

## **RESTRIÇÃO CALÓRICA PRESERVA A RESERVA OVARIANA DE CAMUNDONGOS INDEPENDENTEMENTE DA IDADE DE INÍCIO DA INTERVENÇÃO**

**JULIANE BRISTOT PROSCZEK<sup>1</sup>; ANA JÚLIA<sup>2</sup>; LARISSA MAGALHÃES<sup>2</sup>, DRIELE NESKE GARCIA<sup>2</sup>, SHARA SODRÉ<sup>2</sup>, AUGUSTO SCHNEIDER<sup>3</sup>**

*<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – julianeproszczek@gmail.com*

*<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – annajulianunes153@gmail.com*

*<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – Larissasama@hotmail.com*

*<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – drika\_neske@yahoo.com.br*

*<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – sharasodre@gmail.com*

*<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – augusto.schneider@ufpel.edu.br*

### **1. INTRODUÇÃO**

A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que, até 2050, o número de pessoas com 65 anos ou mais no mundo, alcance 1,6 bilhão, dobrando os registrados de 2021 (ONU). Este envelhecimento populacional levanta questões sobre mudanças biológicas associadas a esse processo. O envelhecimento é caracterizado por alterações no organismo, como exaustão celular até alterações epigenéticas, tendo impacto direto na saúde do idoso (LOPEZ-OTIN, 2023). E nas mulheres, juntamente há o envelhecimento reprodutivo, um processo contínuo até a menopausa (WILKOSZ, 2014), caracterizado pela redução da reserva ovariana, composta principalmente por folículos primordiais. Esse declínio da reserva ovariana ocorre devido à ativação irreversível dos folículos primordiais, sendo a via mTORC1 um dos componentes cruciais nesse processo, chamado de menopausa (MAIDARTI, 2020; TE VELDE, 1998).

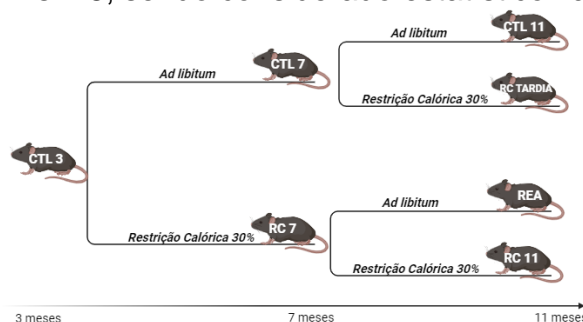
A menopausa ocorre geralmente entre os 45 e 50 anos e marca a exaustão da reserva ovariana (BROEKMANS, 2009), trazendo mudanças hormonais significativas (BITTO, 2009). A associação entre a menopausa e patologias como a síndrome metabólica, destaca a importância à saúde após o término do período reprodutivo (CARR, 2003; JOUYANDEH, 2013). O atraso da menopausa pode promover longevidade e melhor qualidade de vida, sendo evidenciado por intervenções como a restrição calórica (RC) (ISOLA, 2022).

A RC, oferece benefícios à saúde, promovendo a longevidade devido a diminuição da incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento (GONZALEZ, 2012; MONTEFUSCO, 2021). Esta estratégia nutricional, que compreende na redução da ingestão alimentar sem causar desnutrição, promove uma extensão notável da longevidade. Além do mais, a RC exerce influência sobre o envelhecimento ovariano por meio de uma série de mecanismos inter-relacionados, como a inativação da via mTORC1 (GARCIA, 2019; SCHNEIDER, 2021). Sendo assim, nosso objetivo é avaliar o efeito da restrição calórica na reserva ovariana em camundongos de idades diferentes no início da intervenção e verificar se esse efeito persiste após a realimentação ad libitum.

### **2. METODOLOGIA**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), número 23110.033054/2022-23. Fêmeas

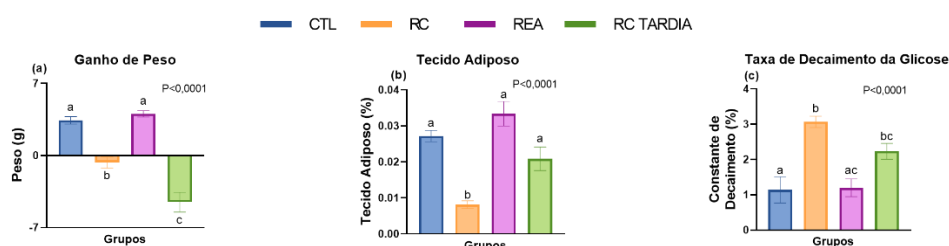
de camundongos C57BL/6, com 3 meses de idade, foram mantidas em condições controladas de temperatura, umidade e ciclo de luz. Os animais foram divididos em 4 grupos, incluindo Controle, RC, RC tardia e realimentação, com duração de 8 meses. Durante esse período, foram monitorados semanalmente o peso corporal e a ingestão alimentar. O teste de tolerância à insulina (TTI) foi realizado com insulina (0,5 UI/kg) após jejum de 12 horas, a glicose aferida nos intervalos 0, 15, 30 e 60 minutos. Ovários foram coletados para análise histológica, com processamento padrão histológico e quantificação dos cortes seccionados. Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism 8, sendo considerado estatístico valores de  $P < 0,05$ .



**Figura 1-** Esquema do delineamento experimental

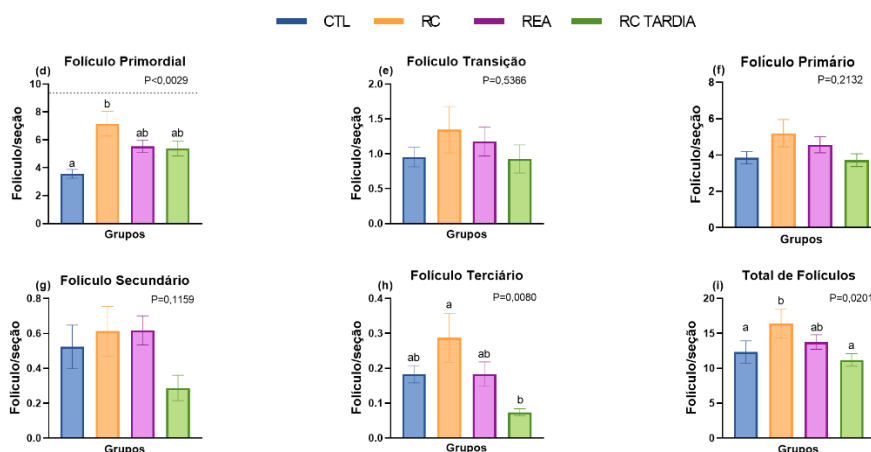
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A RC reduziu o peso corporal ( $P < 0,0001$ ) e a adiposidade ( $P < 0,0001$ ) de forma semelhante quando iniciada aos 3 ou 7 meses de idade (figura A e B). Contudo, os camundongos que tornaram à alimentação *ad libitum*, perderam o efeito da RC e recuperaram peso corporal e adiposidade. O mesmo foi visto quanto a sensibilidade à insulina ( $P < 0,0001$ ).



**Figura 2 -** Ganho de peso corporal (a), percentual de tecido adiposo corporal (b) e taxa de queda da glicose após administração de insulina (c).

É evidente que a RC possui a capacidade de prolongar a longevidade (ACOSTA-RODRIGUEZ, 2022). Este fenômeno é corroborado por estudos que demonstram o controle efetivo do ganho de peso tanto em níveis de restrição de 30% (GARCIA, 2019) quanto de 10% (ISOLA, 2022). A redução no peso corporal desencadeia uma diminuição na quantidade de tecido adiposo, o que possui implicações metabólicas favoráveis no status inflamatório, conseqüentemente na sensibilidade à insulina (SHENG, 2021). Resultado semelhante ao encontrado no presente estudo, onde a constante de decaimento da glicose foi quase duas vezes maior na RC e RC tardia, além da menor quantidade de tecido adiposo abdominal total no grupo RC. Corroborando com achados de que a RC em diferentes idades em camundongos (6, 13 e 19 meses) tem um impacto significativo na reversão de fenótipos relacionados ao envelhecimento em camundongos de meia-idade e mais velhos (SHENG, 2017).



**Figura 3** - Quantificação dos folículos primordiais (d), transição (e) primários (f), secundários (g), terciários (h) e total (i) analisados no ovário de animais controle (CTL), restrição calórica (RC), realimentação (REA) e restrição calórica tardia (RC TARDIA).

Já na reserva ovariana, observamos um número significativamente maior de folículos primordiais ( $P=0,0029$ ) em ambos os grupos submetidos à restrição calórica. Esses achados corroboram com estudos anteriores que demonstraram os benefícios da RC na reserva ovariana, tanto aplicada a curto prazo (por 3 meses, iniciada aos 30 dias de idade) (GARCIA, 2019), ou longo prazo (dos 3 meses até os 8 meses de idade) (SELESNIEMI, 2008). A RC dos 3 aos 15 meses de idade, também mostrou que desempenha um papel crucial na promoção da fertilidade, fecundidade e sobrevivência da prole, especialmente quando o período de realimentação segue o episódio de RC (SELESNIEMI, 2008). Quanto ao número de folículos em transição ( $P=0,5366$ ), primários ( $P=0,2132$ ), secundários ( $P=0,1159$ ) não demonstrou diferenças significativas entre os grupos. Já os folículos terciários ( $P=0,0201$ ) como também nos folículos totais observa-se maior quantidade no grupo RC, o que pode se dar devido a maior reserva ovariana, visto os benefícios que a RC causa na preservação da reserva ovariana, principalmente, pelo seu efeito sobre a inativação da mTORC1 (CHENG, 2015). E mais uma vez, atua também na qualidade, devido a preservação de genes expressos nos ovários que tem função na fertilidade (SHAROV, 2008).

#### 4. CONCLUSÕES

A restrição calórica (RC) de 30% resultou em uma preservação da reserva ovariana semelhante tanto em camundongos jovens quanto de meia-idade. No entanto, a RC prolongada demonstrou ser mais eficaz na preservação da reserva ovariana em comparação com intervenções de curto prazo nesses grupos de idade. Isso sugere que, embora a RC tenha benefícios em diferentes fases da vida, a duração da intervenção desempenha um papel crucial na preservação da função ovariana.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-RODRIGUEZ, V.; RIJO-FERREIRA, F.; IZUMO, M.; XU, P. *et al.* Circadian alignment of early onset caloric restriction promotes longevity in male C57BL/6J mice. *Science*, **376**, n. 6598, p. 1192-1202, Jun 10 2022.

- BITTO, A.; ALTAVILLA, D.; BONAIUTO, A.; POLITO, F. *et al.* Effects of aglycone genistein in a rat experimental model of postmenopausal metabolic syndrome. **J Endocrinol**, 200, n. 3, p. 367-376, Mar 2009.
- BROEKMANS, F. J.; SOULES, M. R.; FAUSER, B. C. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. **Endocr Rev**, 30, n. 5, p. 465-493, Aug 2009.
- CARR, M. C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. **J Clin Endocrinol Metab**, 88, n. 6, p. 2404-2411, Jun 2003.
- CHENG, Y.; KIM, J.; LI, X. X.; HSUEH, A. J. Promotion of ovarian follicle growth following mTOR activation: synergistic effects of AKT stimulators. **PLoS One**, 10, n. 2, p. e0117769, 2015.
- GARCIA, D. N.; SACCON, T. D.; PRADIEE, J.; RINCON, J. A. A. *et al.* Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice. **Geroscience**, 41, n. 4, p. 395-408, Aug 2019.
- GONZALEZ, O.; TOBIA, C.; EBERSOLE, J.; NOVAK, M. J. Caloric restriction and chronic inflammatory diseases. **Oral Dis**, 18, n. 1, p. 16-31, Jan 2012.
- ISOLA, J. V. V.; ZANINI, B. M.; HENSE, J. D.; ALVARADO-RINCON, J. A. *et al.* Mild calorie restriction, but not 17alpha-estradiol, extends ovarian reserve and fertility in female mice. **Exp Gerontol**, 159, p. 111669, Mar 2022.
- JOUYANDEH, Z.; NAYEBZADEH, F.; QORBANI, M.; ASADI, M. Metabolic syndrome and menopause. **J Diabetes Metab Disord**, 12, n. 1, p. 1, Jan 3 2013.
- LOPEZ-OTIN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M. *et al.* Hallmarks of aging: An expanding universe. **Cell**, 186, n. 2, p. 243-278, Jan 19 2023.
- MAIDARTI, M.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E. Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt Signalling and DNA Damage in the Oocyte: Implications for Primordial Follicle Activation, Oocyte Quality and Ageing. **Cells**, 9, n. 1, 2020.
- MONTEFUSCO, L.; D'ADDIO, F.; LORETELLI, C.; BEN NASR, M. *et al.* Anti-inflammatory effects of diet and caloric restriction in metabolic syndrome. **J Endocrinol Invest**, 44, n. 11, p. 2407-2415, Nov 2021.
- SCHNEIDER, A.; SACCON, T. D.; GARCIA, D. N.; ZANINI, B. M. *et al.* The Interconnections Between Somatic and Ovarian Aging in Murine Models. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 76, n. 9, p. 1579-1586, Aug 13 2021.
- SELESNIEMI, K.; LEE, H. J.; TILLY, J. L. Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age. **Aging Cell**, 7, n. 5, p. 622-629, Oct 2008.
- SHAROV, A. A.; FALCO, G.; PIAO, Y.; POOSALA, S. *et al.* Effects of aging and calorie restriction on the global gene expression profiles of mouse testis and ovary. **BMC Biol**, 6, p. 24, Jun 3 2008.
- SHENG, Y.; LV, S.; HUANG, M.; LV, Y. *et al.* Opposing effects on cardiac function by calorie restriction in different-aged mice. **Aging Cell**, 16, n. 5, p. 1155-1167, Oct 2017.
- SHENG, Y.; XIA, F.; CHEN, L.; LV, Y. *et al.* Differential Responses of White Adipose Tissue and Brown Adipose Tissue to Calorie Restriction During Aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 76, n. 3, p. 393-399, Feb 25 2021.
- TE VELDE, E. R.; SCHEFFER, G. J.; DORLAND, M.; BROEKMANS, F. J. *et al.* Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Mol Cell Endocrinol**, 145, n. 1-2, p. 67-73, Oct 25 1998.
- WILKOSZ, P.; GREGGAINS, G. D.; TANBO, T. G.; FEDORCSAK, P. Female reproductive decline is determined by remaining ovarian reserve and age. **PLoS One**, 9, n. 10, p. e108343, 2014.