénesis; además se le considera como citoprotector universal, ya que protege a distintos tipos de células contra el daño de radicales libres y apoptosis (56).

El IGF-I puede cruzar la barrera hematoencefálica al unirse al IGF-IR (Receptor de IGF-I) en las células endoteliales y, posteriormente, los astrocitos lo capturan para transferirlo a las neuronas o directamente llega a las neuronas. El sistema IGF-I/IGF-IR regula la diferenciación y maduración de las neuronas generadas a partir de las células madre neurales y progenitores durante el desarrollo embrionario como en el cerebro adulto en gran parte, a través de la vía PI3K / Akt (51).

Animales sometidos a restricción calórica mostraron un incremento en la expresión de IGF-1, de manera estable durante la vida del animal, dicho aumento favoreció la proliferación neuronal, con respecto a ratas alimentadas *ad libitum* (50).

La dieta puede presentar cambios en la expresión de neurotrofinas y neurogénesis, por lo que se le implica una función importante para el desarrollo cerebral en los humanos. Por lo tanto, se considera que una restricción calórica puede mejorar el aprendizaje y la memoria, además de aumentar la resistencia de las neuronas frente a daños.

II. Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2)

Se ha demostrado que el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), es elemental para estimular la proliferación de las células progenitoras neurales además de tener función mitogénica neural, determinando que es un cofactor necesario para su acción. Y que los receptores para FGF-2, (FGFR1), se encuentran ampliamente distribuidos en las células del hipocampo, teniendo interacción entre FGF-2 astrocitario y FGFR1 neuronal (36).

El gen de FGF-2 se localiza en el cromosoma 4q27 en el humano y en el cromosoma 2q25 en la rata, consiste de 3 exones, contiene una región 5' no traducida, (5'UTR) y una región central que codifica a 28 aminoácidos altamente conservados y 6 idénticos y en su región promotora es de tipo inducible, sitios de unión para promotores de transcripción como SAT-1, AP-1, ATF-2, STAT1beta, c- Jun (56).

FG2-2 es un potente factor angiogénico que puede impulsar a la hematopoyesis además tiene función en la diferenciación celular, en el SNC determina la diferenciación de las células progenitoras, actuando sobre astrocitos y oligodendrocitos.

El FGF-2 representa un componente neurogénico que permite la proliferación y diferenciación de células madre neurales multipotentes en el cerebro en desarrollo, además de la sobrevivencia neuronal al inhibir la apoptosis, ejerciendo protección sobre un amplio rango de fenotipos neuronales y en el adulto por ende la deficiencia de FGF-2 disminuye la neurogénesis (52).

Se ha determinado que mediante la interacción con la neurotrofina 3 y el factor neurotrófico derivado del cerebro promueve la diferenciación de las neuronas hipocampales.

Este se encuentra expresado en los nichos neurogénicos antes mencionados; la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado. En la ZSG y ZSV se ha encontrado la expresión de FGF-2 y de su receptor de alta afinidad FGFR-1, que se expresa en las células madre neurales, jugando un papel fundamental para la proliferación de células madre neurales en el hipocampo. En varios estudios se ha demostrado que, en el SNC de ratas adultos, FGFR1 y FGFR4 tiene predominio en neuronas, FGFR2 y FGFR3 se expresan en oligodendrocitos y astrocitos (52).

2.4 Marcadores de daño asociados a neurogénesis

El cerebro se ve afectado por el daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) y por las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés Rective Nitrosative Species) principalmente. Lo que se debe en gran medida al elevado consumo de oxígeno, alrededor del 20% del consumo total, debido a la gran cantidad de ATP necesaria para mantener la homeostasis de los iones intracelulares neurales, empleados en los canales iónicos para generar potenciales de acción y favorecer la neurosecreción (59).

Las ROS actúan sobre los lípidos, en el proceso conocido como peroxidación lipídica y resulta en la formación de aldehídos, por ejemplo, el malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenosales tales como 4-hidroxi-nonenal (4-HNE). Los cuales pueden formar aductos e inducir alteraciones en el ADN y modificaciones en la funcionalidad de proteínas, dado que el SNC tiene un elevado contenido de ácidos grasos, es un órgano muy susceptible al estrés oxidativo, al cual se ha relacionado con el desarrollo de diferentes enfermedades como la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer, entre otras, y afectando de igual manera a la neurogénesis (62,63).

El estrés nitrosativo es un desequilibrio entre la producción de las especies reactivas de nitrógeno, como el Óxido Nítrico, y los antioxidantes que son los sistemas de defensa de las células. Este desequilibrio puede deberse al exceso de especies reactivas o a mecanismos antioxidante insuficientes (60).

El estrés nitrosativo puede ocasionar S-nitrosilación aberrante de varias proteínas metabólicas, apoptóticas y estructurales que participan en el desarrollo de la memoria y proceso cognitivo, por lo tanto, es un factor clave en el deterioro cognitivo (61).

3. Justificación

En años anteriores se pensaba que se nace con un cierto número de neuronas, las cuales van progresando en la etapa de la infancia, y una vez desarrolladas son las que se tienen en la edad adulta e incluso se irán perdiendo con a lo largo de la vida, lo que determinaba que en el adulto no era posible la formación de nuevas neuronas.

La neurogénesis implica un incremento en los niveles de factores de crecimiento como BDNF, IGF-1 y FGF-2, entre otros, los cuales promueven la proliferación de células madre neuronales, la maduración e integración dentro de los circuitos existentes, lo cual se ve reflejado como una mejora en los procesos de aprendizaje y memoria. En los últimos años se ha demostrado que este proceso llamado neurogénesis sigue en la edad adulta y se ha demostrado que factores ambientales influyen sobre la neurogénesis hipocampal adulta, en los cuales se encuentra un ambiente enriquecido, ejercicio y la restricción calórica.

Por lo tanto, la modulación de la neurogénesis adulta por la dieta (restricción calórica) emerge como un posible mecanismo, por el cual la nutrición impacta sobre el estado de salud mental.

En el inicio de una línea de investigación es importante contar con controles positivos en el que se espera una respuesta conocida ante un tratamiento dado, y por tanto se puede comparar con la respuesta del tratamiento experimental propuesto y cuya respuesta no es conocida, por lo que un control positivo debe considerarse como parte del diseño experimental

En el laboratorio de Investigaciones Químico-Clínicas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se han obtenido ciertos indicios que pueden sugerir neurogénesis en algunos modelos de experimentación, (Blanco-Álvarez, Tesis de Maestría, Tesis de doctorado; Tomás-Sánchez, Tesis de Maestría, Tesis de Doctorado, Aguilar-Peralta, tesis de Maestría), sin embargo hasta el momento no se cuenta con un modelo que asegure la neurogénesis en el laboratorio de Investigaciones Químico-Clínicas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, para poder

emplearlo como control positivo, en estos y en futuros modelos experimentales y que permita conocer si las respuestas observadas corresponden efectivamente a neurogénesis. Dado que la restricción calórica ha demostrado inducir neurogénesis, se evaluarán tres modelos de restricción calórica para determinar cuál de ellos puede emplearse como un control positivo en el grupo de investigación del LICQ.

4. Planteamiento del problema

Los hábitos dietéticos tienen un impacto bien conocido en la longevidad y en el envejecimiento del cerebro en muchas especies, incluidos los humanos. La ingesta calórica es una de las características generales de la dieta que más claramente afecta a las funciones cognitivas. De hecho, la restricción calórica tiene un efecto positivo en la cognición y protege del deterioro del funcionamiento cerebral relacionado con edad, esta idea está aceptada dentro del mundo científico. Sin embargo, actualmente sigue habiendo controversia acerca de un modelo de restricción calórica que asegure una salud cerebral.

La evidencia revela el papel de una alimentación inadecuada y sus efectos negativos sobre la salud mental, causando disfunción mental, depresión, pérdida de la memoria, confusión, entre otros. Sin embargo, deben evaluarse los beneficios de los diferentes modelos de restricción calórica para el beneficio del aprendizaje y memoria. Teniendo como fin preservar y potenciar la función biológica y mental mediante la nutrición, manteniendo siempre las necesidades energéticas del cuerpo. Por lo tanto, en nuestra investigación deberán evaluarse tres modelos de restricción calórica, para conocer cuál de ellos resulta mejor evaluado tanto en el incremento de factores de crecimiento BDNF, FGF-2 e IGF-1, así como en la realización de las pruebas conductuales de aprendizaje y memoria, asociadas a neurogénesis, para poder determinar cuál resulta más idóneo como un control positivo para el proceso de neurogénesis.

Por todo esto la pregunta de investigación que nos planteamos es: ¿Cuál de los tres modelos de restricción calórica considerados, induce un incremento en los niveles de factores de crecimiento, BDNF, IGF-1, FGF-2, y una mejor respuesta en las pruebas de aprendizaje y memoria, como indicadores positivos de neurogénesis, realizadas en rata macho de la Cepa Wistar?

5. Hipótesis Científica

El modelo de restricción calórica empleado afecta a los factores de crecimiento BDNF, IGF-1 Y FGF-2, así como al desarrollo de pruebas de memoria-aprendizaje, y por tanto a la neurogénesis en ratas macho de la cepa Wistar

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de tres modelos de restricción calórica en rata macho de la cepa Wistar sobre los factores de crecimiento BDNF, IGF-1 y FGF-2, y pruebas de aprendizaje-memoria como indicadores del proceso de neurogénesis hipocampal adulta.

6.2 Objetivos Particulares

1. Someter a ratas macho adultas de la cepa Wistar a tres diferentes modelos de restricción calórica por un periodo de mes y medio
2. Evaluar el efecto de la restricción calórica mediante pruebas conductuales (LAM, Campo abierto y Asimetría motora) para valorar sus efectos en procesos de aprendizaje y memoria.
3. Cuantificar los niveles de los factores de crecimiento (BDNF, FGF-2 e IGF-1) en cerebelo, tallo, corteza, hipocampo y núcleos subcorticales de las ratas adultas macho de la cepa Wistar para conocer el efecto de 3 tipos diferentes de restricción calórica sobre su expresión.
4. Valorar los niveles de MDA-4-HDA y Nitritos en las regiones cerebrales cerebelo, tallo, corteza, hipocampo y núcleos subcorticales de la rata macho de la cepa Wistar.

7. Material y métodos

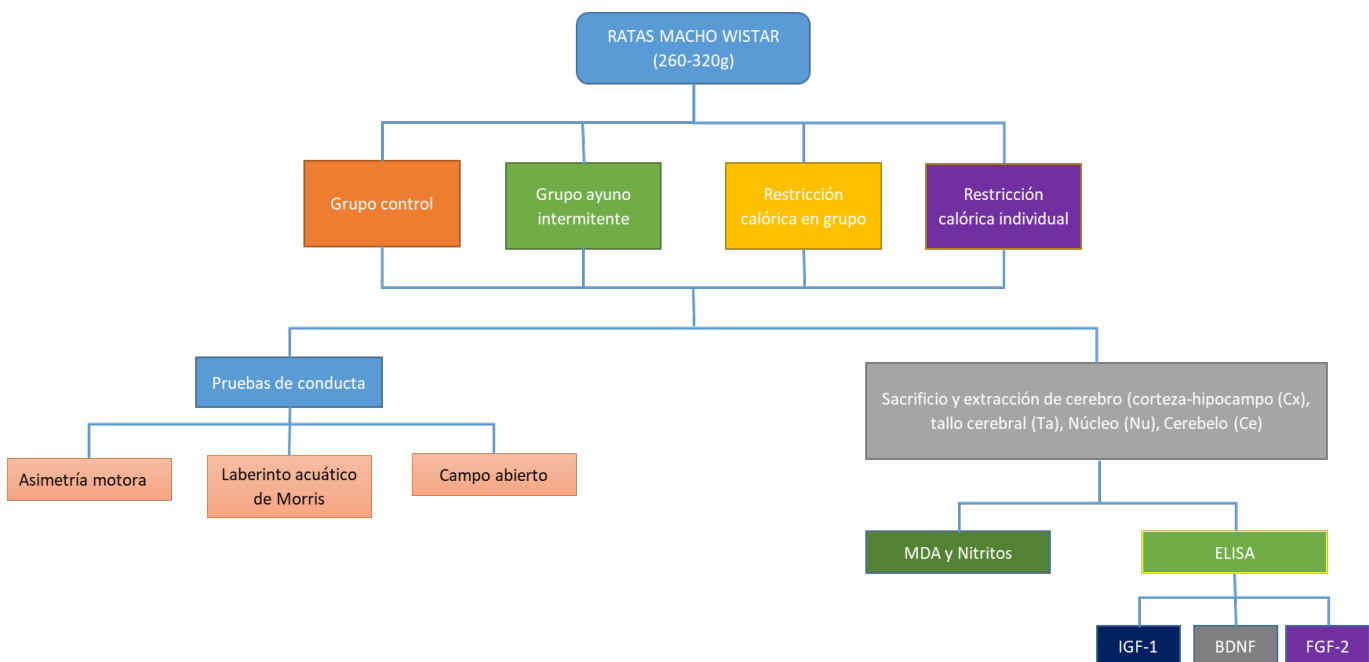
7.1 Diseño del estudio

El estudio es de tipo experimental/analítico y se define de acuerdo a su alcance como correlacional, de acuerdo a la intervención del experimentador es longitudinal y de acuerdo al origen de los datos en el tiempo como prospectivo. Se trabajó bajo lo establecido en la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, de uso y cuidado para animales de laboratorio.

7.2 Ubicación espacio-temporal

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Químico-Clínicas de la Facultad de Ciencias Químicas ubicado en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en donde se efectuó el trabajo experimental durante un periodo de 6 semanas.

7.3 Estrategia de trabajo



7.4 Muestreo

7.4.1 Definición de la población

Se trabajó con ratas macho de la cepa Wistar, en etapa adulta de 250 a 320 g. Son ratas albinas que pertenecen a la especie *Rattus norvegicus*. Se caracterizan por su cabeza ancha, orejas largas y con una longitud de la cola que es siempre inferior a la longitud de su cuerpo. Las ratas fueron provenientes del bioterio de Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) (109-02).

7.4.2 Selección de la muestra

Ratas macho de la cepa Wistar que cumplan con el peso determinado.

7.4.3 Criterios de selección de la muestra

7.4.3.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron las ratas provenientes del bioterio del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) que cumplieron con los siguientes criterios:

- Ratas macho de la cepa Wistar
- Peso entre 250 a 320g
- En etapa adulta.

7.4.3.2 Criterios de exclusión

- Ratas de otra cepa
- Ratas hembras
- Ratas con un peso menor al determinado (<250g)

7.4.3.3 Criterios de eliminación

- Ratas enfermas
- Ratas que presenten infección durante el experimento
- Ratas que mueran durante el proceso de investigación

7.4.3.4 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue de 19 ratas macho de la cepa Wistar, que fueron divididas en 4 grupos:

- Grupo control (4 ratas)
- Grupo restricción calórica del 60% individual (5 ratas)
- Grupo restricción calórica del 60% en grupo (5 ratas)
- Grupo ayuno intermitente (5 ratas)

7.5 Definición de las variables y escalas de medición

Variable	Tipo de variable	Categoría	Escala de medición	Definición conceptual	Definición operativa
Restricción calórica	Independiente	Cuantitativa	Continua	Porcentaje de restricción en alimentación que se dará a cada grupo	Porcentaje (%) con respecto al grupo control
Peso	Dependiente	Cuantitativa	Continua	Cantidad de ganancia o pérdida de peso	g
Consumo de alimento	Dependiente	Cuantitativa	Continua	Cantidad de alimento consumido mediante la alimentación	g

				de grupo control	
Aprendizaje	Dependiente	Cuantitativo	Continua	Tiempo en el que la rata aprende, una nueva tarea	Minutos Segundos
Memoria	Dependiente	Cuantitativo	Continua	Tiempo en el que rata recuerda la tarea aprendida	Minutos Segundos
Factores de crecimiento BDNF, IGF-1, FGF-2	Dependiente	Semi-cuantitativo	Continua	Expresión proteica	Densidad óptica a 415 nm
MDA y Nitritos	Dependiente	Semi-cuantitativo	Continua	Estrés Oxidativo	μM/mg

7.6 Método de recolección de datos

Los datos obtenidos se recolectaron a través del registro de la medición de peso, ingesta de alimento en 24 horas, aplicación de pruebas conductuales y de memoria, además de las pruebas bioquímicas factores de crecimiento (BDNF-IGF-1, FGF-2), nitritos, MDA-4HDA.

7.7 Técnicas y procedimientos

Las ratas que cumplieron con los criterios de inclusión fueron sometidas al estudio, posteriormente a la recepción de las ratas, los animales se sometieron a un periodo de 10 días de aclimatación del bioterio de temperatura, humedad y ciclo de luz/oscuridad, además de que se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*.

Después de los 10 días, fueron asignados aleatoriamente a 4 grupos: a) grupo control, b) restricción calórica del 60% individual, c) restricción calórica del 60% en grupo, d) ayuno intermitente.

Al iniciar con la restricción calórica, se pesó el alimento que consumió el grupo control en 24 horas y se hizo el cálculo de restricción del 60% del consumo, es decir del 100% del consumo por rata, solo se les dio el 40% del alimento.

En el grupo b: restricción calórica del 60% individual; las ratas se mantuvieron separadas únicamente solo el tiempo de la restricción en cajas diferentes para asegurar el consumo de cada una de ellas por un tiempo de 2 a 4 horas o el tiempo en que se terminen el alimento, después de ese tiempo las ratas se volvieron a poner en su ambiente original (las 5 ratas en la misma caja).

El grupo c: restricción calórica del 60% en grupo, las ratas se colocaron en una sola caja y se les dará el alimento a todas juntas por el mismo tiempo de 2 a 4 horas o el tiempo en el que terminen el alimento.

El grupo d: ayuno intermitente, fueron sometidas un día en ayuno y al día siguiente fueron alimentados por 4 horas *ad libitum* y se les retiró el alimento después de ese tiempo, este procedimiento será durante un tiempo de un mes y medio.

Así mismo a partir de la cuarta a la sexta semana de restricción calórica se realizaron las pruebas conductuales y de aprendizaje; asimetría motora, laberinto acuático de Morris y campo abierto, con el fin de medir aprendizaje y memoria.

Después fueron sacrificadas y se hicieron disecciones para obtener cortes del cerebro donde se obtendrá (tallo, núcleo, corteza y cerebelo) y se evaluaron los niveles de los factores de crecimiento mediante la técnica de ELISA y los niveles de MDA-4HDA y Nitritos.

7.8 Análisis de datos

Los datos fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prisma; utilizando estadística descriptiva (promedio, desviación estándar) para el análisis de

los datos, así como la prueba de ANOVA de 1 vía post Dunnet y verificar si hay diferencia significativa en la pérdida o ganancia de peso durante los modelos de restricción calórica, ingesta de alimento, aprendizaje-memoria y niveles de factores de crecimiento además de niveles de MDA y Nitritos a nivel cerebral después del tratamiento con restricción calórica.

7.9 Diseño estadístico

7.9.1 Hipótesis estadística

HE1: Un modelo de restricción calórica por un tiempo determinado tiene beneficio estadístico significativo ($P < 0.05$) favoreciendo a los procesos de neurogénesis en ratas adultas

HE0: Un modelo de restricción calórica por un tiempo determinado no tiene beneficio estadístico significativo favoreciendo a los procesos de neurogénesis en ratas adultas.

7.9.2 Pruebas estadísticas

- Estadística descriptiva
- ANOVA de 1 vía post hoc Dunnet y Bonferroni

8. Resultados y discusión

La figura 8 muestra el registro de los pesos obtenidos como resultado de someter a los grupos experimentales a los diferentes modelos de restricción calórica (RC).

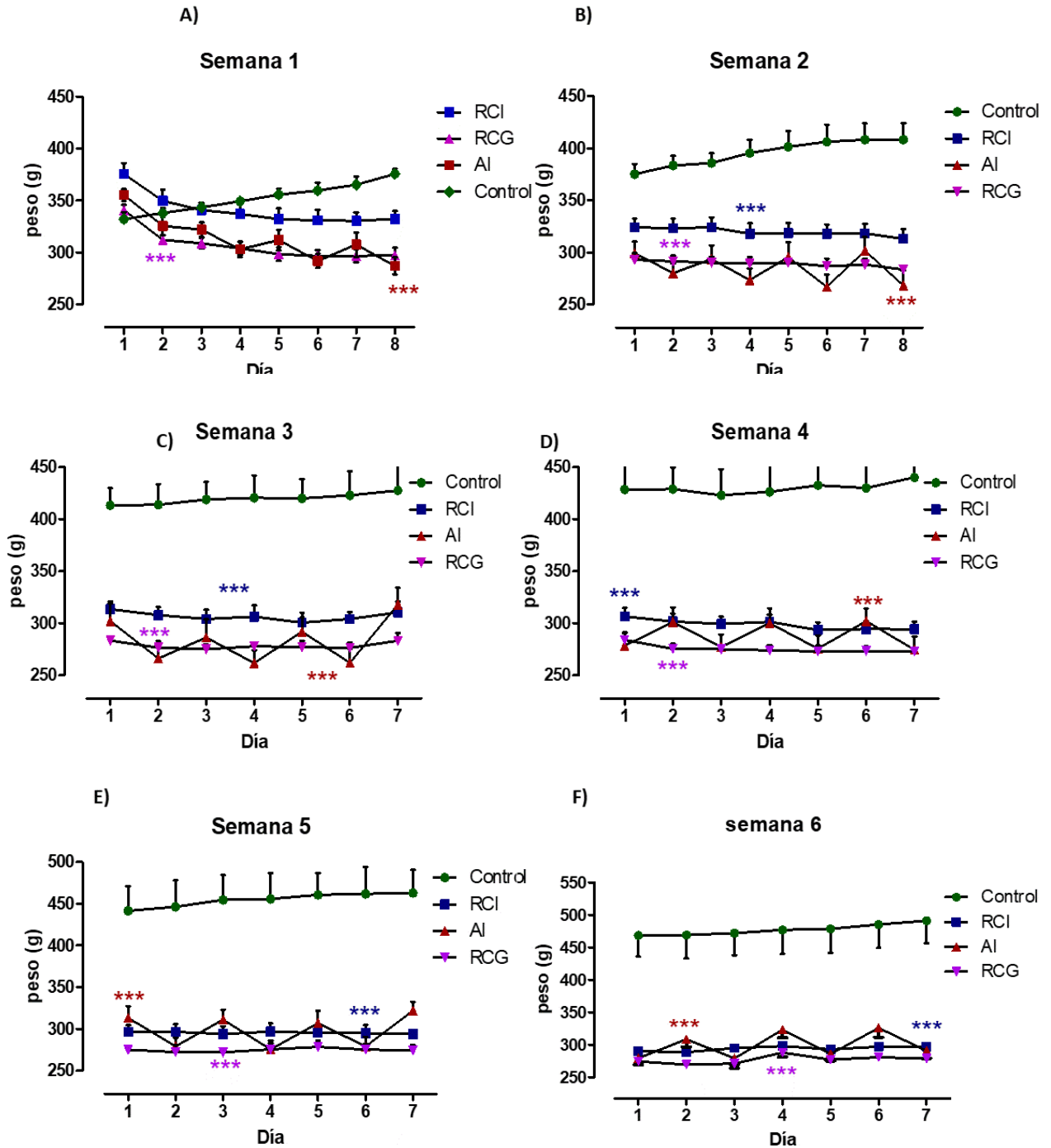


Figura 8. Efecto de 3 modelos de restricción calórica sobre el peso. Se muestran las seis semanas de duración del experimento, n=3-5, (símbolo, diferencia estadísticamente significativa analizada con ANOVA de una vía, post-test de Dunnet, * p<0.05

Cada día se registró el peso de las ratas y se comparó con respecto al grupo control, con la finalidad de observar la ganancia de peso de las ratas con alimentación “ad libitum” y que correspondía al 100% de alimentación, la variación con respecto al grupo control de cada uno de los grupos se muestra en la Tabla1

Tabla 1. Resumen de estadística descriptiva, cada grupo, Restricción calórica individual (RCI), Restricción calórica grupal (RCG) y Ayuno intermitente (AI) se evaluó con respecto al grupo control

Semana		RCI	RCG	AI
1	x		-12.919	-11.159
	SEM		0.683	1.024
	P		P<0.05	P<0.05
Semana 2	x	-19.180	-26.908	-27.963
	SEM	1.0386	0.531	1.360
	P	P<0.05	P<0.05	P<0.05
Semana 3	x	-26.907	-33.634	-32.306
	SEM	0.926	0.521	1.560
	P	P<0.05	P<0.05	P<0.05
Semana 4	x	-30.504	-35.953	-33.242
	SEM	0.735	0.480	1.310
	P	P<0.05	P<0.05	P<0.05
Semana 5	x	-35.025	-39.585	-34.441
	SEM	0.709	0.606	1.148
	P	P<0.05	P<0.05	P<0.05
Semana 6	x	-38.396	-41.968	-37.396
	SEM	0.466	0.472	1.054
	P	P<0.05	P<0.05	P<0.05

Nota: X = media, SEM = Error típico

La restricción calórica (RC) pretende reducir el total de calorías ingeridas de un 30-60%, las formas que se usaron para el déficit calórico fueron reducir la ingesta cada

día dependiendo del consumo del grupo control y el ayuno intermitente. Con el objetivo de determinar cuál es el modelo de RC que tiene menor repercusión sobre el estado de salud y sobre la pérdida de peso abrupta y que el modelo este más facilitada a la adherencia a la vida cotidiana. Asegurando al mismo tiempo una disminución de peso homogénea en las ratas, buscando al mismo tiempo, disminuir el efecto del macho alfa.

Los resultados muestran que en la primera semana el grupo RCI no presentó diferencias significativas respecto al grupo control, sin embargo, si presentó una disminución el grupo RCG del $12.9 \pm 0.68\%$ ($P < 0.05$) y una disminución en el grupo AI del $11.15 \pm 1.02\%$ ($P < 0.05$) respecto al control.

En la figura 8 (A) se puede observar que, en la primera semana con RC, la pérdida de peso del grupo RCG y AI fue más notable y de una manera más rápida, En cambio, el grupo RCI la pérdida de peso mostró una característica progresiva, manteniéndose los tres modelos de restricción calórica en el peso inicial y no incrementando de peso al igual que el grupo control.

En la segunda semana se muestra una disminución de peso en los tres grupos, en el grupo RCI disminuyó $19.18 \pm 1.03\%$ ($P < 0.05$), en el grupo RCG una disminución del $26.9 \pm 0.53\%$ ($P < 0.05$) y por último en el grupo AI una disminución del $27.96 \pm 1.36\%$ ($P < 0.05$) respecto al grupo control.

En la tercera semana la diferencia fue del $-26.9 \pm 0.92\%$ ($P < 0.05$) en el grupo RCI, del $-33.63 \pm 0.52\%$ ($P < 0.05$) en el grupo RCG y en el grupo AI del $-32.3 \pm 1.56\%$ ($P < 0.0001$) todos respecto al grupo control.

En el grupo RCI hubo una variación del $30.5 \pm 0.73\%$ ($P < 0.05$) en la cuarta semana, en la semana cinco fue del $35.02 \pm 0.7\%$ ($P < 0.05$) y en la sexta semana $-38.39 \pm 0.46\%$ ($P < 0.05$) comparado con el grupo control.

En el grupo RCG muestran una disminución del $35.95 \pm 0.48\%$ ($P < 0.05$) en la cuarta semana, una disminución del $39.58 \pm 0.60\%$ ($P < 0.05$) en la quinta semana y en la

sexta semana una disminución del $41.96 \pm 0.47\%$ ($P < 0.05$) respecto al grupo control en los tres grupos.

Por otro lado, la variación con respecto al grupo control para AI fue del $-33.24 \pm 1.31\%$ ($P < 0.05$), en la quinta semana mostró una disminución del $34.44 \pm 1.14\%$ ($P < 0.05$), por último, en la sexta semana el valor fue $-37.39 \pm 1.05\%$ ($P < 0.05$), comparado con el grupo control.

A efecto de los resultados sobre la restricción calórica, los tres modelos llegaron a nivel de peso similar sin embargo, la pérdida de peso del grupo RCI fue menos rápida lo que hace una manera más saludable (figura 8F).

Se ha reportado que, tanto la pérdida rápida de peso, como una pérdida de peso lenta, tienen mejora sobre los perfiles bioquímicos de pacientes obesos, sin embargo una ligera mejora se presentó cuando la pérdida de peso es rápida, es decir la pérdida de peso independientemente de su severidad mejora los indicadores antropométricos, aunque la composición corporal resulta más benéfica siguiendo una pérdida lenta de peso, aunque si se busca mejorar los perfiles lipídicos y glucémicos, la pérdida de peso rápida es más efectiva. (64,65).

Según los datos obtenidos se puede observar que los tres modelos son efectivos para una disminución del peso, y por tanto se debe establecer si existe algún objetivo específico para la disminución de peso. Ya que el organismo humano sano dispone de mecanismos de adaptación que le permiten subsistir sin acceso a nutrientes exógenos durante largos periodos de tiempo. Estos mecanismos son secuenciales y se caracterizan por puesta en marcha de sistemas de producción de glucosa continuados por generación de cuerpos cetónicos, entre otros, sin embargo ante una pérdida de peso descontrolada se pueden ocasionar daños fisiológicos (66).

En el grupo de RCG se hizo notable la organización social natural en cada caja, un roedor dominante (macho alfa) siendo éste, el animal que más alimento consumía dejando al resto del grupo con poco alimento, lo cual reflejó una diferencia mayor en la pérdida de peso.

El grupo de ayuno intermitente mostró una disminución de peso muy rápida durante la primera semana, sin embargo, se observó que durante los días que tenía el alimento disponible, consumía lo doble de ración, esto sugiere que las ratas hicieron un cambio en su esquema de alimentación, adecuándose al ambiente, es decir, una modificación de su ritmo biológico y del cual la alimentación es uno de los principales reguladores (67).

La cronobiología es la ciencia que estudia los ritmos biológicos en todos sus niveles de organización; busca comprender la organización temporal de las funciones y de la conducta (68), según ha sido descrito el ritmo biológico es una forma de adaptación conductual y fisiológica en respuesta al medio ambiente cambiante y cíclico. Esto explica el fenómeno de la ingestión de alimentos, para mantener una necesidad en el balance energético. Es decir, existe el mecanismo que inician en el complejo de búsqueda y consumo de alimentos antes de que suceda una hipoglucemia severa, que ayudaran a mantener el sistema homeostático (68) lo cual se evidenció y está en concordancia con el modelo de ayuno intermitente, ya que las ratas de este grupo cambiaron su ritmo biológico para alimentarse más, el día que se les administraba alimento.

Los tres modelos de RC llegaron a un nivel de peso similar a las 6 semanas, pero en el grupo RCI tuvo una constante en la pérdida de peso haciéndolo más gradual e idóneo para perder peso sin tener daños (69).

Como una medición indirecta del nivel de óxido nítrico y con ello, del posible estrés nitrosativo que pudiera estar causando la RC sobre las células cerebrales, se evaluó el nivel de nitritos en diferentes regiones cerebrales, cuyos resultados se muestran en la figura 9.

La evaluación bioquímica realizada en tallo, cerebelo, corteza, hipocampo y núcleos subcorticales; muestra una disminución de nitritos en tallo del $38.24 \pm 3.59 \%$ ($P=0.0497$) en el grupo RCI; $38.01 \pm 1.84 \%$ ($P=0.0497$) en el grupo AI respecto al grupo control.

Por otra parte, los niveles de Nitritos cuantificados en las demás regiones (cerebelo, núcleos subcorticales, corteza e hipocampo) no mostraron cambios estadísticamente significativos, valores comparados con los niveles del grupo control.

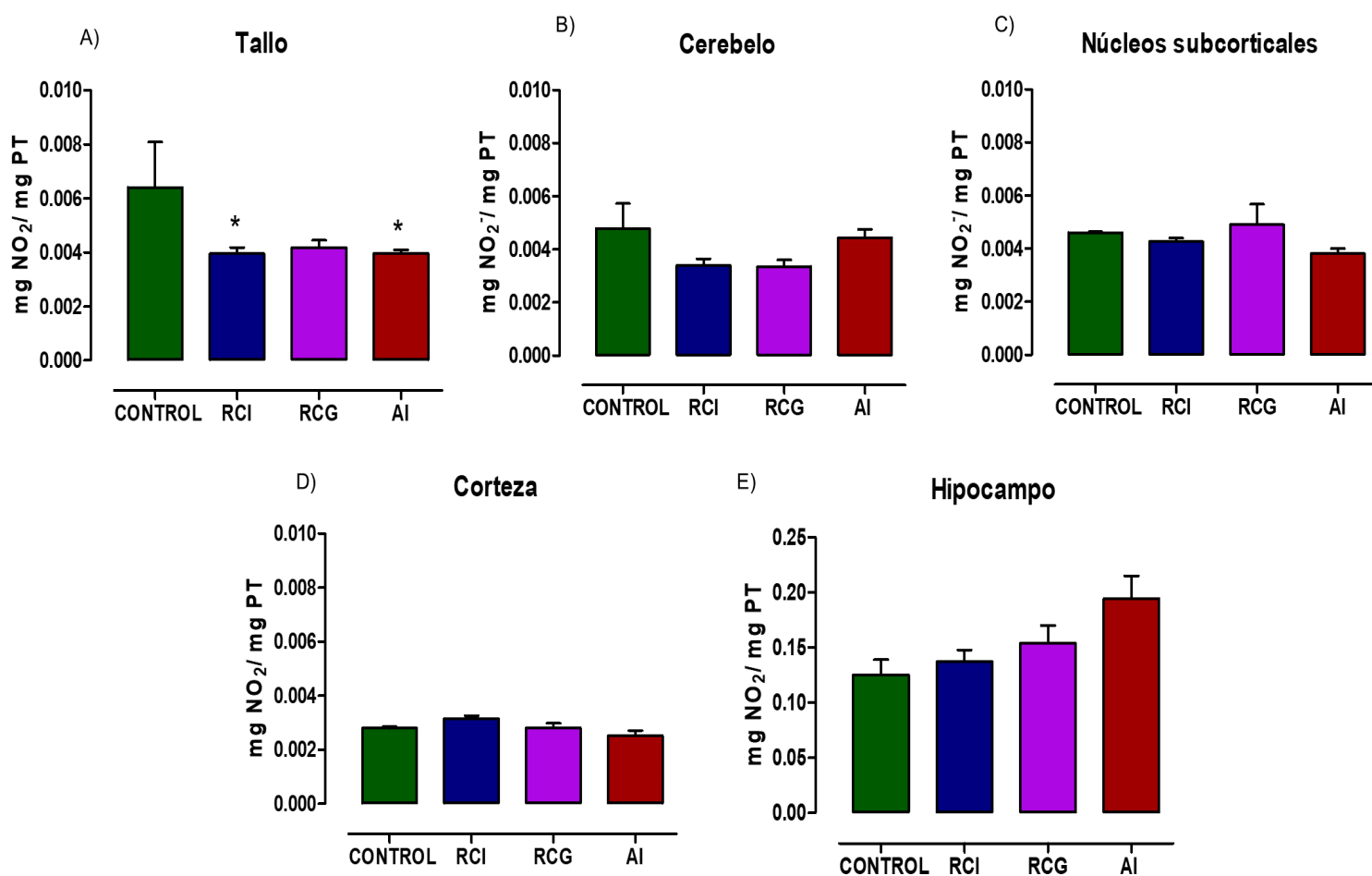


Figura 9. Niveles de nitritos en regiones cerebrales. Efecto de 3 modelos de restricción calórica sobre los niveles de nitritos. Las barras representan la media + SEM. ANOVA de una vía post-test Dunnet. * P < 0.05 vs Control.

Se ha establecido que el óxido nítrico es benéfico en las primeras etapas de producción de células neurales neonatales, sin embargo, muestra un efecto dual, ya que también es perjudicial para la supervivencia de las neuronas recién diferenciadas debido a la inflamación (70).

Mientras que una sobreproducción de óxido nítrico puede provocar daño por estrés oxidativo-nitrosativo, y representa la principal fuente de daño directo a macromoléculas celulares como ADN, proteínas y lípidos (71). Los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 9 sugieren que no hubo un daño a nivel cerebral por el estrés oxidativo-nitrosativo a causa de la restricción calórica, en ninguna de las áreas cerebrales, esto es importante dado que se conoce que el estrés nitrosativo participa en la toxicidad neuronal, y se asocia a estados depresivos y de ansiedad, enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, así como un incremento en el proceso inflamatorio cerebral (72, 73,74).

En la figura 9 (A) se observa una disminución de nitritos respecto al grupo control en la región de tallo. Esto puede deberse a la disminución en el metabolismo de glucosa, consecuencia de la RC, que inhibe la formación de radicales libres, a través de la inhibición del estrés oxidativo mitocondrial en el hipocampo y en las neuronas de la raíz del ganglio dorsal (75).

Por el contrario, al haber un incremento de la glucosa en el citoplasma produce mayor cantidad de equivalentes reductores que ingresan a la mitocondria con las lanzaderas de electrones correspondientes. A su vez, la gran cantidad de piruvato obtenido de la glucólisis puede entrar a la mitocondria por el transportador correspondiente. Una vez dentro de la mitocondria el piruvato se descarboxila dando lugar a más equivalentes reductores y permitiendo obtener la acetil-CoA en grandes cantidades que alimentará al ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo de Krebs), mismo que generará la mayor cantidad de equivalentes reductores ($\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2), los cuales alimentarán a la cadena transportadora de electrones, lo que dará lugar a un incremento de la reducción del oxígeno para formar agua, pero también a la reducción parcial de oxígeno para dar lugar a la formación de O_2^- y el consecuente daño oxidativo (76), y que se confirma mediante la determinación de un marcador de muerte celular, el MDA.

La evaluación bioquímica en tallo, cerebelo, corteza, hipocampo y núcleos subcorticales; muestra una disminución de MDA & 4-HDA en tallo del $62.82 \pm 4.21\%$ ($P= 0.0542$) en el grupo RCI respecto al grupo. Por otra parte, los niveles de lipoperoxidación cuantificados por MDA & 4-HDA en las demás regiones (cerebelo, corteza, hipocampo y núcleos subcorticales) en los grupos de RCG y AI; no mostraron variación estadísticamente significativa contra el grupo control (Figura 9).

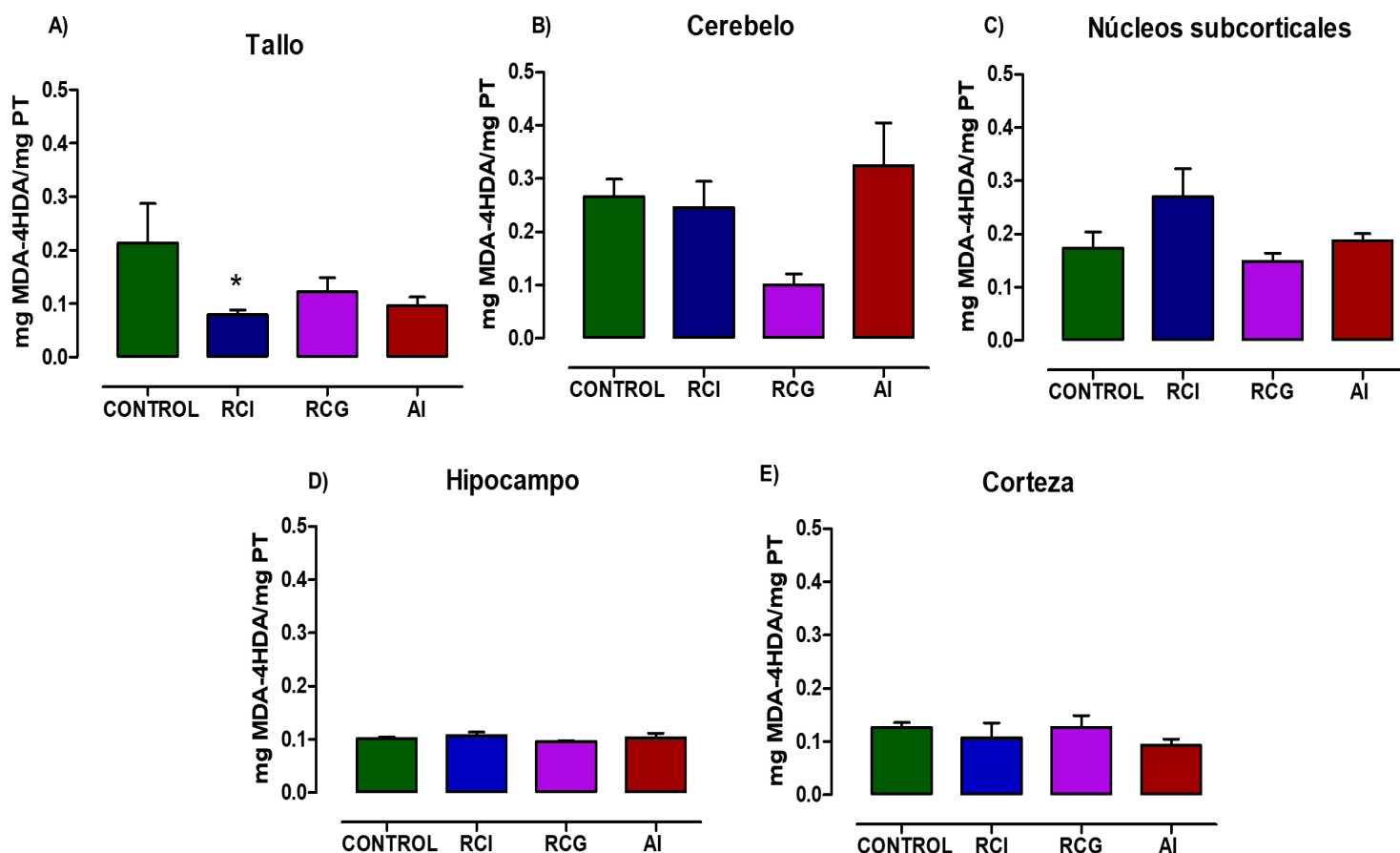


Figura 10. Efectos de la restricción calórica en los distintos grupos sobre los niveles de MDA & 4-HDA. Las barras representan la media. * $P < 0.05$ vs control. Analizado con ANOVA de 1 vía post-test de Dunnet.

Estos resultados pueden explicarse, ya que uno de los principales efectos de la RC a nivel celular es la disminución del estrés oxidativo; mediante mecanismos que ayudan en el decremento de la generación de radicales libre de oxígeno, el aumento de la detoxificación de las especies reactivas (41), en la figura 10 (A) se puede

observar el perfil de analitos cuantificados donde se muestra una disminución de los niveles de MDA & 4-HDA en el grupo con RCI, que podría propiciar que la restricción calórica genera una disminución del estrés oxidativo por una disminución de consumo, y por tanto no genera un estado oxidativo celular. En teoría, la RC incrementa las concentraciones o la activación de proteínas desacoplantes (UCP) disminuyendo el potencial de membrana y disminuyendo la producción de ROS, lo que daría como resultado una membrana más estable, pues el daño a los lípidos de membrana se vería atenuado como consecuencia de menor producción de ROS (41).

Los modelos de RC propuestos no generan un daño oxidativo a nivel del SNC, esto a pesar de que el SNC presenta un ambiente altamente oxidativo, debido a su alta tasa de consumo de oxígeno, su alto contenido en lípidos y la escasez relativa de enzimas antioxidantes en comparación con otros tejidos (77). Los ácidos grasos presentes en células cerebrales son altamente susceptibles al estrés oxidativo y donde en forma de ácidos grasos libres, pueden convertirse en aldehídos de alta toxicidad como Malonildialdehído (MDA) y 4-Hidroxiálquenos (4-HDA), ambos son considerados como marcadores de daño celular directos del proceso de lipoperoxidación (LPO) y que reflejan la severidad del daño celular, ambas moléculas juegan un papel importante en la patogénesis de enfermedades del Sistema Nervioso Central (78).

Con los modelos de RC empleados no existe un incremento de MDA en las regiones evaluadas, con excepción del tallo para RCI. A este respecto se ha establecido una relación entre la proliferación y el estrés oxidativo dentro del hipocampo, dado que la mayoría del estrés oxidativo se genera durante la elevada proliferación que acompaña a la neurogénesis. Y que puede generar un aumento del estrés mitocondrial o aumento en el número total de mitocondrias por célula (70). Dado que este incremento en el estrés oxidativo es transitorio y sólo dura unos pocos días, otra posibilidad es que no se encuentran elevados los niveles de MDA & 4-HDA ya que la cuantificación se realizó al final del experimento a las seis semanas, y las neuronas se encontraban en fase postmitótica. Para evaluar el aprendizaje que tenían los

diferentes grupos de RC, se sometieron a la prueba de Morris, los resultados muestran que no hay un cambio significativo en el aprendizaje entre los tres modelos de restricción calórica respecto al grupo control. Sin embargo, se observa un decremento de tiempo de latencia para llegar a la plataforma en el aprendizaje en los 3 grupos (Figura 11).

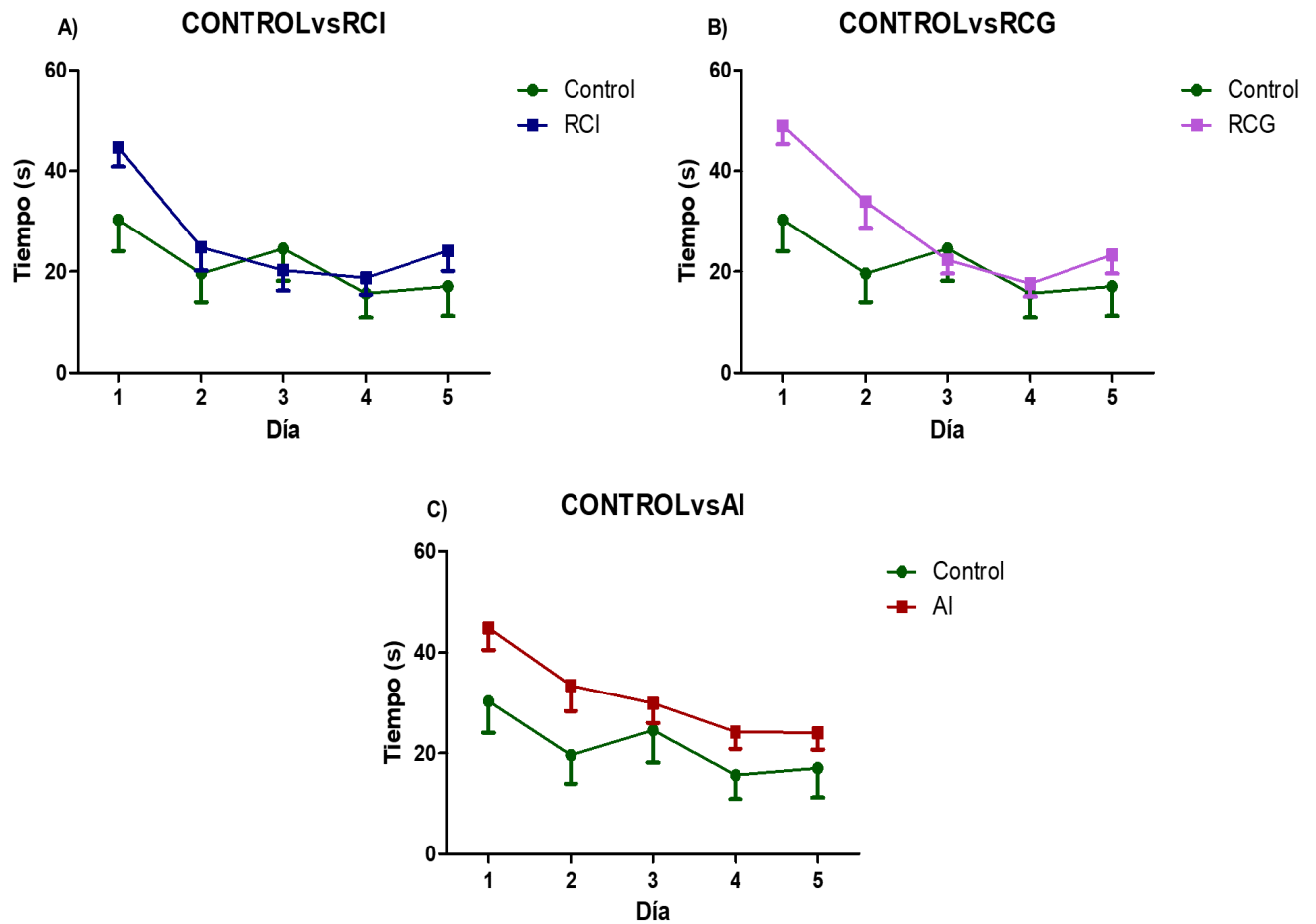


Figura 11. Desempeño de aprendizaje evaluadas en el Laberinto Acuático de Morris. Los tres modelos de restricción calórica fueron comparados contra el grupo Control, $n= 5$ para la evaluación de aprendizaje y $n=3$ para control. Se llevaron a cabo 4 ensayos con duración de 60s cada uno, a lo largo de 5 días para desarrollar el aprendizaje, se muestran los promedios, valores analizados con *t* student.

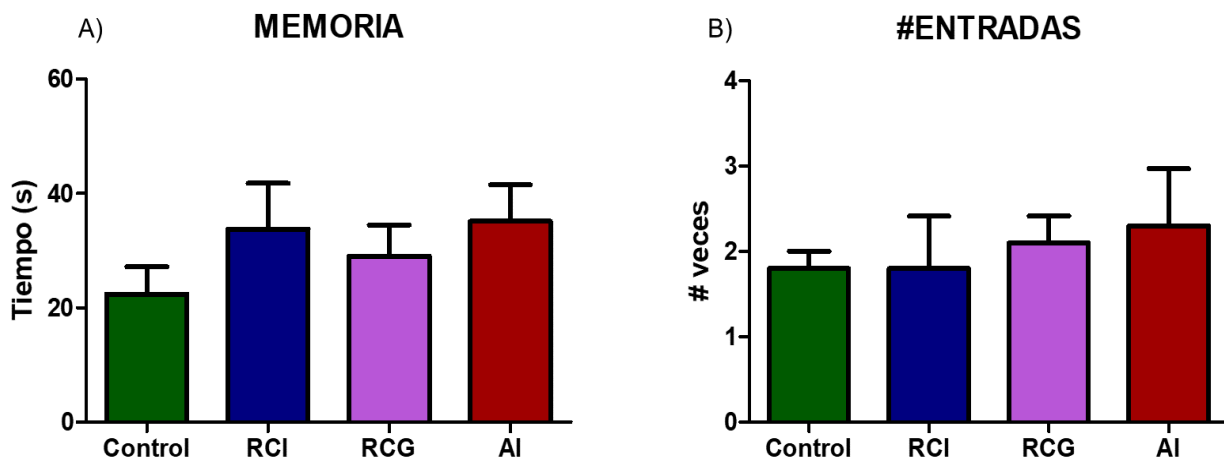


Figura 12. Desempeño de memoria y número de entradas al cuadrante sureste. La evaluación de memoria se realizó 7 días posteriores al último día de aprendizaje. Analizado con ANOVA de una vía, post-test Dunnet.

Los resultados muestran que no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la memoria y el número de entradas al cuadrante sureste, aunque se observa que los grupos con restricción calórica tuvieron preferencia por este cuadrante, donde se encontraba la plataforma. Esto sugiere que los grupos experimentales, excepto el grupo control tuvieron un mayor aprendizaje, ya que de manera continua buscaban la plataforma.

El aprendizaje se evalúa dependiente del ensayo, latente para llegar a la plataforma (79). En la figura 11 se puede observar que conforme pasaron los 5 días de aprendizaje el tiempo era menor para llegar a la plataforma lo que indicaba que había aprendizaje.

El sistema de memoria puede definirse como una función cerebral cuyo propósito es clasificar, codificar, almacenar y recuperar una amplia diversidad de información relevante para el tema (80). Lo que se buscaba en la investigación es que el objeto de investigación recordara en donde se encontraba la plataforma, mediante el desarrollo de la memoria espacial que se define como; la función cerebral

responsable de reconocer, codificar, almacenar y recuperar información espacial sobre la disposición de objetos o rutas específicas (80), en la gráfica de memoria figura 12 (A) se muestra que el tiempo en llegar al cuadrante SE que es donde se encontraba la plataforma fue menor. Además de que se determinó que la estrategia que utilizaban es aloctrica lo que significa que depende de las señales espaciales. Al usar esta estrategia, el sujeto memoriza la ubicación del objetivo en relación con la posición espacial de los puntos de referencia en el ambiente. Como se muestra en la figura 12 (B) el número de entradas en el cuadrante SE es mayor para todos los grupos.

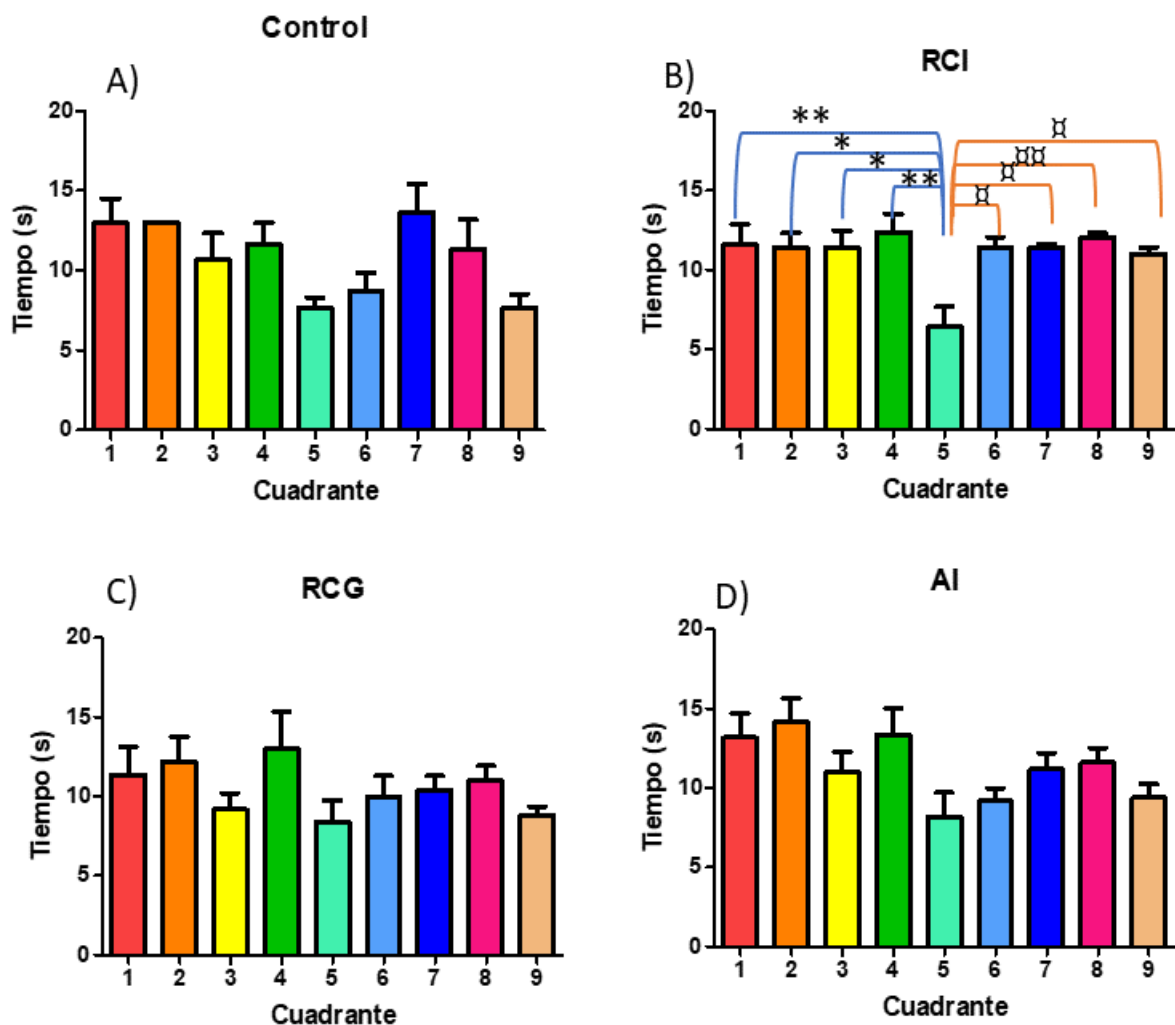


Figura 13. Prueba de campo abierto. Las barras representan la media + SEM. (B) * $p < 0.05$ valores estadísticamente significativos analizados con ANOVA de una vía post-test de Bonferroni. Cuadrante 1,2,3,4 vs cuadrante 5. \square $p < 0.005$ valores estadísticamente significativos analizados con ANOVA de una vía post-test de Bonferroni. Cuadrante 5 vs cuadrante 6,7,8,9.

Dado que un aumento en el estrés nitrosativo-oxidativo puede conducir a conductas de ansiedad-depresión, e incluso aislamiento social, se evaluó si los grupos experimentales mostraban alguna de estas conductas mediante la prueba de campo abierto.

Los resultados de campo abierto se pueden observar en la figura 13, en la figura A, C y D no hubo datos significativamente estadísticos sobre el número de veces que

pasaron sobre los distintos cuadrantes. En la figura 13 (B), se puede observar que hubo una disminución de número de veces la rata pasa por el cuadrante número 5 (zona central) del $44.82\% \pm 11.1$ respecto al cuadrante 1, el cuadrante 5 $-43.85\% \pm 11.3\%$ respecto al cuadrante 2, $-43.85\% \pm 11.3\%$ cuadrante 5 contra cuadrante 3, y $-43.38 \pm 10.29\%$ cuadrante 5 contra cuadrante 4. Con respecto al cuadrante 5 contra los cuadrantes 6, 7, 8 y 9, hubo un aumento en el número de veces que pasaron en los respectivos cuadrantes. Cuadrante 6 más 78.12 ± 10.59 , cuadrante 7 $+78.1 \pm 3.8\%$, cuadrante 8 $+87.5 \pm 4.94\%$ y cuadrante 9 $+71.87 \pm 6.9\%$ todos contra el cuadrante 5.

El campo abierto es una de las pruebas más usadas, consiste en la medición de conductas que se producen al colocar un sujeto en un espacio abierto nuevo, en donde no puede escapar porque hay un muro que lo rodea. El comportamiento de ansiedad que se provoca está dado por dos factores: la prueba individual (el animal se separa de su grupo social) y la agorafobia (como el área es muy grande en relación a la cría de los animales o el medio ambiente natural), de forma tal que, se desencadena ansiedad en las especies y muestran miedo a espacios abiertos en los que se ven obligados a estar (81). Como se puede observar la actividad de las ratas fue más predominante en las orillas del campo abierto (zona exterior).

En estudios se ha determinado que la RC contribuye a la ansiedad y trastornos de depresión (82) en donde se vio reflejado en el comportamiento exploratorio en la prueba, que está a favor las visitas en la zona exterior, lo que indica que una menor exploración en la zona central es indicativa de menor ansiedad. El grupo RCI mostró una menor frecuencia sobre el cuadrante 5, sin embargo, no existe diferencia con respecto al grupo control, lo cual sugiere que la RCI no causa ansiedad a las ratas. Para los otros grupos de RC no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cuadrantes y con respecto al grupo control, así pues, podemos sugerir que ninguno de los tres modelos genera ansiedad.

Se ha visto que los tratamientos con RC en roedores adulta generalmente aumentan la actividad exploratoria y locomotora, lo que se observa que las ratas del

experimento no se afectó la actividad locomotora, que sería perjudicial para la supervivencia del animal.

Asimetría motora

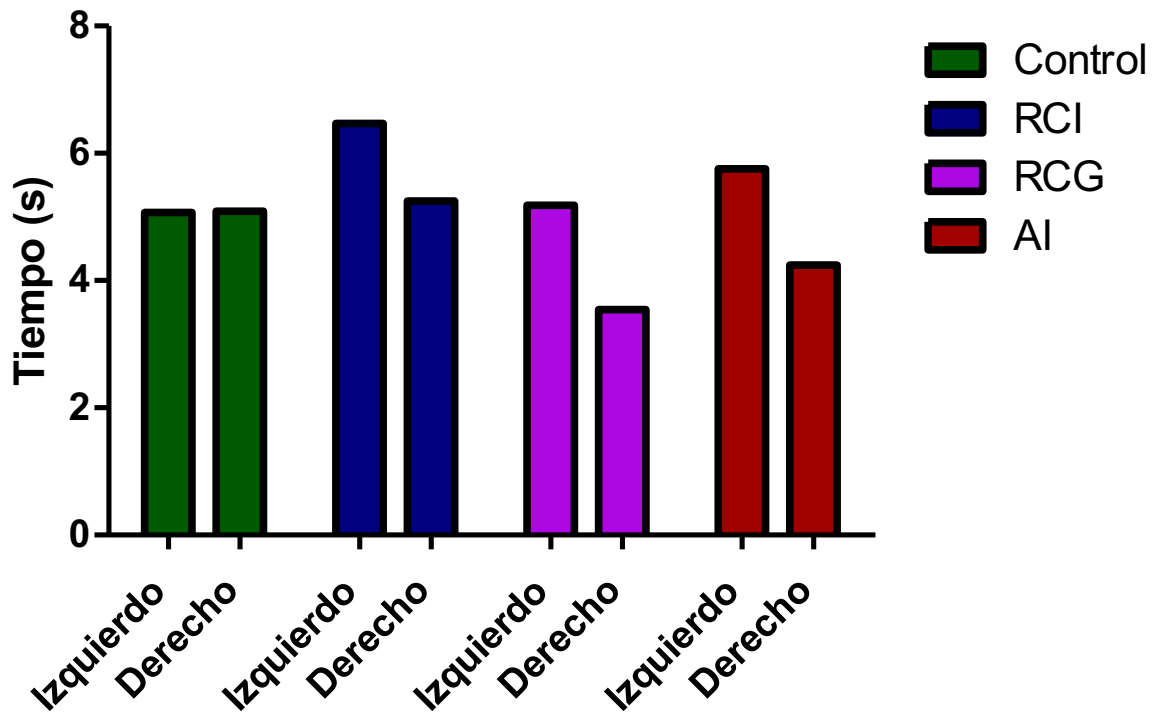


Figura 14. Prueba de asimetría motora, latencia en desprender la etiqueta.

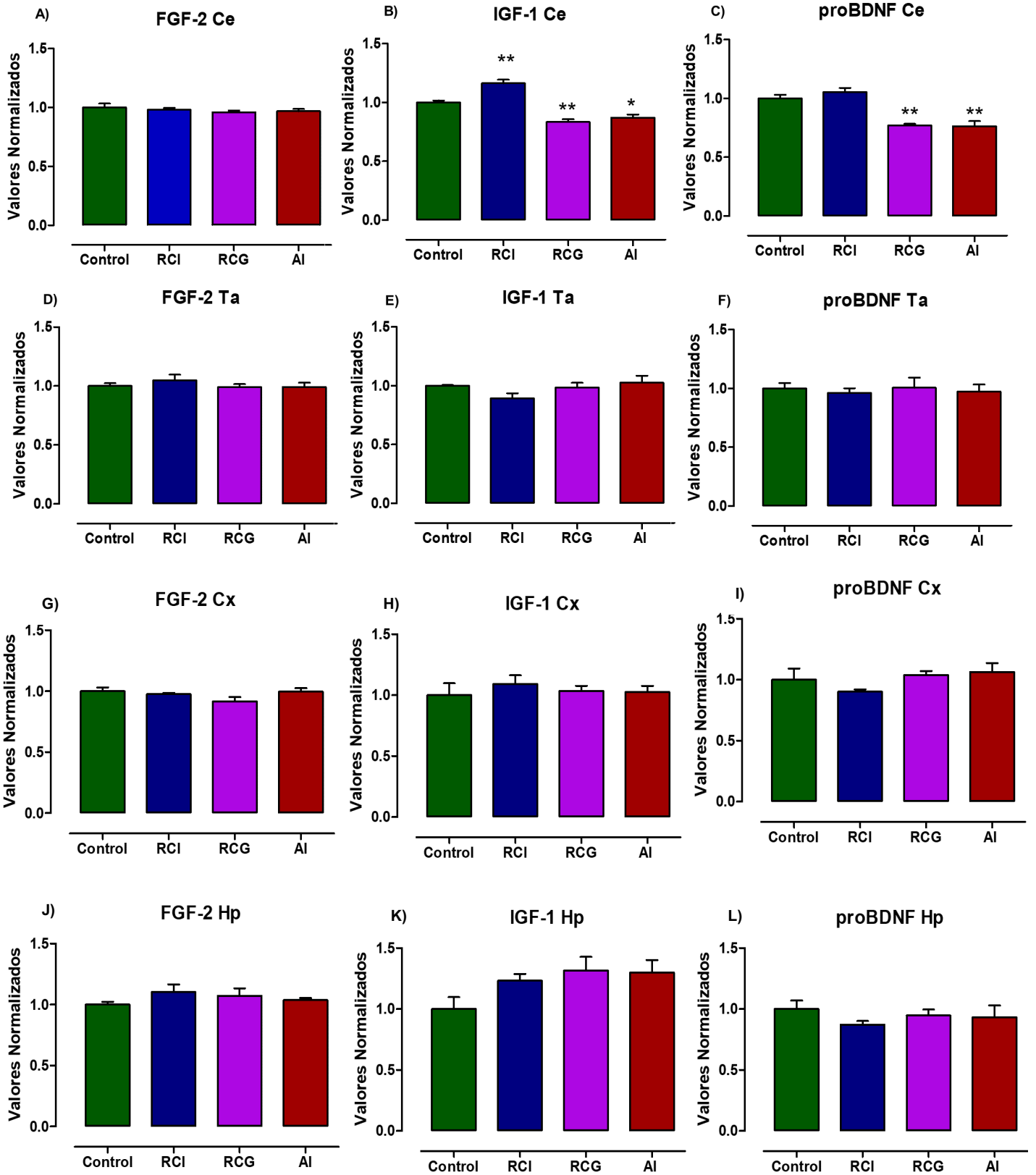
Finalmente, para corroborar que no se generó daño cerebral como consecuencia de la RC o que se afectó la producción de neurotransmisores, se realizó la prueba de asimetría motora. En la cual no se encontraron datos significativamente estadísticos entre la latencia para desprender el estímulo.

En los modelos animales son importantes las pruebas sensoriomotoras que son sensibles a el daño cerebral y los efectos del tratamiento. La prueba de asimetría motora implica reaccionar y eliminar pequeños estímulos pegajosos de la parte delantera de las extremidades (83).

En la investigación la latencia para remover el estímulo fue rápida, es decir en cuestión de segundos las ratas retiraban la etiqueta y este nos indica que no hubo un daño en la capacidad motora y es sensible a estímulos. Lo que indica que las ratas mantenían intacto su concepto de propiocepción (83).

Finalmente, se realizó una medición indirecta del contenido proteínico de tres factores de crecimiento asociados a neurogénesis (84, 85) y que se ha desarrollado en la introducción, Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1), el factor de crecimiento de fibroblastos tipo ácido o 2 (FGF-2) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), con el fin de establecer si la RC, generaba un incremento en estos tres factores de crecimiento.

La evaluación mediante inmunoensayo en tallo, cerebelo, corteza, hipocampo y núcleos subcorticales; muestra un aumento de IGF-1 en cerebelo del $16.27 \pm 3.16\%$ ($P < 0.05$) en el grupo RCI, en el grupo RCG muestra una disminución del $16.53 \pm 3.16\%$ ($P < 0.05$), al igual que en el grupo AI una disminución del $12.94 \pm 2.79\%$ ($P < 0.05$) comparados todos con el grupo control (Figura 15).



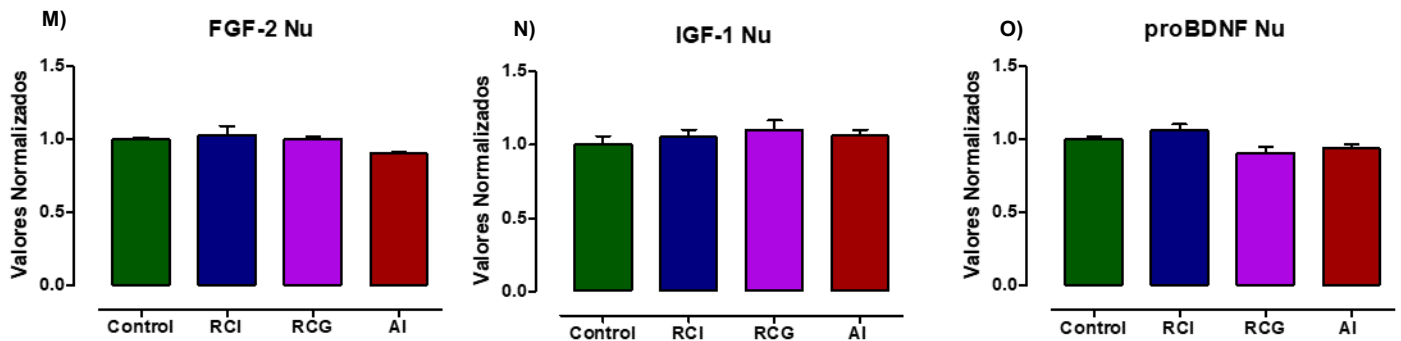


Figura 15. Cuantificación de los niveles de FGF-2, IGF-1 y proBDNF en las regiones de cerebelo (Ce), tallo (Ta), corteza (Cx), hipocampo (Hp) y núcleo (Nu). Las barras representan la media. * $P < 0.05$ vs Control. Analizados con ANOVA de una vía post-test de Dunnett. En la figura (A) (FGF-2 en cerebelo), (B) (IGF-1 en cerebelo), (C) (proBDNF en cerebelo), (D) (FGF-2 en tallo), (E) (IGF-1 en tallo), (F) (proBDNF en tallo), (G) (FGF-2 en corteza), (H) (IGF-1 en corteza), (I) (proBDNF en corteza), (J) (FGF-2 en hipocampo), (K) (IGF-1 en hipocampo), (L) (proBDNF en hipocampo), figura (M) (FGF-2 en núcleo), (N) (IGF-1 en núcleo), (O) (proBDNF en núcleo).

IGF-I influye en la proliferación y diferenciación de NSC en neuronas y glía, así como en la maduración neuronal, incluida la formación de sinapsis (86), adicionalmente estimula la proliferación de los precursores neuronales en presencia de FGF-2 (85). Por lo que el aumento de IGF-1 en cerebelo sugiere que se estén favoreciendo estos procesos en el grupo de RCI.

En el individuo adulto, IGF-I se sintetiza principalmente en el hígado mediante un proceso regulado por la hormona del crecimiento (GH). Además, hay una pequeña producción local en tejidos que incluyen regiones cerebrales como SVZ, bulbo olfatorio, hipocampo y cerebelo. La expresión de IGF-IR comienza temprano durante el desarrollo embrionario en regiones que incluyen la corteza, bulbo olfatorio, hipocampo, cerebelo, hipotálamo (HT) y médula espinal. Postnatalmente, los niveles de IGF-IR se reducen ligeramente y en el adulto, pero su expresión se detecta claramente en SVZ, bulbo olfatorio, hipocampo, cerebelo y el plexo coroideo (86). Como se observa en la gráfica 15 que se vio aumentado IGF-1 en cerebelo en el grupo RCI, determinando que el modelo de restricción calórica individual que indujo un incremento en este factor a las seis semanas. Por otro lado, evidencias respalda que una deficiencia de GH / IGF-1, así como la eliminación de IGF-1R en los

progenitores neurales del DG, no se ve afectada la proliferación postnatal-adulta (86), lo que se puede determinar que la disminución de IGF-1 en los grupos RCG y AI, no se afecta la neurogénesis.

Esta disminución de IGF-1, en los grupos de RCG y AI, al relacionarlos con los resultados anteriores descartan que se trate de un daño inducido por estrés nitrosativo-oxidativo y con ello, muerte celular, si no que puede relacionarse con los resultados descritos, donde se conoce que ante una disminución de la ingesta proteica se genera una disminución en los niveles circulantes de IGF-1, que se asocia con una mayor longevidad, y una mejora en la conducta cognitiva (87,88,89).

Adicionalmente se conoce que la regulación de la expresión de IGF-1 es espacio-temporal y dado que sólo se realizó una determinación al finalizar el experimento, posiblemente esto también condicione la determinación (56).

Los niveles de proBDNF cuantificados en cerebelo muestran una disminución en el grupo RCG del $22.9 \pm 1.35\%$ ($P < 0.05$) y en el grupo AI del $23.64 \pm 4.37\%$ ($P < 0.05$) (Figura 15).

FGF-2 participa activamente en la proliferación y diferenciación de las células progenitoras en el hipocampo adulto (90). En el estudio no se encontró cambios en FGF-2 dado el tiempo en el que se tomó la muestra, esto puede deberse a la variación fisiológica que presenta FGF-2 durante la neurogénesis, según Kalluri y Dempsey, debe generarse un incremento en los primeros días, para estimular la proliferación, mientras que una disminución posterior de FGF-2 y un aumento de IGF-1 se relaciona con la diferenciación de los precursores neuronales (85), esto sugiere que posiblemente al tomar la muestra, el nicho neurogénico no se encontraba en fase de proliferación; dando una nueva perspectiva de tomar muestras en el transcurso del experimento.

En cuanto a PROBDNF, es un precursor del factor neurotrófico derivado del cerebro maduro (BDNF), se sintetiza inicialmente como una proteína precursora, preproBDNF, en el retículo endoplásmico, posteriormente a la eliminación de su péptido señal, el proBDNF, se convierte en BDNF maduro mediado por la acción de

proteasas extracelulares como la matriz metaloproteasa 9 y la plasmina (91) el cual es un importante regulador de la neurodegeneración y la plasticidad sináptica. El proBDNF y sus receptores pan-neurotropina receptor p75 (p75NTR), vps10p receptor que contiene dominio Sortilin y tropomyosin receptor quinasa B (TrkB) se expresan en células neuronales y gliales y el papel del proBDNF en la regulación de la neurogénesis no está completamente definido, pero se conoce que una disminución en BDNF, se asocia con desórdenes depresivos (91,92).

El factor neurotrófico derivado del cerebro maduro ha demostrado un efecto promotor sobre las células neurales en los roedores, incluida la proliferación neural, la diferenciación, la supervivencia y la formación sináptica. Por el contrario, el precursor del factor neurotrófico derivado del cerebro (proBDNF) ha surgido como una proteína diferente contra su forma madura, oponiéndose a las funciones de BDNF maduro al inhibir la proliferación, diferenciación y migración del NSC durante el desarrollo y se ve reflejado en estudios de aprendizaje y memoria, además de tener un papel crítico en el proceso de envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas (93). En la investigación se vio reflejado que no hubo un aumento de proBDNF, en la figura 15 (C), hubo una disminución de proBDNF en el grupo RCG, AI y no hubo cambios significativamente estadísticos en RCI, por lo que no se ve afectada el BDNF para los procesos de aprendizaje y memoria.

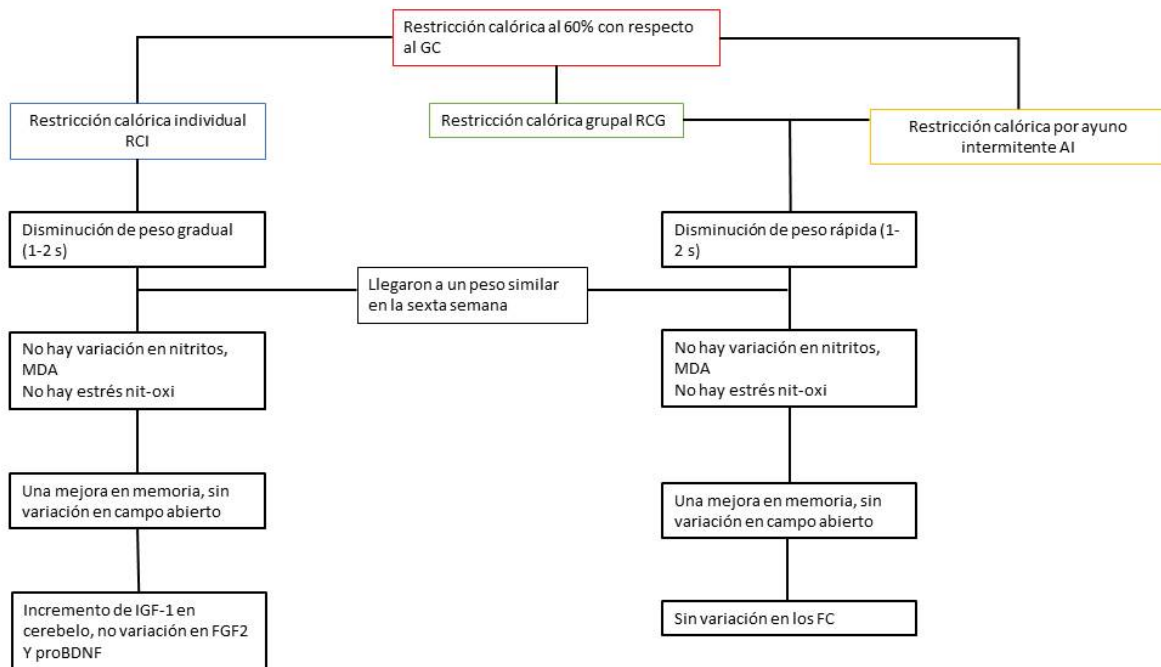
Se ha reportado que una disminución en los niveles de proBDNF, se asocia con una mejora en los procesos de consolidación de las neuritas y con ello, de la formación de memoria, lo cual sugiere que las ratas en los grupos RCG y AI, estaban en el proceso de consolidación de memoria (94,95), aunque también se encontraron niveles disminuidos de proBDNF en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

En las regiones de corteza, hipocampo y núcleos subcorticales no se encontró un cambio estadísticamente significativo en IGF-1, FGF-2, proBDNF, en los tres grupos de restricción calórica (Figura 15).

Con todos los resultados obtenidos, se pueden establecer lo siguiente:

1. De manera indistinta al modelo de RC empleado la pérdida de peso con respecto al grupo control es la misma al término de seis semanas, presentándose la principal diferencia en las dos primeras semanas, esto implicaría que para un diseño experimental se debe considerar el tiempo total de RC
2. La pérdida de peso en el grupo RCG y AI fue más rápida con respecto al grupo RCI, esto también indicaría que se debe considerar esta rapidez con base al objetivo del estudio, ya se trate de mantener la composición corporal o por el contrario se busque una rápida modificación de los parámetros bioquímicos
3. Con el modelo de RCI se elimina el efecto del macho alfa, lo que asegura una ingesta adecuada para el resto de las ratas del grupo.
4. Los modelos de RC empleados no generaron daño por estrés nitrosativo-oxidativo, lo cual se vio reflejado en el mantenimiento de los valores de NO y de MDA.
5. Con los modelos de RC empleados no se afectó a las propiedades de propiocepción de las ratas ni se generó ansiedad o estrés.
6. El modelo de RCI mostró una mejor tendencia a desarrollar memoria
7. El modelo de RCI generó un incremento en la cuantificación proteica de IGF-1 a nivel de cerebelo
8. Los dos últimos puntos sugieren entonces que se favoreció los procesos de neurogénesis mediante la RCI

Estos puntos se establecen con base a los resultados obtenidos y que se resumen en el siguiente esquema



9. Conclusiones

1. Los tres modelos de RC generan una pérdida de peso, manteniéndose en su peso inicial que al final de la etapa experimental (6 semanas) llegan al mismo peso.
2. Los modelos de RC no generan estrés nitrosativo-oxidativo, ni ansiedad o depresión, tampoco se afectó la propiocepción de la rata.
3. El modelo de RCI mostró un incremento en la memoria y aprendizaje, se eliminó la prevalencia del macho alfa y un incremento en el IGF-1.
4. De los tres modelos evaluados, la RCI mostró mejor desempeño en favorecer la neurogénesis.

Perspectivas:

1. Evaluar a lo largo del experimento las variaciones en los niveles proteicos de los factores de crecimiento
2. Modificar los parámetros de RC para evaluar un menor porcentaje (abajo del 60%)
3. Evaluar si estos modelos de RC generan estrés nitrosativo-oxidativo a nivel sistémico.

10. Anexos

10.1 Definiciones operacionales

- Restricción calórica: porcentaje (%)
- Peso: Gramos (g)
- Consumo de alimento: Gramos (g)
- Aprendizaje y Memoria: Minutos (m) y Segundos (s)
- Factores de crecimiento: Densidad óptica a 415nm
- MDA y Nitritos: $\mu\text{M}/\text{mg}$

10.2 Definiciones conceptuales

- Restricción calórica: Porcentaje de restricción de alimentación que se dará a cada grupo. Es decir, del 100% que se consume se le restará el 60% que será de la restricción.
- Peso: Cantidad de ganancia o pérdida de peso con relación a la restricción calórica.
- Consumo de alimento: Cantidad de alimento consumido mediante la alimentación de grupo control. Es decir, se pesará la diferencia de alimento en 24 horas y se calculará los gramos que consume cada rata. Después se le quitará el 60%, y es lo que se dará a las ratas con restricción
- Aprendizaje: Tiempo en el que rata adquiere un nuevo conocimiento a partir de las experiencias
- Memoria: Tiempo en el que la rata recuerda el conocimiento adquirido en el aprendizaje. Que ya fue codificado, almacenado, consolidado y recuperado.
- Factores de crecimiento (BDNF, IGF-1, FGF-2): Expresión proteica
- MDA y Nitritos: Evaluación de lipoperoxidación y el segundo es la producción de óxido nítrico en cerebro.

10.3 Descripción de las técnicas de medición de las variables relevantes

Pruebas conductuales

Para poder valorar la memoria espacial en modelos animales, se han establecido cuatro maneras de navegación que adquieren los roedores para dar una solución a la asignación de tareas espaciales: orientación, guía, cartográfica y de integración de la ruta (33).

En el aprendizaje de orientación, se evalúan los movimientos que aprendieron al llevar a cabo las tareas, es así como los modelos de animales realizan su búsqueda; en el aprendizaje de guía, realizan asociaciones entre el estímulo y la meta; en el aprendizaje cartográfico, mediante un mapa cognitivo hacen una representación de su entorno para localizar la meta; y el aprendizaje de la integración de la ruta consiste en una referencia que es punto de salida antes empezar el recorrido y el modelo animal utiliza pistas cinestésicas y señales vestibulares (33).

Existe un conjunto de pruebas neurológicas para detectar la función cognitiva.

Modelo de estudio de la memoria espacial en roedores

a) Laberinto de acuático de Morris

Este modelo fue diseñado por R.G. Morris con el objeto de evaluar la memoria espacial en ratas. Se caracteriza por ser una piscina en forma circular con agua y en su estructura cuenta con cuatro cuadrantes y en uno de ellos se encuentra una plataforma de escape que tiene que ser identificada por el roedor (Figura 5) (33).

La metodología de este modelo consiste en poner al roedor dentro del circuito y el animal por naturaleza nada buscando la orilla de la pared para poder salir, cuando el roedor tiene un buen aprendizaje entiende que la acción es inútil y busca otra estrategia, nada hasta dar con la plataforma que está sumergida en el agua. Se realizan 4 ensayos, uno por cada cuadrante (norte, sur, este y oeste) con el propósito de valorar la memoria y el aprendizaje del roedor para encontrar la plataforma (33), durante las pruebas, el animal puede pasar por varias estrategias de búsqueda que

disminuyen progresivamente el tiempo requerido para escapar (39). Cuando no hay un aprendizaje y memoria significativa el roedor tarda más en entender que la estrategia de nadar hacia la pared del circuito no es efectiva y una vez entendida tardan más en tener una estrategia (39).

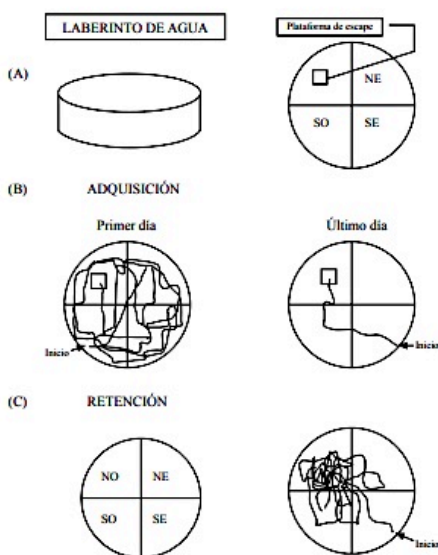


Figura 5. A) Muestra la estructura del laberinto de agua y el cuadro representa la plataforma de escape. B) Muestra la primera fase de adquisición, en donde se ve la primera trayectoria que realiza el roedor siendo evidente un patrón de búsqueda desorientado en comparación con su último día de trayectoria que tiene un patrón de búsqueda ordenado y es directo hacia la plataforma. C) Muestra la prueba final de retención sin plataforma en el circuito en donde el animal ya ha aprendido y nadara más tiempo en donde se encontraba la plataforma. Tomada de Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones, Vicens P et al.

b) Campo abierto

La prueba de campo abierto fue diseñada inicialmente en el año de 1934 para poder analizar el comportamiento en modelos animales de laboratorio. El modelo de campo abierto tiene una forma cuadrada con un área grande, con medidas de 50 cm (largo) x 50 cm (ancho) x 38 cm (altura), con material de madera y no poroso. Consiste en una caja cerrada y las paredes tienen una altura elevada para evitar que los roedores salgan de ella (Figura 6) (40).

Se pueden evaluar distintos parámetros en el campo abierto que involucran la emocionalidad y la actividad motora.

El protocolo que se seguirá para llevar a cabo esta prueba será el siguiente:

1. Se llevarán a los roedores al sitio donde se realizará la prueba para que se aclimaten.

2. Se pasará un roedor a la vez a la caja de campo abierto, y se comenzará a grabar para rastrear el movimiento del roedor, es normal que el roedor se mueva inmediatamente a las paredes periféricas del laberinto.
3. Permitir el movimiento libre e ininterrumpido del ratón sujeto en el cuadrante respectivo del laberinto durante un período de 5 minutos.
4. Al final del período de prueba, se levantará suavemente el ratón sujeto, sacándolo del campo abierto y devolviéndolo a su jaula de origen.
5. Antes de limpiar el laberinto, contar visualmente las bolitas de bolos fecales presentes en el laberinto y registrar manualmente los números para su posterior análisis.
6. Se repetirá el procedimiento con las demás ratas.

Tres aspectos del comportamiento en campo abierto se caracterizan fácilmente mediante este protocolo: 1) Distancia total cubierta (en cm) durante toda la parte cronometrada de la prueba; 2) Tigmotaxis o una medida del porcentaje del tiempo total de prueba de 5 minutos que el sujeto permanece adyacente a la pared exterior del laberinto, lo que es indicativo de un comportamiento similar a la ansiedad; 3) Se contarán el número de bolitas fecales (boli) que quedan en el cuadrante después de retirar el sujeto. La defecación es una medida de la emocionalidad relacionada negativamente en los roedores y se puede utilizar para indicar niveles de ansiedad en el ratón (40).

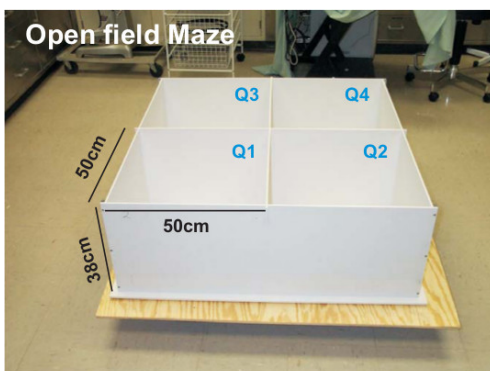


FIGURA 6. Ejemplo de una caja de campo abierto. Las dimensiones de un cuadrante del laberinto son en centímetros y cada cuadrante está identificado (Q1-Q4). Tomado de Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice.

c) Prueba de estimulación táctil (etiqueta)

La prueba de estimulación táctil se ha probado en modelos animales, donde consiste en colocar pedazos pequeños de papel pegajoso (pegatinas) de manera bilateral en las caras radiales de las muñecas o en la parte inferior de las patas delanteras, posteriormente las ratas intentan eliminar los estímulos con su hocico y los dientes (39).

Antes de la operación se realizan 5 ensayos de prueba, en 5 diferentes días para que elimine de forma fiable y rápida las pegatinas. Después de realizar esto, se realizan 4 intentos separados por 10min, en donde las ratas contactarán y eliminarán ambos estímulos dentro de unos 15 segundos (39).

Cuando hay una lesión unilateral en el estriado o de la región de la extremidad anterior de la corteza sensorial, los animales responden primero a las piezas de papel pegajosas en la extremidad anterior antes de responder a las colocadas en la extremidad posterior (39).

Cuando el estímulo del lado no lesionado es eliminado por el experimentador, el animal responde inmediatamente al estímulo contralateral (39).

Técnica ELISA: Esta técnica se hará utilizando anticuerpos específicos. Se colocarán 20 mg de proteínas totales/100 mL de buffer de carbonato 0.1 M de cada alícuota de los homogenizados de las diferentes regiones cerebrales (corteza, cerebelo, tallo y núcleos) y diferentes edades (15 días, 1, 3, 6 y 8 meses), en los pozos de placas de ELISA. Para bloquear los sitios inespecíficos se utilizará albúmina libre de IgG al 0.5%. Los anticuerpos primarios serán incubados por 18 h a 4 °C y los anticuerpos secundarios por 2 h a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica será producida por el sustrato ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethybenz-thiazoline-6-sulfonic acid) conteniendo 0.3% de H₂O₂. Después de 15 min, la densidad óptica será determinada a 415 nm usando un lector de ELISA para multiplacas (Benchmark, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Cuantificación de nitritos por el Método de Griess: se determinará mediante el contenido de ión nitrito (NO_2^-) en los sobrenadantes de las muestras utilizando el método de Griess. El reactivo Griess está compuesto de volúmenes iguales dihidrocloruro de N-1 naftiletildiamino al 0.1% disuelto en agua destilada y sulfanilamida al 1.32% disuelto en ácido acético glial al 60%. La reacción será leída en un espectrofotómetro a 540 nm y la concentración de NO_2^- se determinará extrapolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de NaNO_2 (0.5 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Cuantificación de malonildialdehído (MDA) y 4-Hidroxiálquenos (4-HDA) por el método de Gerard-Monnier: los niveles de MDA y 4-HDA se cuantificarán por el método de Gerard-Monnier. Este ensayo se basará en la reacción entre N-metil-2-fenilindol con MDA y los 4-HDA a 45°C; una molécula de MDA o de 4HDA reaccionarán con 2 moléculas de entre N-metil-2-fenilindol formando un cromóforo estable. Para cuantificar lipoperoxidación en las muestras se tomarán 200 μL del sobrenadante del cerebro, se le adicionará 650 μL de la solución I (compuesta de N-metil-2-fenilindol a una concentración de 10.3 Mm en acetonitrilo y metanol) y 150 μL de ácido metanosulfónico. Las muestras serán incubadas por una hora a 45°C en baño maría. Después serán centrifugadas a 12500 rpm a (4°C) por 15 minutos y leídas en espectrofotómetro a 586 nm.

10.4 Formatos de capturas de datos

ANEXO II
FORMATO DE PESO Y CONSUMO DE ALIMENTO

GRUPO CONTROL			HORA DE INICIO HORA TERMINÓ	
# Rata	Peso	Alimento	Sobrante	Diferencia
GRUPO RESTRICCIÓN CALÓRICA DEL 60% INDIVIDUAL			HORA DE INICIO HORA TERMINÓ	
# Rata	Peso	Alimento	Sobrante	Diferencia
GRUPO RESTRICCIÓN CALÓRICA DEL 60% EN GRUPO			HORA DE INICIO HORA TERMINÓ	
# Rata	Peso	Alimento	Sobrante	Diferencia
GRUPO AYUNO INTERMITENTE			HORA DE INICIO HORA TERMINÓ	
# Rata	Peso	Alimento	Sobrante	Diferencia

10.5 Logística

10.5.1 Recursos humanos

El trabajo estuvo guiado por investigadoras expertas; directora de tesis, docente de la Licenciatura en Nutrición Clínica de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Co-Director externo, profesor investigador de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y

alumnos de posgrado del Laboratorio de Investigaciones Químico-Clínicas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Director: D.C. Guadalupe Soto Rodríguez
- Co-Director: D.C. Bertha Alicia León Chávez
- Alumnos posgrado:
cDC Constantino Tomás-Sánchez
MC Karina Aguilar-Peralta
- Alumna de la Licenciatura en Nutrición Clínica:
Tesisista: pLNC Arizeth Roa Ortega

10.5.2 Recursos materiales

Recurso de infraestructura: se contó con la infraestructura del Laboratorio de Investigaciones Químico-Clínicas de la Facultad de Ciencias Químicas ubicado en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

10.5.3 Recursos financieros

Este proyecto no contó con financiamiento por lo que se realizó con recursos propios de las investigadoras expertas.

10.6 Bioética

Se siguió la Norma Oficial Mexicana; NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, evitando su sufrimiento.

El protocolo experimental fue aprobado por el comité de uso y cuidado animal del CINVESTAV, # 0218-16, se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento y el número de animales usados fue mantenido al mínimo para el diseño experimental.

11 Bibliografía

1. Altman, J. Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? The American Association for the Advancement of Science. 1962; Vol. 135 (3509): pages 1127-1128.
2. Altman, J. Autoradiographic Investigation of Cell Proliferation in the Brains of Rats and Cats. The anatomical record. 1963; Vol. 145(4): 573-591.
3. Altman, J & Das GD. Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. The journal of comparative.1965; Vol. 124(3): 319-35.
4. Rahirant S, Garavito Z, Hurtado H. Técnica inmunocitoquímica para evaluar la proliferación de células en cultivo por la incorporación de bromodeoxiuridina. Biomédica. 2000; 20:144-150.
5. Lois, C., y Alvarez-Buylla, A. The proliferation of cells of the subventricular zone in the mammalian adult prosencephalon can be differentiated into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90 (5), 2074-2077.
6. Ming, G., Song, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*. 2011; 70(4), 687–702.
7. Zainuddin MS. & Thuret S. Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health. *Br Med Bull*. 2012; 103 (1), 89-114.
8. [Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH.](#) Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. *Physiological Reviews*. 2014; 94(4), 991–1026.
9. Rakic, P. Evolution of the neocortex: Perspective from developmental biology. *Nature Reviews. Neuroscience*. 2009; 10(10), 724–735.
10. Prósper F., Verfaillie C.M. Células madre adultas. *Anales Sis San Navarra* [Internet]. 2003 Dic [citado 2018 Julio 26]; 26(3): 345-356. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000500002&lng=es.
11. Santos-Marcial E. Neurogénesis de células progenitoras de la zona subventricular. *Revista Mexicana Neurociencia*. 2008; vol.9(3): Páginas: 202-205
12. Ramírez-Rodríguez Gerardo, Silva-Lucero María del Carmen, Gómez-Virgilio Laura, Ocaña-Fernández María del Ángel, Ortiz-López Leonardo, Torres-Pérez Mario O. et al . Las zonas neurogénicas en el adulto y su relación con las enfermedades neuropsiquiátricas. *Salud Ment* [revista en la Internet]. 2013 Jun [citado 2018 Jul 25] ; 36(3): 201-210. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252013000300005&lng=es.
13. Alvarez-Buylla , A, Garcia-Verdugo, JM. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22 (3) 629 – 634.

14. Lui, J. H., Hansen, D. V., & Kriegstein, A. R. Development and Evolution of the Human Neocortex. *Cell*. 2011; 146(1),18–36.
15. Encinas, J. M., Michurina, T. V., Peunova, N., Park, J.-H., Tordo, J., Peterson, D. A.,... Enikolopov, G. Division-Coupled Astrocytic Differentiation and Age-Related Depletion of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell*. 2011; 8(5), 566–579.
16. Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M., Sun, G.J., Hsu, D., Yan Gu, Meletis, K., et al. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*. 2012; volume 489 (7414), pages 150–154.
17. Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, KA, y Gage, FH. El análisis del destino *in vivo* revela las capacidades multipotenciales y de autorrenovación de las células madre neurales Sox2⁺ en el hipocampo adulto. *Cell Stem Cell*. 2007; 1 (5), 515-528.
18. Kuhn, H. G., Eisch, A. J., Spalding, K., & Peterson, D. A. Detection and Phenotypic Characterization of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016; 8(3).
19. Barkho, BZ, Song, H., Aimone, JB, Smrt, RD, Kuwabara, T., Nakashima, K.,... Zhao, X. Identification of factors expressed in astrocytes that modulate the differentiation of neural stem / progenitor cells. *Stem Cells and Development*. 2006; 15 (3), 407-421.
20. Sato, K. Effects of Microglia on Neurogenesis. *Glia*. 2015; 63(8), 1394–1405.
21. Carpentier PA, Palmer TD. Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron*. 2009; 64(1):79–92.
22. Arias, O., Cortes, V., Madrid, M., García, N., Valentín, M., González, S.,... Alcanzar de San Juan, E. ESTUDIO DEL HIPOCAMPO CON RM: anatomía normal, variantes de la normalidad y patología. *Sociedad Española de Radiología Medica*. 2014; 56 (Espec Cong):1083.
23. Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015; 7(9): a018812.
24. Rodríguez Sáez S. Activación de la neurogénesis en el hipocampo de ratón adulto por factores embrionarios (tesis de maestría). Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina. 2012.
25. Legidos Garcia ME. Bases estructurales de la memoria declarativa. Estudio de la interacción entre la formación del hipocampo y la corteza cerebral en el primate *Macaca fascicularis* (tesis de doctorado). Universidad de Castilla La Mancha. Departamento de Ciencias Médicas. 2014.
26. Piatti, V. C., Ewell, L. A., & Leutgeb, J. K. Neurogenesis in the dentate gyrus: carrying the message or dictating the tone. *Frontiers in Neuroscience*. 2013; 7, 50.

- 27.Olivares, J.A., Juárez, E., y García, F. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV*. 2015; 15 (1): 20-28.
- 28.Ortega, C. & Franco, JC. Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. *Plasticidad Neuronal*. iMedPub Journals. 2010; Vol. 6, N°. 1
- 29.Solis, H. & Lopez, E. Neuroanatomía Funcional de la Memoria. *Arch Neurocién (Mex)*. 2009;Vol. 14, No 3, 176-187.
- 30.Aguirre, E.E. La función del hipocampo en el procesamiento de la memoria y su deterioro durante el envejecimiento. *Revista Mexicana de Neurociencia*. 2015; 16 (4):21-30.
- 31.Eichenbaum, H., & Cohen, N. J. Can we reconcile the declarative memory and spatial navigation views on hippocampal function? *Neuron*. 2014; 83(4), 764–770.
- 32.Eichenbaum, H. The role of the hippocampus in navigation is memory. *Journal of Neurophysiology*. 2017; 117 (4), 1785-1796.
- 33.Vicens P, Redolat R y Carrasco C. Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema*. 2003; Vol. 15, nº 4, pp. 539-544.
- 34.Santín, L. Rubio, S. Begega, A. Miranda, R. Arias, J. Spatial learning and the hippocampus. *Rev. Neurol*. 2000; 31(5): 455-462.
- 35.Aguayo DCA, Sánchez CH, Casasola CC. Alternancia espacial: el laberinto en forma de T, sus procedimientos y procesos. *Rev Mex Neuroci*. 2016; 17(5): 36-48
- 36.Argibay, PF. La regeneración del sistema nervioso central: Cambios de paradigma y medicina regenerativa. *Química Viva [Internet]*. 2006;5(3):33-56. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86350304>
- 37.Decimo, I., Bifari, F., Krampera, M., y Fumagalli, G. Neural stem cell niches in health and diseases. *Current pharmaceutical design*. 2012; 18(13), 1755–1783.
- 38.Encinas, J. M., Vaahtokari, A., & Enikolopov, G. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103(21), 8233–8238.
- 39.Schallert T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2012; 3(4), 497–504.
- 40.Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*. 2015;(96):e52434.
- 41.Ortiz-Bautista, RJ, Aguilar-Salinas, CA, Monroy-Guzmán, A. Restricción calórica: efectos metabólicos positivos e impacto celular. *Cirugía y Cirujanos [Internet]*. 2013;81(5):459-464. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=66228814016>
- 42.Jiménez L., R. Restricción calórica, ¿un camino para la prevención y tratamiento de la diabetes tipo 2? *Revista Chilena de Nutrición [Internet]*.

- 2012;39(3):88-93. Recuperado de:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46923920013>
43. Coll-Risco, I, Camiletti-Moirón, D, Tirado, D, Nebot, E, Andrade, A, Martínez, R, Kapravelou, G, Porres, J, Aranda, P, Aparicio, V. Efectos del ejercicio aeróbico interválico, combinado con entrenamiento de fuerza y de la restricción calórica, sobre la composición corporal de ratas obesas. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte [Internet]*. 2017;10(1):3-8. Recuperado de:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323349686002>
44. Lee, S. H., & Min, K. J. Caloric restriction and its mimetics. *BMB reports*. 2013; 46(4), 181–187.
45. Sharma, N., Castorena, C. M., & Cartee, G. D. Tissue-specific responses of IGF-1/insulin and mTOR signaling in calorie restricted rats. *PLoS one*, 2012; 7(6).
46. Ozonas, RB. Restricción calórica y obesidad. *Real Academia Nacional de Farmacia*. 2016; vol 82.
47. Zainuddin, M. S. A., & Thuret, S. Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health. *British medical bulletin*. 2012; 103(1), 89.
48. Lee, J. Seroogy, KB. Mattson, MP. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. [J Neurochem](#). 2002; 80 (3): 539-47.
49. Cabrera, VS. El control neurotrófico en el desarrollo y la función de dos órganos endocrinos: el ovario y el páncreas. *Revista de Investigación Clínica*. 2007; Vol. 59, Núm. 3, pp 219-228
50. Nicolovius, MN. Garcia, RA. Envejecimiento y memoria: efectos de la restricción calórica. *Rev Neurol*. 2018; 66:415-422
51. More, RG. León LM. Goya GR. Therapeutic potential of IGF-1 on hippocampal neurogenesis and function during aging. *Neurogenesis* 2017.
52. Woodbury ME, et al. Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. *Neuroimmune Pharmacol*. 2014; 9(2):92-101.
53. Blanco AV, Soto RG, González BJ, Beltrán GO, Martínez FD, León CB. Acción neuroinflamatoria y neurotrófica de las quimiocinas durante un proceso isquémico cerebral. *Rev Esp Med Quir*. 2015; 20(2), pp 184-192.
54. Hong YR, Lee H, Park MH, Lee JK, Lee JY, Suh HD, Jeong MS, Bae JS, Jin HK. CCL2 induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation in Niemann-Pick type C mice. *J Vet Med*. 2015; 77(6):693-9
55. Hornsby AK, Redhead YT, Rees DJ, Ratcliff MS, Reichenbach A, Wells T. et al. Short-term calorie restriction enhances adult hippocampal neurogenesis and remote fear memory in a Ghnr-dependent manner. *Psychoneuroendocrinology*. 2016; 63:198-207.

- 56.Soto RG. Estudio de la expresión de quimiocinas en la rata taiep, un modelo animal de hipomielinización / desmielinización. [Tesis doctoral]. Puebla: Laboratorio de investigación Clínico – Químico; 2013.
- 57.Marion S. Buckwalter, Makiko Yamane, Bronwen S. Coleman, Brandi K. Ormerod, Jocelyn T. Chin, Theo Palmer, Tony Wyss-Coray. Chronically Increased Transforming Growth Factor- β 1 Strongly Inhibits Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. Elsevier. 2006; Volumen 169: páginas 154-164
- 58.Daniela Battista, Carina C. Ferrari, Fred H. Gage, Fernando J. Pitossi. Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor β increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. European journal of neuroscience. 2006; volume 23: páginas 83-93.
- 59.Shichiri, Mototada. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2014; vol. 54,3: páginas 161-60.
- 60.Enrique Torres Rasgado. Nitration de la Tyrosine dans l'albumine et les lipoprotéines. [Tesis doctoral]. Université Paul Cézanne Aix-Marseille III; 2007.
- 61.Aneeqa Noor, Saadia Zahid. Alterations in adult hippocampal neurogenesis, aberrant protein s-nitrosylation, and associated spatial memory loss in streptozotocin-induced diabetes mellitus type 2 mice. Iranian journal of basic medical sciences. 2017; vol. 20(10): páginas: 1159-1165
- 62.Barcia JM, Flores-Bellver M, Muriach M, Sancho-Pelluz J, López-Malo D, Urdaneta AC, Martínez-Gil N, et al. Matching Diabetes and Alcoholism: Oxidative Stress, Inflammation, and Neurogenesis Are Commonly Involved. Mediators of Inflammation. 2015; vol. 2015: 624287.
- 63.Parque HR , Parque M, Choi J, Parque KY, Chung HY, Lee J. A high-fat diet impairs neurogenesis: Involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett*. 2010; vol. 482. Páginas 235-239.
- 64.Ashtary-Larky D, Ghanavati M, Lamuchi-Deli N, Payami SA, Alavi-Rad S, Boustaninejad M, Afrisham R, Abbasnezhad A, Alipour M. Rapid Weight Loss vs. Slow Weight Loss: Which is More Effective on Body Composition and Metabolic Risk Factors? *Int J Endocrinol Metab*. 2017; 15 (3): e13249.
- 65.Xydakis AM, Caso CC, Jones PH, Hoogeveen RC, Liu MY, Smith EO, Nelson KW, Ballantyne CM. Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6): 2697-703.
- 66.García de Lorenzo y Mateos, Abelardo, Rodríguez Montes, José Antonio. Metabolismo en el ayuno y la agresión. Su papel en el desarrollo de la desnutrición relacionada con la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria* [Internet]. 2013;6(1):1-9. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309228933001>

67. Gómez-Abellán P, Hernández-Morante JJ, Luján JA, Madrid JA, Garaulet M. Clock genes are implicated in the human metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(1): 121-8.
68. Escobar, C., Castellanos, M.Á., Rodríguez, K.L., & Salgado, R. Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos. *Rev Fac Med UNAM*. 2007; 50 (6): 238-241.
69. Reig Garcia GM, Rizo Baeza, Mercedes, Cortes Castell. Factores de pérdida de peso y grasa en el tratamiento dietético: sexo, edad, índice de masa corporal y consulta de asistencia. *Nutr. Hosp*. 2015; 32 (3): 1028-1035
70. Santos R, Bulteau AL, Gomes CM. Neurodegeneration, Neurogenesis, and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2016.
71. Andrew B. Knott & Ella Bossy-Wetzel. Nitric Oxide in Health and Disease of the Nervous System. *Forum Review Articles*. 2009; 11 (3): 541-554.
72. Filipović D, Todorović N, Bernardi RE, Gass P. Oxidative and nitrosative stress pathways in the brain of socially isolated adult male rats demonstrating depressive- and anxiety-like symptoms. *Brain Struct Funct*. 2017 Jan;222(1):1-20.
73. Martin-Subero M, Anderson G, Kanchanatawan B, Berk M, Maes M. Comorbidity between depression and inflammatory bowel disease explained by immune-inflammatory, oxidative, and nitrosative stress; tryptophan catabolite; and gut-brain pathways. *CNS Spectr*. 2016 Apr; 21(2):184-98.
74. Bindu D. Paul and Solomon H. Snyder. Therapeutic Applications of Cysteamine and Cystamine in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Diseases. 2019; 10: 1315.
75. Gültekin F, Nazıroğlu M, Savaş HB, Çiğ B. Calorie restriction protects against apoptosis, mitochondrial oxidative stress and increased calcium signaling through inhibition of TRPV1 channel in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis*. 2018 Oct; 33(5):1761-1774.
76. Calderón Salinas José Víctor, Muñoz Reyes Elvia Guadalupe, Quintanar Escorza Martha Angélica. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev. educ. bioquím [revista en la Internet]*. 2013 [citado 2019 NOV 07]; 32(2): 53-66. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952013000200002&lng=es.
77. Walton NM, Shin R, Tajinda K, Heusner CL, Kogan JH, Miyake S, Chen Q, Tamura K, Matsumoto M. Adult neurogenesis transiently generates oxidative stress. *PLoS One*. 2012;7(4): e35264.
78. Talarowska M, Gałeczki P, Maes M, Bobińska K, Kowalczyk E. Total antioxidant status correlates with cognitive impairment in patients with recurrent depressive disorder. *Neurochem Res*. 2012 Aug;37(8):1761-7.

79. Charles V Vorhees & Michael T Williams. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*. 2006. volume 1, pages 848–858.
80. Carrillo-Mora Paul, Giordano Magda, Santamaría Abel. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *ELSEVIER*. 2009; 203 (2): 151-164.
81. Polanco, Lady Andrea, Vargas-Irwin, Cristina, Góngora, Manuel Eduardo, *MODELOS ANIMALES: UNA REVISIÓN DESDE TRES PRUEBAS UTILIZADAS EN ANSIEDAD*. *Suma Psicológica* [Internet]. 2011;18(2):141-148. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=134222985011>
82. Cardoso A, Marrana F, Andrade JP. Caloric restriction in young rats disturbs hippocampal neurogenesis and spatial learning. *Send to Neurobiol Learn Mem*. 2016 Sep;133:214-224.
83. Tim Schallert & Martin T. Woodlee. Orienting and Placing. En: Director Ian Q. Whishaw. *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. Publicado en Oxford Scholarship Online: 2009. 129-135.
84. Ruan L, Wang B. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. *Brain Res*. 2015 Oct 14;1623:166-73.
85. Kalluri HS, Dempsey RJ. Growth factors, stem cells, and stroke. *Neurosurg Focus*. 2008; 24(3-4):E14.
86. Nieto-Estévez V, Defterali C, Vicario-Abejón C. IGF-I: A Key Growth Factor that Regulates Neurogenesis and Synaptogenesis from Embryonic to Adult Stages of the Brain. *Front Neurosci*. 2016 Feb 23;10:52.
87. Straus DS, Takemoto CD. Effect of fasting on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-I gene transcription in rat liver. *Mol Endocrinol*. 1990 Jan; 4(1):91-100.
88. Milman S, Atzmon G, Huffman DM, Wan J, Crandall JP, Cohen P, Barzilai N. Low insulin-like growth factor-1 level predicts survival in humans with exceptional longevity. *Aging Cell*. 2014 Aug;13(4):769-71.
89. Perice L, Barzilai N, Verghese J, Weiss EF, Holtzer R, Cohen P, Milman S. Lower circulating insulin-like growth factor-I is associated with better cognition in females with exceptional longevity without compromise to muscle mass and function. *Aging (Albany NY)*. 2016 Oct 14; 8(10):2414-2424.
90. Li JY, Liu J, Manaph NPA, Bobrovskaya L, Zhou XF. ProBDNF inhibits proliferation, migration and differentiation of mouse neural stem cells. *Brain Res*. 2017 Aug 1;1668:46-55.
91. Yoshida T, Ishikawa M, Niitsu T, Nakazato M, Watanabe H, Shiraishi T, Shiina A, Hashimoto T, Kanahara N, Hasegawa T, Enohara M, Kimura A, Iyo M, Hashimoto K. Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with major depressive disorder. *PLoS One*. 2012;7(8):e42676.

92. Foltran RB, Diaz SL. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J Neurochem*. 2016 Jul;138(2):204-21.
93. Chen J, Li CR, Yang H, Liu J, Zhang T, Jiao SS, Wang YJ, Xu ZQ. proBDNF Attenuates Hippocampal Neurogenesis and Induces Learning and Memory Deficits in Aged Mice. *Neurotox Res*. 2016 Jan;29 (1):47-53.
94. Ying Sun, Yoon Lim, Fang Li, Shen Liu, Jian-Jun Lu, Rainer Haberberger, Jin-Hua Zhong, and Xin-Fu Zhou. ProBDNF Collapses Neurite Outgrowth of Primary Neurons by Activating RhoA/PLoS One. 2012; 7(4): e35883.
95. Barnes P, Thomas KL. Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *PLoS One*. 2008 Sep 24; 3(9):e3248.