

## EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA NA PRIMEIRA NA PRIMEIRA E SEGUNDA METADE DA VIDA REPRODUTIVA DE FÊMEAS SOBRE O GANHO DE PESO E RESISTÊNCIA À INSULINA

GABRIELA A. BLANCO<sup>1</sup>; JULIANE B. PROSCZEK<sup>2</sup>; GIULIA C. PEREIRA<sup>3</sup>;  
CÉSAR A. P. OSÓRIO<sup>4</sup>; BIANCA M. ÁVILA<sup>5</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [gabriela.altmayer.blanco15@gmail.com](mailto:gabriela.altmayer.blanco15@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – [julianeprosczek@gmail.com](mailto:julianeprosczek@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [giuliacpereira@gmail.com](mailto:giuliacpereira@gmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – [capinzono@unal.edu.co](mailto:capinzono@unal.edu.co)

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – [bianca\\_avila@ymail.com](mailto:bianca_avila@ymail.com)

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas – [augustoschneider@gmail.com](mailto:augustoschneider@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo natural que afeta todos os seres vivos, e é acompanhado de mudanças sistêmicas, celulares e moleculares, que podem levar ao aumento da propensão a doenças e a redução da capacidade de adaptação (NICCOLI; PARTRIDGE, 2012). Ressalta-se que uma das áreas mais impactadas pelo envelhecimento nas fêmeas é a fertilidade (BROEKMANS; SOULES et al., 2011). Conforme as mulheres envelhecem, suas reservas ovarianas diminuem e a qualidade dos oócitos também é afetada (FAUSER et al., 2011).

A restrição calórica (RC) é caracterizada como uma estratégia dietética que diminui a ingestão alimentar sem ocasionar desnutrição (MATTSON et al., 2017). Diversos autores têm mostrado que a RC é capaz de trazer múltiplos benefícios à saúde, incluindo o prolongamento da expectativa de vida e a diminuição dos fenótipos ligados ao envelhecimento (MASORO, 2006). Outro exemplo dos benefícios à saúde causados pela RC é a menor resistência à insulina (BARTKE, 2008). Este processo ocorre pois o acúmulo de tecido adiposo está ligado à liberação de citocinas pró-inflamatórias células pré-adiposas e à diminuição da atividade dos macrófagos devido ao envelhecimento. Este processo ocorre pois o acúmulo de tecido adiposo está ligado à liberação de citocinas pró-inflamatórias células pré-adiposas e à diminuição da atividade dos macrófagos devido ao envelhecimento. Esse tecido adiposo disfuncional emite excesso de sinais inflamatórios, resultando em resistência à insulina (MAU et al., 2018).

Em camundongos se observa que o pico da vida reprodutiva se dá entre os 3 e 12 meses de idade com redução progressiva da fertilidade após essa idade (Selesniemi 2008). Nesse sentido, estando ciente do atual panorama de buscas por métodos que auxiliem na preservação da vida reprodutiva feminina e visando entender o período mais adequado para o início da estratégia dietética, o presente estudo propõe analisar os efeitos da RC na primeira e segunda metade da vida fértil através da análise de indicadores como, ganho de peso, gordura total e sensibilidade à glicose e insulina de camundongos fêmeas C57BL/6 submetidos a RC de 30%.

### 2. METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas. Para o experimento foram utilizados camundongos fêmeas (n=30) da linhagem C57BL/6 com idade de 3 e 7 meses

mantidos em condições controladas de temperatura, luz e umidade ( $22 \pm 2$  °C, ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro e 40%-60%). Os camundongos foram divididos em quatro grupos: controle jovem ( $n=8$ ), RC jovem ( $n=6$ ), controle envelhecido ( $n=7$ ) e RC envelhecido ( $n=9$ ). Todos os animais foram alimentados com ração padrão para roedores e água. Os grupos RC receberam água ad libitum e uma quantidade 30% menor do que a média do consumo do grupo controle que recebeu comida ad libitum. Os dados do consumo alimentar do grupo controle foram coletados semanalmente, também o consumo do RC foi ajustado semanalmente.

O teste de tolerância a insulina (TTI) com todos os animais do experimento foi realizado 7 dias antes da eutanásia, onde todos os animais foram receberem uma injeção intraperitoneal de insulina (0,5 UI/kg de peso corporal) e tiveram sua glicemia monitorada nos tempos de 0, 15, 30 e 60 minutos após a injeção. O sangue foi coletado através de uma pequena incisão na ponta da cauda dos animais mensurando os níveis de glicose sérica pelo uso de um glicosímetro (AccuChek Active, Roche Diagnostics®, USA) (FANG *et al.*, 2013).

Para avaliar a quantidade de gordura, foi obtido tecido adiposo das áreas ao redor dos ovários, ao redor dos rins e da região visceral durante a dissecação, realizada após a conclusão dos procedimentos de eutanásia nos animais.

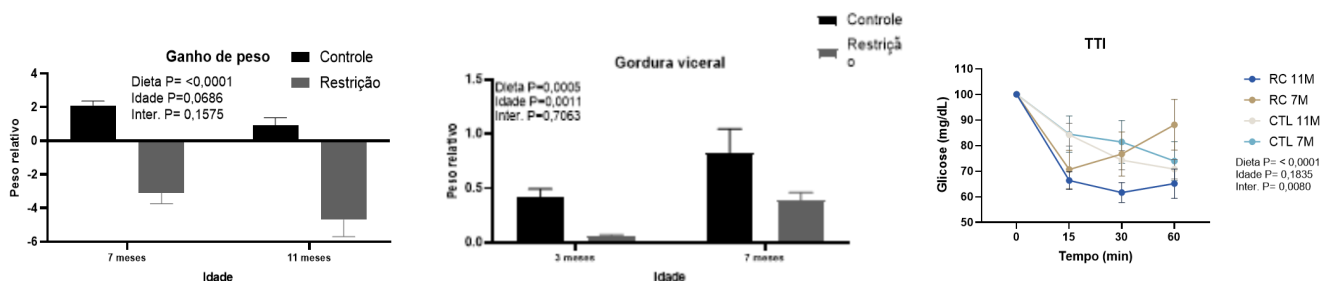
A análise estatística foi executada por meio do software GraphPad Prism 9.0. Foi utilizado a ANOVA de duas vias para avaliar o consumo, o ganho de peso corporal, as quantidades de gordura e o TTI. Foram considerados significativos valores de  $P < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao examinarmos o ganho de peso durante o tempo de estudo, observa-se que os animais em RC tiveram uma perda significativa de peso, enquanto os animais do grupo controle permaneceram em um linear ganho de peso (Figura 1A). Esse resultado está de acordo com as pesquisas anteriores, as quais identificaram a perda de peso e gordura nos grupos submetidos a RC (Wiesenborn *et al.* 2014, Isola *et al.* 2020).

Em relação ao teor de gordura visceral, animais em RC tiveram um ganho menor de gordura em comparação aos animais do grupo controle (Figura 1B). Ainda, observou-se que animais mais velhos têm naturalmente um teor maior de gordura visceral (Figura 1B). Este fato pode estar ligado a taxa metabólica basal, que em animais mais jovens é maior, tornando o acúmulo de gordura visceral menor nessa faixa etária. Contudo, a interação entres estas variáveis não foi significativa, o que mostra que a restrição calórica agiu de maneira igual em ambos os grupos etários.

Ao analisar os resultados do teste de tolerância à insulina, conclui-se que animais em RC são mais sensíveis à insulina (Figura 1C). Este resultado já era esperado, uma vez que animais em RC tendem a ter menor teor de gordura, que é um dos principais fatores relacionados a menor sensibilidade à insulina (Nikolai *et al.* 2015).



**Figura 1-** Quantificação do ganho de peso corporal (A), gordura visceral (B) e do teste de tolerância a insulina (C) em camundongos fêmeas 7 meses e 11 meses que passaram por um período de 4 meses de 30% de restrição calórica. Em preto, fêmeas do grupo controle. Em cinza, as fêmeas do grupo restrição.

#### 4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra que animais submetidos a RC perderam peso ao longo do estudo, tiveram menor acúmulo de gordura visceral, o que resultou em uma maior sensibilidade à insulina. Quanto à idade, conclui-se de modo geral que animais mais velhos têm tendência natural de maior peso e maior acúmulo de tecido adiposo, porém similar sensibilidade à insulina.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Niccoli T, Partridge L. Ageing as a Risk Factor for Disease. *Curr Biol*. 2012;22(17):R741-R752.
2. Kirkland JL, Tchkonian T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*. 2017;21:21-28.
3. Fontana L, Partridge L. Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans. *Cell*. 2015;161(1):106-118.
4. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences. *Endocr Rev*. 2009;30(5):465-493.
5. Fauser BCJM, et al. Contemporary genetic technologies and female reproduction. *Hum Reprod Update*. 2011;17(6):829-847.
6. Jayaprakasan K, et al. Establishing the intercycle variability of three-dimensional ultrasonographic predictors of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2008;90(6):2126-2132.
7. Selesniemi K, Lee H-J, Tilly JL. Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age. *Aging Cell*. 2008;7(5):622-629.
8. Mattson MP, et al. Meal frequency and timing in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(47):16647-16653.
9. Masoro EJ. Caloric Restriction and Aging: Controversial Issues. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006;61(1):14-19.
10. Bartke A. Insulin and aging. *Cell Cycle*. 2008;7(21):3338-3343.
11. Mau T, et al. Sex differences in lifespan extension with acarbose and 17- $\alpha$  estradiol: Gonadal hormones underlie male-specific improvements in glucose tolerance and mTORC2 signaling. *Aging Cell*. 2018;17(1):e12696.
12. Palmer AK, et al. Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell*. 2019;18(3):e12950.

13. Michán S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007;404(1):1-13.
14. Schneider L, et al. Gut-Induced Inflammation During Aging Promotes Drp1-Dependent Mitochondrial Fission and Liver Senescence. *Cell Metab.* 2020;30(4):800-816.e6.
15. Zheng Y, et al. The Role of Toll-Like Receptors in the Control of Autoimmune Diabetes. *Diabetologia.* 2012;55(3):261-270.
16. Maidarti M, et al. Quality of life and sexual function of polycystic ovary syndrome patients in Indonesia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2019;45(8):1548-1555.
17. Lins KS, et al. Metabolically healthy obese individuals have a worse left ventricular diastolic function compared to metabolically healthy lean individuals. *Arch Endocrinol Metab.* 2021;65(2):127-133.
18. Saccon TD, et al. Association between red blood cell distribution width and age of onset of coronary artery disease in men. *Int J Cardiol.* 2016;203:608-609.
19. Xiang L, et al. The pathophysiology of obesity-driven osteoarthritis is influenced by the sex hormone estrogen. *Sci Rep.* 2017;7(1):4325.
20. Martins JC, et al. The Role of Estrogen in Cardiovascular Disease. *Curr Pharm Des.* 2008;14(25):2486-2497.
21. Fang X, et al. Association between fine particulate matter and daily clinic visits for migraine in a subtropical city: Taipei, Taiwan. *J Toxicol Environ Health A.* 2013;76(12):746-755.
22. Wiesenborn DS, et al. Extracorporeal membrane oxygenation support for peripartum cardiomyopathy: A 5-year cohort study. *Heart Lung.* 2014;43(4):345-349.
23. Isola L, et al. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020;152:103005.
24. Garcia DN, et al. Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice. *GeroScience.* 2019;41(4):395-408.
25. Vaughan J, et al. Chronological changes in tissue fibrinolytic activity in men: correlation with age, abdominal obesity, hyperinsulinemia, and changes in metabolic variables. *Circulation.* 2018;81(3):840-848.
26. Forster JI, et al. From Menarche to Menopause: the Frailty of Epigenetic Events. In: Preedy VR, editor. *Handbook of Epigenetics.* Academic Press; 2011. p. 559-582.
27. Neves NN. Induction of weight loss by calorie restriction with a high-fat diet and its effects on adipose tissue inflammation in obese mice [dissertation]. Diamantina: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2018.