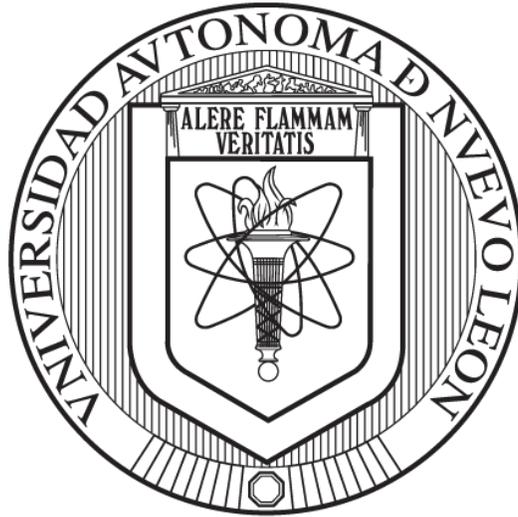


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA**  
**EN CEREBRO DE RATONES ENVEJECIDOS**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. CRISTINA SARAHI RÍOS VÁZQUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

**JUNIO 2025**

# **“EFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA EN CEREBRO DE RATONES ENVEJECIDOS”**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas**

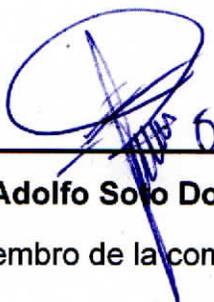
Directora de Tesis



---

**Dra. C. Sheila Adela Villa Cedillo**

Codirectora de Tesis



---

**Dr. C. Adolfo Solo Domínguez**

Miembro de la comisión



---

**Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez**

Subdirector de Estudios de Posgrado

# **EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA EN CEREBRO DE RATONES ENVEJECIDOS**

Presentado por:

Q.F.B. Cristina Sarahi Ríos Vázquez

Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas y la codirección de la Dra. C. Sheila Adela Villa Cedillo.



---

Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas

**Directora de tesis**



---

Dra. C. Sheila Adela Villa Cedillo

**Codirectora de tesis**

**“Maybe I made a mistake yesterday, but yesterday’s me is still me. I am who I am today, with all my faults. Tomorrow I might be a tiny bit wiser, and that’s me too.** These faults and mistakes are what I am, making up the brightest stars in the constellation of my life. **I have come to love myself for who I was, who I am, and who I hope to become”** – 김남준

# AGRADECIMIENTOS

## **A mi abuelo, Mario**

Gracias abuelito, porque durante tu vida me hiciste sentir especial e imparable.

Gracias por permitirme creer que era capaz de lograr todo lo que en algún momento me llegara a proponer, por entender que era yo, Cristina, quien lo haría, nadie más.

Gracias por abrir mi mente, por abrazarme en los momentos donde temía ser una mujer en la ciencia, por darme las palabras de apoyo que siempre necesitaba.

Te dedico mi tesis principalmente a ti por siempre creer en mí y apoyarme hasta donde la vida te lo permitió, siempre sentiré tu amor y apoyo en todo el camino que me falta por recorrer, porque sé que estás a mi lado en cada momento.

## **A mi madre, Verónica**

Por su toda su paciencia, por su inmenso amor, por su apoyo y compañía. Por ser mi mayor sostén en esta vida, por no dejarme sola nunca en cada una de mis aventuras.

## **A mi padre, Eduardo**

Por permitirme seguir mis sueños de ser investigadora, por abrir su mente al comprender que éste es el camino que he elegido.

Por brindarme su tiempo y amor al escucharme cuando no podía conmigo misma, por dejar que mi voz sea escuchada en todo momento.

### **A mi sobrino, Jesús**

Por ser mi eterno recordatorio de la razón por la cual hago investigación: por la curiosidad de saber. Por ser mi compañero, quien me brinda tanto amor solo por existir, quien me recuerda la pasión por compartir mi conocimiento.

### **A mis hermanas Estephane, Cynthia y a mi hermano Eduardo**

Por preocuparse tanto por mí durante este proceso, por permitirme crecer, equivocarme y aprender sin miedo a estar sola. Muchas gracias por brindarme espacio y por amarme siempre.

### **A la doctora Odila**

Gracias por creer en mí y apoyarme desde aquel verano de investigación del 2021, por brindarme la oportunidad de aprender de usted, por compartirme su conocimiento con tanta pasión y paciencia.

Gracias, por abrazarme en cada momento donde sentía inseguridad, por cada momento donde me otorgó palabras de afirmación sobre mi potencial y capacidad en este mundo de la investigación. Gracias por permitirme ser parte de su equipo.

### **A la doctora Sheila**

Por ser mi mentora, mi maestra, por enseñarme a trabajar y desenvolverme en el laboratorio, por resolver todas y cada una de mis dudas con paciencia.

Gracias por permitirme recurrir a ti cuando tenía miedo, por abrazarme y consolarme en cada uno de esos momentos. Gracias por todo tu amor, por todo tu apoyo, por ser parte de mi crecimiento y mi proceso.

### **Al doctor Adolfo**

Por brindarme de su tiempo, por escucharme y apoyarme en todos los semestres. Gracias por cada una de las largas pláticas que me brindó, donde me consoló con sus historias y palabras, dándome fuerzas para continuar y terminar esta gran aventura. Muchas gracias por brindarme un refugio, por tenerme paciencia, por guiarme en todo momento.

### **A mis compañeros de posgrado, Gloria, y Ulises**

Por brindarme apoyo al resolver mis dudas con diversos temas o experimentos, por las palabras de aliento cuando sentía inseguridad respecto a mi trabajo, por cada una de las ocasiones donde tuve la oportunidad de convivir con ustedes, de conocerlos, escucharlos y aprender. Gracias por haber coincidido conmigo.

### **A mis amigos y compañeros de maestría, Juan Carlos y Edgar Piña**

Por tenerme paciencia, por ayudarme a encontrar un equilibrio en mi desarrollo al trabajar en equipo, por corregirme y hacerme ver mis errores de forma amable. Gracias por ser mis compañeros de maestría, por la convivencia estudiando para los exámenes, por las tardes en las que tuvimos que repetir prácticas (más de una vez) y por las noches de pláticas en los momentos de estrés académico.

Gracias por los abrazos, por la compañía, por las palabras, por ser las personas que constantemente me hacían recordar por qué estaba haciendo esto.

Cada uno desde su propia historia, logramos acabar nuestra aventura llamada maestría. Les deseo el mayor de los éxitos, mis compañeros.

### **A mis amigos de laboratorio, Eduardo y Daniel**

Por acompañarme en este proceso, que resultó más ameno por estar con ustedes. Gracias por cuidarme, por protegerme, por sostenerme. Les debo una cantidad inmensa de “gracias” por cada día que estuvieron conmigo.

Gracias por brindarme en todo momento palabras de apoyo, de consuelo, por darme de su tiempo haciéndome compañía, por no dejarme sola. Por hacerme recuperar mi autenticidad, mi confianza en mí, por hacerme reír tanto.

### **A mi amigo, compañero y consejero, Edgar Montes**

Quien coincidió desde el primer día conmigo, ¿será que el universo tenía preparado que dos géminis se encontraran en su camino? Muchas gracias por tener interés en mí y buscar crear un vínculo conmigo, fui muy afortunada al conocerte.

Agradezco haber encontrado a una persona con tanta madurez emocional en este proceso, quien me ayudó a mantener mi mente enfocada en cumplir esta meta y a creer en mí misma, en mi potencial.

Gracias por cada ocasión donde me escuchaste, donde me permitiste hablar para quejarme, para buscar una respuesta, donde me brindaste consejos, observaciones y regaños que no sabía que necesitaba, gracias por brindarme de tu conocimiento, de tus experiencias, y por buscar siempre ayudarme en todo momento.

Te quiero mucho Eddie, lo logramos, ¿vamos por el doctorado, colega?

**A mi compañero, a mi mejor amigo, a mi persona vitamina, Armando Valenzuela**

Una cuartilla no es suficiente espacio para plasmar cada una de las palabras que quisiera escribir para agradecer por cada momento que viví junto a ti.

Armando, mi único compañero que comprendió la complejidad de haber enfocado nuestros proyectos en uno de los sistemas más interesantes, bonitos y complicados del cuerpo humano: el sistema nervioso.

Me siento orgullosa de nosotros, del gran equipo que hicimos durante la maestría.

Gracias Armando, por haberte acercado a mí, por pedirme hacer equipo juntos, por interesarte en formar una amistad, gracias por ser paciente en mi proceso de confiar en ti. Y es que, quien llegó a conocernos durante estos dos años, sabe que no podría haber existido un Armando sin su Cristina, y yo no podría haber sobrevivido (ni vivido) estos dos años sin mi Armando.

Gracias por ser parte de mi crecimiento como neurocientífica, por brindarme siempre tus brazos y hombros cuando ocupaba consuelo, cuando me sentía abrumada, con miedo. Gracias por cada una de tus palabras, que con tanto amor y paciencia me brindaste en cada noche de crisis por mi propuesta, avance y terminación. Gracias por siempre estar a mi lado, por crecer emocionalmente junto a mí. Gracias, por ser mi solecito, mi persona vitamina, por arreglar algo que tú no rompiste, pero que decidiste que no iba a romperme a mí, gracias por no soltarme.

Te amo con todo mi corazón y sé que el vínculo que creamos se mantendrá siempre.

# TABLA DE CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS .....  | 13        |
| LISTA DE TABLAS .....   | 14        |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....   | 15        |
| RESUMEN .....   | 16        |
| <b>CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN .....</b>                                  | <b>17</b> |
| <b>CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES .....</b>                                  | <b>18</b> |
| <b>2.1 Esperanza de vida.....</b>                                     | <b>18</b> |
| <b>2.2 Esperanza de vida saludable .....</b>                          | <b>19</b> |
| <b>2.3 Envejecimiento.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>2.4 Mantenimiento de la homeostasis en el envejecimiento .....</b> | <b>21</b> |
| <b>2.4.1 Autofagia .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>2.4.2 Apoptosis .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>2.5 Enfermedades asociadas al envejecimiento.....</b>              | <b>25</b> |
| <b>2.6 Enfermedades neurodegenerativas .....</b>                      | <b>26</b> |
| <b>2.7 Estrategias anti-envejecimiento .....</b>                      | <b>28</b> |
| <b>2.7.1 Estilo de vida.....</b>                                      | <b>28</b> |
| <b>2.7.1.1 Dieta.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>2.7.1.2 Regímenes alimenticios .....</b>                           | <b>29</b> |
| <b>2.8 Uso de la restricción calórica en modelos animales .....</b>   | <b>30</b> |

|  |    |
|--|----|
| <b>CAPÍTULO 3 JUSTIFICACIÓN</b> .....                          | 32 |
| <b>CAPÍTULO 4 HIPÓTESIS</b> .....                              | 32 |
| <b>CAPÍTULO 5 OBJETIVO GENERAL</b> .....                       | 33 |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....                             | 33 |
| <b>CAPÍTULO 6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....                | 34 |
| <b>CAPÍTULO 7 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                   | 35 |
| <b>7.1 Material</b> .....                                      | 35 |
| <b>7.1.1 Material biológico</b> .....                          | 35 |
| <b>7.1.2 Reactivos</b> .....                                   | 36 |
| <b>7.2 Equipo de laboratorio</b> .....                         | 37 |
| <b>7.2.1 Cuantificación del alimento</b> .....                 | 37 |
| <b>7.2.2 Perfusión cardíaca</b> .....                          | 37 |
| <b>7.2.3 Procesamiento del tejido</b> .....                    | 37 |
| <b>7.2.4 Microscopía</b> .....                                 | 37 |
| <b>7.3 Análisis de datos</b> .....                             | 38 |
| <b>CAPÍTULO 8 METODOLOGÍA</b> .....                            | 38 |
| <b>8.1 Cuantificación del consumo diario de alimento</b> ..... | 38 |
| <b>8.2 Administración del régimen alimenticio</b> .....        | 39 |
| <b>8.3 Diseño experimental</b> .....                           | 40 |
| <b>8.4 Obtención de los tejidos</b> .....                      | 40 |

|  |    |
|--|----|
| <b>8.5 Inclusión de tejidos en parafina</b> .....  | 41 |
| <b>8.6 Microtomía</b> .....  | 41 |
| <b>8.7 Tinciones</b> .....   | 41 |
| <b>8.7.1 Tinción hematoxilina y eosina (H&amp;E)</b> .....   | 42 |
| <b>8.7.2 Método de Nissl</b> .....   | 43 |
| <b>8.7.3 Método de Klüver Barrera</b> .....  | 43 |
| <b>8.8 Regiones de estudio</b> .....   | 44 |
| <b>8.8.1 Análisis morfométrico – Hematoxilina y Eosina</b> .....   | 45 |
| <b>8.8.2 Análisis morfométrico – Método de Nissl</b> .....   | 46 |
| <b>8.8.3 Análisis morfométrico – Método de Klüver-Barrera</b> .....  | 47 |
| <b>8.9 Inmunomarcaje de cortes en parafina</b> .....   | 48 |
| <b>8.9.1 Inmunofluorescencia indirecta LC3IIB</b> .....  | 48 |
| <b>8.9.2 Ensayo TUNEL</b> .....  | 49 |
| <b>8.10 Análisis estadístico</b> .....   | 50 |
| <b>CAPÍTULO 9 RESULTADOS</b> .....   | 52 |
| <b>9.1 Evaluación de la estructura general del hipocampo</b> .....   | 52 |
| <b>9.2 La restricción calórica preserva la morfología del giro dentado al mantener su grosor estructural durante el envejecimiento</b> ..... | 53 |
| <b>9.3 La restricción calórica no induce cambios en el número de núcleos neuronales del giro dentado durante el envejecimiento</b> .....     | 55 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>9.4 La restricción calórica previene la disminución del tamaño de los núcleos neuronales en el giro dentado durante el envejecimiento .....</b>  | <b>57</b> |
| <b>9.5 La restricción calórica no induce cambios en la densidad de la mielina del cuerpo calloso durante el envejecimiento.....</b>                 | <b>59</b> |
| <b>9.6 La restricción calórica disminuye el proceso de apoptosis en el giro dentado durante el envejecimiento.....</b>                              | <b>61</b> |
| <b>9.7 La restricción calórica no induce cambios en el proceso de autofagia en las neuronas del giro dentado durante el envejecimiento.....</b>     | <b>63</b> |
| <b>9.8 La restricción calórica no induce cambios estructurales en la capa granular y molecular del cerebelo durante el envejecimiento.....</b>      | <b>66</b> |
| <b>9.10 La restricción calórica ejerce un efecto neuroprotector sobre las neuronas de Purkinje del cerebelo durante el envejecimiento .....</b>     | <b>71</b> |
| <b>9.11 La restricción calórica previene los cambios morfológicos asociados al envejecimiento sobre las neuronas de Purkinje del cerebelo .....</b> | <b>73</b> |
| <b>9.12 La restricción calórica reduce la apoptosis de neuronas de Purkinje en el cerebelo durante el envejecimiento.....</b>                       | <b>75</b> |
| <b>CAPÍTULO 10 DISCUSIÓN.....</b>   | <b>81</b> |
| <b>CAPÍTULO 11 CONCLUSIONES .....</b>   | <b>87</b> |
| <b>CAPÍTULO 12 REFERENCIAS .....</b>  | <b>88</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Esperanza de vida saludable y años vividos con discapacidad o enfermedad .....   | 20 |
| Figura 2. Características del envejecimiento.....  | 22 |
| Figura 3. Principales enfermedades neurodegenerativas y regiones cerebrales afectadas durante el envejecimiento .....  | 27 |
| Figura 4. Estrategia experimental .....  | 34 |
| Figura 5. Representación esquemática de las regiones analizadas para el estudio morfométrico.....  | 44 |
| Figura 6. Microfotografías representativas del hipocampo de cerebros de ratones envejecidos con y sin restricción calórica teñidos con hematoxilina y eosina ..... | 52 |
| Figura 7. La restricción calórica previene la disminución del grosor del giro dentado en un modelo murino de envejecimiento .....                                  | 54 |
| Figura 8. La restricción calórica no modifica la cantidad de núcleos neuronales en el giro dentado en un modelo murino de envejecimiento .....                     | 56 |
| Figura 9. La restricción calórica previene la disminución del tamaño de los núcleos neuronales en el giro dentado en un modelo murino de envejecimiento.....       | 58 |
| Figura 10. La restricción calórica no influye en la densidad de mielina del cuerpo caloso en un modelo animal de envejecimiento .....                              | 60 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 11. La restricción calórica disminuye la apoptosis neuronal en el giro dentado en un modelo murino de envejecimiento .....</b>  | <b>62</b> |
| <b>Figura 12. La restricción calórica no induce cambios en el proceso de autofagia en el giro dentado en un modelo animal de envejecimiento ...</b>                               | <b>65</b> |
| <b>Figura 13. La restricción calórica no induce cambios en la capa granular y molecular del cerebelo en un modelo animal de envejecimiento .....</b>                              | <b>68</b> |
| <b>Figura 14. La restricción calórica no influye en la densidad de mielina en la sustancia blanca del cerebelo en un modelo animal de envejecimiento</b>                          | <b>70</b> |
| <b>Figura 15. La restricción calórica previene la disminución de neuronas de Purkinje en el cerebelo de un modelo murino de envejecimiento .....</b>                              | <b>72</b> |
| <b>Figura 16. La restricción calórica promueve la preservación de la morfología normal de las neuronas de Purkinje en el cerebelo de un modelo murino de envejecimiento .....</b> | <b>74</b> |
| <b>Figura 17. La restricción calórica disminuye la apoptosis de neuronas de Purkinje en el cerebelo en un modelo murino de envejecimiento .....</b>                               | <b>77</b> |
| <b>Figura 18. La restricción calórica no induce cambios en el proceso de autofagia en las neuronas de Purkinje en el cerebelo en un modelo animal de envejecimiento. ....</b>     | <b>81</b> |

## **LISTA DE TABLAS**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1 Promedio de alimento consumido diariamente por individuo.....</b> | <b>38</b> |
| <b>Tabla 2. Grupos experimentales. ....</b>                                  | <b>40</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|  |   |
|--|---|
| Del inglés "Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3" ( <b>LC3</b> )             | Gramos ( <b>g</b> )                                   |
| Ácido desoxirribonucleico ( <b>ADN</b> )   | Miligramos ( <b>mg</b> )                              |
| Del inglés "B-cell lymphoma 2" ( <b>BCL-2</b> )  | Kilogramos ( <b>kg</b> )                              |
| Del inglés "Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1" ( <b>mTORC1</b> )                   | Del inglés "Phosphate-buffered saline" ( <b>PBS</b> ) |
| Del inglés "AMP-activated protein kinase" ( <b>AMPK</b> )                                  | Porcentaje (%)  |
| Sirtuina ( <b>SIRT</b> )   | Positivo ( <b>+</b> )                                 |
| "Nicotinamida adenina dinucleótido" ( <b>NAD<sup>+</sup></b> )                             | Milímetros ( <b>mm</b> )                              |
| Del inglés "Lysosome-associated membrane protein 2" ( <b>LAMP2</b> )                       | Micrómetros ( <b>µm</b> )                             |
| Inmunoglobulina G ( <b>IgG</b> )   | Grados Celsius ( <b>°C</b> )                          |
| Del inglés "Tetramethylrhodamine isothiocyanate" ( <b>TRITC</b> )                          | Hematoxilina y eosina ( <b>H&amp;E</b> )              |
| Del inglés "4',6-diamidino-2-phenylindole" ( <b>DAPI</b> )                                 | Esclerosis lateral amiotrófica ( <b>ELA</b> )         |
| Del inglés "Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling" ( <b>TUNEL</b> ) | Restricción calórica ( <b>RC</b> )                    |
| Forma lipida de LC3 ( <b>LC3IIB</b> )  | Giro dentado ( <b>GD</b> )                            |
| Del inglés "Terminal deoxynucleotidyl transferase" ( <b>TdT</b> )                          | Capa molecular del giro dentado ( <b>MoGD</b> )       |
| Del inglés "Deoxynucleotide triphosphates" ( <b>dNTP</b> )                                 | Capa granular del giro dentado ( <b>GrGD</b> )        |
| Microlitro ( <b>µL</b> )   | Capa polimórfica del giro dentado ( <b>PoGD</b> )     |
| Manganeso ( <b>Mn<sup>2+</sup></b> )   | Capa molecular ( <b>CM</b> )                          |
| Potencial de hidrógeno ( <b>pH</b> )   | Capa de células de Purkinje ( <b>CP</b> )             |
|  | Capa granular ( <b>CG</b> )                           |
|  | Sustancia blanca ( <b>SB</b> )                        |
|  | Morfología normal ( <b>Mn</b> )                       |
|  | Morfología hipercromática ( <b>Mhc</b> )              |
|  | Morfología picnótica ( <b>Mp</b> )                    |

# RESUMEN

Q.F.B Cristina Sarahi Ríos Vázquez

Fecha de Titulación: Junio 2025

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del estudio: "EFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA EN CEREBRO DE RATONES ENVEJECIDOS"

Páginas en el estudio: 98

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Morfología

Área de estudio: Morfología

**Propósito y Método del Estudio:** El estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de la restricción calórica (RC) sobre los cambios morfológicos y moleculares asociados al envejecimiento cerebral en un modelo murino. Se enfocó en dos regiones vulnerables: el hipocampo y el cerebelo. Para ello, se utilizaron ratones C57BL/6J divididos en grupos alimentados *ad libitum* o con RC del 40%, desde los 2 meses de edad hasta los 12 o 16 meses. Se realizaron análisis histológicos (hematoxilina-eosina, Nissl, Klüver-Barrera) e inmunofluorescencia para evaluar apoptosis (TUNEL) y autofagia (LC3-IIB), y se aplicaron técnicas morfométricas y estadísticas para el análisis de resultados.

**Conclusiones y Contribuciones:** La RC mitigó varios cambios asociados al envejecimiento, como la reducción del grosor del giro dentado, el tamaño nuclear neuronal y la degeneración de neuronas de Purkinje. También disminuyó significativamente la apoptosis en hipocampo y cerebelo, y mostró una tendencia en el incremento de la actividad autofágica detectada por LC3-IIB, sin modificar de forma relevante la mielinización. Estos hallazgos respaldan el efecto neuroprotector de la RC, señalando su potencial como estrategia para preservar la integridad neuronal en regiones clave para las funciones cognitivas y motoras durante el envejecimiento.



---

Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas

Directora de tesis

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los avances médicos y tecnológicos han incrementado la esperanza de vida a nivel global, permitiendo que una mayor proporción de la población supere los 60 años (PAHO, 2023). Sin embargo, este aumento en la longevidad no siempre se correlaciona con una mejor calidad de vida, ya que se ha reportado la incidencia de enfermedades crónicas y discapacidades asociadas con la edad (Mathers, 2001).

El envejecimiento es un proceso biológico complejo caracterizado por el deterioro progresivo de la homeostasis celular y tisular, influido por múltiples mecanismos (López, 2023). Estos cambios afectan especialmente al sistema nervioso, donde la acumulación de daño celular y la disminución de mecanismos protectores como la autofagia y la apoptosis contribuyen a la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Aman, 2021). Las enfermedades neurodegenerativas se han vuelto más prevalentes con la edad, debido a la pérdida neuronal, alteraciones sinápticas y disfunción glial en regiones vulnerables del encéfalo como el hipocampo y el cerebelo (Hou, 2019).

Diversas investigaciones recientes han puesto de manifiesto que ciertos factores modificables del estilo de vida, como la actividad física y la alimentación, desempeñan un papel fundamental en la prevención de enfermedades crónicas. En el ámbito nutricional, destacan dos enfoques que han sido ampliamente estudiados: el ayuno intermitente y la restricción calórica (RC). El primero consiste en alternar

períodos definidos de ayuno con periodos de consumo de alimentos, modificando principalmente el momento de la ingesta. Por otro lado, la RC implica una reducción sostenida en el consumo total de calorías, sin provocar desnutrición, y suele oscilar entre un 10 – 40% de reducción respecto a la ingesta calórica habitual (Shetty, 2018).

Frente a este panorama, la RC ha surgido como una estrategia prometedora para mitigar los efectos del envejecimiento. Estudios en modelos animales han demostrado que la RC mejora la función mitocondrial, estimula la autofagia y reduce la inflamación, prolongando la esperanza de vida saludable (Hansen, 2018; Behr, 2023).

A pesar de los avances en la investigación, todavía se desconoce en gran medida como afecta la RC al tejido cerebral a nivel funcional y estructural. En particular, no se ha determinado existencia de algún tipo de daño morfológico que esta condición podría ocasionar en las diferentes regiones del sistema nervioso central, lo que limita la comprensión de sus mecanismos patológicos y las posibles implicaciones clínicas.

## **CAPÍTULO 2**

### **ANTECEDENTES**

#### **2.1 Esperanza de vida**

La esperanza de vida hace referencia a la cantidad de tiempo que un miembro de una especie puede esperar vivir. Es una característica poblacional y suele definirse

como la edad a la que aún sobrevive la mitad de los integrantes de dicha población (Moody, 2001).

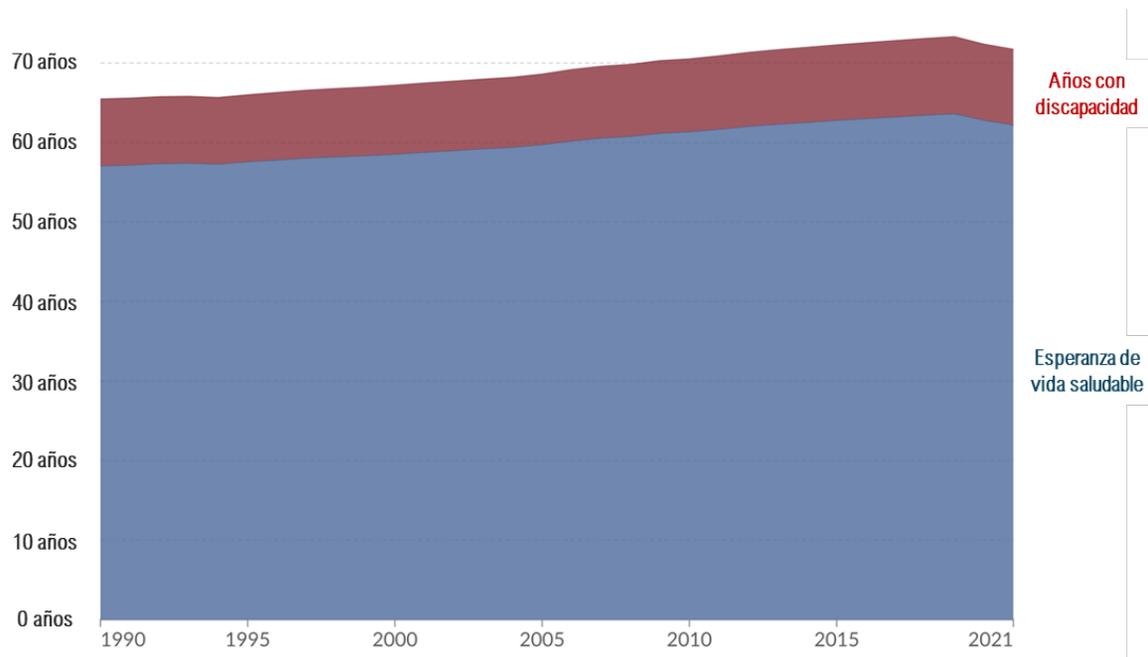
En las últimas décadas, avances significativos como el desarrollo de fármacos (principalmente antibióticos), la mejora en las condiciones de saneamiento (acceso a agua potable y alimentos seguros), así como el progreso en el diagnóstico y la atención médica, han contribuido notablemente al aumento de la esperanza de vida, la cual, en muchas regiones alcanza e incluso supera los 60 años. Este fenómeno ha dado lugar a un aumento en la proporción de personas mayores a nivel global (Ritchie, 2024).

## **2.2 Esperanza de vida saludable**

En los últimos años, se ha observado un aumento en la incidencia de enfermedades crónicas y discapacidades en la población adulta mayor, lo que evidencia que la esperanza de vida no está acompañada de una mejora proporcional en la calidad de vida (PAHO, 2023).

A partir de este fenómeno, surge el concepto de esperanza de vida saludable, que hace referencia a los años que una persona puede vivir sin presentar enfermedades incapacitantes ni discapacidades graves, es decir, con una calidad de vida funcional y autónoma (Figura 1) (Mathers, 2001).

En este contexto, los entornos desempeñan un papel clave en el bienestar a lo largo de la vida. Factores como la exposición a riesgos ambientales, la violencia, la calidad del aire, el acceso a atención médica, el estilo de vida y el apoyo social influyen directamente en cómo se experimenta el envejecimiento (WHO, 2022).



**Figura 1. Esperanza de vida saludable y años vividos con discapacidad o enfermedad.**

Esperanza de vida al nacer en función de los años vividos en condiciones de plena salud (color azul) frente a los años afectados por enfermedad o discapacidad (color rojo). (Fuente: <https://ourworldindata.org/life-expectancy>).

### 2.3 Envejecimiento

Comprender los mecanismos biológicos asociados al envejecimiento permite interpretar mejor los factores que influyen en la calidad de vida durante la vejez.

A nivel biológico, el envejecimiento resulta del impacto de la acumulación de una amplia variedad de daños moleculares y celulares que ocurren a lo largo del tiempo, como el estrés oxidativo, daño al ADN, entre otros. Este proceso conduce a una disminución progresiva de la capacidad física y mental, a un riesgo creciente de desarrollar enfermedades y, en última instancia, a la muerte (Behr, 2023).

La investigación sobre el envejecimiento se centra en el declive funcional de los organismos durante la edad adulta (López, 2023).

En este contexto, se distinguen dos conceptos fundamentales: la edad cronológica y la edad biológica. La primera se refiere al tiempo transcurrido desde el nacimiento, mientras que la segunda refleja el estado de salud general y el funcionamiento físico y mental de un individuo (Salih, 2023).

Sin embargo, la distinción entre las características del envejecimiento es compleja, ya que hay una interacción dinámica y no actúan de manera independiente, donde factores como el estilo de vida pueden provocar diferencias significativas entre ambas, haciendo que personas con la misma edad cronológica presenten diferentes grados de envejecimiento biológico (Behr, 2023).

#### **2.4 Mantenimiento de la homeostasis en el envejecimiento**

En el proceso del envejecimiento se han identificado doce características distintivas, denominadas “sellos del envejecimiento” las cuales se encuentran estrechamente interrelacionadas y organizadas de forma jerárquica en tres grupos: los factores primarios, los factores antagonistas y los factores integradores (Figura 2) (López, 2023).

Los factores primarios corresponden a daños iniciales que afectan componentes celulares fundamentales como el genoma, los telómeros, el epigenoma, el proteoma y los orgánulos. Estos daños se acumulan de manera progresiva con el tiempo y constituyen el punto clave del proceso de envejecimiento (Behr, 2023).

Los factores antagonistas, por su parte, representan las respuestas del organismo frente a los daños, como la autofagia, la senescencia celular y la apoptosis. Aunque en principio estas respuestas son adaptativas, su desregulación (disminución o incremento) puede contribuir al avance del envejecimiento (Behr, 2023).

Finalmente, los factores integradores surgen cuando el daño acumulado por los mecanismos primarios excede el umbral donde los mecanismos antagonistas ya no pueden regular este proceso. Esto conduce al agotamiento de las células madre, a alteraciones en la comunicación intercelular, inflamación crónica y disbiosis. En conjunto, estos factores determinan el ritmo y la manifestación del envejecimiento fisiológico (Behr, 2023).



**Figura 2. Características del envejecimiento.** Las doce características asociadas al envejecimiento se agrupan en tres categorías: (1) Factores primarios, que incluyen la inestabilidad genómica, las mutaciones genéticas, las alteraciones epigenéticas, el desgaste de los telómeros y la pérdida de proteostasis; (2) Factores antagonistas, como la autofagia, la inducción de la apoptosis y la senescencia celular; y (3) Factores integradores, que abarcan el agotamiento de las células madre, la alteración de la comunicación intercelular, la inflamación crónica y la disbiosis. (Fuente: López-Otín et al., 2023. Hallmarks of aging: An expanding universe).

### **2.4.1 Autofagia**

La autofagia (del griego auto, 'uno mismo', y phagein, 'comer') es un mecanismo celular altamente conservado mediante el cual se degradan y reciclan componentes intracelulares, incluidos orgánulos dañados y proteínas mal plegadas. Este proceso implica el encapsulamiento de material citoplasmático en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, los cuales posteriormente se fusionan con los lisosomas para llevar a cabo la degradación del contenido (Aman, 2021).

Con el envejecimiento, se ha observado una disminución progresiva en la eficiencia del proceso de autofagia, lo que compromete la capacidad de las células para mantener la homeostasis. Esta disfunción se relaciona directamente con la acumulación de estructuras dañadas, como mitocondrias defectuosas, y con una reducción del recambio de orgánulos, lo cual contribuye al deterioro funcional de los tejidos (Aman, 2021).

Además de su función principal, los componentes del sistema autofágico también participan en otras rutas degradativas, como la fagocitosis mediada por LC3, que permite la eliminación de materiales extracelulares, y en la extrusión de desechos intracelulares. Estas funciones complementarias refuerzan la relevancia de la autofagia como un proceso integral para la longevidad celular (Behr, 2023).

Estudios en modelos animales han demostrado que la activación de la autofagia puede extender tanto la esperanza de vida como el periodo de vida saludable, lo que posiciona a la autofagia como un blanco terapéutico potencial para mitigar los efectos del envejecimiento (Hansen, 2018).

### **2.4.2 Apoptosis**

La apoptosis es un proceso conocido como "muerte celular programada", ocurre normalmente durante el desarrollo embrionario, en el adulto y en la edad avanzada como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones celulares en los tejidos.

Existen dos vías apoptóticas principales: la vía extrínseca, también denominada vía del receptor de muerte, y la vía intrínseca o mitocondrial. Esta última se activa ante estímulos internos, como el daño al ADN o el estrés oxidativo, y está mediada por proteínas de la familia Bcl-2, que regulan la permeabilidad mitocondrial. La activación de cualquiera de estas vías culmina con la escisión y activación de caspasas efectoras, como la caspasa-3, lo que desencadena una serie de eventos: fragmentación del ADN, degradación de proteínas citoesqueléticas y nucleares, formación de cuerpos apoptóticos y su posterior eliminación por fagocitos (Taylor, 2008).

Durante el envejecimiento, se ha observado una disminución en la eficiencia del proceso apoptótico en diversos tipos celulares. A nivel molecular, esta disminución se acompaña de una reducción en la expresión de genes proapoptóticos y un aumento en la expresión de genes asociados con la senescencia celular (Zhou, 2014). Esta alteración en el equilibrio entre apoptosis y senescencia puede favorecer la acumulación de células disfuncionales en los tejidos, contribuyendo al deterioro progresivo de la función orgánica.

Estudios recientes han demostrado que la intensidad de la apoptosis disminuye significativamente con la edad en organismos humanos, lo que sugiere una pérdida

progresiva de la capacidad de eliminar células dañadas de forma eficiente (Wang, 2021). Sin embargo, el papel de la apoptosis en el proceso de envejecimiento, así como los mecanismos que regulan su represión en la vejez, aún no se comprenden completamente.

Por lo que, la modulación de la apoptosis se plantea como una estrategia terapéutica potencial en el contexto del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad, ya que restaurar su equilibrio podría contribuir a mejorar la homeostasis celular y tisular (Fuchs, 2011).

## **2.5 Enfermedades asociadas al envejecimiento**

Durante el proceso de envejecimiento, los tejidos corporales y los órganos de las personas mayores experimentan un declive o deterioro funcional como consecuencia de la pérdida de la homeostasis tisular y el deterioro progresivo de los mecanismos que mantienen la salud celular, debido a la acumulación de daños a lo largo del tiempo, lo que aumenta su susceptibilidad a las enfermedades relacionadas con la edad y acorta su vida saludable (Li, 2024).

Entre estas enfermedades se encuentran los trastornos neurodegenerativos, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, entre otras. Estas condiciones provocan una disminución de la capacidad funcional de los individuos, afectando tanto su capacidad intrínseca (fisiología, movilidad, cognición y función sensorial) como su entorno físico (acceso a transporte, alimentación, recursos económicos, atención médica, salud mental, nivel de aislamiento e independencia). Todo ello puede derivar en discapacidad o incluso en la muerte de quienes las padecen (Guo, 2022).

## 2.6 Enfermedades neurodegenerativas

Entre las afecciones con mayor prevalencia en adultos mayores se encuentran las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer **(EA)**, enfermedad de Parkinson **(EP)**, entre otras), las cuales evidencian la alta vulnerabilidad del sistema nervioso frente al envejecimiento (Kesidou, 2023). Esta susceptibilidad está relacionada con la disrupción progresiva de mecanismos celulares que preservan la funcionalidad de las neuronas y células gliales (López, 2023).

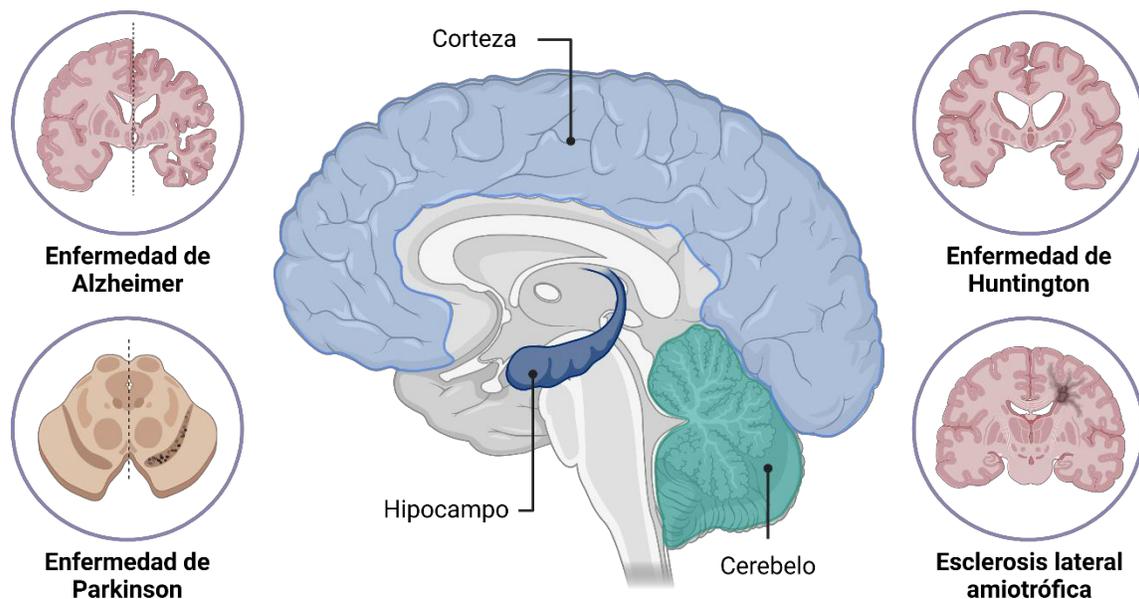
A nivel estructural, el envejecimiento conlleva alteraciones significativas en elementos fundamentales del sistema nervioso, como las dendritas, los axones y las sinapsis, afectando la conectividad y la plasticidad neuronal (Kesidou, 2023). Además, se ha documentado una disminución progresiva en el peso del cerebro, así como en el tamaño y número de neuronas, lo cual se asocia directamente con el deterioro cognitivo observado en la vejez (Hou, 2019).

Entre los mecanismos celulares más relevantes para mantener la homeostasis neuronal se encuentra la autofagia. En particular, los autofagosomas cumplen un papel crucial en la eliminación de desechos celulares (como neurotransmisores, proteínas disfuncionales y orgánulos envejecidos). La disfunción de este proceso se ha vinculado con el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, como la EP y la enfermedad de Huntington **(EH)** (Kesidou, 2023).

Dentro de este grupo de patologías, la EA destaca como la forma más común de demencia y la enfermedad neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial. Su incidencia aumenta considerablemente con la edad, constituyendo una de las

principales causas de discapacidad en adultos mayores (Trevisan, 2019). De manera similar, la EP presenta un notable incremento en su prevalencia con el envejecimiento, multiplicándose por diez entre los 50 y los 80 años (Pringsheim, 2014).

Estas enfermedades afectan de forma selectiva distintas regiones del encéfalo (Figura 3). El hipocampo y el cerebelo son particularmente vulnerables al daño asociado a la edad, y exhiben patrones de envejecimiento diferenciados, lo cual se traduce en alteraciones funcionales, motoras y cognitivas específicas.



**Figura 3. Principales enfermedades neurodegenerativas y regiones cerebrales afectadas durante el envejecimiento.** La neurodegeneración implica el deterioro de diversas regiones del cerebro, como la corteza cerebral (relacionada con el pensamiento, el lenguaje y la percepción sensorial), el hipocampo (implicado en la formación y recuperación de la memoria) y el cerebelo, involucrado en la coordinación motora y el equilibrio. El daño progresivo en estas estructuras contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la EP, EH y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

## **2.7 Estrategias anti-envejecimiento**

Prevenir las enfermedades asociadas al envejecimiento es cada vez más relevante ante el aumento sostenido de la población adulta mayor a nivel mundial. Estudios en modelos animales han demostrado que diversas intervenciones genéticas, dietéticas y farmacológicas pueden mejorar la esperanza y calidad de vida (Shetty, 2018).

### **2.7.1 Estilo de vida**

Factores como el estilo de vida pueden hacer que la edad biológica varíe considerablemente entre personas con la misma edad cronológica. Hábitos perjudiciales pueden acelerar el proceso de envejecimiento (Behr, 2023).

Por lo que, la promoción de hábitos saludables que abarcan una dieta equilibrada, ejercicio regular, buen descanso y la participación en actividades sociales pueden prevenir los efectos asociados al envejecimiento (Li, 2024).

#### **2.7.1.1 Dieta**

La dieta representa uno de los enfoques más accesibles y efectivos para intervenir en los procesos del envejecimiento humano.

Se ha demostrado que una ingesta excesiva de nutrientes activa sensores intracelulares, como mTORC1, estimulado por aminoácidos como la leucina. Al mismo tiempo, este exceso inhibe sensores que detectan la escasez energética, como la quinasa activada por AMP (AMPK) y las desacetilasas SIRT1 y SIRT3, que responden a los niveles de NAD<sup>+</sup>. Además, suprime procesos catabólicos

esenciales (como la glucogenólisis, la proteólisis y la lipólisis) y, en consecuencia, bloquea respuestas adaptativas clave al estrés celular, incluyendo la autofagia, la defensa antioxidante y la reparación del ADN (López, 2023). Debido a su papel central en la regulación del metabolismo y la homeostasis celular, estos sensores de nutrientes se han convertido en blancos prometedores para el desarrollo de fármacos orientados a la longevidad (Li, 2024).

### **2.7.1.2 Regímenes alimenticios**

No obstante, múltiples estudios han demostrado que beneficios similares, tanto en salud como en extensión de la vida útil, pueden lograrse mediante intervenciones dietéticas como la reducción de la ingesta calórica total, la modificación de la composición de la dieta o la implementación de patrones alimentarios como la alimentación restringida en el tiempo (López, 2023).

Entre las estrategias más estudiadas en los últimos años destacan el ayuno intermitente, que consiste en alternar períodos definidos de ayuno con períodos de ingesta de alimentos; y la restricción calórica (RC), que implica una reducción en la ingesta energética proveniente de alimentos y bebidas, sin provocar desnutrición (Hwangbo, 2020).

Estos regímenes han mostrado efectos positivos en organismos modelo, ya que inhiben mTORC1 y EP300, activan AMPK, SIRT1 y SIRT3, y estimulan mecanismos de respuesta al estrés celular (López, 2023).

## **2.8 Uso de la restricción calórica en modelos animales**

El avance de las ciencias biomédicas en la comprensión de los procesos biológicos y patológicos asociados con el envejecimiento se debe en gran medida a la contribución de los modelos animales. Los modelos animales se basan en el principio de la medicina comparativa y se consideran herramientas que pueden replicar los procesos fisiológicos y patológicos observados en humanos (Domínguez, 2023).

Desde 1930, la RC ha proporcionado una gran cantidad de información mediante el uso de modelos animales con diferentes especies. Los resultados han demostrado la prevención de enfermedades como la obesidad, protección contra la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, además de proporcionar datos valiosos sobre los mecanismos relacionados con la longevidad, el envejecimiento y la neurodegeneración (Hwangbo, 2020).

Diversos estudios en modelos animales han demostrado que la RC tiene efectos beneficiosos sobre procesos clave del envejecimiento. Por ejemplo, en ratas se ha observado que la RC previene la disminución de la autofagia asociada a la edad, al mantener estable la expresión de proteínas lisosomales como LAMP2 (Jafari, 2024). A nivel de transcriptómica, también se ha reportado que la RC revierte parcialmente la expresión de genes relacionados con el envejecimiento en múltiples tejidos, lo que sugiere un efecto de rejuvenecimiento molecular (Ma, 2020).

Adicionalmente, en un modelo murino de desmielinización inducido por cuprizona, la RC promovió la remielinización parcial del cerebro, incrementando la generación

de oligodendrocitos y reduciendo su apoptosis. Estos hallazgos respaldan el potencial de la RC como una intervención efectiva para modular mecanismos celulares y tisulares vinculados al envejecimiento y la neurodegeneración (Mojaverrostami, 2023).

Sin embargo, a pesar de los avances obtenidos a través de estas investigaciones, en el campo de neurociencias se continúan planteando preguntas sobre el proceso de envejecimiento y los efectos de la RC en el sistema nervioso.

# **CAPÍTULO 3**

## **JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad la esperanza de vida supera los 60 años, lo que resulta en un aumento de la población adulta mayor. El envejecimiento, se considera un factor de riesgo significativo para el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, incluidas las enfermedades neurodegenerativas.

El envejecimiento puede ser modulado por factores como la dieta. La restricción calórica muestra promesas en la reducción de los daños celulares asociados al envejecimiento y la neuro-inflamación, siendo considerada como una estrategia terapéutica para numerosas enfermedades. Sin embargo, todavía falta mucho por explorar en los cambios que ocurren a nivel celular y tisular.

Es por lo anterior, que surge nuestro interés en analizar el efecto de la restricción calórica en cerebro de ratones envejecidos, enfocándonos en los cambios morfológicos y en los procesos implicados en la homeostasis celular (apoptosis y autofagia).

# **CAPÍTULO 4**

## **HIPÓTESIS**

La restricción calórica posee un efecto neuroprotector en las regiones asociadas con el equilibrio y memoria en los cerebros de ratones envejecidos.

# **CAPÍTULO 5**

## **OBJETIVO GENERAL**

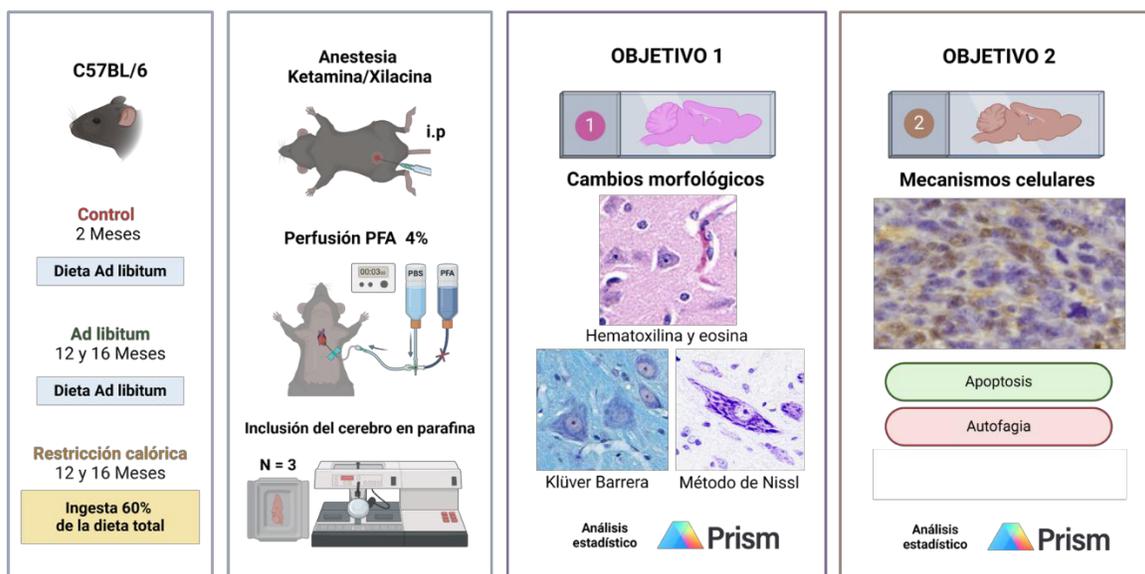
Analizar el efecto de la restricción calórica en cerebro de ratones envejecidos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Comparar los cambios morfológicos en cerebro de un modelo murino de envejecimiento con y sin restricción calórica mediante tinciones especiales.
2. Analizar los procesos de autofagia y apoptosis mediante inmunomarcaje en un modelo murino de envejecimiento con y sin restricción calórica.

# CAPÍTULO 6

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 4. Estrategia experimental.** A partir de los 2 meses de edad, se establecieron cinco grupos experimentales con ratones de la cepa C57BL/6J: un **grupo control** (2 meses de edad), dos grupos con dieta *ad libitum* y dos grupos con RC (60% de la dieta estándar total) hasta los 12 y 16 meses de edad. Tras el sacrificio de los murinos, se realizó perfusión cardíaca con paraformaldehído al 4% para la fijación de los órganos. Posteriormente, se extrajo el cerebro y se procesó mediante la técnica histológica convencional, obteniendo bloques de parafina a partir de los cuales se realizaron cortes seriados en orientación sagital, para realizar la metodología de los objetivos uno y dos. El objetivo uno consistió en evaluar los cambios morfológicos mediante tinciones de hematoxilina y eosina, método de Nissl y método de Klüver-Barrera. El objetivo dos se enfocó en analizar los mecanismos moleculares involucrados en la homeostasis tisular, mediante inmunomarcado dirigido a procesos de autofagia y apoptosis. Todos los análisis morfométricos se realizaron con el programa ImageJ, y los datos obtenidos fueron analizados mediante el software GraphPad Prism 8.

# CAPÍTULO 7

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material

#### 7.1.1 Material biológico

- **Animales**

Los ratones de la cepa C57BL/6J fueron obtenidos de la compañía círculo ADN S.A de C.V (Ciudad de México, México). El manejo de los murinos fue acorde a lo descrito por la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz/obscuridad, con libre acceso a agua y con cantidades designadas de alimentos según el grupo experimental.

El alimento administrado a los ratones fue obtenido de St. Louis, MO, LabDiet (#5P14). Para el manejo de los animales se utilizaron los anestésicos ketamina (Q-0449-265) y xilacina (Q-7833-111).

- **Anticuerpos primarios**

El anticuerpo anti-LC3 IIB (L7543) fue obtenido de Sigma-Aldrich.

- **Anticuerpos secundarios**

El anticuerpo Anti-Rabbit IgG TRITC (T6778) fue obtenido de Sigma-Aldrich.

La solución de montaje VECTASHIELD con DAPI (H-1200) fue obtenido de Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA).

- **KIT TUNEL – Apoptosis**

El kit para el ensayo TUNEL (4812-30K-020) fue obtenido de R&D Systems (McKinley Place NE, Minneapolis, USA).

### **7.1.2 Reactivos**

- **Colorantes**

Los colorantes hematoxilina (H-9627), eosina amarillenta Y (17372-87-1), violeta de cresilo (C5042-10G) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

El colorante azul rápido Luxol (02272) fue obtenido de CTR Scientific

Los reactivos carbonato de litio (K38321680), ácido acético (695092) y agua amoniacal (221228) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

- **Soluciones**

Los reactivos para la fijación de tejidos como paraformaldehído (P6148), cloruro de sodio (7647-14-5), cloruro de potasio (7447-40-7), fosfato de sodio (7558-79-4) y fosfato de potasio (7778-53-2) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Los reactivos para las técnicas de inmunomarcaje como Tritón X-100 (9002-93-1), buffer de citratos pH 6.0 (H-3300), suero de caballo (GIBCO 16050) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

## **7.2 Equipo de laboratorio**

### **7.2.1 Cuantificación del alimento**

Para proporcionar la cantidad de gramos indicada de alimento con base al grupo experimental, y el pesaje de los sujetos, se utilizó una balanza (GR-120, AND).

### **7.2.2 Perfusión cardíaca**

Para el sacrificio por perfusión cardíaca de los animales se utilizó una bomba peristáltica FH100 de Thermo Fisher Scientific.

### **7.2.3 Procesamiento del tejido**

Para el procesamiento de las muestras de cerebro obtenidas se utilizó el equipo automatizado “Histoquinete” (Kedee).

Para la obtención de bloques y cortes de cerebro en parafina se utilizaron el centro de inclusión KD-BM (Kedee), la crioplaca KD-BL (Kedee), el microtomo RM2245 (Leica) y el baño de flotación KD-P (Kedee).

### **7.2.4 Microscopía**

Para la obtención de microfotografías en campo claro se utilizó el microscopio Nikon TS2-FL (CC204) y el software NIS-ELEMENTS. Mientras que, para fluorescencia se trabajó con el microscopio DM500 (Leica) con cámara Nikon Eclipse 50i (5.0 RTV, Micropublisher) y el software Q-Capture7.

### 7.3 Análisis de datos

Para el análisis morfológico se utilizó el software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA), para el análisis estadístico se trabajó con el software GraphPad Prism 9 (La Jolla, CA, USA).

## CAPÍTULO 8 METODOLOGÍA

### 8.1 Cuantificación del consumo diario de alimento

Con el objetivo de estimar el consumo diario de alimento en un entorno social, cinco ratones macho fueron alojados en la misma jaula durante un período de cinco días.

Cada día, a las 08:00 horas, se colocaron 50 g de alimento (alimento inicial, *ai*) en la jaula, estableciendo un intervalo fijo de 24 horas entre cada medición. Transcurrido este periodo, se retiró y pesó el alimento remanente (*ar*), y los datos fueron registrados en una bitácora. El consumo diario se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Alimento consumido} = (ai - ar)$$

El consumo total registrado se dividió entre el número de animales para obtener el consumo promedio por individuo (Tabla 1).

| Fecha | Alimento por cinco sujetos |          |           | Cálculo por sujeto |
|-------|----------------------------|----------|-----------|--------------------|
|       | Inicial                    | Restante | Consumido |                    |
| Lunes | 50g                        | 27g      | 23g       | 23 / 5 = 4.6       |

|           |     |     |     |                |
|-----------|-----|-----|-----|----------------|
| Martes    | 50g | 29g | 21g | $21 / 5 = 4.2$ |
| Miércoles | 50g | 33g | 17g | $17 / 5 = 3.4$ |
| Jueves    | 50g | 32g | 18g | $18 / 5 = 3.6$ |
| Viernes   | 50g | 29g | 21g | $21 / 5 = 4.2$ |
| Promedio  |     |     |     | <b>4g</b>      |

**Tabla 1 Promedio de alimento consumido diariamente por individuo.**

## **8.2 Administración del régimen alimenticio**

Una vez establecido el consumo diario promedio de alimento por los sujetos experimentales, se realizó una revisión bibliográfica para definir un rango adecuado de RC basado en el modelo murino empleado. Los estudios consultados reportan porcentajes de RC que oscilan entre el 10 – 40% (Donald, 2018).

Antes de iniciar el protocolo experimental, se llevó a cabo un periodo de validación de siete días, con el propósito de evaluar que la RC no ocasionara pérdida de peso, disminución de la actividad ni signos evidentes de malestar en los animales. Con base en los resultados obtenidos, se eligió una RC del 40%, al no observarse efectos adversos en los sujetos.

Dado que el consumo promedio diario fue de 4g por ratón, se calculó que el 60% correspondiente a la dieta restringida equivalía a 2.5g de alimento por individuo. A partir de los 2 meses de edad y hasta los 12 o 16 meses (según el grupo experimental), se colocó diariamente 2.5g de alimento por sujeto en las jaulas con el régimen de RC a las 8:00 horas.

### 8.3 Diseño experimental

Los grupos experimentales se establecieron con base en dos variables principales: (1) tipo de dieta, que incluyó alimentación *ad libitum* y RC del 40%; y (2) edad de los sujetos, categorizada como adultos jóvenes (2 meses), adultos (12 meses) y adultos envejecidos (16 meses). Se utilizaron tres sujetos por grupo, donde los grupos resultantes fueron los siguientes:

| Edad     | n | Grupo                | Tipo de dieta     |
|----------|---|----------------------|-------------------|
| 2 meses  | 3 | Control adulto joven | <i>Ad libitum</i> |
| 12 meses | 3 | Adulto               | <i>Ad libitum</i> |
| 12 meses | 3 | Adulto               | RC 40%            |
| 16 meses | 3 | Adulto envejecido    | <i>Ad libitum</i> |
| 16 meses | 3 | Adulto envejecido    | RC 40%            |

Tabla 2. Grupos experimentales.

### 8.4 Obtención de los tejidos

La obtención de muestras de tejido se llevó a cabo mediante el sacrificio de ratones *Mus musculus* de la cepa C57BL/6, siguiendo los protocolos éticos establecidos y utilizando anestesia intraperitoneal con ketamina/xilacina (100mg/kg).

Posteriormente, se realizó la fijación de los tejidos utilizando PBS 1X – paraformaldehído al 4% mediante la técnica de perfusión, y se llevó a cabo la disección con instrumentos de cirugía para obtener el órgano de interés: el cerebro.

El cerebro extraído se sumergió en paraformaldehído al 4% en una proporción de 1:50 durante 24 horas para asegurar una fijación adecuada. Dada la complejidad de la estructura tisular del cerebro, se emplearon matrices elaboradas de acero

inoxidable (70191-3DFRZ) que permitieron seccionar el cerebro en sentido sagital, obteniendo muestras con un grosor de 0,5 – 1mm.

### **8.5 Inclusión de tejidos en parafina**

Una vez obtenidos los tejidos, se continuó con el procesamiento de la muestra mediante inmersión durante 1 hora en las siguientes soluciones: para la deshidratación gradual, se utilizaron alcoholes al 70%, 80%, 90%, 96% y 100% (dos cambios); para el aclaramiento, se empleó xilol absoluto (dos cambios); y para la preinclusión, se utilizó parafina (dos cambios).

Al finalizar el procesamiento, se obtuvo un tejido preincluido en parafina. La inclusión definitiva del tejido se llevó a cabo posicionando la muestra del cerebro en sentido sagital sobre un molde metálico, donde se vertió parafina derretida desde un dispensador perteneciente al centro de inclusión, se dejó enfriar para solidificar y se obtuvo un bloque de parafina con el tejido.

### **8.6 Microtomía**

Se realizaron cortes seriados de 5 µm de grosor utilizando un microtomo Leica RM2245.

### **8.7 Tinciones**

Para el análisis de los cambios morfológicos en los cerebros de los grupos experimentales, se emplearon tres técnicas de tinción. Como método de rutina, se utilizó la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar la morfología general del tejido cerebral. Para una caracterización más detallada de la morfología

neuronal, se aplicó la tinción de Nissl. Finalmente, con el objetivo de evaluar la integridad de la mielina en las fibras nerviosas, se empleó la tinción de Klüver – Barrera.

En los tres protocolos, los cortes fueron inicialmente desparafinados en estufa a 57 °C durante 20 minutos, seguidos de inmersiones sucesivas en xilol absoluto (5 minutos) y en una mezcla de xilol/etanol absoluto 1:1 (5 minutos). La rehidratación se llevó a cabo de forma gradual; en el caso de las tinciones de H&E y Nissl, se realizaron inmersiones en etanol al 100% y 96% (5 minutos cada una), seguidas de una inmersión en agua destilada (2 minutos). Para el método de Klüver – Barrera, la rehidratación se realizó únicamente hasta etanol al 96%.

#### **8.7.1 Tinción hematoxilina y eosina (H&E)**

Posterior a la rehidratación, los cortes se tiñeron con hematoxilina de Gill durante 2 minutos y se enjuagaron con agua corriente mediante siete inmersiones. La diferenciación se llevó a cabo con una inmersión rápida en alcohol ácido, seguida de dos inmersiones en agua corriente. Luego, se realizaron dos inmersiones rápidas en agua amoniacal, dos inmersiones en agua corriente y se enjuagó con agua destilada.

Se continuó con siete inmersiones en eosina Y, seguida de una inmersión en etanol al 96%. A continuación, se procedió a la deshidratación en una serie creciente de alcohol: etanol al 96% (1 minuto), dos cambios en etanol al 100% (2 minutos cada uno), una inmersión en etanol absoluto/xilol (3 minutos) y una inmersión final en xilol (5 minutos). El montaje se realizó utilizando resina Entellan y un cubreobjetos.

### **8.7.2 Método de Nissl**

Posterior a la rehidratación, los cortes se tiñeron con violeta de cresilo al 0.5% durante 30 minutos. El exceso de colorante fue eliminado mediante un enjuague con agua destilada. La diferenciación se llevó a cabo con una inmersión breve (8 segundos) en ácido acético al 0.25% para eliminar el exceso de tinción del tejido sin afinidad al colorante. A continuación, se realizó una inmersión rápida en una solución de etanol absoluto/xilol. Finalmente, se realizó la deshidratación en una serie creciente de alcoholes (96%, 100% y xilol/etanol absoluto 1:1), seguida de inmersión en xilol absoluto. Las muestras se montaron con resina Entellan y un cubreobjetos.

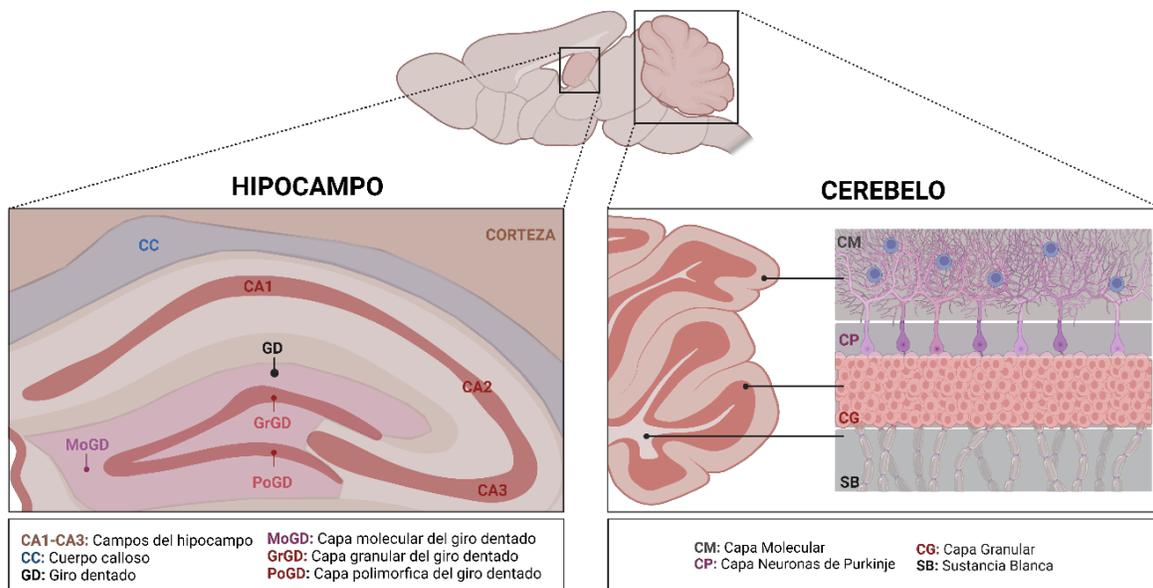
### **8.7.3 Método de Klüver Barrera**

Posteriormente a la rehidratación con etanol al 96%, los cortes fueron sumergidos en azul rápido de Luxol al 0.1%, incubándose durante toda la noche a temperatura ambiente o, alternativamente, en una estufa a 57 °C durante 90 minutos. El exceso de colorante se eliminó mediante un enjuague en etanol al 96%, seguido de lavados con agua destilada hasta que los cortes dejaron de desteñirse. Las muestras fueron observadas al microscopio para evaluar el grado de sobrecoloración de la mielina. A continuación, se realizó la diferenciación utilizando una solución de carbonato de litio al 0.05% mediante una inmersión rápida, seguida de lavados en etanol al 70% hasta que fue posible distinguir claramente la sustancia gris de la sustancia blanca, esta última teñida de color azul.

Después de un lavado con agua destilada, se procedió a la tinción nuclear mediante la inmersión de los cortes en violeta de cresilo al 0.1% durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados en etanol al 96% (2 minutos cada uno). Finalmente, se llevó a cabo la deshidratación en una serie creciente de alcohol: etanol al 96% (1 minuto), dos cambios en etanol al 100% (2 minutos cada uno), una inmersión en etanol absoluto/xilol (3 minutos) y una inmersión final en xilol (5 minutos). El montaje se realizó utilizando resina Entellan y un cubreobjetos.

### 8.8 Regiones de estudio

Este estudio se centró en el análisis morfológico del hipocampo y el cerebelo, debido a su susceptibilidad a los procesos neurodegenerativos relacionados con el envejecimiento (Figura 5). Para tal fin, se establecieron distintos parámetros de evaluación morfométrica a partir de las tinciones descritas previamente para el objetivo uno.



**Figura 5. Representación esquemática de las regiones analizadas para el estudio morfométrico.** A la izquierda, se muestra una ampliación del hipocampo, destacando la región del giro dentado (GD) y sus subdivisiones: capa molecular (MoGD), capa granular (GrGD) y capa polimórfica (PoGD). A la derecha, se presenta una ampliación de la corteza cerebelosa, donde se identifican la capa molecular (CM), capa de células de Purkinje (CP), capa granular (CG) y sustancia blanca (SB).

### **8.8.1 Análisis morfométrico – Hematoxilina y Eosina**

Para evaluar cambios estructurales, se realizó un análisis morfométrico en cortes teñidos con H&E, enfocándonos en el giro dentado del hipocampo y en la corteza cerebelosa.

En el hipocampo, se delimitó manualmente el área del giro dentado trazando una línea continua alrededor de la región de interés. Además, se evaluó el grosor de esta zona mediante el trazo de seis líneas verticales por campo, distribuidas equitativamente. Se analizaron ocho campos por sujeto, con un total de tres sujetos por grupo experimental ( $n = 3$ ), utilizando un aumento de 40X (Figura 7b).

Para el cerebelo, se evaluaron por separado el grosor de la capa molecular y de la capa granular. En cada capa se trazaron seis líneas verticales por campo, siguiendo un criterio de distribución uniforme. Se analizaron ocho campos por sujeto ( $n = 3$  por grupo), con un aumento de 40X (Figura 12b).

### 8.8.2 Análisis morfométrico – Método de Nissl

Para evaluar cambios en la morfología neuronal, se realizó un análisis morfométrico en cortes teñidos con el método de Nissl, enfocándose en los núcleos neuronales del giro dentado del hipocampo y en las neuronas de Purkinje del cerebelo.

En el hipocampo, se cuantificó el número de núcleos neuronales en el giro dentado mediante conteo manual. Adicionalmente, se evaluó el tamaño de los núcleos trazando una línea continua alrededor de cada núcleo claramente definido. Se analizaron ocho campos por sujeto (n = 3 por grupo), utilizando un aumento de 40X para el conteo y 100X para la medición del tamaño nuclear (Figura 8b).

En el cerebelo, se evaluó la capa de células de Purkinje. Se realizó un conteo manual del total de neuronas de Purkinje por sujeto, analizando 25 campos distribuidos en cinco lóbulos, con cinco campos por lóbulo (n = 3 por grupo), a un aumento de 40X (Figura 13b). Posteriormente, se clasificaron morfológicamente las neuronas de Purkinje en tres categorías (Becerra, 2009):

- Morfología normal (Mn): núcleo esférico, eucromático, con nucléolo prominente.
- Morfología hipercromática (Mhc): núcleo condensado, sin nucléolo visible.
- Morfología picnótica (Mp): núcleo altamente condensado, con fragmentación evidente y forma irregular.

Se calculó el porcentaje de cada tipo de morfología neuronal mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de neuronas} = \left( \frac{\text{Número de neuronas Mn, Mhc, o Mp}}{\text{Total de neuronas de Purkinje contadas}} \right) \times 100$$

### 8.8.3 Análisis morfométrico – Método de Klüver-Barrera

Para evaluar cambios en la densidad de la mielina que reviste las fibras nerviosas, se realizó un análisis morfométrico en cortes teñidos con el método de Klüver-Barrera, enfocándonos en la zona del cuerpo calloso sobre el hipocampo y la sustancia blanca del cerebelo.

Para el cuerpo calloso, nos enfocamos en la zona que se encontraba encima del hipocampo, se utilizaron cuatro campos por sujeto (n = 3 por grupo) a un aumento del 10X (Figura 9b). En el cerebelo, se evaluó la sustancia blanca, analizando 8 campos por sujeto (n = 3 por grupo), a un aumento de 40X (Figura 14b).

Para ambas regiones se utilizó el programa ImageJ, y la metodología que se implementó fue la siguiente:

1. Abrir imagen > Image > Color > Colour Deconvolution > Vectors “Alcian Blue and H”
2. Al observar la separación de capas, mantener el color azul (densidad de mielina)
3. Medir el área de la imagen original
4. Medir el área de la imagen en color azul
5. Medir el porcentaje de la densidad de mielina mediante la formula:

$$\% \text{ de mielina} = \left( \frac{\text{Número de neuronas } n, hc, o p}{\text{Total de neuronas de Purkinje contadas}} \right) \times 100$$

## **8.9 Inmunomarcaje de cortes en parafina**

### **8.9.1 Inmunofluorescencia indirecta LC3IIB**

Los cortes fueron inicialmente desparafinados en una estufa a 57 °C durante 20 minutos, seguidos de inmersiones sucesivas en xilol y en una mezcla de xilol/etanol absoluto (1:1) durante 5 minutos. La rehidratación se realizó de forma gradual mediante inmersiones en etanol al 100% y al 96% (5 minutos cada una), seguidas de una inmersión en agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron permeabilizadas con tres lavados en PBS1X-Tritón 0.1%, (5 minutos cada uno).

La recuperación de antígenos se llevó a cabo utilizando un buffer de citrato a pH 6.0, aplicando un protocolo de 15 minutos de calentamiento, 15 minutos de inmersión de las muestras y 15 minutos de enfriamiento. A continuación, se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos mediante la incubación con suero de caballo al 10%, diluido en PBS1X-Tritón 0.1%, durante 2 horas. Luego, se retiró el exceso de suero y se añadieron 100 µL del anticuerpo primario anti-LC3 IIB (dilución 1:500) por muestra, incubándose durante 12 horas a 4 °C. Después, se realizaron tres lavados con PBS1X-Tritón 0.1% (5 minutos cada uno) y se agregó el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con TRITC (dilución 1:1000), incubando durante 2 horas a temperatura ambiente (TA) en oscuridad. Posteriormente, se efectuaron tres lavados adicionales con PBS 1X (5 minutos cada uno).

Finalmente, los núcleos fueron teñidos con DAPI mounting solution durante 15 minutos y se colocaron los cubreobjetos para su visualización mediante microscopía

de fluorescencia. El análisis morfométrico se llevó a cabo realizando un conteo de las neuronas LC3IIB<sup>+</sup> además del conteo de vesículas en neuronas LC3IIB<sup>+</sup> (Figuras 10b y 15b).

### **8.9.2 Ensayo TUNEL**

Para determinar la muerte celular por apoptosis, se utilizó el ensayo TUNEL, que evalúa la fragmentación de la cromatina, una característica clave de este proceso. Se empleó el kit 4812-30K-020 de R&D Systems.

Los cortes fueron desparafinados en una estufa a 57 °C durante 20 minutos, seguidos de inmersiones sucesivas en xilol y en una mezcla de xilol/etanol absoluto (1:1) durante 5 minutos. La rehidratación se realizó de forma gradual mediante inmersiones en etanol al 100%, 96% y 70% (5 minutos cada una), seguidas de una inmersión en agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con PBS 1X durante 10 minutos a TA.

Se incubaron con 50µL de proteinasa K (dilución 1:200) durante 30 minutos a TA. Luego, se realizaron dos lavados con agua destilada (2 minutos cada uno) y las muestras se sumergieron en “Labeling Buffer TdT 1X” durante 5 minutos a TA.

Para la reacción enzimática, se preparó el “Reaction Mix Buffer” a 4 °C con los siguientes reactivos, en el siguiente orden: TdT dNTP Mix (1 µL por muestra), enzima TdT (0.5 µL por muestra), catión Mn<sup>2+</sup> (1 µL por muestra) y Labeling Buffer TdT 1X (50 µL por muestra). Las muestras se cubrieron con 50 µL de esta mezcla, se sellaron con papel Parafilm y se incubaron a 37 °C durante 1 hora en condiciones de humedad.

Posteriormente, se sumergieron en “Stop Buffer TdT 1X” durante 10 minutos a RT y se lavaron dos veces con agua destilada (5 minutos cada una). Para la detección de la señal, se colocó PBS 1X con Tween 0.05 % y Estreptavidina-Fluoresceína (1  $\mu$ L por muestra), incubando durante 30 minutos a TA, seguido de dos lavados con PBS 1X (2 minutos cada uno).

Para la observación nuclear, se utilizó DAPI Mounting Solution (H-1200) y se colocó un cubreobjetos. Finalmente, las muestras fueron observadas con un microscopio de fluorescencia. El análisis morfométrico se llevó a cabo realizando un conteo de las neuronas TUNEL<sup>+</sup> (Figuras 11b y 16b).

### **8.10 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico los resultados obtenidos se sometieron a una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar si los datos siguen una distribución paramétrica o no paramétrica.

Al ser datos paramétricos, se utilizó la prueba t de Student para comparar dos grupos y la prueba ANOVA con el post-hoc de Tukey para comparar más de dos grupos. En caso de que los datos no sean paramétricos, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis con el post-hoc de Dunn para más de dos grupos.

Los resultados se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar para datos paramétricos y media  $\pm$  rango intercuartil para datos no paramétricos. Se consideró significativo un valor de p menor a 0.05

### **8.11 Aspectos éticos**

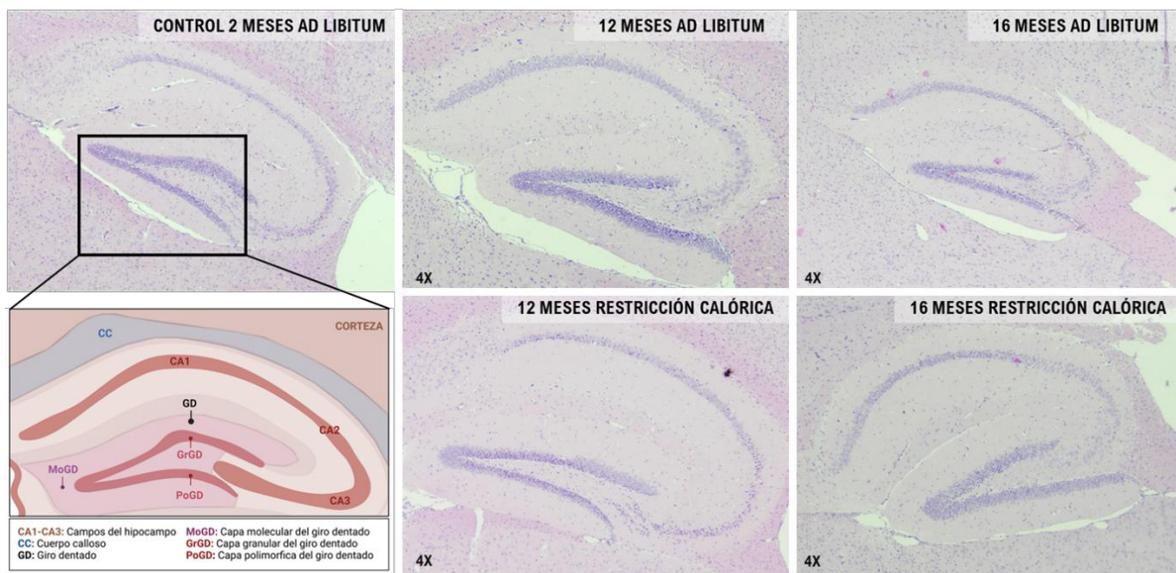
Todos los procedimientos experimentales realizados en este estudio fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) con la clave HT23-00001 y se llevaron a cabo conforme a las normas establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que regula el uso y cuidado de animales de laboratorio en México. Se procuró en todo momento minimizar el sufrimiento de los animales, aplicando protocolos de anestesia adecuados y métodos de sacrificio humanitarios. Además, se utilizó el menor número posible de animales necesario para alcanzar significancia estadística, en apego al principio de las 3R (reducir, reemplazar, refinar),

# CAPÍTULO 9

## RESULTADOS

### 9.1 Evaluación de la estructura general del hipocampo

Se evaluó la estructura general del hipocampo en los distintos grupos experimentales, para identificar posibles diferencias cualitativas evidentes (Figura 6). Se prestó especial atención a la organización de los somas neuronales, la integridad y morfología de las capas que conforman esta región, la intensidad de tinción tanto del neuropilo como de los somas neuronales, así como posibles reducciones en el tamaño total del hipocampo. Estos parámetros permiten detectar signos tempranos de neurodegeneración o atrofia tisular, comúnmente asociados al envejecimiento o a la exposición a agentes neurotóxicos (Mohamed, 2020).



**Figura 6. Microfotografías representativas del hipocampo de cerebros de ratones envejecidos con y sin restricción calórica teñidos con hematoxilina y eosina. Magnificación: 4X.**

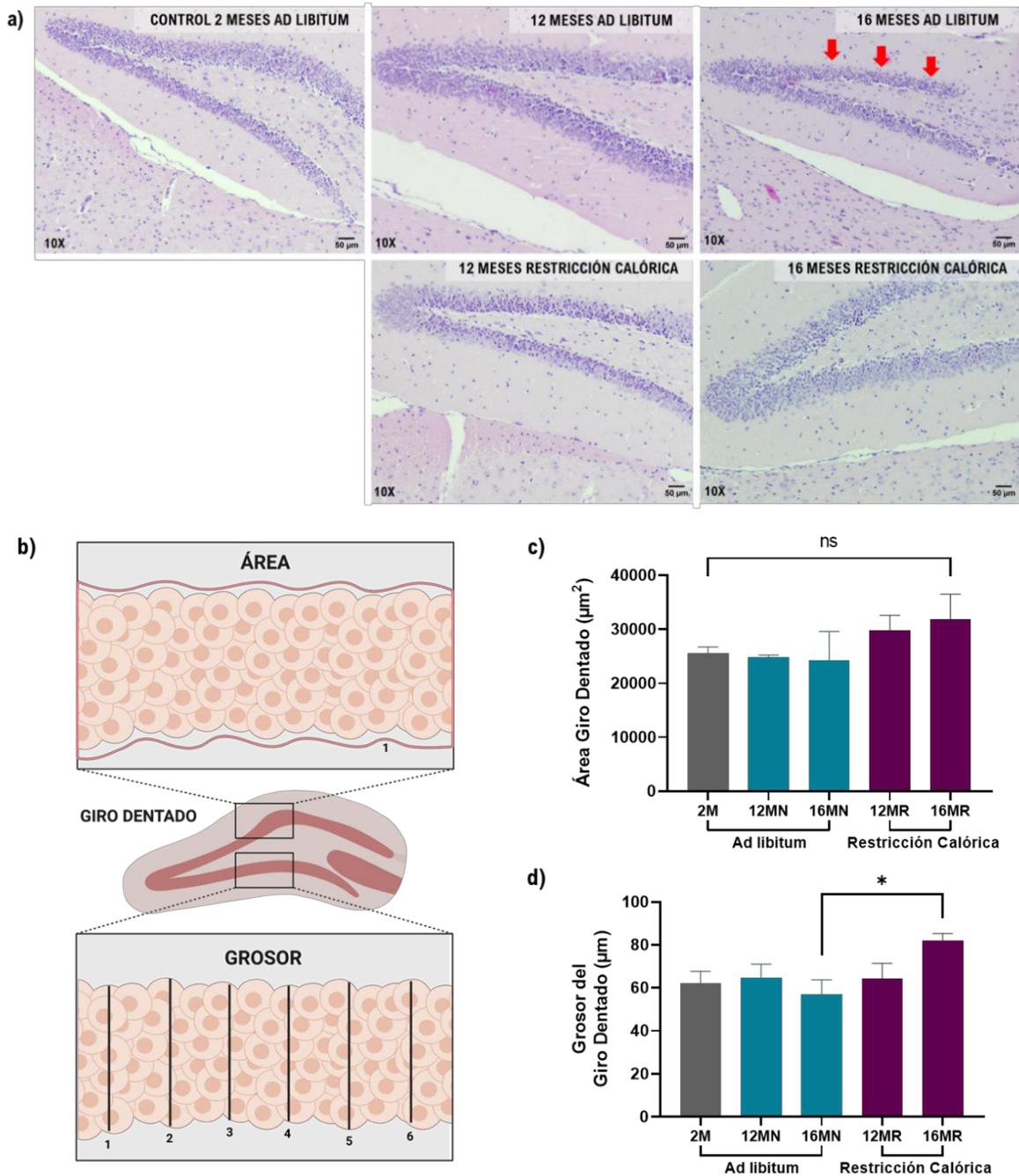
## **9.2 La restricción calórica preserva la morfología del giro dentado al mantener su grosor estructural durante el envejecimiento**

Dada la importancia del giro dentado en funciones relacionadas con la formación y recuperación de la memoria en las que participan las neuronas del giro dentado (Jinno, 2010), se enfocaron los análisis morfológicos en esta región específica del hipocampo.

Se realizó una observación con el objetivo de 10X, en la que se detectaron alteraciones estructurales evidentes en los murinos de 16 meses alimentados *ad libitum* (Figura 7a, flechas rojas), en comparación con los grupos de 12 y 16 meses sometidos a RC. Asimismo, se observó que el grupo de 12 meses con dieta *ad libitum* conserva una morfología similar al grupo joven de 2 meses (Figura 7a).

Las principales diferencias cualitativas observadas fueron el tamaño del giro dentado y un menor grosor en las capas que lo conforman. Para profundizar en este hallazgo, se procedió a realizar un análisis morfométrico, utilizando como parámetros la medición del área total y del grosor de la región (Figura 7b).

El análisis estadístico mostró una tendencia al aumento en el área total del giro dentado en los grupos de 12 y 16 meses con RC. En cuanto al grosor, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el grupo de 16 meses con RC, que presentó un incremento en comparación con el grupo *ad libitum* de la misma edad. Este hallazgo sugiere que la RC contribuye a preservar el grosor estructural del giro dentado durante el envejecimiento.



**Figura 7. La restricción calórica previene la disminución del grosor del giro dentado en un modelo murino de envejecimiento. a)** Microfotografías representativas del giro dentado de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados *ad libitum* o con RC, teñidas con H&E (10X). **b)** Esquema del análisis morfométrico del área y grosor del giro dentado. **c)** Análisis estadístico del área total del giro dentado en el hipocampo, con una tendencia a mayor área en los grupos con RC. **d)** Análisis estadístico del grosor del giro dentado, evidenciando una disminución significativa en ratones de 16

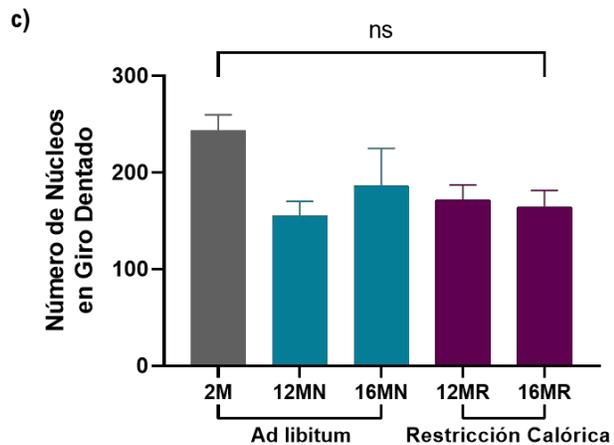
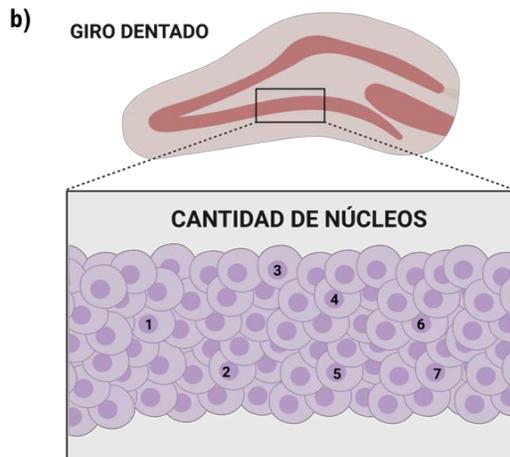
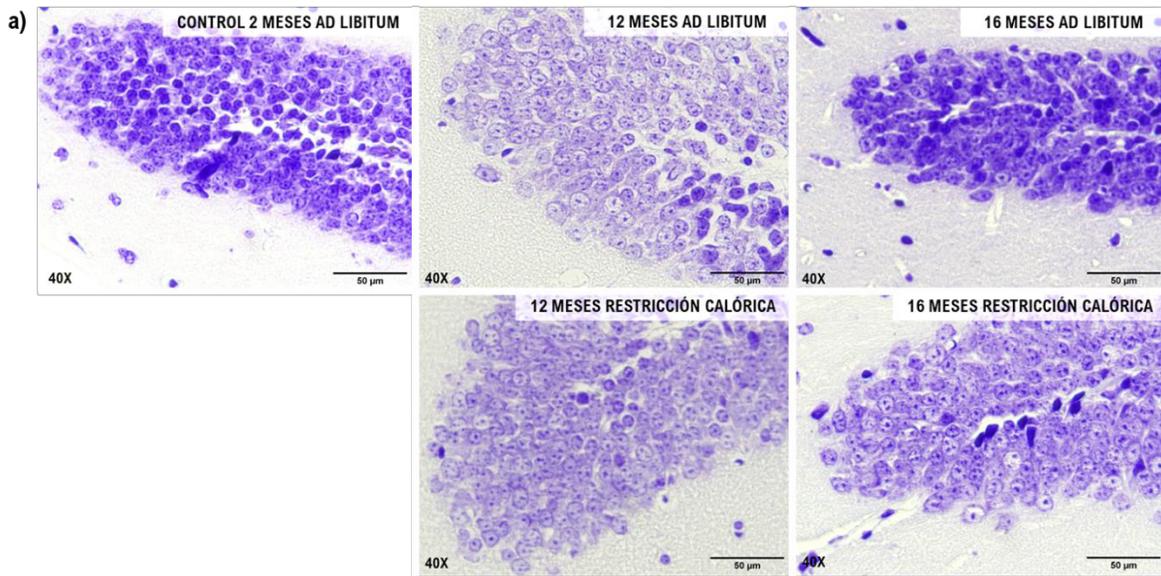
meses alimentados *ad libitum* en comparación con los tratados con RC. Análisis realizado mediante ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey (n = 3). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  (\*);  $p < 0.001$  (\*\*); ns: no significativo.

### **9.3 La restricción calórica no induce cambios en el número de núcleos neuronales del giro dentado durante el envejecimiento**

El giro dentado contiene un nicho de células progenitoras que, en respuesta a diversos estímulos, permite llevar a cabo la neurogénesis, es decir, la proliferación de nuevas neuronas (Cole, 2022). Se ha reportado que la RC promueve este proceso (Bondolfi, 2003). Por ello, con el objetivo de determinar si los cambios observados en el grosor del giro dentado estaban asociados a un incremento en el número de núcleos neuronales, se procedió a analizar cortes histológicos teñidos con el método de Nissl, utilizando un aumento de 40X.

De manera general, se observaron diferencias morfológicas entre los grupos. En los murinos de 16 meses alimentado *ad libitum* se identificaron núcleos predominantemente heterocromáticos y con una organización más compacta. En contraste, los grupos con RC presentaron núcleos eucromáticos y una mayor dispersión celular, lo cual sugiere un estado más activo y funcional (Figura 8a).

El análisis morfométrico se realizó mediante un conteo manual del número total de núcleos neuronales (Figura 8b). Los resultados del análisis estadístico indicaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales en cuanto al número total de núcleos neuronales en el giro dentado durante el envejecimiento (Figura 8c).



**Figura 8. La restricción calórica no modifica la cantidad de núcleos neuronales en el giro dentado en un modelo murino de envejecimiento. a)** Microfotografías representativas del giro dentado de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados *ad libitum* o con RC, teñidas mediante el método de Nissl. Los núcleos neuronales se observan teñidos de morado (40X). **b)** Esquema del análisis morfométrico para la cuantificación de núcleos neuronales en el giro dentado. **c)** Análisis estadístico del número de núcleos neuronales, sin diferencias significativas entre los grupos experimentales. Análisis realizado mediante ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey (n = 3). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  (\*);  $p < 0.001$  (\*\*); ns: no significativo.

#### **9.4 La restricción calórica previene la disminución del tamaño de los núcleos neuronales en el giro dentado durante el envejecimiento**

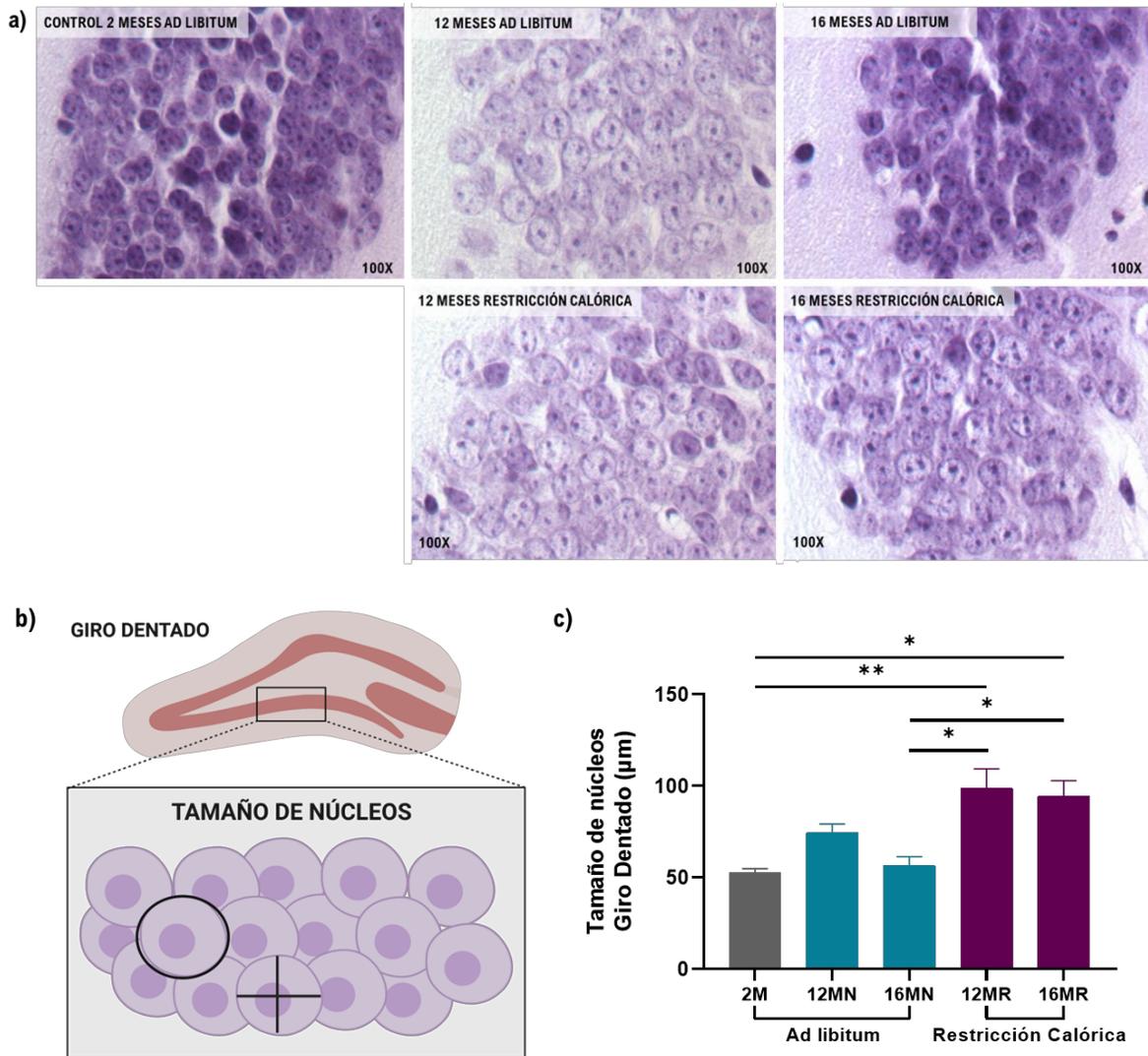
Dado que no se observaron cambios estadísticamente significativos en la cantidad de núcleos neuronales, el siguiente parámetro evaluado fue el tamaño de los núcleos. Para ello, se analizaron cortes teñidos con el método de Nissl, utilizando un aumento de 100X.

Se identificaron diferencias morfológicas evidentes en el grupo de 16 meses alimentado *ad libitum*, cuyos núcleos presentaron una tinción más intensa y una aparente disminución en el tamaño y número de nucléolos. Estas características sugieren un estado heterocromático asociado a baja actividad transcripcional. En contraste, los núcleos observados en los grupos de 12 meses *ad libitum* y en ambos grupos con RC presentaron una morfología eucromática, con mayor tamaño, tinción más clara y forma circular, lo cual se relaciona con una mayor actividad metabólica (Figura 9a).

Para validar estas observaciones, se procedió a medir el tamaño nuclear. Se delimitó manualmente la periferia de cada núcleo observado y trazando dos líneas perpendiculares en el diámetro de cada célula (Figura 9b), registrando las dimensiones obtenidas para el análisis cuantitativo.

Los resultados del análisis estadístico revelaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de 16 meses con dieta *ad libitum* y el grupo con RC de la misma edad. Además, se observaron diferencias adicionales entre los grupos con RC y el grupo control de 2 meses de edad (Figura 9c). Estos hallazgos sugieren que

la RC podría contribuir a preservar la estructura nuclear y, potencialmente, la funcionalidad de las neuronas del giro dentado durante el envejecimiento.



**Figura 9. La restricción calórica previene la disminución del tamaño de los núcleos neuronales en el giro dentado en un modelo murino de envejecimiento. a)** Microfotografías representativas del giro dentado de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados *ad libitum* o con RC, teñidas mediante el método de Nissl. Los núcleos neuronales se observan teñidos de morado (100X). **b)** Esquema representativo del análisis morfométrico del tamaño de los núcleos neuronales en el giro dentado. **c)** Análisis estadístico del tamaño de los núcleos neuronales, con diferencias significativas entre los grupos experimentales; los animales con RC mostraron núcleos

de mayor tamaño en comparación con los alimentados *ad libitum*. Análisis realizado mediante ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey (n = 3). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  (\*);  $p < 0.001$  (\*\*); ns: no significativo.

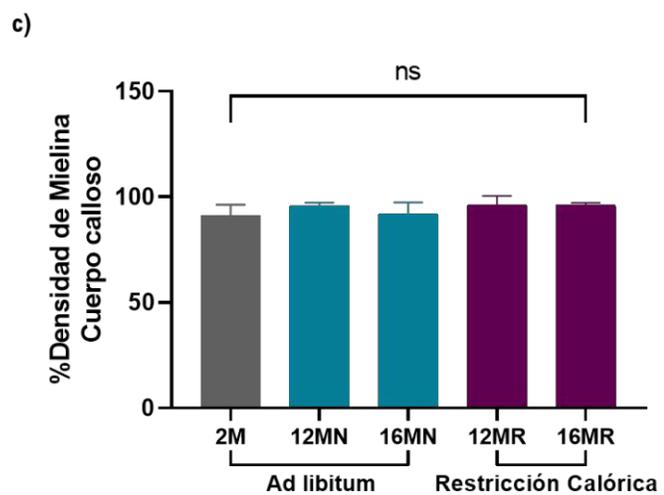
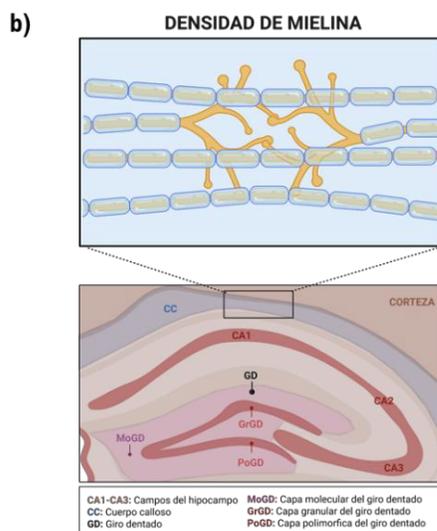
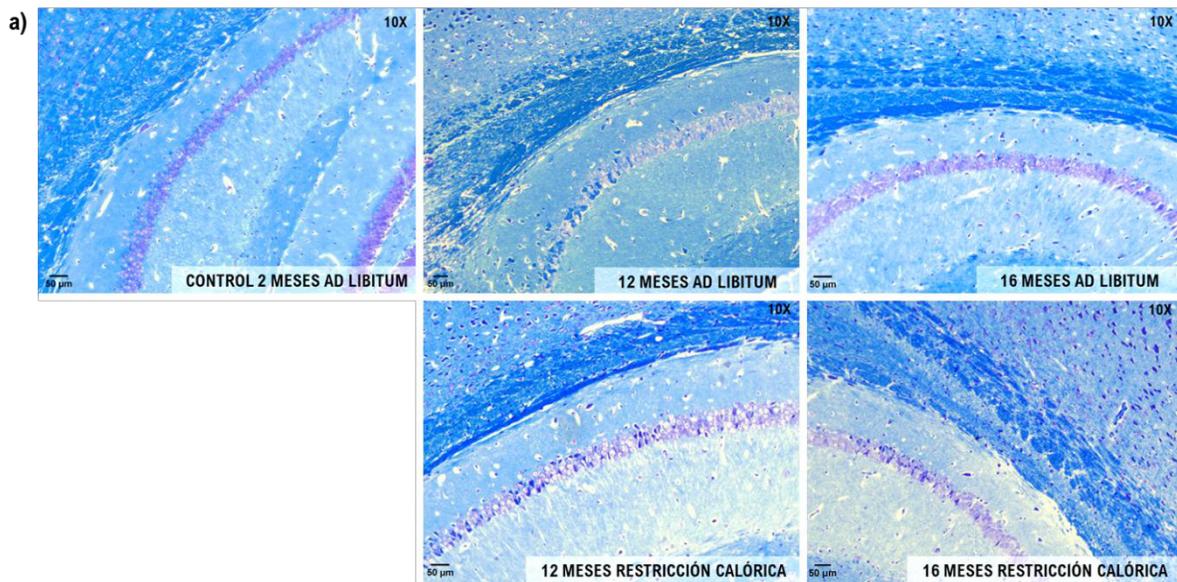
### **9.5 La restricción calórica no induce cambios en la densidad de la mielina del cuerpo calloso durante el envejecimiento**

Además de evaluar los cambios asociados a la estructura general y morfología neuronal, se consideró un componente clave para el mantenimiento de la función adecuada del sistema nervioso central: la mielina que recubre las fibras nerviosas (Parandavar, 2024). Diversos estudios han reportado que, durante el envejecimiento fisiológico normal en modelos murinos, disminuye la capacidad de mielinización por parte de los oligodendrocitos (Parandavar, 2024). Por esta razón, se decidió incluir la evaluación de este parámetro en el presente estudio.

El análisis se centró en el cuerpo calloso, una estructura ubicada entre la corteza cerebral y el hipocampo, compuesta por fibras mielinizadas que provienen tanto de neuronas corticales (motoras, sensoriales, entre otras) como de neuronas de integración del hipocampo.

Para el análisis histológico, se emplearon cortes teñidos con el método de Klüver–Barrera y se observaron con un aumento de 10X. En esta tinción, la mielina se visualiza con una coloración azul intensa, mientras que los núcleos neuronales aparecen en color morado gracias a la contratinción con violeta de cresilo. A nivel cualitativo, no se observaron alteraciones evidentes entre los grupos experimentales respecto a la intensidad de la mielinización (Figura 10a).

Para validar estas observaciones, se realizó un análisis morfométrico utilizando el software ImageJ, mediante el cual se calculó la densidad de mielina dividiendo el área teñida por mielina entre el área total del cuerpo calloso (Figura 10b). Los resultados del análisis estadístico confirmaron las observaciones cualitativas, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales en el porcentaje de densidad de mielina (Figura 10c).



**Figura 10. La restricción calórica no influye en la densidad de mielina del cuerpo caloso en un modelo animal de envejecimiento.** **a)** Microfotografías representativas del cuerpo caloso de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados con dieta *ad libitum* y con RC, teñidas mediante el método de Klüver-Barrera. La mielina se observa teñida en azul y los núcleos de células gliales y neuronas en morado (10X). **b)** Esquema representativo del análisis morfométrico del porcentaje de densidad de mielina. **c)** Análisis estadístico del porcentaje de densidad de mielina en cuerpo caloso, donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Análisis estadístico realizado mediante prueba de Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn (n = 3). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.05$ ;  $*p < 0.01$ ;  $**p < 0.001$ ; ns, no significativo.

## **9.6 La restricción calórica disminuye el proceso de apoptosis en el giro dentado durante el envejecimiento**

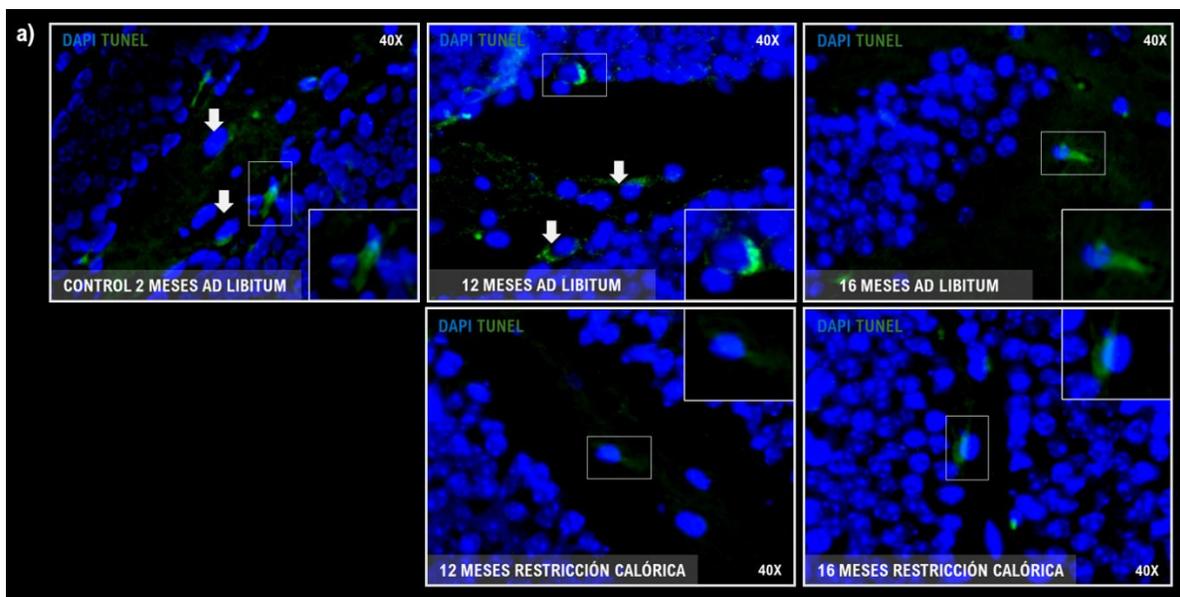
Durante el envejecimiento, la función de diversos mecanismos asociados al mantenimiento de la homeostasis tisular se ve comprometida debido a la acumulación progresiva de daños (López, 2023). Uno de estos mecanismos es la apoptosis, por lo que se decidió incluir su evaluación en el presente estudio.

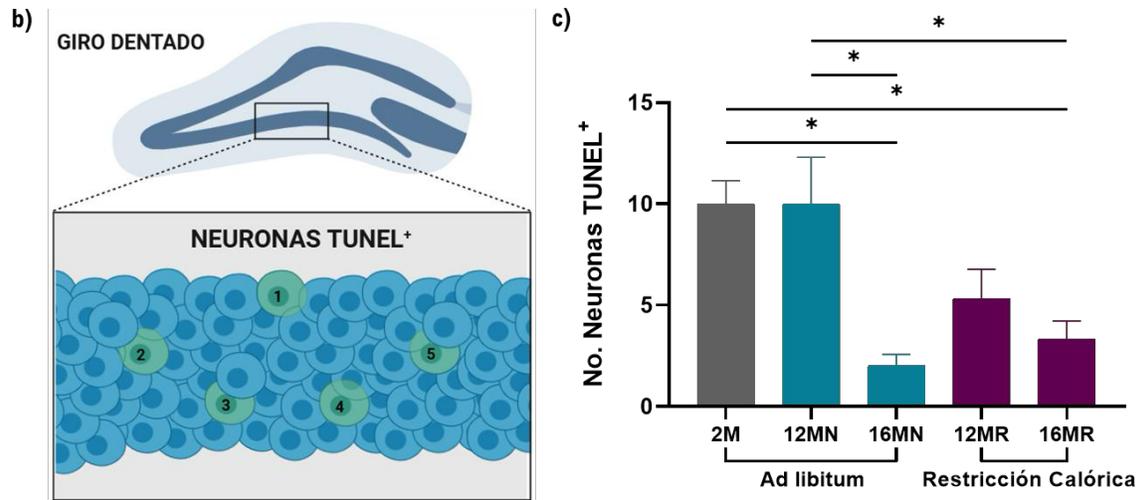
Se analizó una de las principales características de la apoptosis: la fragmentación de la cromatina, mediante el ensayo TUNEL, el cual permite la incorporación de una molécula fluorescente en los extremos 3'-OH del ADN fragmentado por acción de las caspasas. Las células positivas a esta técnica se visualizaron mediante una señal fluorescente verde, mientras que los núcleos neuronales fueron teñidos en azul mediante el marcador nuclear DAPI (Figura 11a).

A nivel cualitativo, se observaron diferencias en la cantidad de neuronas TUNEL<sup>+</sup> por campo, siendo más notoria en los grupos con alimentación *ad libitum* en comparación con aquellos bajo RC (Figura 11a).

Para validar estas observaciones, se realizó un análisis morfométrico cuantificando el número de neuronas TUNEL<sup>+</sup> (Figura 11b). Los resultados del análisis estadístico revelaron diferencias significativas, en donde los grupos con RC presentaron un menor número de neuronas apoptóticas en comparación con el grupo control y el grupo con dieta *ad libitum* a los 12 meses. Además, dentro de los grupos *ad libitum* se observó una disminución progresiva del número de neuronas apoptóticas a los 12 y 16 meses de edad (Figura 11c).

Estos hallazgos podrían indicar una pérdida progresiva de la capacidad apoptótica asociada al envejecimiento, mientras que este efecto parece atenuarse en condiciones de RC. Este efecto podría contribuir al mantenimiento del equilibrio tisular mediante una apoptosis regulada y eficiente.





**Figura 11. La restricción calórica disminuye la apoptosis neuronal en el giro dentado en un modelo murino de envejecimiento.** a) El proceso de apoptosis se evaluó usando el ensayo TUNEL para determinar la fragmentación de la cromatina en las neuronas del giro dentado de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados *ad libitum* o con RC. Los núcleos neuronales se visualizan con tinción DAPI (azul), y la fragmentación de la cromatina se observa mediante la señal TUNEL (verde) (40X). b) Esquema representativo del análisis morfométrico para el conteo de neuronas TUNEL<sup>+</sup> en el giro dentado. c) Análisis estadístico del número de neuronas positivas al ensayo TUNEL, mostrando una disminución significativa en los grupos con RC en comparación con los alimentados *ad libitum*. Análisis realizado mediante ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey (n = 3). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  (\*);  $p < 0.001$  (\*\*); ns: no significativo.

### 9.7 La restricción calórica no induce cambios en el proceso de autofagia en las neuronas del giro dentado durante el envejecimiento

La autofagia es un proceso celular clave en el mantenimiento de la homeostasis, cuyo deterioro durante el envejecimiento ha sido ampliamente documentado (López, 2023). Con el objetivo de evaluar si este mecanismo se ve alterado en nuestro modelo murino, se analizó la presencia del marcador LC3IIB, una forma

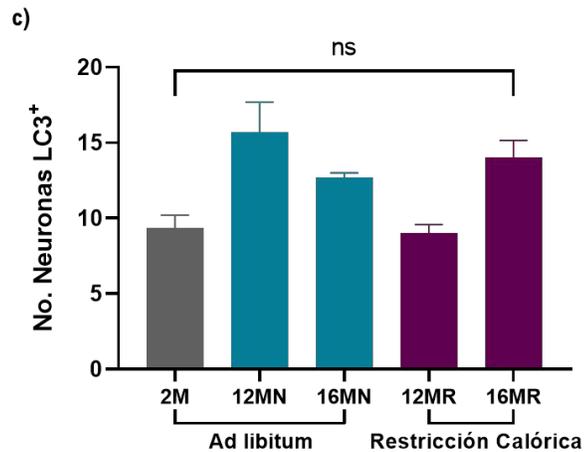
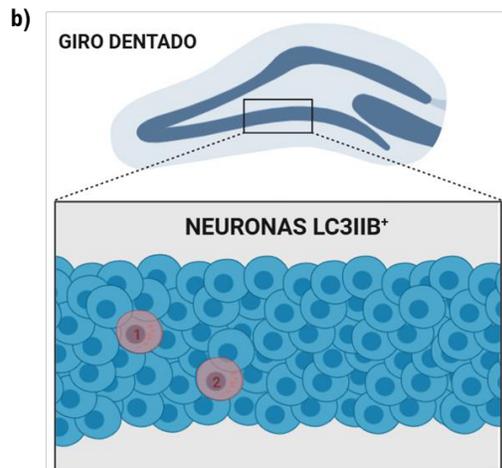
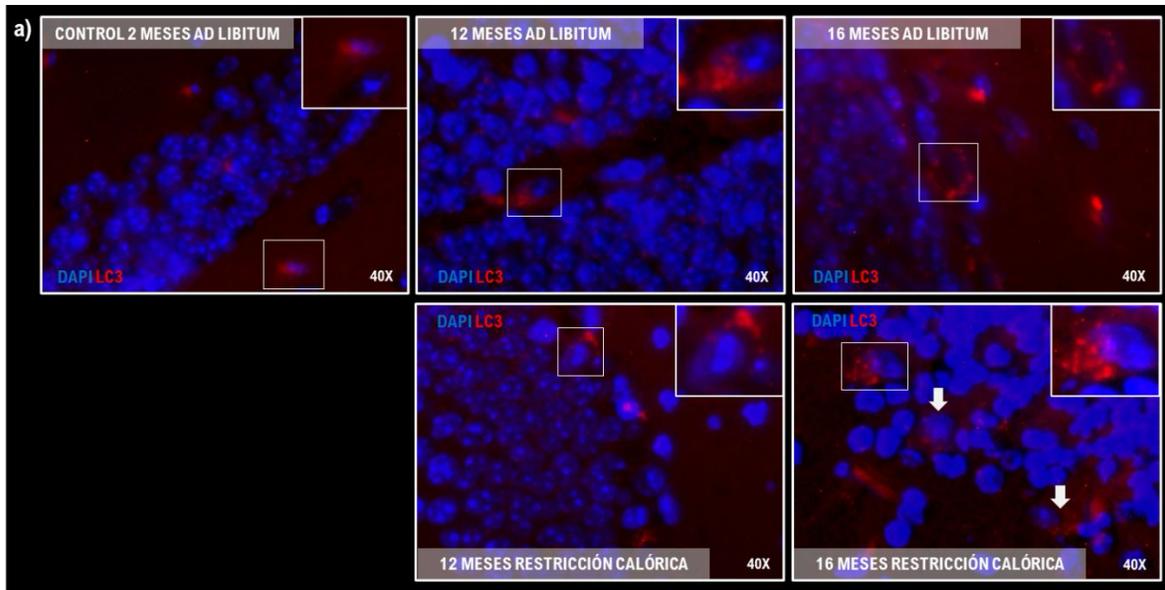
lipídica asociada a la membrana de los autofagosomas. La señal positiva a LC3IIB se visualizó mediante fluorescencia roja, mientras que los núcleos celulares se marcaron en azul con DAPI (Figura 12a).

El análisis cualitativo no reveló diferencias evidentes en la cantidad de neuronas LC3IIB+ por campo entre los distintos grupos experimentales. Tanto los animales alimentados *ad libitum* como aquellos sometidos RC, mostraron presencia de señal positiva para LC3IIB (Figura 12a).

Para confirmar estas observaciones, se realizó un análisis morfométrico cuantitativo del número de neuronas positivas a LC3IIB (Figura 12b). Los resultados estadísticos corroboraron la ausencia de diferencias significativas entre los grupos (Figura 12c). Sin embargo, se identificó una tendencia no significativa hacia un mayor número de neuronas LC3IIB+ en el grupo de 12 meses con RC en comparación con su control *ad libitum*.

Esta observación sugiere una posible preservación parcial del proceso autofágico en condiciones de RC a mediana edad. No obstante, dicha tendencia no se mantuvo a los 16 meses, lo que podría reflejar una declinación asociada a la progresión del envejecimiento, incluso bajo condiciones de intervención.

En conjunto, estos hallazgos plantean que la RC contribuya al sostenimiento transitorio de la actividad autofágica en etapas tempranas o intermedias del envejecimiento, apoyando el mantenimiento de la homeostasis tisular.



**Figura 12. La restricción calórica no induce cambios en el proceso de autofagia en el giro dentado en un modelo animal de envejecimiento. a)** Inmunofluorescencias representativas de la detección de neuronas positivas a autofagia utilizando el anticuerpo anti-LC3IIB en giro dentado de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados con dieta *ad libitum* y con RC (40X). **b)** Esquema representativo del análisis morfométrico del conteo de neuronas LC3IIB positivas. **c)** Análisis estadístico del número de neuronas LC3IIB<sup>+</sup>, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Análisis estadístico realizado mediante prueba de Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn (n = 3). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.05$ ;  $*p < 0.01$ ;  $**p < 0.001$ ; ns, no significativo.

## **9.8 La restricción calórica no induce cambios estructurales en la capa granular y molecular del cerebelo durante el envejecimiento**

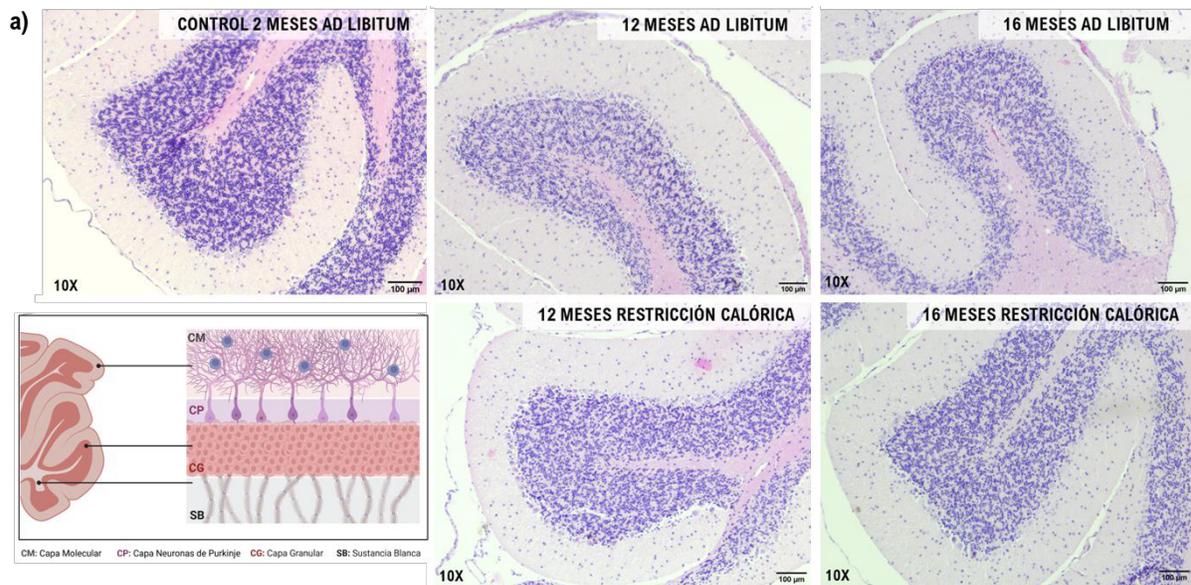
El cerebelo es una región del sistema nervioso central encargada de recibir información de diversas áreas de la corteza cerebral y participa en la ejecución de movimientos complejos, que incluyen la planificación de secuencias espaciales y temporales intrincadas (Christopher, 2024). Durante el envejecimiento fisiológico, se ha reportado una disminución en el volumen del cerebelo, atribuida a la reducción de sustancia blanca, la pérdida de somas en las neuronas de Purkinje y el adelgazamiento de las capas de sustancia gris (Mohamed, 2020). Por esta razón, se decidió enfocar el análisis morfológico en esta región, con el objetivo de identificar diferencias en su organización estructural.

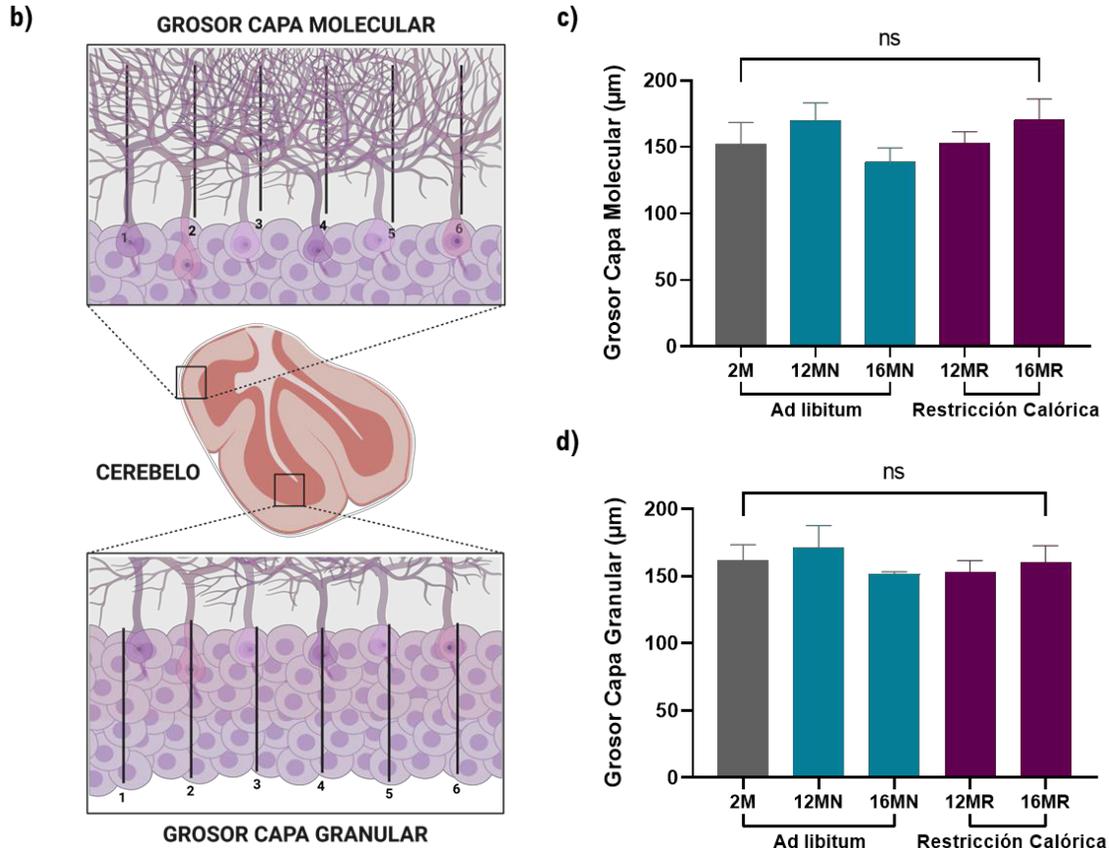
Para ello, se realizaron observaciones con un objetivo de 10X utilizando la tinción de hematoxilina y eosina. Desde la periferia del lóbulo cerebeloso hacia el centro, se distingue la sustancia gris, compuesta por la capa molecular (CM) de aspecto eosinófilo, la capa de células de Purkinje (PC) y la capa granular (CG), ambas basófilas. También se identifica claramente la sustancia blanca. De manera general, no se observaron alteraciones estructurales evidentes entre los distintos grupos experimentales (Figura 13a).

Para validar estas observaciones cualitativas, se llevó a cabo un análisis morfométrico, tomando como parámetros el grosor de la capa molecular y de la capa granular del cerebelo (Figura 13b). El análisis estadístico posterior no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales alimentados con dieta *ad libitum* o con RC, independientemente de la edad, en

ninguna de las capas evaluadas (Figuras 13c y 13d). Sin embargo, se observó una tendencia a la disminución en el grosor de la capa molecular en el grupo de 16 meses con dieta *ad libitum*, en comparación con su contraparte de 12 meses. En contraste, el grupo con RC mostró una tendencia al aumento del grosor en esta misma capa (Figura 13c).

Estos hallazgos sugieren que los posibles cambios morfológicos en las capas del cerebelo asociados al envejecimiento podrían manifestarse de forma más evidente en etapas más avanzadas, y que la RC podría contribuir a atenuar dichas alteraciones de forma sutil en **etapas** intermedias del proceso de envejecimiento.





**Figura 13. La restricción calórica no induce cambios en la capa granular y molecular del cerebelo en un modelo animal de envejecimiento. a)** Microfotografías representativas de lóbulos cerebelosos de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados *ad libitum* o con RC, teñidas con hematoxilina y eosina (10X). **b)** Esquema del análisis morfométrico del grosor de la capa molecular y granular. **c)** Análisis estadístico del grosor de la capa molecular, sin diferencias significativas entre grupos. Se utilizó ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey ( $n = 3$ ). **d)** Análisis estadístico del grosor de la capa granular, sin diferencias significativas entre grupos. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn ( $n = 3$ ). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  (\*);  $p < 0.001$  (\*\*); ns: no significativo.

## **9.9 La restricción calórica no induce cambios en la densidad de la mielina en la sustancia blanca del cerebelo durante el envejecimiento**

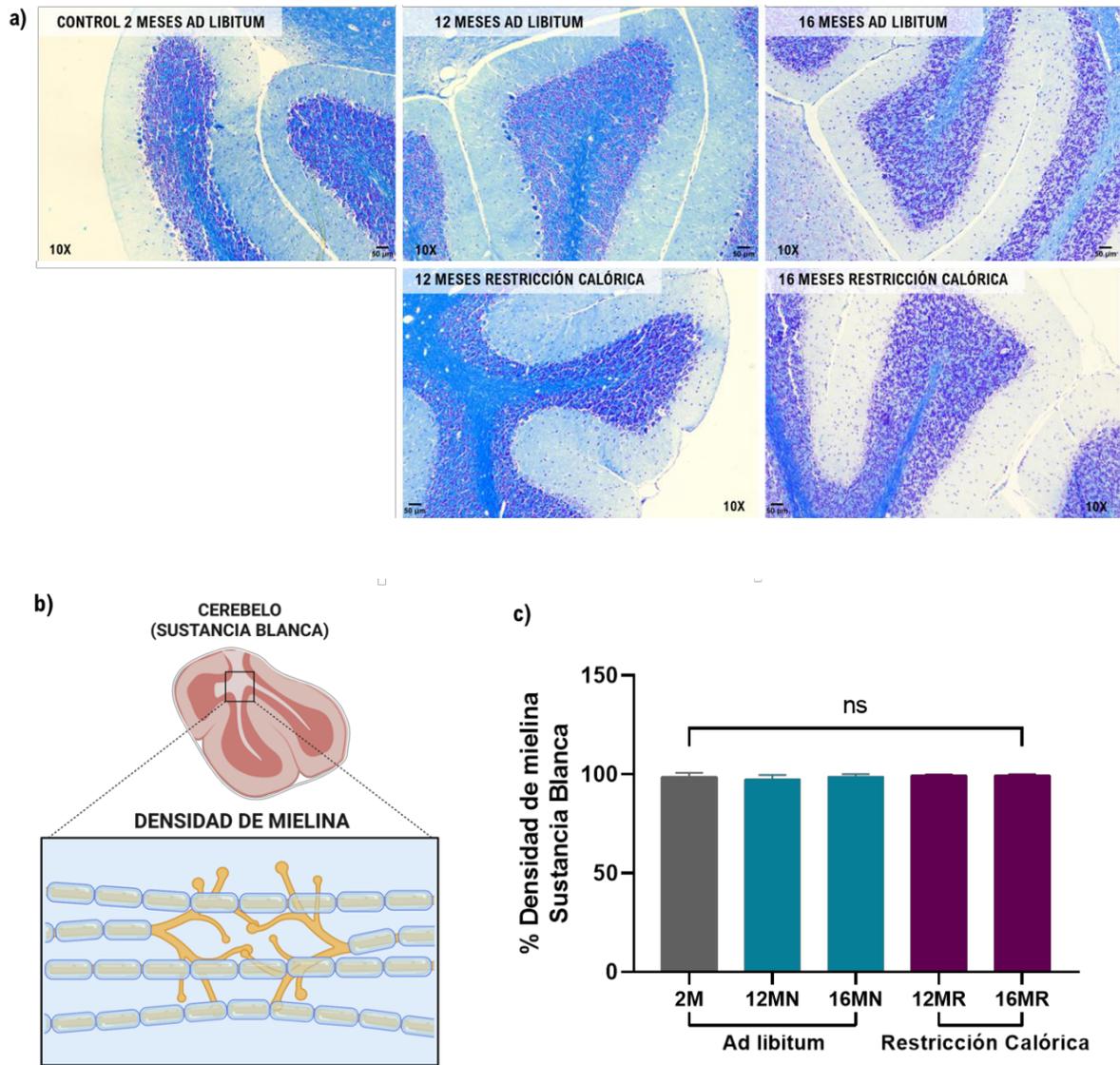
Durante el envejecimiento, uno de los principales indicadores de deterioro en las funciones del sistema nervioso es la alteración de la sustancia blanca (Chapman, 2019). Diversos estudios han demostrado que la RC ejerce un efecto neuroprotector, al prevenir el proceso de desmielinización (Mojaverrostami, 2020). Por esta razón, en este estudio se evaluaron los cambios morfológicos en la mielina de la sustancia blanca del cerebelo entre los distintos grupos experimentales.

Para el análisis histológico, se utilizaron cortes teñidos con el método de Klüver–Barrera, observados con un aumento de 10X. En esta tinción, la mielina se visualiza con una coloración azul intensa, mientras que los núcleos neuronales se tiñen de color morado gracias a la contratinción con violeta de cresilo. A nivel cualitativo, no se identificaron alteraciones evidentes en la intensidad de la mielinización entre los grupos (Figura 14a).

Para complementar estas observaciones, se llevó a cabo un análisis morfométrico, evaluando como parámetro la densidad de mielina en la sustancia blanca (Figura 14b). El análisis estadístico posterior no reveló diferencias significativas entre los grupos alimentados *ad libitum* y aquellos con RC (Figura 14c).

Estos resultados sugieren que el proceso de desmielinización asociado al envejecimiento aún no se manifiesta de forma evidente en murinos de 16 meses de edad, lo que indica que podría requerirse etapas más avanzadas del envejecimiento para su detección.

Además, la RC no indujo cambios detectables en la preservación de este componente estructural a la edad evaluada.



**Figura 14. La restricción calórica no influye en la densidad de mielina en la sustancia blanca del cerebelo en un modelo animal de envejecimiento. a)** Microfotografías representativas del cerebelo de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados con dieta *ad libitum* y con RC, teñidas mediante el método de Klüver-Barrera. La mielina se observa teñida en azul, mientras que los núcleos de la glía y neuronas se observan en morado (10X). **b)** Esquema representativo del análisis morfométrico del porcentaje de densidad de mielina. **c)** Análisis estadístico del porcentaje de

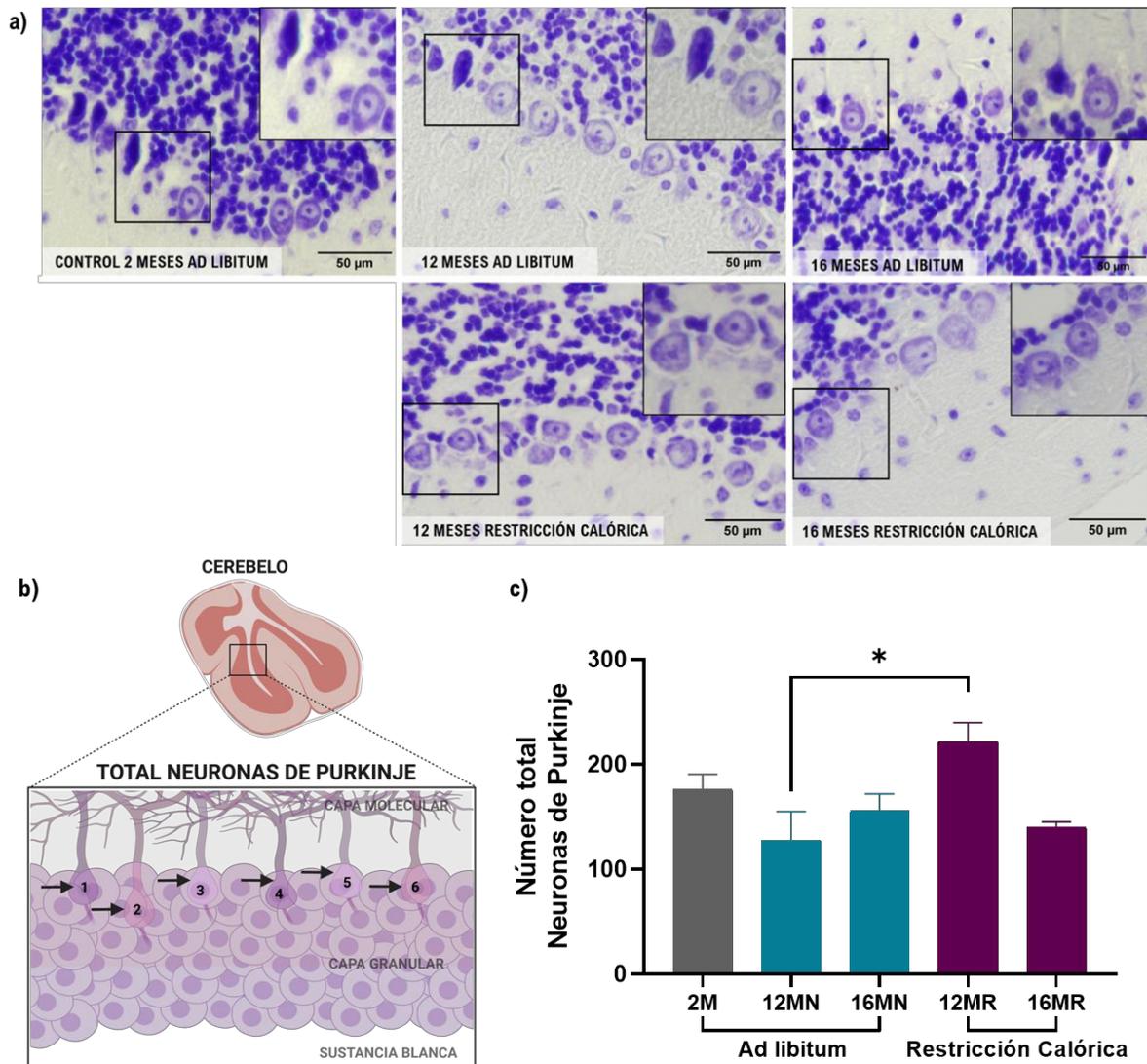
densidad de mielina en sustancia blanca, donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Análisis estadístico realizado mediante prueba de Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn (n = 3). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.05$ ;  $*p < 0.01$ ;  $**p < 0.001$ ; ns, no significativo.

### **9.10 La restricción calórica ejerce un efecto neuroprotector sobre las neuronas de Purkinje del cerebelo durante el envejecimiento**

En la sustancia gris del cerebelo se encuentra una capa de neuronas especializadas, conocidas como células de Purkinje, que desempeñan un papel fundamental en la plasticidad sináptica, la integración de la información y la conducción del impulso nervioso necesario para el equilibrio y la coordinación motora. Diversos estudios han reportado que, durante el envejecimiento, estas neuronas presentan alteraciones estructurales (Zhang, 2010).

Con base en esta evidencia, se estableció como parámetro principal evaluar si existían cambios en el número de células de Purkinje asociados al envejecimiento y a la intervención dietética. Para ello, se analizaron cortes histológicos teñidos con el método de Nissl, utilizando un aumento de 40X. El análisis morfométrico consistió en un conteo manual del número total de células de Purkinje (Figura 15b).

Los resultados del análisis estadístico mostraron una diferencia significativa entre los grupos de 12 meses, con un mayor número de células de Purkinje en el grupo con RC en comparación con el alimentado *ad libitum*. En los grupos de 16 meses no se observaron diferencias significativas, independientemente del régimen alimenticio (Figura 8c).



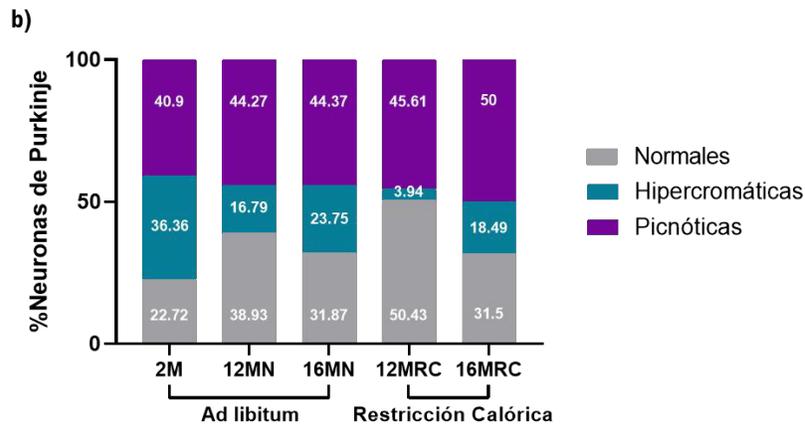
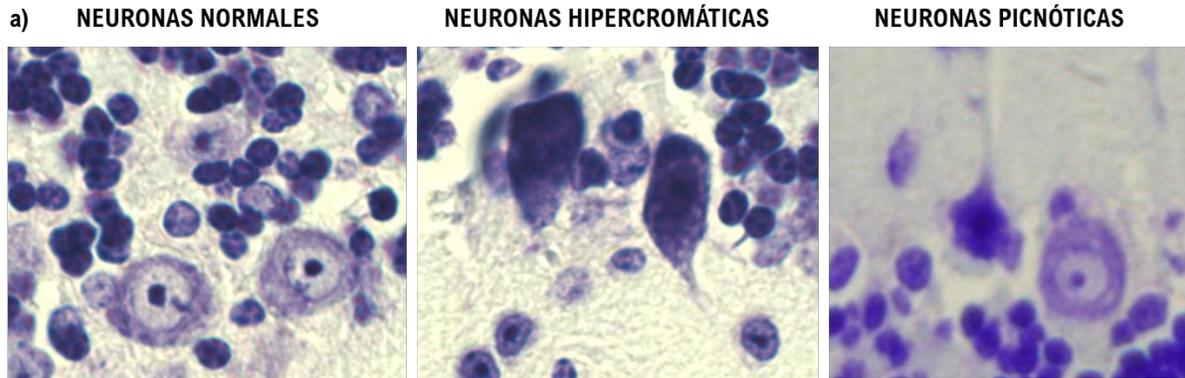
**Figura 15. La restricción calórica previene la disminución de neuronas de Purkinje en el cerebelo de un modelo murino de envejecimiento. a)** Microfotografías representativas de la capa de neuronas de Purkinje en el cerebelo de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados *ad libitum* o con RC, teñidas mediante el método de Nissl. Los núcleos de las células granulares y de las neuronas de Purkinje se observan teñidos de morado (40X). **b)** Esquema del análisis morfométrico utilizado para la cuantificación del número total de neuronas de Purkinje en el cerebelo. **c)** Análisis estadístico que muestra una diferencia significativa entre los grupos de 12 meses alimentados con RC y *ad libitum*. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey (n = 3). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  (\*);  $p < 0.001$  (\*\*); ns: no significativo.

### **9.11 La restricción calórica previene los cambios morfológicos asociados al envejecimiento sobre las neuronas de Purkinje del cerebelo**

A partir del análisis morfológico inicial, se observaron diferencias en la apariencia de las neuronas de Purkinje entre los distintos grupos experimentales (Figura 15a, acercamiento). Por ello, se decidió profundizar en su caracterización morfológica, con el objetivo de identificar posibles signos de daño celular asociados al envejecimiento o modulados por la intervención dietética. Para ello, se emplearon los criterios descritos por Becerra Verdín, clasificando las neuronas en tres categorías según su morfología: normales, con hipercromasia y en picnosis (Figura 16a).

El análisis se llevó a cabo en cortes histológicos teñidos con el método de Nissl, utilizando un aumento de 40X. Se llevó a cabo un conteo manual del número total de neuronas de Purkinje, clasificándolas según su morfología, y posteriormente se determinó el porcentaje correspondiente a cada categoría (Figura 16b).

Los resultados del análisis estadístico mostraron que el porcentaje de neuronas con morfología picnótica se mantuvo entre el 45 y el 50% en todos los grupos experimentales. En cuanto a las neuronas con morfología normal, el grupo de 12 meses con RC presentó un mayor porcentaje en comparación con el grupo alimentado *ad libitum*. Asimismo, se observó una reducción en la proporción de neuronas con hipercromasia en el grupo de 12 meses con RC, en relación con su control *ad libitum*. Esta misma tendencia se mantuvo en los grupos de 16 meses, destacando una menor proporción de neuronas hipercromáticas en los animales con RC.



**Figura 16. La restricción calórica promueve la preservación de la morfología normal de las neuronas de Purkinje en el cerebelo de un modelo murino de envejecimiento. a)** Microfotografías representativas de la clasificación morfológica de las neuronas de Purkinje. Las neuronas normales presentan un núcleo eucromático, esférico y con nucléolo prominente; las neuronas con hiperchromasia muestran una tinción intensa en la que no se distingue el núcleo ni el nucléolo; las neuronas con picnosis exhiben un núcleo compactado, con cromatina fragmentada y de forma irregular. **b)** Análisis estadístico del porcentaje correspondiente a cada categoría morfológica. Se observa que, en los grupos de 12 meses, la dieta con RC se asocia con un mayor porcentaje de neuronas normales y una reducción en las neuronas con hiperchromasia, en comparación con el grupo alimentado *ad libitum*. Esta misma tendencia se mantiene en los grupos de 16 meses, destacando una menor proporción de neuronas hiperchromáticas en animales con RC. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey ( $n = 3$ ). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  (\*);  $p < 0.001$  (\*\*); ns: no significativo.

## 9.12 La restricción calórica reduce la apoptosis de neuronas de Purkinje en el cerebelo durante el envejecimiento

Las neuronas de Purkinje en el cerebelo son células de gran tamaño, con alta actividad metabólica y transcripcional, lo que las hace particularmente vulnerables al daño acumulativo asociado al envejecimiento, en particular cuando los mecanismos que regulan la homeostasis tisular se ven comprometidos (Cooper, 2024). Dichas alteraciones pueden derivar en un estado de daño celular excesivo, que conduce a la activación de la vía apoptótica.

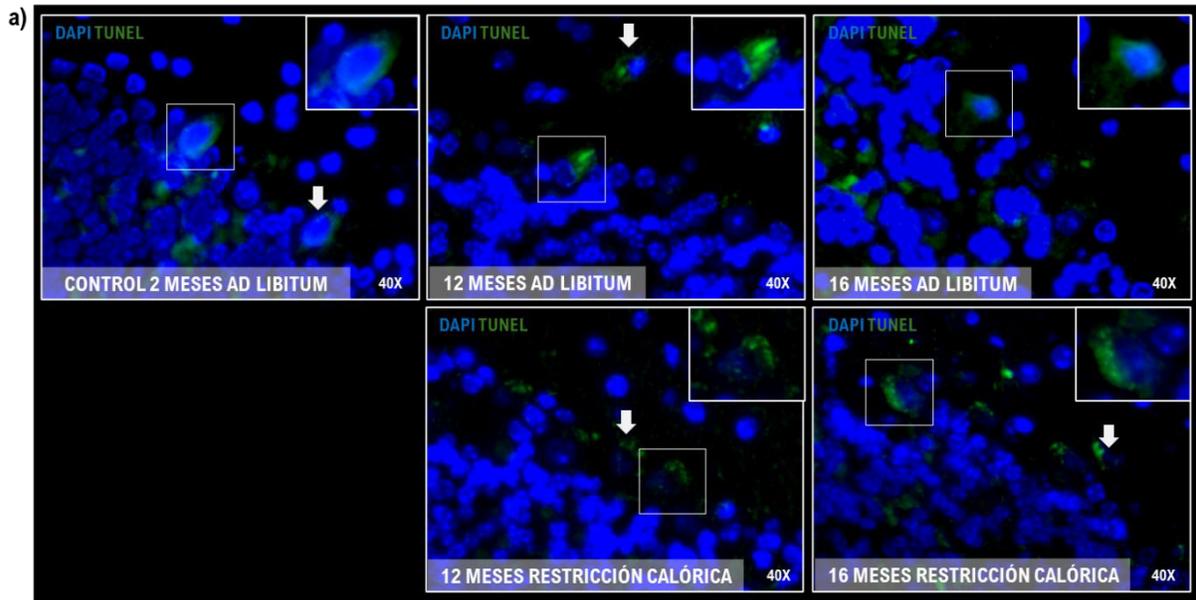
Con el fin de evaluar este proceso, se analizó la fragmentación de la cromatina como indicador de apoptosis mediante el ensayo TUNEL. La positividad en esta técnica se visualizó como una señal fluorescente verde, mientras que los núcleos neuronales fueron visualizados en azul mediante la tinción nuclear con DAPI (Figura 17a).

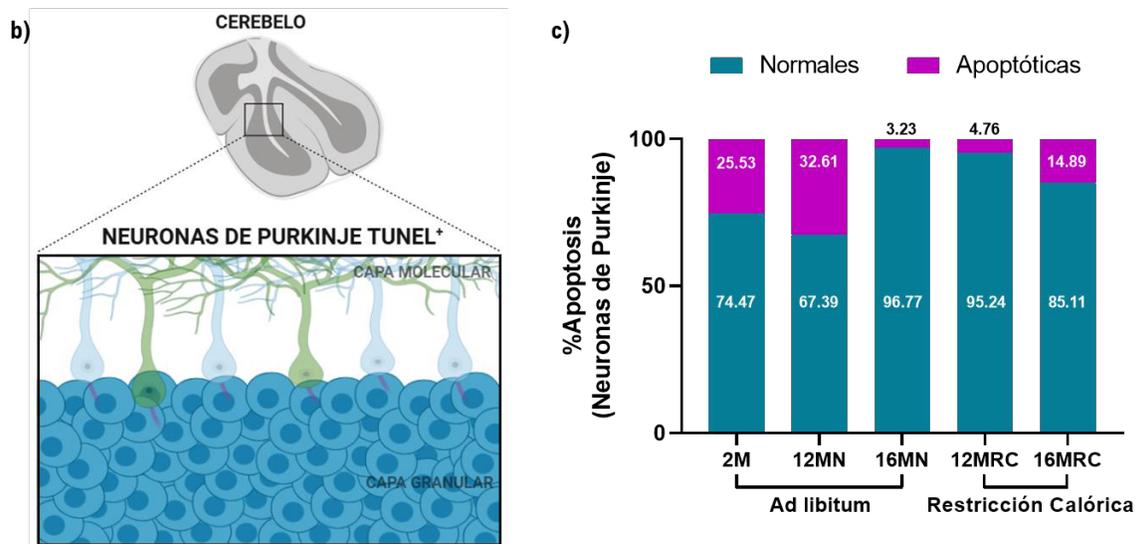
Los grupos experimentales mostraron diferencias cualitativas en la cantidad de neuronas TUNEL-positivas por campo, observándose una mayor presencia de células apoptóticas en los grupos alimentados *ad libitum* en comparación con aquellos bajo RC (Figura 17a).

Para validar estas observaciones, se realizó un análisis morfométrico cuantificando el número de neuronas TUNEL-positivas (Figura 17b). Los resultados del análisis estadístico revelaron diferencias significativas: los grupos con RC presentaron un menor número de neuronas apoptóticas en comparación con los grupos control y con dieta *ad libitum* a los 12 meses de edad. Asimismo, dentro de los grupos *ad*

*libitum*, se observó una disminución progresiva del número de neuronas apoptóticas entre los 12 y 16 meses (Figura 11c).

Estos hallazgos podrían indicar una posible resistencia o pérdida progresiva del proceso apoptótico asociada al envejecimiento. En contraste, este efecto parece atenuarse en condiciones de RC, lo que sugiere un papel protector de esta intervención al favorecer una apoptosis regulada y, con ello, contribuir al mantenimiento del equilibrio tisular en el cerebelo.





**Figura 17. La restricción calórica disminuye la apoptosis de neuronas de Purkinje en el cerebelo en un modelo murino de envejecimiento.** a) El proceso de apoptosis se evaluó mediante el ensayo TUNEL, que permite detectar la fragmentación de la cromatina en las neuronas de Purkinje del cerebelo de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados *ad libitum* o con RC. Los núcleos neuronales se visualizan con tinción DAPI (azul) y la fragmentación de la cromatina se observa a través de la señal TUNEL (verde) (40X). b) Esquema representativo del análisis morfométrico utilizado para el conteo de neuronas de Purkinje TUNEL+ en el cerebelo. c) Análisis estadístico del porcentaje de neuronas positivas al ensayo TUNEL. Se observó una disminución significativa en el grupo de 12 meses con RC en comparación con el grupo alimentado *ad libitum*. El análisis se realizó mediante ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey (n = 3). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  (\*);  $p < 0.001$  (\*\*); ns: no significativo.

### 9.13 La restricción calórica no induce cambios en el proceso de autofagia en las neuronas de Purkinje en el cerebelo en un modelo animal de envejecimiento

Las neuronas de Purkinje se caracterizan por presentar un soma y núcleo de gran tamaño, reflejo de su elevada actividad transcripcional, alta demanda metabólica y transporte constante de organelos a lo largo del axón hacia sus terminaciones

sinápticas. Debido a estas propiedades, estas neuronas dependen de manera continua del proceso de autofagia para mantener su funcionalidad. Sin embargo, durante el envejecimiento, diversos mecanismos moleculares asociados al mantenimiento de la homeostasis se ven comprometidos, incluyendo la autofagia (López, 2023).

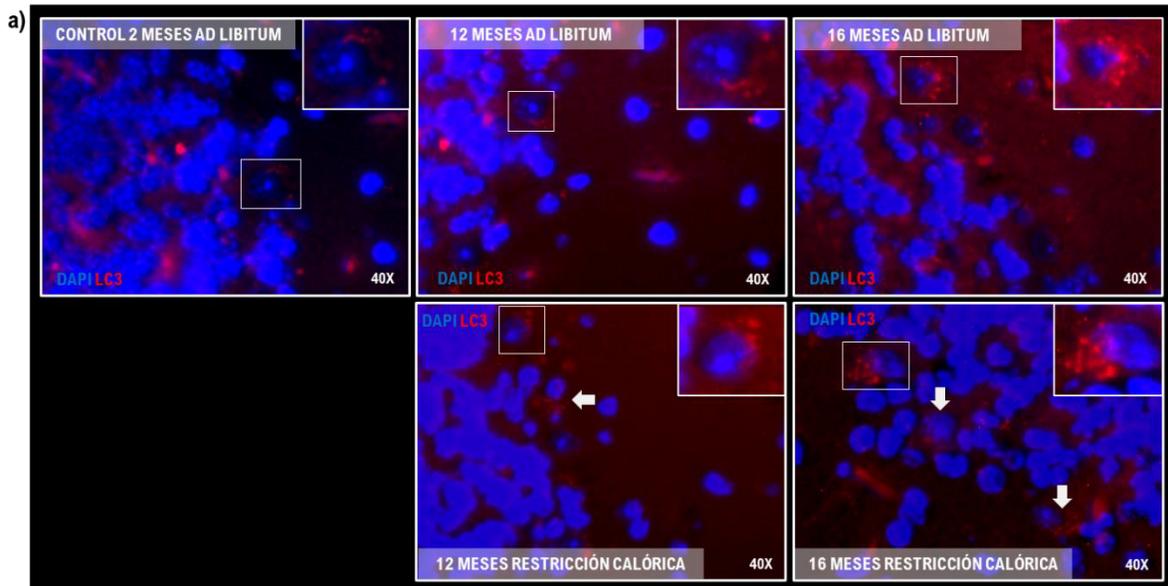
Con el fin de evaluar posibles alteraciones en este proceso, se analizó la señal del marcador LC3IIB, asociado a la formación de autofagosomas. La señal positiva a LC3IIB fue detectada mediante fluorescencia roja, y los núcleos celulares fueron marcados en azul con DAPI (Figura 18a).

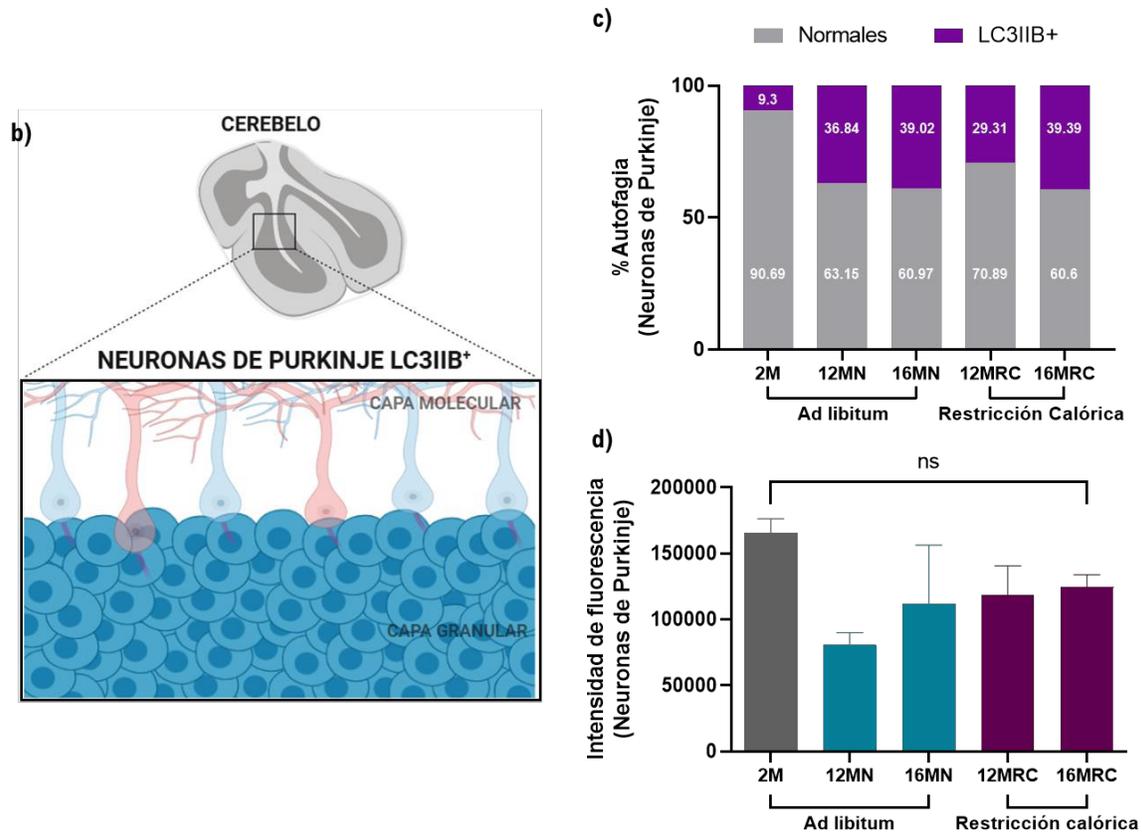
El análisis cualitativo mostró diferencias notables en la cantidad de neuronas LC3IIB<sup>+</sup> entre los distintos grupos experimentales. En particular, se observó un aumento en la señal del marcador en los grupos sometidos a RC, así como una mayor intensidad de fluorescencia (Figura 18a).

Para corroborar estas observaciones, se realizó un análisis morfométrico cuantificando el número y porcentaje de neuronas de Purkinje positivas a LC3IIB, además de medir la intensidad de fluorescencia para determinar la actividad autofágica entre los grupos experimentales (Figura 18b). El análisis estadístico reveló una diferencia significativa en el grupo de 12 meses con RC, que mostró una menor proporción de neuronas LC3IIB<sup>+</sup> en comparación con su grupo control *ad libitum* (Figura 18c). En contraste, a los 16 meses, ambos grupos presentaron porcentajes similares, independientemente del régimen alimenticio. No obstante, en

el análisis de la intensidad de fluorescencia, se observó una tendencia en los grupos con RC de mayor actividad autofágica, en comparación con los grupos *ad libitum*.

Dado que la autofagia participa en la degradación y reciclaje de organelos y proteínas dañadas, una menor positividad e intensidad de LC3IIB podría interpretarse como una reducción en la formación de autofagosomas. Estos resultados sugieren que, a los 12 meses, la RC podría estar modulando la actividad autofágica, al activar este proceso por una mejor eficiencia metabólica o menor acumulación de daño celular. Sin embargo, a edades más avanzadas, este efecto no sufre modificaciones, lo cual podría deberse a la progresión del envejecimiento y la pérdida de capacidad adaptativa en las neuronas de Purkinje.





**Figura 18.** La restricción calórica no induce cambios en el proceso de autofagia en las neuronas de Purkinje en el cerebelo en un modelo animal de envejecimiento. **a)** Inmunofluorescencias representativas de la detección de las neuronas de Purkinje positivas a autofagia utilizando el anticuerpo anti-LC3IIB en cerebelo de ratones de 2, 12 y 16 meses de edad, alimentados con dieta *ad libitum* y con RC (40X). **b)** Esquema representativo del análisis morfométrico del conteo de neuronas LC3IIB<sup>+</sup>. **c)** Análisis estadístico del número de neuronas LC3IIB<sup>+</sup>, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. **d)** Análisis estadístico de la intensidad de fluorescencia de LC3IIB, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Análisis estadístico realizado mediante prueba de Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn (n = 3). Se consideró estadísticamente significativo un valor de p<0.05; p<0.05; \*p<0.01; \*\*p<0.001; ns, no significativo.

# CAPÍTULO 10

## DISCUSIÓN

El envejecimiento cerebral es un proceso complejo y multifactorial que conlleva un deterioro progresivo de distintas estructuras neuronales, manifestándose en alteraciones tanto morfológicas como funcionales. Entre los procesos más afectados se encuentran la integridad de la mielina, la homeostasis celular y la supervivencia neuronal (Hou, 2019; López, 2023). Las regiones cerebrales más vulnerables a estos cambios incluyen el hipocampo y el cerebelo, fundamentales para las funciones cognitivas y sensoriomotoras, respectivamente (Zhao, 2022; Mohamed, 2020).

En este contexto, la RC se ha propuesto como una estrategia capaz de modular múltiples mecanismos involucrados en el envejecimiento cerebral, promoviendo la longevidad y ejerciendo efectos neuroprotectores en distintos modelos animales (Ma, 2020; Duregon, 2021; Jafar, 2024).

En el presente estudio se evaluó el impacto de la RC sobre el hipocampo y el cerebelo mediante análisis morfométrico, complementado con la evaluación de procesos celulares clave relacionados con el mantenimiento de la homeostasis tisular, como la apoptosis y la autofagia.

Los resultados indican que la RC atenúa algunos de los cambios morfológicos y celulares típicamente asociados al envejecimiento cerebral, particularmente en aspectos relacionados a la morfología neuronal, mielinización, muerte celular y autofagia.

El análisis morfométrico del hipocampo reveló que, en los animales de 16 meses alimentados *ad libitum*, se observaron alteraciones estructurales evidentes. Cualitativamente, se identificó una menor densidad celular y una definición menos clara del giro dentado, lo cual fue confirmado cuantitativamente mediante la medición del área total y el grosor de esta estructura. Aunque el área total no presentó diferencias estadísticamente significativas, sí se observaron cambios en el grosor del giro dentado. Estos hallazgos son consistentes con reportes previos que describen una pérdida progresiva de la integridad celular en el hipocampo durante el envejecimiento normal (Lee et al., 2000; Zhao et al., 2022).

Asimismo, al analizar el número y tamaño de núcleos celulares, se encontró que, aunque la cantidad total de núcleos no mostró cambios relevantes, el tamaño nuclear disminuyó en los animales envejecidos alimentados *ad libitum*. En contraste, la RC mitigó esta reducción en animales de la misma edad, lo que sugiere un efecto protector frente al deterioro morfológico esperado. Esta preservación podría deberse a una disminución del estrés oxidativo y a la activación de vías metabólicas asociadas con la longevidad celular (Ma, 2020; Durego, 2021).

En la región del cerebelo, se observó una tendencia a la reducción del grosor de la capa molecular. En particular, se observó una leve reducción en los animales de 16 meses alimentados *ad libitum*, posiblemente relacionada con la pérdida progresiva de neuronas de Purkinje y alteraciones en la conectividad sináptica, recordando que esta capa está compuesta principalmente por dendritas de neuronas de Purkinje y axones paralelos de células granulares, por lo que su adelgazamiento se ha

asociado con procesos de degeneración dendrítica y reorganización sináptica durante el envejecimiento (Zhang., 2010; Mojaverrostami, 2023)

En cambio, el grosor de la capa granular no mostró diferencias significativas entre los grupos, lo que sugiere una relativa estabilidad estructural en esta región, independientemente de la dieta.

No obstante, el análisis específico de las neuronas de Purkinje, fundamentales para la coordinación motora, reveló hallazgos relevantes. Se observó un aumento en el número total de estas neuronas en el grupo de 12 meses con RC, lo que podría indicar una conservación celular inducida por esta intervención. En contraste, los animales de 16 meses alimentados *ad libitum* presentaron un mayor porcentaje de neuronas con morfología alterada (incluyendo hipercromasia, retracción del soma y picnosis), características típicas de degeneración neuronal, descritos previamente en el envejecimiento (Woodruff, 2010; Mahmood, 2020).

La RC redujo la proporción de células alteradas y tendió a preservar un mayor número total de neuronas de Purkinje, lo cual apunta a un efecto neuroprotector sobre esta población neuronal (Luo, 2020). Esta preservación sugiere que la intervención dietética podría mitigar procesos degenerativos que contribuyen a déficits funcionales durante la senescencia.

La mielina es otro componente esencial en el envejecimiento cerebral, ya que su deterioro compromete la transmisión eficiente de los impulsos nerviosos (Parandavar, 2024). En este estudio se evaluó la integridad de la mielina mediante tinción de Klüver-Barrera en el cuerpo caloso y la sustancia blanca cerebelosa. No

se observaron diferencias evidentes entre los grupos de 12 y 16 meses alimentados *ad libitum* o con RC, lo cual sugiere que, al menos hasta esta edad, no ocurre una desmielinización significativa detectable mediante esta técnica.

Estos resultados concuerdan con estudios que indican que la pérdida de mielina durante el envejecimiento puede ser un proceso más tardío o focal (Lasiene , 2009; Mojaverrostami, 2023). No obstante, el método empleado evalúa la mielina de forma indirecta, por lo que se propone que futuros estudios incluyan técnicas complementarias de mayor resolución, como inmunohistoquímica para marcadores de oligodendrocitos (Olig2, NG2, CNPase) y proteínas de mielina (MBP, MOG), así como microscopía electrónica de transmisión para identificar cambios ultraestructurales (Zhang, 2019; Sturrock, 1980).

De igual manera, estudios funcionales como la medición de potenciales evocados o pruebas de conducción nerviosa podrían ayudar a determinar si existen alteraciones funcionales asociadas a posibles cambios estructurales en la mielina (Peters, 2002; Marner, 2003).

Durante el envejecimiento, uno de los procesos celulares más afectados es la apoptosis neuronal. Aunque es un mecanismo fisiológico necesario para el mantenimiento del tejido, su activación excesiva puede contribuir a la pérdida neuronal progresiva (Yankner, 2008; Mattson, 2018). En este estudio, se utilizó la técnica de TUNEL para identificar células en etapas avanzadas de apoptosis.

Los resultados mostraron un incremento en el número de células TUNEL<sup>+</sup> en el hipocampo y el cerebelo de animales de 16 meses alimentados *ad libitum*, en

concordancia con estudios que relacionan el envejecimiento con mayor activación de vías apoptóticas inducidas por estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y daño en el ADN (Cao, 2022; Camandola, 2017; López, 2013). Además, se observaron núcleos picnóticos e hipercromáticos, característicos de células en proceso de muerte programada.

Por el contrario, los animales bajo RC presentaron una menor cantidad de células TUNEL<sup>+</sup>, lo que sugiere que esta intervención tiene un efecto protector sobre la viabilidad neuronal. Estudios previos han propuesto que este efecto se debe a la regulación de vías moleculares asociadas con la supervivencia celular, como la activación de sirtuinas (SIRT1, SIRT3), la inhibición de mTOR, y la expresión de factores antiapoptóticos como Bcl-2 (Guo et al., 2020; Ma et al., 2020; Mattison et al., 2017).

La interacción entre apoptosis y autofagia también es relevante en este contexto. Se ha planteado que la RC promueve la autofagia basal, un proceso que permite la eliminación de organelos dañados y proteínas mal plegadas, y que podría disminuir la activación apoptótica asociada a estrés intracelular prolongado (Madeo, 2019; Rubinsztein, 2011). Esta interacción funcional entre autofagia y apoptosis puede representar uno de los mecanismos clave mediante los cuales la RC ejerce su efecto neuroprotector.

Finalmente, en cuanto al proceso de autofagia, el análisis de neuronas positivas al marcador LC3IIB en el giro dentado no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. En contraste, en el cerebelo (específicamente en las neuronas de Purkinje) se observó una disminución

significativa en el número de neuronas positivas a este marcador en los grupos de 12 meses con RC, en comparación con sus controles alimentados *ad libitum*. No obstante, el análisis de intensidad de fluorescencia reveló una tendencia a una mayor señal del marcador en los grupos con RC de 12 y 16 meses. Estas observaciones sugieren que la actividad autofágica no solo varía en función del régimen alimenticio y la edad, sino también entre regiones cerebrales.

Las neuronas de Purkinje, por su gran tamaño somático, elevada actividad transcripcional, y alta demanda energética, muestran una dependencia continua del sistema autofágico para el mantenimiento de la homeostasis y el recambio de orgánulos (García, 2012; Hara, 2006). Esto las haría particularmente sensibles a alteraciones en este proceso durante el envejecimiento. En cambio, las neuronas del giro dentado, aunque también activas, pueden tener una menor demanda de autofagia basal o diferentes mecanismos compensatorios, lo que explicaría la ausencia de cambios detectables en esta región (Yin, 2016; Kang, 2011).

Desde esta perspectiva, la menor cantidad de neuronas LC3IIB-positivas observada en las neuronas de Purkinje con RC, junto con una mayor intensidad de fluorescencia del marcador, podría interpretarse como una indicación de una menor necesidad de activar masivamente la autofagia, pero con una mayor eficiencia en la degradación de proteínas mal plegadas y orgánulos envejecidos, como se ha planteado en estudios previos que han señalado que la RC no solo incrementa la actividad autofágica, sino que mejora la calidad del proceso, contribuyendo así a la prevención de la acumulación de daño celular (Madeo, 2019).

# CAPÍTULO 11

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio respaldan el potencial neuroprotector de la RC frente al envejecimiento cerebral, particularmente en regiones clave como el hipocampo y el cerebelo.

Esta intervención atenuó alteraciones morfológicas asociadas a la edad, redujo la activación de vías apoptóticas y moduló diferencialmente la autofagia, promoviendo la preservación de la morfología neuronal, especialmente de las neuronas de Purkinje, y mantenimiento estructural del giro dentado.

Aunque no se observaron cambios significativos en la mielinización, los hallazgos sugieren que la RC contribuye a mantener la homeostasis celular y podría retrasar la progresión de los procesos neurodegenerativos. Estos efectos parecen estar mediados por una menor acumulación de daño celular, una mayor eficiencia metabólica y una modulación favorable de mecanismos celulares clave.

En conjunto, los datos obtenidos refuerzan que la RC no solo influye en la extensión de la vida útil, sino también en la calidad del envejecimiento cerebral, al preservar estructuras esenciales para la memoria, la coordinación motora y el procesamiento sensorial.

Por lo que, se mantiene como perspectiva ampliar las técnicas moleculares específicas y estudios funcionales que permitan confirmar estos efectos y su aplicabilidad en el contexto del envejecimiento humano.

# CAPÍTULO 12

## REFERENCIAS

- Moody, S. A. (2001). Aging: The biology of senescence. En S. F. Gilbert & M. J. F. Barresi (Eds.), *Developmental biology* (6th ed.). NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9980/>
- Ritchie, H., Roser, M., & Ortiz-Ospina, E. (2024). *Life expectancy increased in all countries of the world*. Our World in Data. <https://ourworldindata.org/life-expectancy>
- Pan American Health Organization (PAHO). (2023). Life expectancy, healthy life expectancy, and burden of disease in older people in the Americas, 1990–2019: A population-based study. <https://www.paho.org/en/documents/life-expectancy-healthy-life-expectancy-and-burden-disease-older-people-americas-1990>
- World Health Organization (WHO). (2022). Healthy life expectancy and years lived with disability or disease. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/indicator-groups/healthy-life-expectancy>
- World Health Organization (WHO). (n.d.). Ageing. <https://www.who.int/health-topics/ageing>
- Salih, A., Nichols, T., Szabo, L., Petersen, S. E., & Raisi-Estabragh, Z. (2023). Conceptual Overview of Biological Age Estimation. *Aging And Disease*, 14(3), 583. <https://doi.org/10.14336/ad.2022.1107>
- Aman, Y., Schmauck-Medina, T., Hansen, M., Morimoto, R. I., Simon, A. K., Bjedov, I., Palikaras, K., Simonsen, A., Johansen, T., Tavernarakis, N.,

- Rubinsztein, D. C., Partridge, L., Kroemer, G., Labbadia, J., & Fang, E. F. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. *Nature Aging*, 1(8), 634-650. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00098-4>
- Behr, L. C., Simm, A., Kluttig, A., & Großkopf, A. G. (2023). 60 years of healthy aging: On definitions, biomarkers, scores and challenges. *Ageing Research Reviews*, 88, 101934. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101934>
  - Jayatunga, D. P. W., Rea, S., Martins, R., & Bharadwaj, P. (2020). Activate or Inhibit? Implications of Autophagy Modulation as a Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(18), 6739. <https://doi.org/10.3390/>
  - Hansen, M., Rubinsztein, D. C., & Walker, D. W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(9), 579-593. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>
  - Autophagy and Longevity. (2018b). PubMed. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2333>
  - López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243-278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
  - Krawczyk-Suszek, M., Gaweł, A., & Kleinrok, A. (2024). Ranking of diseases affecting the health-related quality of life of patients in Poland – a cross-sectional study. *Archives Of Medical Science*. <https://doi.org/10.5114/aoms/171634>
  - Guo, J., Huang, X., Dou, L., Yan, M., Shen, T., Tang, W., & Li, J. (2022). Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and

treatments. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 7(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01251-0>

- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G. & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Neurology*, 15(10), 565-581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Kesidou, E., Theotokis, P., Damianidou, O., Boziki, M., Konstantinidou, N., Taloumtzis, C., Sintila, S., Grigoriadis, P., Evangelopoulos, M. E., Bakirtzis, C., & Simeonidou, C. (2023). CNS Ageing in Health and Neurodegenerative Disorders. *Journal Of Clinical Medicine*, 12(6), 2255. <https://doi.org/10.3390/jcm12062255>
- Shetty, A. K., Kodali, M., Upadhya, R., & Madhu, L. N. (2018). Emerging Anti-Aging Strategies - Scientific Basis and Efficacy. *Aging And Disease*, 9(6), 1165. <https://doi.org/10.14336/ad.2018.1026>
- Li, Y., Tian, X., Luo, J., Bao, T., Wang, S., & Wu, X. (2024). Molecular mechanisms of aging and anti-aging strategies. *Cell Communication And Signaling*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01663-1>
- Domínguez-Oliva, A., Hernández-Ávalos, I., Martínez-Burnes, J., Olmos-Hernández, A., Verduzco-Mendoza, A., & Mota-Rojas, D. (2023). The Importance of Animal Models in Biomedical Research: Current Insights and Applications. *Animals (Basel)*, 13(7), 1223. <https://doi.org/10.3390/ani13071223>
- Duregon, E., Pomatto-Watson, L. C. D., Bernier, M., Price, N. L., & De Cabo, R. (2021). Intermittent fasting: from calories to time restriction. *GeroScience*, 43(3), 1083-1092. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00335-z>
- Vaughan, K. L., Kaiser, T., Peadar, R., Anson, R. M., De Cabo, R., & Mattison, J. A. (2017). Caloric Restriction Study Design Limitations in Rodent and

Nonhuman Primate Studies. *The Journals Of Gerontology Series A*, 73(1), 48-53. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx088>

- Ingram, D. K., & De Cabo, R. (2017). Calorie restriction in rodents: Caveats to consider. *Ageing Research Reviews*, 39, 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.05.008>
- Smith, D. L., Mitchell, S. E., Johnson, M. S., Gibbs, V. K., Dickinson, S., Henschel, B., Li, R., Kaiser, K. A., Chusyd, D. E., Brown, A. W., Allison, D. B., Speakman, J. R., & Nagy, T. R. (2024). Benefits of calorie restriction in mice are mediated via energy imbalance, not absolute energy or protein intake. *GeroScience*, 46(5), 4809-4826. <https://doi.org/10.1007/s11357-024-01166-4>
- Hwangbo, D., Lee, H., Abozaid, L. S., & Min, K. (2020). Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. *Nutrients*, 12(4), 1194. <https://doi.org/10.3390/nu12041194>
- Jafari, M., Macho-González, A., Diaz, A., Lindenau, K., Santiago-Fernández, O., Zeng, M., Massey, A. C., De Cabo, R., Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2024). Calorie restriction and calorie-restriction mimetics activate chaperone-mediated autophagy. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 121(26). <https://doi.org/10.1073/pnas.2317945121>
- Ma, S., Sun, S., Geng, L., Song, M., Wang, W., Ye, Y., Ji, Q., Zou, Z., Wang, S., He, X., Li, W., Esteban, C. R., Long, X., Guo, G., Chan, P., Zhou, Q., Belmonte, J. C. I., Zhang, W., Qu, J., & Liu, G. (2020). Caloric Restriction Reprograms the Single-Cell Transcriptional Landscape of *Rattus Norvegicus* Aging. *Cell*, 180(5), 984-1001.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.008>

- Mojaverrostami, S., Pasbakhsh, P., Madadi, S., Nekoonam, S., Zarini, D., Noori, L., Shiri, E., Salama, M., Zibara, K., & Kashani, I. R. (2023). Correction to: Calorie restriction promotes remyelination in a Cuprizone-Induced demyelination mouse model of multiple sclerosis. *Metabolic Brain Disease*, 39(2), 359-360. <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01297-1>
- Apoptosis | NHGRI. (s. f.). Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Apoptosis>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Salminen, A., Ojala, J., & Kaarniranta, K. (2010). Apoptosis and aging: increased resistance to apoptosis enhances the aging process. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 68(6), 1021-1031. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0597-y>
- Jinno, S. (2010). Decline in adult neurogenesis during aging follows a topographic pattern in the mouse hippocampus. *The Journal Of Comparative Neurology*, 519(3), 451-466. <https://doi.org/10.1002/cne.22527>
- Cole, J. D., Del Castillo, J. S., Gut, G., Gonzalez-Bohorquez, D., Pelkmans, L., & Jessberger, S. (2022). Characterization of the neurogenic niche in the aging dentate gyrus using iterative immunofluorescence imaging. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/elife.68000>
- Bondolfi, L., Ermini, F., Long, J. M., Ingram, D. K., & Jucker, M. (2003). Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiology Of Aging*, 25(3), 333-340. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(03\)00083-6](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(03)00083-6)

- Lee, J., Duan, W., Long, J. M., Ingram, D. K., & Mattson, M. P. (2000). Dietary Restriction Increases the Number of Newly Generated Neural Cells, and Induces BDNF Expression, in the Dentate Gyrus of Rats. *Journal Of Molecular Neuroscience*, 15(2), 99-108. <https://doi.org/10.1385/jmn:15:2:99>
- Parandavar, E., Shafizadeh, M., Ahmadian, S., & Javan, M. (2024). Long-term demyelination and aging-associated changes in mice corpus callosum; evidence for the role of accelerated aging in remyelination failure in a mouse model of multiple sclerosis. *Aging Cell*, 23(9). <https://doi.org/10.1111/accel.14211>
- McElroy, C. L., Wang, B., Zhang, H., & Jin, K. (2024b). Cerebellum and Aging: Update and Challenges. *Aging And Disease*. <https://doi.org/10.14336/ad.2024.0220>
- Mohamed, E. A., & Sayed, W. M. (2020). Implication of JAK1/STAT3/SOCS3 Pathway in Aging of Cerebellum of Male Rat: Histological and Molecular study. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64050-z>
- Chapman, T. W., & Hill, R. A. (2019). Myelin plasticity in adulthood and aging. *Neuroscience Letters*, 715, 134645. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134645>
- Trejo, J. A. O., Tanida, I., Suzuki, C., Kakuta, S., Tada, N., & Uchiyama, Y. (2020). Characterization of starvation-induced autophagy in cerebellar Purkinje cells of pHluorin-mKate2-human LC3B transgenic mice. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66370-6>
- Lasiene, J., Matsui, A., Sawa, Y., Wong, F., & Horner, P. J. (2009b). Age-related myelin dynamics revealed by increased oligodendrogenesis and short

internodes. *Aging Cell*, 8(2), 201-213. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00462.x>

- Zhang, C., Zhu, Q., & Hua, T. (2010). Aging of cerebellar Purkinje cells. *Cell And Tissue Research*, 341(3), 341-347. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1016-2>
- Cooper, C. P., Cheng, L. H., Bhatti, J. A., Rivera, E. L., Huell, D., Banuelos, C., Perez, E. J., Long, J. M., & Rapp, P. R. (2024). Cerebellum Purkinje cell vulnerability in aged rats with memory impairment. *The Journal Of Comparative Neurology*, 532(4). <https://doi.org/10.1002/cne.25610>
- Arleo, A., Bareš, M., Bernard, J. A., Bogoian, H. R., Bruchhage, M. M. K., Bryant, P., Carlson, E. S., Chan, C. C. H., Chen, L., Chung, C., Dotson, V. M., Filip, P., Guell, X., Habas, C., Jacobs, H. I., Kakei, S., Lee, T. M. C., Leggio, M., Misiura, M., Manto, M. (2023). Consensus Paper: Cerebellum and Ageing. *The Cerebellum*, 23(2), 802-832. <https://doi.org/10.1007/s12311-023-01577-7>
- Huang, C., Miyamoto, H., & Huang, R. H. (2005). The mouse cerebellum from 1 to 34 months: Parallel fibers. *Neurobiology Of Aging*, 27(11), 1715-1718. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.025>
- Wang, L., Deng, J., Fan, W., Yan, M., Sun, Y., & Deng, J. (2018). Synaptic aging disrupts synaptic morphology and function in cerebellar Purkinje cells. *Neural Regeneration Research*, 13(6), 1019. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.233445>
- García-Matas, S., et al. (2012). Autophagy in healthy aging and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00170>

- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M. et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature04724>