

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**A restrição calórica mantém a reserva ovariana e melhora parâmetros
metabólicos independentemente da idade em camundongos**

Juliane Bristot Prosczek

Pelotas, 2024

Juliane Bristot Prosczek

A restrição calórica mantém a reserva ovariana e melhora parâmetros metabólicos independentemente da idade em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schneider

Pelotas, 2024

Ficha Catalográfica

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

P966r Prosczek, Juliane Bristot

A restrição calórica mantém a reserva ovariana e melhora parâmetros metabólicos independentemente da idade em camundongos [recurso eletrônico] / Juliane Bristot Prosczek ; Augusto Schneider, orientador. — Pelotas, 2024.

76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Restrição calórica. 2. Reserva ovariana. 3. Inibição de mTORC1. I. Schneider, Augusto, orient. II. Título.

CDD 613.25

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Juliane Bristot Prosczek

A restrição calórica mantém a reserva ovariana e melhora parâmetros metabólicos independentemente da idade em camundongos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre (a) em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 01/03/2024

Banca examinadora:



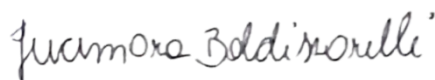
Prof. Dr. Augusto Schneider

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas



Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dr. Jucimara Baldissarelli

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Maria

Agradecimentos

Com imensa gratidão, quero expressar meus sinceros agradecimentos a Deus e à força interior que me conduziram até este ponto. Sobretudo, desejo estender minha gratidão a todos que compartilharam essa jornada não apenas de pesquisa, mas também os bastidores desse processo fascinante. À minha família - meu pai, minha mãe e meu irmão - que sempre me apoiaram, compreendendo que a busca pelo conhecimento é uma vocação nobre e desafiadora. Eles me amaram incondicionalmente e, nos raros fins de semana em que eu conseguia visitá-los, proporcionaram um refúgio, tornando esses momentos ainda mais especiais e reconfortantes quando eu mais precisava. Ao meu namorado, que, mesmo nas longas noites de estudo e nos trabalhos acumulados, esteve ao meu lado, incentivando-me a perseguir meus sonhos e reafirmando minha determinação. Agradeço-lhe imensamente por sua parceria durante todo o experimento, desde a manipulação de tubos até o sacrifício dos fins de semana para que eu pudesse dar continuidade ao meu trabalho. Gostaria também de expressar minha profunda gratidão ao meu orientador, Augusto Schneider, por sua infinita paciência, compreensão, e orientação desde o meu TCC em 2019, onde não abriu caminho somente para a pesquisa, mas me deu a oportunidade de descobrir que tenho a sorte de amar o que faço, tornando essa jornada um pouco menos árdua. Embora não seja fácil o mundo da pesquisa. A minha amiga Tete, por todos as refeições acompanhadas de muitos conselhos. Não poderia deixar de reconhecer meu ex-colega, José Isola, que nos bastidores das férias, sempre me incentivava em meio a toda insegurança que sou e fazia acreditar/cogitar em algo que nem eu tinha ideia. Agradeço também às minhas colegas que se tornaram amigas - Driele Garcia, Jéssica Hense e Giulia Pereira - por suportarem meus momentos de fraqueza e incerteza, mesmo quando eu cogitava em desistir. E um agradecimento especial à técnica de laboratório, Renata Ramirez (Renatinha), que não apenas me ofereceu apoio emocional durante minha jornada de pesquisa, mas também cuidou de mim. Sua ajuda e suporte no laboratório foram inestimáveis. Gostaria também, de agradecer aos técnicos do laboratório parceiro de histologia, Luis Augusto e Eliane, pela ajuda nas análises, mesmo sem eu chegar com nenhum conhecimento prévio sobre o assunto. Além disso, não posso deixar de mencionar Guto, cujas tardes repletas de risadas durante o trabalho não só tornaram tudo mais leve, e, por estimular meu espírito questionador.

Resumo

PROSCZEK, Juliane Bristot. A restrição calórica mantém a reserva ovariana e melhora parâmetros metabólicos independentemente da idade em camundongos. Orientador: Augusto Schneider. 2024. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

O envelhecimento reprodutivo feminino avança até a menopausa, marcado pelo esgotamento progressivo da reserva ovariana e pela redução dos folículos primordiais, o que leva a uma queda na fertilidade e a maiores desafios reprodutivos em mulheres mais velhas. Processos críticos como a ativação dos folículos primordiais, influenciados por vias como PI3K/AKT e mTORC1, são centrais para esta perda de reserva. A qualidade do oócito também se deteriora com o tempo devido a danos no DNA e influências ambientais. A menopausa, além de encerrar o período reprodutivo, traz mudanças hormonais significativas que afetam várias áreas além da reprodução, como a saúde metabólica, e pode predispor a várias doenças. No entanto, uma menopausa tardia pode indicar maior longevidade e qualidade de vida, sublinhando a relevância da reserva ovariana para a expectativa de vida geral. Estratégias como a restrição calórica (RC), que diminui a ingestão de calorias sem causar desnutrição, surgem como métodos promissores para conservar a reserva ovariana e estender a fase reprodutiva, apoiadas por benefícios como redução da inflamação, fortalecimento das defesas antioxidantes e melhorias na saúde metabólica, observados em estudos com modelos animais. Nós investigamos os efeitos da RC na reserva ovariana e nos parâmetros metabólicos em camundongos fêmeas jovens (3 meses) e de meia-idade (7 meses). Os animais do grupo RC foram submetidos a uma restrição calórica de 30%, com base no consumo alimentar do grupo controle, durante um período de 4 meses (equivalente a 16 semanas), sendo válido mencionar que foi utilizado um grupo controle de 3 meses para observar os aspectos do envelhecimento metabólico e reprodutivo. Após a intervenção, foram realizados o teste de tolerância à insulina (TTI) e a eutanásia, para coleta de órgãos (tecido adiposo e ovário). Como resultado do estudo, a RC levou a uma perda de peso semelhante nos grupos de 3-7 e 7-11 meses. A RC também reduziu o ganho de peso durante o período de intervenção e diminuiu o tecido adiposo abdominal. A taxa de decaimento da glicose foi significativamente mais altas em ambos os grupos CR,

independentemente da idade. A análise da reserva ovariana revelou um maior número de folículos primordiais nos grupos RC de 3-7 e 7-11 meses em comparação aos controles. No entanto, a RC não teve efeito nos folículos de transição, primários e secundários. Reduções relacionadas à idade foram observadas em folículos primordiais, primários e secundários. O número de folículos terciários mostrou uma interação significativa, com o grupo RC 3-7 exibindo menos folículos em comparação com o seu controle, ao contrário dos grupos de 7-11 meses. O número total de folículos não diferiu entre os grupos, mas diminuiu com a idade. Sendo assim, nossos achados destacam a eficácia da RC na promoção da longevidade reprodutiva por meio da preservação da reserva ovariana e melhora dos aspectos metabólicos independente do momento de início.

Palavras chaves: restrição calórica, reserva ovariana, inibição da mTORC1.

Abstract

PROSCZEK, Juliane Bristot. Caloric restriction preserves ovarian reserve and improves metabolic parameters regardless of age in mice. Advisor: Augusto Schneider. 2024. Dissertation (Master's in Biochemistry and Bioprospecting) - Center for Chemical, Pharmaceutical, and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2024.

Female reproductive aging progresses until menopause, marked by a progressive depletion of the ovarian reserve and a reduction in primordial follicles, leading to a decline in fertility and greater reproductive challenges in older women. Critical processes, such as the activation of primordial follicles, are influenced by PI3K/AKT and mTORC1 pathways, which play a central role in this loss of reserve. Oocyte quality also deteriorates over time due to DNA damage and environmental influences. Menopause, besides ending the reproductive period, brings significant hormonal changes that affect various areas beyond reproduction, such as metabolic health, and predisposition to various diseases. However, a delayed menopause can indicate greater longevity and quality of life, underlining the relevance of the ovarian reserve for the overall life expectancy. Strategies like caloric restriction (CR), which reduces calorie intake without causing malnutrition, emerge as promising methods to preserve the ovarian reserve and extend the reproductive phase, supported by benefits such as inflammation reduction, strengthening of antioxidant defenses, and improvements in metabolic health in animal models. We investigated the effects of CR on the ovarian reserve and metabolic parameters in young (3 months) and middle-aged (7 months) female mice. The animals in the CR group underwent a 30% caloric restriction, based on the food intake of the control group, over a period of 4 months (equivalent to 16 weeks). A 3-month control group was also used to observe aspects of metabolic and reproductive aging. After the intervention, an insulin tolerance test (ITT) was performed, and euthanasia was conducted for organ collection (adipose tissue and ovary). As a result of the study, CR led to a similar weight loss in the 3-7 and 7-11 month groups. CR also reduced weight gain during the intervention period and decreased abdominal adipose tissue. The glucose decay rate was significantly higher in both CR groups, regardless of age. The analysis of the ovarian reserve revealed a higher number of primordial follicles in the 3-7 and 7-11 month CR groups compared to controls. However, CR had no effect on transition, primary, and secondary follicles.

Age-related reductions were observed in primordial, primary, and secondary follicles. The number of tertiary follicles showed a significant interaction, with the 3-7 CR group displaying fewer follicles compared to its control, unlike the 7-11 month groups. The total number of follicles did not differ between groups but decreased with age. Thus, our findings highlight the efficacy of CR in promoting reproductive longevity through the preservation of the ovarian reserve and improvement of metabolic aspects regardless of the age os start.

Keywords: caloric restriction, ovarian reserve, mTORC1 inhibition

Lista de Figuras

Figura 1. Impacto do envelhecimento no organismo humano	19
Figura 2. Envelhecimento epigenético	22
Figura 3. Vias intracelulares ao recrutamento e ativação de folículos primordiais ovarianos	27
Figura 4. Adaptações biológicas induzidas pela restrição alimentar	32
Figura 5. Interações da restrição calórica e seus miméticos no metabolismo e reserva ovariana	38

Lista de Abreviaturas

IBGE	Instituto brasileiro de Geografia e Estatística
OMS	Organização Mundial da Saúde
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
PCR	Proteína C Reativa
TNF- α	Fator de Necrose tumoral alfa
SASP	Fenótipo Secretório Associado a Senescência
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
PI3K	Via Intracelular da Fosfatidinositol 3 Quinase
AKT	Proteína Quinase B
FoxO	Forkhead Box O
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DM2	Diabetes Tipo 2
mTOR	Alvo da Rapamicina
PIP2	Fosfatidinositol 4,5 Bifosfato
PIP3	Fosfatidinositol 3,4,5 Trifosfato
KIT	Receptor Tirosinaquinase
KITL	Expressão de KIT ligand
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
RC	Restrição Calórica
SIRT6	Sirtuínas
GH	Hormônio do Crescimento
Igf-1	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina Tipo 1
SOP	Síndrome do Ovário Policístico
NMN	Mononucleotídeo de Nicotinamida
17 α E2	17alfa-estradiol

Sumário

1. Introdução	13
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivo Específico	17
3. Revisão Bibliográfica	18
3.1 Envelhecimento	18
3.2 Envelhecimento Reprodutivo e Menopausa	23
3.3 Restrição Calórica	30
3.4 Miméticos da Restrição Calórica	35
4. Manuscrito	39
5. Discussão	57
6. Conclusão	62
7. Referências	63
Parecer CEEA	76

1. Introdução

O rápido aumento da população idosa no Brasil, conforme indicado pelos dados do Censo de 2022 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estabelece uma mudança significativa na estrutura demográfica do país. Nos últimos doze anos, houve o crescimento de 57,4% no número de indivíduos com 65 anos ou mais, traduzindo-se em um acréscimo médio anual superior a 1 milhão de pessoas idosas. Essa ascensão destaca a necessidade de compreender os complexos fenômenos associados ao envelhecimento, uma vez que a Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê que, até 2030, uma em cada seis pessoas atingirá a marca dos 60 anos ou mais. Esse envelhecimento populacional levanta questões cruciais sobre as consequências metabólicas desse processo.

O envelhecimento é caracterizado por uma série de alterações no organismo, abrangendo desde a exaustão celular até alterações epigenéticas. Tais transformações progressivas manifestam-se de maneira complexa, exercendo influências diretas na saúde e no bem-estar do indivíduo idoso (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023). A resposta compensatória do organismo, desencadeada por eventos como a desregulação na sensibilidade de nutrientes e a disfunção mitocondrial, muitas vezes, resulta em respostas exacerbadas ou crônicas, associadas a doenças relacionadas ao envelhecimento (LIGUORI; RUSSO; CURCIO; BULLI *et al.*, 2018; LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). A disfunção do tecido adiposo, uma peça-chave nesse quebra-cabeça biológico, desempenha um papel central na promoção de um estado inflamatório persistente (KUK; SAUNDERS; DAVIDSON; ROSS, 2009; MANCUSO; BOUCHARD, 2019). Este fenômeno, agravado pela resistência à insulina, impacta na saúde metabólica (JAMES; STOCKLI; BIRNBAUM, 2021; KITADA; OGURA; MONNO; KOYA, 2019), gerando inflamação, senescência e estresse oxidativo, que estão intrinsecamente ligados a condições crônicas como diabetes tipo II, doença cardiovascular, Alzheimer e câncer (SANADA; TANIYAMA; MURATSU; OTSU *et al.*, 2018).

O envelhecimento reprodutivo feminino, um processo contínuo até a menopausa (WILKOSZ; GREGGAINS; TANBO; FEDORCSAK, 2014), destaca-se pela diminuição na reserva ovariana, composta principalmente por folículos

primordiais. A redução acentuada nos números de folículos após os 30 anos (HANSEN; KNOWLTON; THYER; CHARLESTON *et al.*, 2008) está associada a um aumento na taxa de abortos espontâneos e anormalidades embrionárias (TAL; SEIFER, 2017). Esse declínio na reserva ovariana ocorre devido à ativação irreversível dos folículos primordiais, sendo a via PI3K/AKT um componente crucial nesse processo (MAIDARTI; ANDERSON; TELFER, 2020; TE VELDE; SCHEFFER; DORLAND; BROEKMANS *et al.*, 1998). O declínio na qualidade dos oócitos, decorrente de alterações nas células da granulosa, associadas ao envelhecimento, influencia negativamente a viabilidade reprodutiva (BABAYEV; DUNCAN, 2022). Danos acumulativos no material genético (SACCON; ROVANI; GARCIA; MONDADORI *et al.*, 2020), instabilidade cromossômica e fatores ambientais contribuem para a degeneração dos oócitos, impactando a fertilidade feminina (KORDOWITZKI, 2021). A maternidade em idade avançada, uma tendência crescente, apresenta implicações médicas e obstétricas, indicando riscos associados à gravidez e parto (LERIDON, 2004; TAL; SEIFER, 2017).

A menopausa ocorre geralmente entre os 45 e 50 anos e marca a exaustão da reserva ovariana (BROEKMANS; SOULES; FAUSER, 2009), trazendo mudanças hormonais significativas (BITTO; ALTAVILLA; BONAIUTO; POLITO *et al.*, 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; NAYEBZADEH; QORBANI; ASADI, 2013). O atraso da menopausa pode promover longevidade e melhor qualidade de vida, sendo evidenciado por intervenções como a restrição calórica (BENEDUSI; MARTINI; KALLIKOURDIS; VILLA *et al.*, 2015; ISOLA; ZANINI; HENSE; ALVARADO-RINCON *et al.*, 2022).

A restrição calórica (RC), uma intervenção promissora no contexto do envelhecimento, oferece benefícios à saúde, prolongando a longevidade (MASORO, 2005). O envelhecimento, caracterizado pelo declínio físico e fisiológico, varia entre indivíduos, mas a RC tem mostrado resultados benéficos em diversos modelos animais (HEILBRONN; RAVUSSIN, 2003). Esta estratégia nutricional, que compreende na redução da ingestão alimentar sem causar desnutrição, promove uma extensão notável da longevidade, além de reduzir a incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento (GONZALEZ; TOBIA; EBERSOLE; NOVAK, 2012; MONTEFUSCO; D'ADDIO; LORETELLI; BEN NASR *et al.*, 2021).

Os mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos da RC, destacam-se a redução do status inflamatório e do estresse oxidativo, proporcionando condições metabólicas ideais. A RC influencia positivamente a microbiota intestinal, revelando uma possível conexão entre a modulação nutricional da microbiota e o envelhecimento saudável (WANG; HUANG; YOU; ZHAO *et al.*, 2018). A RC demonstra exercer influência sobre o envelhecimento ovariano por meio de uma série de mecanismos inter-relacionados, entre os quais se destacam a diminuição das espécies reativas de oxigênio (EROS), a regulação de vias de sinalização críticas, o aprimoramento da função mitocondrial e a atenuação de processos inflamatórios. Estas intervenções são fundamentais para a preservação da reserva ovariana e a continuidade da função reprodutiva, conforme observado em estudos com modelos roedores (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019; SCHNEIDER; SACCON; GARCIA; ZANINI *et al.*, 2021). Pesquisas adicionais apontam que a RC tem o potencial de ampliar consideravelmente a capacidade do eixo reprodutivo feminino de manter sua função até uma fase mais avançada da vida. Este efeito se manifesta tanto nos benefícios diretos às fêmeas submetidas à RC quanto nas melhorias nas taxas de sobrevivência da prole gerada por estes animais. Tal fenômeno é atribuído tanto às ações diretas da RC sobre a reserva ovariana quanto às modificações epigenéticas favorecidas pela RC, reforçando a complexidade e a abrangência dos seus impactos benéficos na saúde reprodutiva (SELESNIEMI; LEE; TILLY, 2008).

Os mecanismos pelos quais a RC atua incluem o aumento da razão NAD⁺/NADH, a sinalização da AMPK (SCHNEIDER; SACCON; GARCIA; ZANINI *et al.*, 2021) e a inibição da atividade do complexo mTOR (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019; LI; FU; XU; LIN *et al.*, 2015). Esses efeitos, relacionados à modulação de fatores como FoxO3a e SIRT1, desempenham um papel crucial na redução da ativação da reserva ovariana (XIANG; XU; LI; LIN *et al.*, 2012). Além do mais, a complexa interação entre a RC e os ritmos circadianos destacam sua importância na regulação do metabolismo e promoção da saúde (PATEL; CHAUDHARI; GUPTA; VELINGKAAR *et al.*, 2016).

Além disto, diferentes miméticos da restrição calórica (RC) têm sido examinados pelo seu impacto na longevidade. Particularmente a rapamicina, metformina, potenciação do NAD⁺ com mononucleótido de nicotinamida (NMN), e

17 α -Estradiol (17 α E2). A rapamicina, reconhecida como um mimético promissor da RC, demonstra efeitos semelhantes na preservação da reserva ovariana e na fertilidade em comparação com a RC (ZHOU; XIE; LI; LIANG *et al.*, 2017). Da mesma forma, a metformina, originalmente utilizada para tratar diabetes tipo 2, exibe benefícios na saúde reprodutiva, retardando o envelhecimento ovariano e melhorando a fertilidade em estudos com animais (FURAT RENCBER; KURNAZ OZBEK; ERALDEMIR; SEZER *et al.*, 2018; QIN; DU; CHEN; WU *et al.*, 2019). A potenciação do NAD⁺ através do NMN também mostra resultados promissores na restauração dos níveis de NAD⁺ em oócitos, resultando em melhores taxas de maturação e fertilidade em camundongos idosos (MOUCHIROUD; HOUTKOOPE; MOULLAN; KATSYUBA *et al.*, 2013). Por fim, o 17 α E2, um estrogênio não feminilizante, demonstra prolongar a longevidade em camundongos machos, impactando a ingestão de energia e reduzindo a massa corporal, sem afetar significativamente a reserva ovariana em fêmeas (GARRATT; LEANDER; PIFER; BOWER *et al.*, 2019). Essas intervenções farmacológicas oferecem perspectivas interessantes para a pesquisa sobre envelhecimento e saúde reprodutiva.

Apesar dos avanços, os mecanismos específicos da ação da RC ainda não estão totalmente esclarecidos, indicando a necessidade de mais estudos comparativos diretos. A compreensão desses processos pode abrir caminho para a aplicação segura e eficaz da RC em seres humanos, oferecendo não apenas uma vida mais longa, mas também uma vida mais saudável.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar os efeitos da RC em diferentes fases da vida da fêmea sobre o envelhecimento ovariano e parâmetros metabólicos em camundongos.

2.2 Objetivo Específico

Analisar o efeito da RC de 30% dos 3 até os 7 meses de idade ou dos 7 até os 11 meses de idade no:

- Peso corporal
- Gordura corporal
- Sensibilidade a insulina
- Número de folículos ovarianos

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Envelhecimento

Segundo dados provenientes do censo de 2022, conduzido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), é observada notória ascensão populacional de idosos no contexto brasileiro. Ao longo dos últimos doze anos, observou-se um incremento de 57,4% no número de indivíduos com 65 anos ou mais, caracterizado por um crescimento anual excedente a 4%. Este padrão resultou em um acréscimo médio anual superior a 1 milhão de pessoas idosas. A magnitude dessa tendência denota uma transformação substancial na composição demográfica nacional. Além disso, cabe destacar a projeção da Organização Mundial da Saúde (OMS), que prevê, para o ano de 2030 que uma em cada seis pessoas atingirá a marca dos 60 anos ou mais.

O envelhecimento é um fenômeno complexo, marcado pelo declínio gradual da funcionalidade do organismo. Este processo se manifesta através de diversos eventos, como exaustão celular, alterações epigenéticas, instabilidade genômica, comunicação intracelular comprometida, disfunção mitocondrial e desregulação na sensibilidade a nutrientes (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023). Como consequência a esses eventos, o organismo dá início a uma resposta compensatória que tem por objetivo atenuar esses danos, como a desregulação na sensibilidade de nutrientes, disfunção mitocondrial e senescência celular, que são projetadas para proteger o organismo contra danos ou escassez de nutrientes (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). Estas respostas quando em excesso, ou de forma crônica, como no processo de envelhecimento avançado, acabam gerando doenças relacionadas ao envelhecimento (LIGUORI; RUSSO; CURCIO; BULLI *et al.*, 2018) e juntamente com o envelhecimento, há o aumento do depósito de tecido adiposo, com redistribuição do depósito subcutâneo para a região visceral (KUK; SAUNDERS; DAVIDSON; ROSS, 2009), que está intimamente relacionado a disfunção metabólica (MANCUSO; BOUCHARD, 2019). Este tecido adiposo que deveria desempenhar funções cruciais, como armazenamento de energia, detecção de nutrientes, regulação da temperatura, modulação imunológica, cicatrização de feridas e regeneração de tecidos, apresenta disfunção com o envelhecimento (TCHKONIA; MORBECK; VON ZGLINICKI; VAN

DEURSEN *et al.*, 2010). Esta disfunção resulta em um processo de inflamação persistente (WU; REN; PAE; GUO *et al.*, 2007) e desenvolvimento de várias doenças do envelhecimento como câncer, doença cardiovascular, Alzheimer, diabetes tipo II, sarcopenia e osteoporose (Figura 1) (SANADA; TANIYAMA; MURATSU; OTSU *et al.*, 2018). Essas interações complexas revelam a intrínseca relação entre o envelhecimento, a disfunção metabólica e a inflamação no contexto do tecido adiposo.

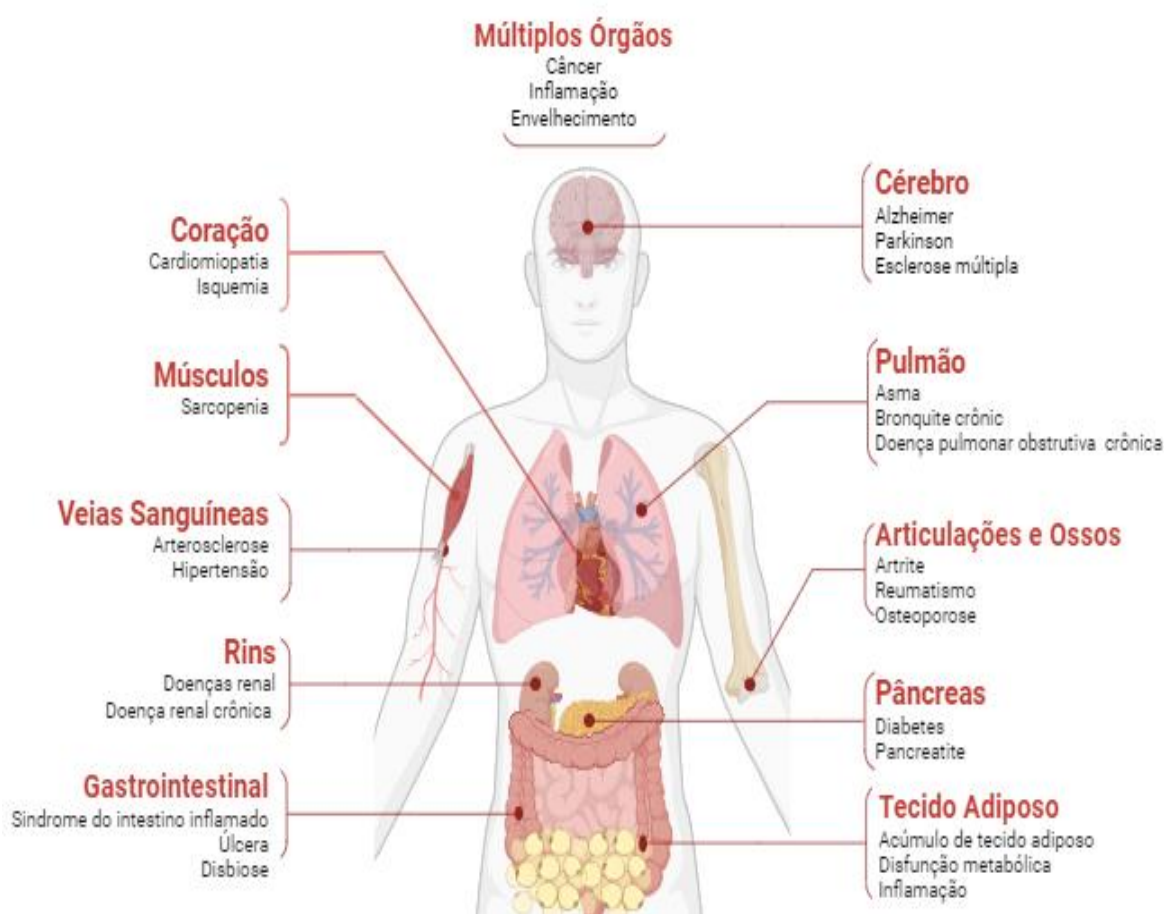


Figura 1- Impacto do envelhecimento no organismo humano. A representação destaca as áreas suscetíveis a alterações relacionadas ao envelhecimento, evidenciando a maior probabilidade de desenvolvimento, principalmente de distúrbios relacionados a inflamação. As consequências do envelhecimento são ilustradas em órgãos vitais, incluindo o cérebro, massa muscular, vasos sanguíneos, tecido adiposo, coração, rins, pulmões, coração, fígado e intestino. Essas mudanças destacam a complexidade do processo de envelhecimento e suas ramificações em todo os sistemas. Fonte: Figura do Autor.

Desta maneira, fica claro que a instauração de um estado crônico de inflamação ocorre durante o envelhecimento e potencializa-se e/ou antecipa-se com a obesidade. Mesmo na ausência de sinais evidentes de infecção (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014). É observado um aumento das células imunes inflamatórias no soro de indivíduos idosos, como interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), proteína C reativa (PCR) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MANCUSO; BOUCHARD, 2019; MILAN-MATTOS; ANIBAL; PERSEGUINI; MINATEL *et al.*, 2019). Esta inflamação também pode ter origem no acúmulo de células danificadas (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014), conhecidas como células senescentes. Estas células se encontram em estado de parada irreversível do ciclo celular (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013) e implementam uma resposta pró-inflamatória complexa conhecida como fenótipo secretor associado à senescência (SASP) (MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014). Além do mais, com o envelhecimento há o aumento do estresse oxidativo e os radicais livres devido a disfunção mitocondrial progressiva que ocorre com o envelhecimento (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). O aumento de radicais livres é acompanhado do aumento de células senescentes (MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014) e de inflamação (LIGUORI; RUSSO; CURCIO; BULLI *et al.*, 2018). Outra teoria, uma das mais comuns do envelhecimento é a “teoria dos radicais livres”, que propõe que as EROS os subprodutos do metabolismo celular, podem acumular-se e danificar outras moléculas, conduzindo assim à senescência. Embora a resposta inflamatória seja uma reação natural e essencial ao estresse vivenciado por um organismo, o acúmulo excessivo de EROS pode causar diversas patologias, principalmente mediadas por inflamação (LIGUORI; RUSSO; CURCIO; BULLI *et al.*, 2018).

Além da inflamação, a resistência à insulina é uma disfunção metabólica comum associada ao envelhecimento (KITADA; OGURA; MONNO; KOYA, 2019). Em termos simples, a resistência à insulina ocorre quando as células se tornam resistentes a entrada de glicose em níveis normais de insulina, resultando no distúrbio da homeostase da glicose (JAMES; STOCKLI; BIRNBAUM, 2021). Também, notável em condições como a obesidade, onde o acúmulo de tecido adiposo está vinculado a um aumento significativo da resposta inflamatória (WU; BALLANTYNE, 2020). Este processo inflamatório associado a obesidade está associado a resistência à insulina (ABBATECOLA; FERRUCCI; GRELLA; BANDINELLI *et al.*, 2004; ELLULU; PATIMAH;

KHAZA'Al; RAHMAT *et al.*, 2017). Ocorrendo devido à contribuição das células imunes inflamatórias metabolicamente ativas na disfunção do tecido adiposo, regulando negativamente o metabolismo dos adipócitos e remodelando-o (WU; BALLANTYNE, 2020; XU; BARNES; YANG; TAN *et al.*, 2003). As citocinas liberadas pelas células imunes inflamatórias ativam uma série de vias de sinalização intracelular, que prejudicam a sinalização da insulina (WU; BALLANTYNE, 2017), induzindo resistência à insulina. Interessantemente, é bem sabido que a via de sinalização da insulina pode influenciar a expectativa de vida dos mamíferos, visto que diversos compostos e tratamentos que modulam a via intracelular da fosfatidinositol 3 quinase (PI3K)-proteína quinase B (AKT) - Forkhead Box O (FoxO) podem aumentar a longevidade (BARTKE, 2008; SELMAN; LINGARD; CHOUDHURY; BATTERHAM *et al.*, 2008). Desta maneira, fica claro que existe uma associação entre o estado inflamatório observado no envelhecimento/obesidade com a resistência à insulina, revelando que maiores níveis de inflamação estão ligados a uma maior resistência à insulina.

Também, há mudanças epigenéticas que ocorrem durante o envelhecimento, como modificações na metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e nas histonas, que desempenham um papel crucial na regulação da expressão gênica. Essas alterações têm implicações significativas na relação entre envelhecimento, acúmulo de tecido adiposo, inflamação e diabetes. À medida que envelhecemos, as mudanças epigenéticas podem influenciar a distribuição e o armazenamento de tecido adiposo. O acúmulo excessivo de tecido adiposo, característico da obesidade, é muitas vezes resultado de modificações epigenéticas que afetam genes relacionados ao metabolismo e à regulação do apetite. A obesidade, por sua vez, cria um ambiente propício para a inflamação crônica, onde genes pró-inflamatórios são ativados desreguladamente. Esse estado inflamatório persistente está intimamente ligado à resistência à insulina, um precursor comum do diabetes tipo 2 (DM2). As mudanças epigenéticas contribuem para essa desregulação, impactando a expressão gênica associada à resposta inflamatória e à sensibilidade à insulina. Assim, a relação entre envelhecimento, acúmulo de tecido adiposo, inflamação e diabetes é intrincada e mediada, em parte, por alterações epigenéticas (Figura 2) (SAUL; KOSINSKY, 2021).

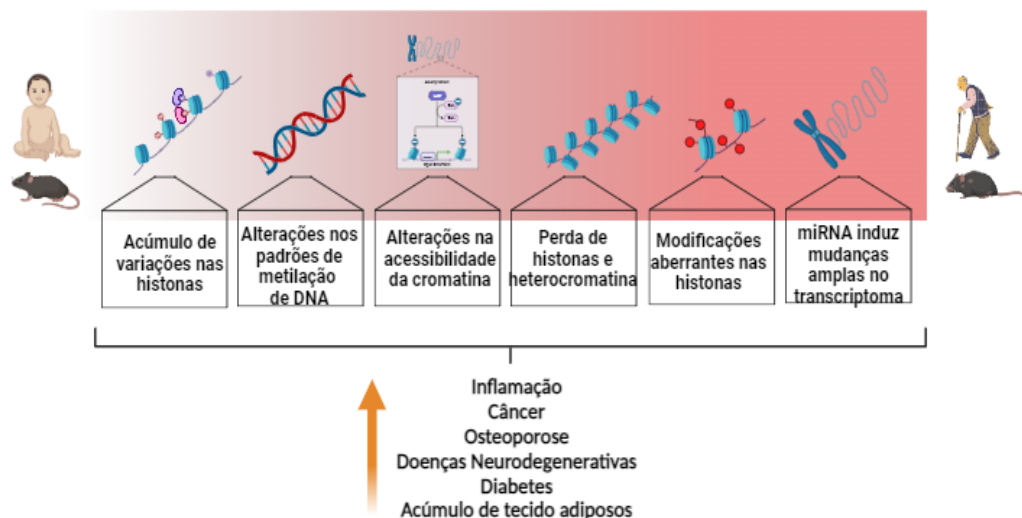


Figura 2 – Envelhecimento epigenético. A ilustração destaca as mudanças no nível epigenético associadas ao processo de envelhecimento. Estas incluem o acúmulo de variações nas histonas, alterações nos padrões de metilação do DNA, modificações na acessibilidade da cromatina, perda de histonas e heterocromatina, além de alterações aberrantes nas histonas. O envelhecimento epigenético também envolve mudanças significativas nos microRNA (miRNA) e amplas modificações no transcriptoma. Essas mudanças epigenéticas contribuem para a complexidade do envelhecimento, impactando a regulação gênica e a homeostase celular. Fonte: Figura do Autor.

Tanto na condição de obesidade como durante o processo de envelhecimento, o acúmulo de tecido adiposo e o aumento de sinais pró-inflamatórios são fatores preponderantes a resistência à insulina (MANCUSO; BOUCHARD, 2019). Porém, o envelhecimento, assim como o excesso calórico, também resulta em alterações na sinalização do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Sua disfunção interfere na sinalização normal da insulina, contribuindo para o desenvolvimento da resistência à insulina. A via do mTOR desempenha um papel fundamental em processos celulares, como a regulação do metabolismo de glicose e lipídios, ambos cruciais para a manutenção da sensibilidade à insulina (DEBLON; BOURGOIN; VEYRAT-DUREBEX; PEYROU *et al.*, 2012). Além do mais, as características do envelhecimento, como

alterações do sistema imunitário, ganho de peso e tecido adiposo, tumores e lesões pré-cancerígenas, bem como alterações neurocomportamentais foram melhoradas pela rapamicina, que é uma molécula inibidora específica da mTOR (DEBLON; BOURGOIN; VEYRAT-DUREBEX; PEYROU *et al.*, 2012; EHNINGER; NEFF; XIE, 2014).

A mTOR, é uma quinase sensível a serina/treonina, que atua na regulação do crescimento, metabolismo, proliferação e sobrevivência celular (SAXTON; SABATINI, 2017; STALLONE; INFANTE; PRISCIANDARO; GRANDALIANO, 2019). Ela é subdividida em dois complexos distintos, mTORC1 e mTORC2 (LAPLANTE; SABATINI, 2009). O complexo mTORC1 assume uma função central na regulação dos processos de crescimento e metabolismo celular, desempenhando um papel crucial ao modular o equilíbrio entre anabolismo e catabolismo em resposta às condições ambientais. Essa regulação é fundamental para viabilizar o crescimento e a divisão celular, uma vez que demanda uma intensificação coordenada na síntese de proteínas, lipídios e nucleotídeos, enquanto simultaneamente restringe vias catabólicas, como a autofagia (SAXTON; SABATINI, 2017). A ativação de mTORC1 é dependente de aminoácidos, além do sistema AMPK e da sinalização da insulina, ou seja, aminoácidos e energia. Já para ativação da mTORC2 não se faz necessário a presença de aminoácidos (LAPLANTE; SABATINI, 2013; YOON, 2017). Ambos desempenham papéis importantes na regulação da Akt, contudo mTORC2 apresenta papel principal na fosforilação e ativação de Akt, um efetor chave da sinalização de insulina/PI3K (SARBASSOV; GUERTIN; ALI; SABATINI, 2005). Uma vez ativa, a Akt promove a sobrevivência, proliferação e crescimento celular através da fosforilação e inibição de vários substratos-chave, incluindo os fatores de transcrição FoxO (DU; ZHENG, 2021).

Outra via de sinalização chave no envelhecimento é a da FoxO, que regula múltiplas funções fisiológicas, incluindo metabolismo celular, resposta ao estresse e inflamação de baixo grau (DU; ZHENG, 2021). Animais knockout para FoxO apresentam uma menor longevidade (SHIMOKAWA, 2023), indicando seu papel chave na regulação do envelhecimento. As proteínas FoxO, atuam como mediadoras na resposta inibitória desencadeada pela insulina em diversas funções vitais (LEE; DONG, 2017). Pertencentes à classe O dos fatores de transcrição Forkhead, caracterizam-se por um domínio conservado de ligação ao DNA conhecido como

Forkhead box ou FOX (ACCILI; ARDEN, 2004). Essas proteínas, sensíveis às variações nutricionais, desempenham um papel fundamental na regulação da homeostase metabólica em diversos tecidos e órgãos. Além disso, atuam como reguladores versáteis em uma variedade de processos celulares essenciais, incluindo autofagia, controle do ciclo celular, reparo de danos ao DNA, apoptose e resistência ao estresse oxidativo (DU; ZHENG, 2021). Nesse contexto, a supressão da sinalização na via mTOR, emerge como um fator crucial para a promoção da longevidade (WEICHHART, 2018).

A longevidade e a expectativa de vida são fenômenos complexos e multifatoriais, resultantes de uma intrincada interação entre diversos elementos de natureza ambiental, genética, epigenética e estocástica. Cada um desses componentes desempenha uma função singular na conformação do fenótipo global associado à longevidade (AUSTAD; BARTKE, 2015; LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023). É notável que exista uma disparidade de sexo na expectativa de vida, com as mulheres apresentando uma maior longevidade em comparação aos homens (OSTAN; MONTI; GUERESI; BUSSOLOTTO *et al.*, 2016). Diversos fatores podem explicar essa disparidade, sendo um deles o sistema imunológico mais responsivo nas mulheres em comparação aos homens (OERTELT-PRIGIONE, 2012). Ademais, ressalta-se que tal disparidade não se limita exclusivamente à humanos, camundongos machos em condições de laboratório, também apresentam menor longevidade (AUSTAD; BARTKE, 2015). Diante desse cenário, destaca-se a importância intrínseca de compreender as distinções do sexo no contexto do envelhecimento. Salienta-se, assim, a necessidade de adotar abordagens diferenciadas a fim de entender a complexidade dos processos que regulam a longevidade, conferindo especial atenção aos fatores determinantes que moldam o envelhecimento feminino.

3.2 Envelhecimento Reprodutivo e Menopausa

No contexto das disfunções metabólicas associadas ao envelhecimento no organismo destaca-se o envelhecimento reprodutivo feminino, um processo contínuo que perdura até a menopausa (WILKOSZ; GREGGAINS; TANBO; FEDORCSAK, 2014). A reserva ovariana é constituída pelos folículos primordiais remanescentes nos

ovários (PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. ELECTRONIC ADDRESS; PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE, 2020), que são oócitos rodeados por uma única camada de células da pré-granulosa (MYERS; BRITT; WREFORD; EBLING *et al.*, 2004). Ao nascer, uma mulher possui aproximadamente 1 milhão de folículos primordiais. No início da menarca, esse número reduz-se naturalmente para cerca de 400.000 devido à atresia folicular. A partir dos 30 anos, observa-se um aumento no ritmo de depleção dos oócitos, resultando em uma diminuição significativa no número de folículos, que atinge aproximadamente 25.000 (HANSEN; KNOWLTON; THYER; CHARLESTON *et al.*, 2008). Concomitantemente, a partir dos 30 anos é observado um expressivo aumento na taxa de abortos espontâneos e anormalidades embrionárias devido ao declínio da qualidade dos oócitos que também ocorre com o avançar da idade (TAL; SEIFER, 2017). Em modelos animais, como camundongos e outros mamíferos, a reserva ovariana também é estabelecida no período neonatal e no início da vida (MONNIAUX; CLEMENT; DALBIES-TRAN; ESTIENNE *et al.*, 2014). Esta reserva também apresenta uma redução gradual à medida que os animais envelhecem, podendo ser chamada de estropausa. Camundongos da linhagem C57BL/6 têm um declínio mais pronunciado a partir dos 9 meses de idade, evidenciado pela redução aproximadamente da metade da densidade folicular aos 3 meses para os 9 meses (ANSERE; ALI-MONDAL; SATHIASEELAN; GARCIA *et al.*, 2021). Aos 18 meses, observa-se uma diminuição aproximada de 10 vezes na reserva ovariana (KEVENAAR; MEERASAHIB; KRAMER; VAN DE LANG-BORN *et al.*, 2006). Em decorrência disso, há uma redução na taxa de fertilidade, manifestada pela diminuição no desenvolvimento embrionário também em camundongos (ISONO; WADA-HIRAIKE; KAWAMURA; FUJII *et al.*, 2018), similar ao observado em mulheres.

A redução na reserva ovariana ocorre devido à ativação de folículos primordiais, que é um processo irreversível (BROEKMANS; SOULES; FAUSER, 2009; TE VELDE; SCHEFFER; DORLAND; BROEKMANS *et al.*, 1998). Na ativação de folículos primordiais, a via PI3K/AKT parece ser determinante (MAIDARTI; ANDERSON; TELFER, 2020). Assim, quando ativa no interior do oócito, a PI3K converte fosfatidinositol 4,5 bifosfato (PIP2) em fosfatidinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), o que por sua vez leva a AKT a migrar para o núcleo celular, levando a fosforilação do fator

de transcrição FoxO3a e ativação do folículo primordial quiescente (Figura 3) (SCHNEIDER; SACCON; GARCIA; ZANINI *et al.*, 2021). A ativação da mTORC1 nas células da pré-granulosa do folículo primordial aumenta a expressão do KIT ligand (KITL), que se liga ao receptor tirosina quinase KIT na superfície de oócitos, ativando a via da PI3K/AKT no oócito primordial (ZHANG; RISAL; GORRE; BUSAYAVALLASA *et al.*, 2014) (Figura 3). A inibição da mTORC1 nas células da pré-granulosa de folículos primordiais previne a ativação e crescimento destes, enquanto a hiperativação da mTORC1 leva a hiperativação folicular e falha ovariana prematura (GUO; ZHANG; GUO; SUN *et al.*, 2018). A sinalização da AMPK parece inibir a ativação folicular por impedir a sinalização da via da mTOR e da PI3K/AKT (BHARDWAJ; PALIWAL; SARAF; SACHDEVA, 2022). Nesse contexto, fica claro que a ativação e o desenvolvimento folicular são processos dependentes da ação e comunicação de diversas vias metabólicas sensoras dos níveis de nutrientes e energia (SON; DAS; SHALOM-PAZ; HOLZER, 2011). Assim as vias mTOR e FoxO3a são essenciais na regulação do envelhecimento ovariano. Camundongos knockout para o gene FoxO3a apresentam infertilidade após um período de 15 semanas, decorrente da ativação prematura e depleção da reserva de folículos primordiais (CASTRILLON; MIAO; KOLLIPARA; HORNER *et al.*, 2003). Igualmente, a ausência funcional do gene que codifica a esclerose tuberosa 1 (TSC1), um inibidor da sinalização mTORC1, nas células da pré-granulosa dos folículos primordiais em roedores resultou em uma ativação folicular generalizada e falência ovariana prematura (ZHANG; RISAL; GORRE; BUSAYAVALLASA *et al.*, 2014).

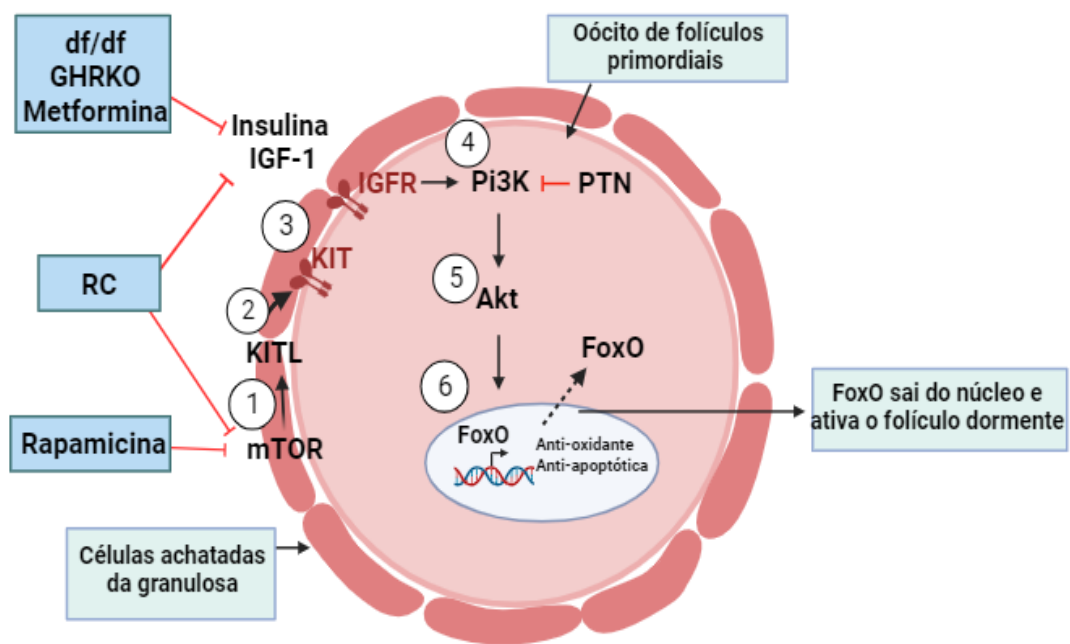


Figura 3 – Vias intracelulares relacionadas ao recrutamento e ativação de folículos primordiais ovarianos. Adaptado de revisão publicada por (SCHNEIDER; SACCON; GARCIA; ZANINI *et al.*, 2021). Os camundongos anões Ames (df/df) carregam uma mutação no locus Prop1 (Profeta de Pit1) que resulta em deficiência de hormônio do crescimento (GH), e esta mutação em Prop1 causa atraso no envelhecimento ovariano (SCHNEIDER; ZHI; MOREIRA; LUCIA *et al.*, 2014). Similarmente o modelo knockout para o receptor do hormônio do crescimento (GHRKO) apresenta idade biológica mais jovem nos ovários (SLUCZANOWSKA-GLABOWSKA; LASZCZYNSKA; PIOTROWSKA; GLABOWSKI *et al.*, 2012). Ao mesmo tempo intervenções como RC e rapamicina diminuem a ativação do alvo da rapamicina em mamíferos mTORC1, presente na camada da granulosa, que não modifica a expressão de KITL e não há ligação no receptor tirosina quinase (KIT). Consequentemente não há sinalização das vias fosfoinositídeo-3-quinase (Pi3K), phosphatase and tensin homolog (Pten) e proteína quinase B (AKT), quais são processo chave para a fosforilação das proteínas forkhead box (FoxO3a).

A reserva ovariana diminui progressivamente ao longo do tempo, um processo natural decorrente da ovulação regular e da atresia folicular. Paralelamente, a qualidade dos oócitos tende a declinar com a idade, evidenciando mecanismos complexos de regulação da qualidade oocitária (BROEKMANS; SOULES; FAUSER, 2009; KULIEV; CIESLAK; VERLINSKY, 2005). Este declínio na qualidade dos oócitos

está associado as células da granulosa, ao fornecerem suporte essencial ao desenvolvimento oocitário, desempenham uma função crucial. Alterações na qualidade dessas células, associadas ao envelhecimento, influenciam negativamente a viabilidade e o potencial reprodutivo dos oócitos, devido danos cumulativos ao longo do ciclo de vida e modificações na integridade das células da granulosa (BABAYEV; DUNCAN, 2022). Ademais, o prejuízo cumulativo no material genético, DNA, vinculado ao mecanismo de quebra e inadequação na reparação da fita dupla, é um dos contribuintes essenciais no desencadeamento do processo de envelhecimento em oócitos de camundongos e seres humanos (SACCON; ROVANI; GARCIA; MONDADORI *et al.*, 2020; TITUS; LI; STOBZKI; AKULA *et al.*, 2013). Fatores contribuintes, como, instabilidade cromossômica e processos celulares adversos, desempenham papéis fundamentais nesse fenômeno. Adicionalmente, a exposição a elementos ambientais, toxinas e estresse oxidativo, pode contribuir para a degeneração dos oócitos (KORDOWITZKI, 2021). Esses aspectos têm significativa relevância no contexto da fertilidade feminina, afetando tanto a probabilidade de concepção espontânea quanto o êxito de abordagens de reprodução assistida (LERIDON, 2004). A compreensão destes processos é essencial para orientar considerações relativas à saúde reprodutiva e à tomada de decisões no âmbito da concepção assistida.

A maternidade em idade avançada tem sido uma tendência crescente nas últimas décadas, desafiando as normas tradicionais. Este fenômeno é corroborado por dados demográficos que destacam um aumento significativo na idade média das mulheres ao darem à luz. Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística, entre os anos de 1980 e 2021, houve um aumento notável na proporção de mulheres que optam por ter filhos após os 35 anos. Este fenômeno pode ser atribuído a uma variedade de fatores sociais, econômicos e médicos. Mulheres estão buscando carreiras profissionais mais estáveis antes de iniciar uma família, refletindo mudanças nas oportunidades e expectativas de gênero na sociedade contemporânea. Além disso, avanços na tecnologia médica, como tratamentos de fertilidade e cuidados pré-natais aprimorados, têm contribuído para a possibilidade de gravidezes bem-sucedidas em idades mais avançadas (LERIDON, 2004). Contudo, é crucial considerar as implicações desse fenômeno. Estudos indicam que a maternidade tardia pode estar associada a um aumento nas complicações durante a gravidez e o parto,

bem como a um maior risco de certas condições médicas para o feto (TAL; SEIFER, 2017).

Um estudo recente evidenciou que em camundongos, mesmo em uma fase relativamente precoce, aos 9 meses de idade, quando os ovários dos animais ainda permanecem férteis e reprodutivamente ativos, já ocorre o acúmulo de células imunes. Este fenômeno coexiste com um aumento notável de células imunes que frequentemente expressam marcadores transcricionais associados à senescência celular, sugerindo uma possível contribuição para o aumento da senescência celular ovariana durante o avanço da idade. Simultaneamente, observa-se aumento na produção de colágeno, indicando um processo concomitante de fibrose (ISOLA; OCANAS; HUBBART; KO *et al.*, 2023).

A menopausa é uma fase natural na vida de uma mulher, geralmente ocorrendo entre os 45 e 50 anos de idade. Os primeiros sinais de envelhecimento reprodutivo tornam-se perceptíveis, pela redução na duração do ciclo menstrual, que avança progressivamente até que os ciclos se tornam irregulares, quando ocorre a menopausa, que é a exaustão da reserva ovariana e representa a transição do período reprodutivo para o pós-reprodutivo, com cessação dos ciclos menstruais e do período fértil (BROEKMANS; SOULES; FAUSER, 2009). Essa transição é caracterizada por mudanças hormonais significativas. Os ovários tornam-se menos sensíveis aos estímulos gonadotróficos, resultando em um aumento sérico do hormônio folículo-estimulante (FSH). Esse aumento está associado ao declínio na produção de inibina B e estradiol pelas células da granulosa dos folículos antrais saudáveis no ovário. Os impactos da menopausa vão além do sistema reprodutivo. A redução dos níveis de estrogênio, pode desencadear alterações em vários órgãos. Isto porque, a perda da função ovariana, visto a redução dos folículos antrais e a subsequente diminuição nos níveis circulantes de estrogênio apresentam uma notável associação com várias alterações metabólicas durante a menopausa (BITTO; ALTAVILLA; BONAIUTO; POLITO *et al.*, 2009). Com isso, a menopausa está associada a um aumento nas chances de desenvolvimento da síndrome metabólica (JOUYANDEH; NAYEBZADEH; QORBANI; ASADI, 2013). Essa síndrome, por sua vez, é caracterizada pelo aumento da propensão ao desenvolvimento de aterosclerose, doença cardiovascular, diabetes mellitus, além de complicações vasculares e neurológicas, como acidente vascular cerebral (BITTO; ALTAVILLA; BONAIUTO; POLITO *et al.*, 2009; CARR, 2003). O

excesso de peso e a obesidade são fatores subjacentes à etiologia desta síndrome metabólica (SWARUP; GOYAL; GRIGOROVA; ZELTSER, 2023).

Sendo assim, o atraso da menopausa pode levar à longevidade e maior qualidade de vida, visto que camundongos submetidos à ovariectomia apresentam menor expectativa de vida (BENEDUSI; MARTINI; KALLIKOURDIS; VILLA *et al.*, 2015). Além disso, a relação clara entre a reserva ovariana e longevidade é destacada, como ilustrado pelo aumento da expectativa de vida em animais velhos transplantados com ovários jovens (MASON; CARGILL; ANDERSON; CAREY, 2009). No entanto, outras intervenções menos invasivas, como a restrição calórica, também beneficiam a longevidade ao prolongar o término da reserva ovariana (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019; ISOLA; ZANINI; HENSE; ALVARADO-RINCON *et al.*, 2022).

3.3 Restrição calórica

O envelhecimento descreve o declínio no funcionamento físico e fisiológico dos organismos vivos. O envelhecimento é inevitável, mas a velocidade ou progressão do envelhecimento é altamente variável entre indivíduos (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023; SCHNEIDER; SACCON; GARCIA; ZANINI *et al.*, 2021). Intervenções como a restrição calórica podem trazer efeitos benéficos à saúde e, resultar em uma longevidade prolongada (MASORO, 2005).

Nesse contexto, a restrição calórica (RC) é uma estratégia nutricional marcada pela redução da ingestão alimentar total, sem que ocorra desnutrição (FLANAGAN; MOST; MEY; REDMAN, 2020). Esta intervenção dietética é consolidada na literatura por promover aumento da longevidade e reduzir incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento (FLANAGAN; MOST; MEY; REDMAN, 2020). A RC de 30 a 50% se revela uma estratégia notável na busca pela extensão do período de vida em 50 a 300% em diversos modelos animais, de invertebrados a primatas (HEILBRONN; RAVUSSIN, 2003). Os mecanismos subjacentes a esse fenômeno complexo são multifacetados. Um dos principais benefícios observados está relacionado à redução do status inflamatório no organismo. A RC tem a capacidade de atenuar processos inflamatórios sistêmicos, destacando-se como um fator-chave na promoção da saúde

ao longo do tempo (GONZALEZ; TOBIA; EBERSOLE; NOVAK, 2012) . Além disso, a RC demonstra a capacidade de reduzir o estresse oxidativo, um processo intimamente ligado ao envelhecimento e às condições relacionadas à idade. Esse efeito antioxidante pode desempenhar um papel crucial na manutenção da integridade celular e na prevenção de danos celulares associados ao envelhecimento. Um ponto de destaque é a melhora na sensibilidade a nutrientes como resultado da RC. A capacidade aprimorada do organismo de utilizar eficientemente os nutrientes disponíveis pode influenciar positivamente a longevidade, proporcionando condições metabólicas ideais (MONTEFUSCO; D'ADDIO; LORETELLI; BEN NASR *et al.*, 2021). A microbiota intestinal também se mostra importante em modular os efeitos benéficos da RC no metabolismo (WANG; HUANG; YOU; ZHAO *et al.*, 2018), curiosamente a RC apresenta potencial na promoção de uma composição equilibrada da microbiota, revelando uma possível ligação estreita entre a modulação nutricional da microbiota intestinal e o envelhecimento saudável (ZHANG; LI; XU; WANG *et al.*, 2013). Considerando esses resultados promissores em modelos animais, há um crescente interesse em compreender como a RC pode ser aplicada de maneira segura e eficaz em seres humanos (Figura 4). As implicações para a saúde humana são significativas, pois a RC pode representar uma abordagem potencialmente poderosa para promover não apenas uma vida mais longa, mas também uma vida mais saudável (COLMAN; BEASLEY; KEMNITZ; JOHNSON *et al.*, 2014) .

No entanto, os mecanismos de ação da RC ainda não estão totalmente elucidados. Dentre esses mecanismos, o aumento da razão Dinucleótido de nicotinamida e adenina+/Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo NAD⁺/NADH em virtude da RC leva a maior sinalização da AMPK, que regula processos de diferenciação e crescimento celular, biogênese mitocondrial, reparo ao DNA e estresse oxidativo (MIHAYLOVA; SHAW, 2011). Além disso, as alterações da razão NAD⁺/NADH levam ao aumento da expressão de um grupo de proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina sirtuínas (SIRTs) (SARTORELLI; CARETTI, 2005). Tanto a atividade da AMPK como das SIRTs são apontadas como reguladoras do envelhecimento e da homeostase celular por sua capacidade de modular o fator de transcrição FoxO (SHARPLES; HUGHES; DEANE; SAINI *et al.*, 2015). A RC também leva a inibição da atividade do complexo mTOR (JOHNSON; RABINOVITCH; KAEBERLEIN, 2013), o que explica parcialmente seus efeitos benéficos no envelhecimento.



Figura 4 – Adaptações biológicas induzidas pela restrição alimentar, as quais apresentam um efeito protetor contra distúrbios e doenças relacionados ao envelhecimento em roedores, primatas não humanos e humanos. Esses efeitos protetores abrangem a prevenção da obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, câncer, enfermidades renais, doenças autoimunes e inflamatórias, resultando em um aumento tanto na expectativa de saúde quanto na expectativa de vida. Adaptado de (GREEN; LAMMING; FONTANA, 2022). Fonte: Figura do Autor.

Além da longevidade, a RC também impacta a reserva ovariana e vida reprodutiva feminina. Estudos bastante antigos já mostravam que a redução da ingestão alimentar em roedores fêmeas resultava em maior sustentabilidade da fertilidade (Osborne, Mendel et al. 1917). Atualmente sabe-se que quando aplicada em intensidades de até 30% a RC é capaz de reduzir a ativação de folículos primordiais, como mostrado por nosso grupo (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019) e outros (LIU; ZHANG; WANG; ZHOU *et al.*, 2015). Contudo, grande parte dos estudos avaliando os impactos da RC na reserva ovariana foram

realizados em animais logo após o desmame, o que pareceu retardar o crescimento e maturação sexual dos animais (MARTIN; GOLDEN; CARLSON; EGAN *et al.*, 2008), impactando o desenvolvimento ovariano. Ainda, camundongos expostos a RC durante toda a vida adulta demonstram fertilidade e taxa de sobrevivência das proles notavelmente maior que os animais em dieta ad libitum após 15 meses de idade (SELESNIEMI; LEE; TILLY, 2008). No entanto, não há estudos avaliando por quanto tempo este efeito pode persistir. No mesmo sentido, estudos mostram que a RC de apenas 10% já foi suficiente para impactar positivamente a preservação da reserva ovariana, de maneira similar a RC de 30% (ISOLA; ZANINI; HENSE; ALVARADO-RINCON *et al.*, 2022). Interessantemente, neste mesmo estudo (ISOLA; ZANINI; HENSE; ALVARADO-RINCON *et al.*, 2022) após 6 meses de 30% de RC observa-se um efeito negativo no número de ovulações, que foram revertidos após 10 dias de realimentação, quando a prenhez do grupo RC foi maior que do grupo controle. Assim sendo, é óbvia a capacidade da RC em modular o envelhecimento ovariano, no entanto, muitas questões sobre as diferentes intensidades de RC e fases da vida em que é aplicada ainda não foram exploradas em estudos comparativos diretos. Contudo, um estudo em camundongos, mostra que a RC moderada iniciada na vida adulta pode estender significativamente a função do eixo reprodutivo feminino até a idade avançada. Benefícios quais, não se limitam apenas às fêmeas submetidas à RC, mas também se refletem nas taxas de sobrevivência da prole concebida destes animais mais velhos, após retornarem a uma dieta de alimentação livre (SELESNIEMI; LEE; TILLY, 2008).

Com relação aos mecanismos pelo qual a RC atua sobre a reserva ovariana, podemos observar similaridade com as vias que regulam envelhecimento e longevidade. Os estudos apontam que a maior expressão de FoxO3a e SIRT1 seria o principal efeito da RC favorecendo menor ativação da reserva ovariana, visto que são genes relacionados a dormência folicular (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019; LIU; ZHANG; WANG; ZHOU *et al.*, 2015; XIANG; XU; LI; LIN *et al.*, 2012). Ainda, um estudo anterior sugere que a inibição da atividade do complexo mTOR leva a preservação da reserva ovariana em camundongos submetidos a RC de 45% (LI; FU; XU; LIN *et al.*, 2015), sugerindo um papel central também da mTOR neste processo. Isto foi também evidenciado pelo nosso grupo mostrando que um inibidor

específico da mTOR, a rapamicina, teve efeito idêntico a RC de 30% na preservação da reserva ovariana (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019).

Os roedores são frequentemente utilizados como modelo para estudar os efeitos da RC em mamíferos (MITCHELL; MADRIGAL-MATUTE; SCHEIBYE-KNUDSEN; FANG *et al.*, 2016). A RC em roedores pode ser implementada de diversas maneiras, sendo a alimentação com restrição de tempo uma abordagem comum, onde os animais recebem uma quantidade reduzida de alimentos (60% a 80% da ingestão diária) em uma única refeição diária, induzindo forte antecipação e concentração da ingesta alimentar. A alimentação com restrição de tempo tem demonstrado melhorar a saúde metabólica de camundongos em dietas ricas em gordura (HF) ou açúcar, associada à restauração ou aumento dos ritmos circadianos na expressão e sinalização gênica (CHAIX; ZARRINPAR; MIU; PANDA, 2014; HATORI; VOLLMERS; ZARRINPAR; DITACCHIO *et al.*, 2012; SHERMAN; GENZER; COHEN; CHAPNIK *et al.*, 2012). Além disso, a alimentação com tempo determinado, na qual 100% da alimentação diária é fornecida em uma única refeição diária num período de 8 à 12 horas, aumenta a longevidade em camundongos, independentemente da ingestão calórica. Essas intervenções representam formas de dietas periódicas de alimentação e jejum, com evidências sugerindo benefícios na saúde e longevidade. Estudos indicam que o jejum, simulando dietas como a cetogênica e o jejum intermitente, pode ter efeitos positivos no metabolismo e, em alguns casos, na longevidade (ANSON; GUO; DE CABO; IYUN *et al.*, 2003; ROBERTS; WALLACE; TOMILOV; ZHOU *et al.*, 2017). Essas dietas periódicas estão intimamente ligadas aos ritmos circadianos, padrões presentes no comportamento, fisiologia e metabolismo, coordenados pelo relógio circadiano. Intervenções dietéticas, como RC, restrição de tempo e dieta cetogênica, impactam os ritmos circadianos, sendo que a RC aumenta a amplitude da expressão do gene do relógio e reprograma os ritmos circadianos em diversos processos fisiológicos. Esta interação entre RC e o relógio circadiano é indicada por estudos em mutantes do relógio circadiano (KATEWA; AKAGI; BOSE; RAKSHIT *et al.*, 2016; PATEL; CHAUDHARI; GUPTA; VELINGKAAR *et al.*, 2016). Por outro lado, dietas ricas em gordura têm efeitos negativos na saúde e no metabolismo, perturbando os ritmos circadianos (HATORI; VOLLMERS; ZARRINPAR; DITACCHIO *et al.*, 2012), além de ativar a perda de folículos primordiais e causar envelhecimento prematuro dos ovários, afetando mecanismos inflamatórios locais e sistêmicos

(SKAZNIK-WIKIEL; SWINDLE; ALLSHOUSE; POLOTSKY *et al.*, 2016). A alimentação com restrição de tempo, no entanto, pode restaurar esses ritmos, correlacionando-se com melhorias no metabolismo (HATORI; VOLLMERS; ZARRINPAR; DITACCHIO *et al.*, 2012; SHERMAN; GENZER; COHEN; CHAPNIK *et al.*, 2012). Esses resultados destacam a complexa interconexão entre a restrição calórica, o tempo de alimentação e os ritmos circadianos na regulação do metabolismo e na promoção da saúde.

3.4 Miméticos da Restrição Calórica

O crescimento celular é um processo coordenado regulado pelo mTOR. Em condições favoráveis, o mTOR ativo estimula a síntese macromolecular e inibe processos catabólicos. Em condições adversas, a inibição do mTOR leva a respostas de estresse, como aumento da macroautofagia (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). A busca por miméticos da RC para aumentar a longevidade tem levado ao interesse na rapamicina, uma droga imunossupressora (POWERS; KAEBERLEIN; CALDWELL; KENNEDY *et al.*, 2006). A rapamicina, reconhecida como um mimético promissor da RC, demonstrou aumentar a longevidade em camundongos de maneira semelhante à RC (UNNIKRIISHNAN; KURUP; SALMON; RICHARDSON, 2020). Ambos têm efeitos na função ovariana, mas com efeitos sistêmicos diferentes (DOU; SUN; LI; ZHANG *et al.*, 2017). A RC reduz peso e gordura corporal, aumentando a sensibilidade à insulina, enquanto a rapamicina não influencia o peso ou gordura, promovendo resistência à insulina (FANG; WESTBROOK; HILL; BOPARAI *et al.*, 2013). A RC e a rapamicina têm efeitos semelhantes nos ovários, preservando a reserva ovariana e influenciando o envelhecimento (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). Além disso, ambas protegem os ovários contra a exaustão prematura do folículo induzida pela quimioterapia (ZHOU; XIE; LI; LIANG *et al.*, 2017). A expressão de FoxO3a, um fator associado à longevidade, é ampliada nos ovários quando expostos à Restrição Calórica (RC) e à rapamicina. Ambos os tratamentos preservam a reserva ovariana de maneira qualitativa. É fundamental destacar que este aumento na expressão de FoxO3a é vantajoso, pois desempenha funções antioxidantes e antiapoptóticas no núcleo dos folículos primordiais. Isso contrasta com a fosforilação do FoxO3a, processo que leva à sua saída do núcleo do oócito, ativando o folículo em estado de quiescência. Esse mecanismo sublinha a importância da

localização e função do FoxO3a na regulação da saúde e da atividade ovariana (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). Este efeito benéfico estende-se à fertilidade, com animais sob RC ou rapamicina apresentando taxas de prenhez e tamanhos de ninhada superiores (DOU; SUN; LI; ZHANG *et al.*, 2017; LI; FU; XU; LIN *et al.*, 2015).

Outro mecanismo que desempenha papel fundamental na longevidade de camundongos é o eixo do hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I), evidenciado pela longevidade de camundongos deficientes em GH (df/df) e receptor do GH (BROWN-BORG; BORG; MELISKA; BARTKE, 1996). Diferente de camundongos que superexpressam GH têm longevidade reduzida (BARTKE, 2003). O GH afeta a programação do desenvolvimento do envelhecimento, com tratamento precoce encurtando a vida dos df/df (SUN; FANG; PATKI; KOOPMAN *et al.*, 2017). O eixo GH/IGF-I é essencial para a função ovariana normal, influenciando a reserva primordial e afetando o recrutamento de folículos primordiais (CHANDRASHEKAR; ZACZEK; BARTKE, 2004). Os camundongos df/df são incapazes de manter a prenhez e os GHRKO apresentam diminuição da taxa de prenhez e do número de filhotes/ninhada (ROCHA; BONKOWSKI; DE FRANCA; BARTKE, 2007). O aumento da expressão de FoxO3a é observado nos camundongos df/df, associado à manutenção dos folículos primordiais (SCHNEIDER; ZHI; MOREIRA; LUCIA *et al.*, 2014). A deficiência de GH preserva não apenas a quantidade (MEHLMANN, 2005), mas também a qualidade dos oócitos, reduzindo danos no DNA (SACCON; ROVANI; GARCIA; MONDADORI *et al.*, 2020). A longevidade nos órgãos reprodutivos femininos está associada à ativação do FoxO3a e à preservação da reserva ovariana em camundongos com deficiência de GH.

A metformina, um medicamento utilizado principalmente no tratamento do DM2, demonstrou efetivamente aumentar a expectativa de vida. Estudos em humanos estão explorando seus efeitos antienvhecimento, evidenciando uma redução na taxa de mortalidade em pacientes diabéticos tratados com metformina superior a dos controles não diabéticos (CAMPBELL; BELLMAN; STEPHENSON; LISY, 2017). Seus mecanismos de ação são semelhantes à restrição calórica, incluindo a redução dos níveis de insulina e IGF-I (MARTIN-MONTALVO; MERCKEN; MITCHELL; PALACIOS *et al.*, 2013). A metformina beneficia a saúde ao diminuir a glicose no sangue

(GRZYBOWSKA; BOBER; OLSZEWSKA, 2011), inibindo a via mTOR (ANISIMOV, 2013), reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (NA; PARK; PYO; LEE *et al.*, 2013) e protegendo o DNA (MARTIN-MONTALVO; MERCKEN; MITCHELL; PALACIOS *et al.*, 2013). Estudos em camundongos mostraram que a metformina impacta a reserva ovariana, diminuindo a ativação do folículo primordial (QIN; DU; CHEN; WU *et al.*, 2019). Em roedores, melhorou o ciclo estral, influenciou positivamente o perfil hormonal e tratou a síndrome dos ovários policísticos (FURAT RENCBER; KURNAZ OZBEK; ERALDEMIR; SEZER *et al.*, 2018). Em resumo, a metformina não só trata condições médicas, como a síndrome do ovário policístico (SOP) e a resistência à insulina, mas também retarda o envelhecimento reprodutivo, melhora a fertilidade e aumenta a longevidade em estudos com animais.

Além do mais a potenciação do NAD⁺ através da suplementação com seu precursor metabólico, o mononucleótido de nicotinamida (NMN), tem sido investigada como uma intervenção farmacológica para aumentar a longevidade. O NAD⁺ desempenha um papel crucial como cofator redox e substrato enzimático, participando na manutenção da homeostase epigenética através da ativação das sirtuínas (HOUTKOOPE; CANTO; WANDERS; AUWERX, 2010). O aumento dos níveis de NAD⁺ está associado à ativação das sirtuínas, o que pode retardar o processo de envelhecimento. Com a idade, os níveis de NAD⁺ diminuem nos tecidos somáticos, incluindo o ovário (MOUCHIROUD; HOUTKOOPE; MOULLAN; KATSYUBA *et al.*, 2013). Estudos em camundongos idosos demonstraram que a suplementação com NMN restaurou os níveis de NAD⁺ em oócitos, resultando em melhores taxas de maturação *in vitro*, produção de embriões, e taxas de prenhez e nascimento (BERTOLDO; LISTIJONO; HO; RIEPSAMEN *et al.*, 2020). Apesar desses resultados promissores, ainda não foram realizadas medições diretas dos efeitos da suplementação de NMN nos folículos primordiais, indicando a necessidade de mais pesquisas nessa área.

O 17 α -Estradiol (17 α E2) é uma substância que demonstrou prolongar a longevidade em camundongos machos (HARRISON; STRONG; ALLISON; AMES *et al.*, 2014). Este composto é classificado como um estrogênio não feminilizante devido à sua limitada ativação dos receptores de estrogênio tradicionais (ANSTEAD; CARLSON; KATZENELLENBOGEN, 1997). O tratamento com 17 α -E2 induz uma redução na ingestão alimentar, ativando vias hipotalâmicas anorexígenas (GARRATT;

LEANDER; PIFER; BOWER *et al.*, 2019). Isso resulta em diminuição da massa corporal, redução da adiposidade visceral e diminuição da deposição lipídica ectópica (STOUT; STEYN; JURCZAK; CAMPOREZ *et al.*, 2017), de forma semelhante aos efeitos da RC. Notavelmente, esses efeitos são mais pronunciados em camundongos machos, enquanto nas fêmeas, o 17 α -E2 exibe pouco ou nenhum impacto significativo (GARRATT; LEANDER; PIFER; BOWER *et al.*, 2019). Podendo ser visto que mesmo diminuindo o consumo alimentar e o peso levemente, não afeta a reserva ovariana (ISOLA; ZANINI; HENSE; ALVARADO-RINCON *et al.*, 2022).

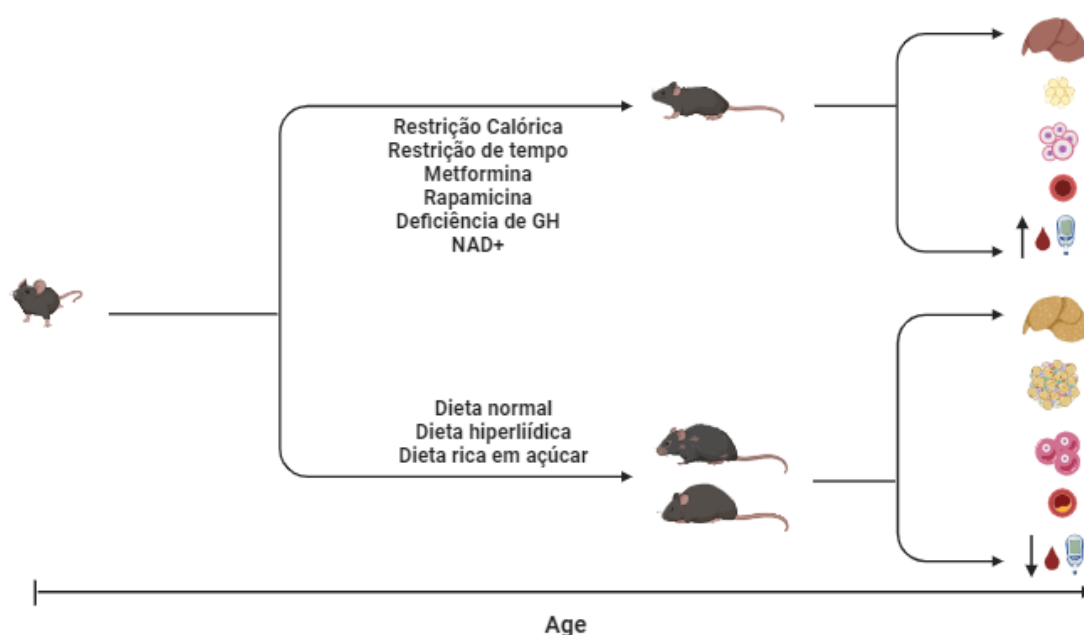


Figura 5 - Influência de fatores reguladores, incluindo RC, mTOR, rapamicina, GH/IGF-I, metformina, NAD+, nos processos de longevidade e saúde ovariana. A figura destaca as interações e impactos desses fatores nas respostas celulares e nos resultados reprodutivos, conforme discutido no texto. Fonte: Figura do Autor.

4. Manuscrito

CALORIE RESTRICTION PRESERVES THE OVARIAN RESERVE INDEPENDENT OF AGE IN MICE

Juliane B. Prosczek¹, César A. P. Osório¹, Driele N. Garcia¹, Jessica D. Hense¹, Giulia Pereira¹,
Augusto Schneider^{1*}

¹Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

* Corresponding author.

Email: augusto.schneider@ufpel.edu.br

Rua Gomes Carneiro, 1 - Sala 239

CEP 96010-610

Pelotas, RS, Brazil.

Number of Words: 3512

Abstract

Calorie restriction (CR) increases the preservation of the ovarian primordial follicular reserve, which can potentially delay menopause, as well as improve healthspan in females. Therefore, our aim was to evaluate the effects of CR on metabolism and ovarian reserve of female mice starting at 3 and 7 months of age. Thirty-six female mice were allocated into five groups, control (3 mo), control (3-7 mo), RC 30% (3-7 mo), control (7-11 mo) and RC 30% (7-11 mo). Females from the CR 3-7 and CR 7-11 groups had a greater number of primordial follicles ($P=0.038$). However, for transition ($P=0.408$), primary ($P=0.865$) and secondary ($P=0.306$) follicles, there was no effect of CR. CR mice of both ages had similar weight loss ($P=0.0001$). CR mice also had a less abdominal adipose tissue ($P=0.0001$) and a higher glucose decay constant in response to insulin ($P=0.0012$). Therefore, our findings highlight the effectiveness of CR in promoting reproductive longevity by preserving ovarian reserve and improving metabolic aspects.

Key words: Primordial Follicle, menopause, metabolism

Introduction

Female reproductive aging is a complex process that extends until menopause, and it is characterized by the decline of the ovarian reserve over time (BROEKMANS; SOULES; FAUSER, 2009; WILKOSZ; GREGGAINS; TANBO; FEDORCSAK, 2014). The ovarian reserve, composed mainly of primordial follicles, decreases significantly with age in mice (ANSERE; ALI-MONDAL; SATHIASEELAN; GARCIA *et al.*, 2021) leading to reduced fertility (ISONO; WADA-HIRAIKE; KAWAMURA; FUJII *et al.*, 2018). This decline in ovarian reserve is associated with an increased rate of miscarriages and embryonic abnormalities, contributing to reproductive challenges in older women (TAL; SEIFER, 2017). Activation of primordial follicles, mediated by PI3K/AKT and mTORC1 pathways, plays a pivotal role in this irreversible loss of the ovarian reserve (MAIDARTI; ANDERSON; TELFER, 2020). Furthermore, oocyte quality also declines with age, influenced by cumulative DNA damage and exposure to environmental stressors (SACCON; ROVANI; GARCIA; MONDADORI *et al.*, 2020). Understanding the mechanisms of ovarian aging is essential to guide reproductive health and decisions related to assisted conception.

Menopause is a milestone in the transition from the reproductive to the post-reproductive period in women, resulting in significant hormonal changes and impacts beyond the reproductive system (BROEKMANS; SOULES; FAUSER, 2009). The reduction in estrogen levels associated with menopause is linked to metabolic changes, increasing the risk of metabolic syndrome, atherosclerosis, cardiovascular disease and diabetes mellitus (BITTO; ALTAVILLA; BONAIUTO; POLITO *et al.*, 2009). Delayed menopause has been associated with increased longevity and quality of life, highlighting the importance of the ovarian reserve in determining life expectancy (SHADYAB; MACERA; SHAFFER; JAIN *et al.*, 2017). In this sense, several nutritional and pharmacological interventions demonstrate benefits in preserving the ovarian reserve, highlighting the complex interaction between reproductive aging and lifestyle (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019; SCHNEIDER; SACCON; GARCIA; ZANINI *et al.*, 2021).

Calorie restriction (CR) emerges as a promising nutritional intervention to promote a longer and healthier life, having beneficial effects in several animal models, from invertebrates to primates. This dietary regimen is defined by a controlled reduction in total caloric intake without malnutrition, extending life and healthspan (FLANAGAN; MOST; MEY; REDMAN, 2020). One of the main benefits observed from CR is the reduction of the inflammatory status

(GONZALEZ; TOBIA; EBERSOLE; NOVAK, 2012). Furthermore, CR exerts antioxidant effects, contributing to the preservation of cellular integrity and prevention of damage associated with aging. The improvement in sensitivity to nutrients and the modulation of the intestinal microbiota positively influence longevity and metabolic health mediated by CR (MONTEFUSCO; D'ADDIO; LORETELLI; BEN NASR *et al.*, 2021; WANG; HUANG; YOU; ZHAO *et al.*, 2018). The safe and effective application of CR in humans is the subject of increasing interest, given its potential ability not only to increase lifespan, but also to reduce age-associated diseases (COLMAN; BEASLEY; KEMNITZ; JOHNSON *et al.*, 2014).

In addition to its impacts on longevity and metabolic health, CR has been shown to directly influence ovarian reserve and female reproductive lifespan. CR can reduce the activation of primordial follicles in mice, preserving the ovarian reserve (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019; LIU; ZHANG; WANG; ZHOU *et al.*, 2015). Moderate CR in adult mice can significantly extend the function of the female reproductive axis into old age, increasing fertility and survival rate of offspring conceived by older females after returning to an ad libitum diet (SELESNIEMI; LEE; TILLY, 2008). The mechanisms underlying these effects involve the expression of genes related to follicular dormancy, such as FoxO3a and SIRT1, as well as the inhibition of mTOR activity, revealing a complex network of metabolic and reproductive regulation associated with CR (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019; LIU; SABATINI, 2020; XIANG; XU; LI; LIN *et al.*, 2012). These findings highlight the potential of CR in modulating ovarian aging. However, given the age decline of the ovarian reserve, the impact of CR at different ages and its implications on female reproductive health is still controversial. Thus, the aim of the current study was to observe the effect of CR in the ovarian reserve of young and middle-aged mice.

Materials and methods

Animals and intervention

This study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Universidade Federal de Pelotas (UFPe), number 23110.033054/2022-23. Female C57BL/6 mice at 3-month-old (n=21) and 7-month-old (n=16) were maintained under controlled conditions (22 ± 2 °C, cycles of 12 h light/12 h dark and 40–60% humidity). Mice were housed in groups of three mice per cage and randomly allocated into five groups: control group

euthanized at 3 months-old (n = 6), control group 3-7 months (n = 9), control group 7-11 months (n = 6), 30% CR group 3-7 months (n = 6) and 30% CR group 7-11 months (n = 10). The CR intervention lasted for 4 months. All mice were fed a standard chow for rodents (Nuvilab® CR-1 with 50 g/kg of fat and 230 g/kg of protein) and water ad libitum. Control groups received chow ad libitum. For the CR group, a 30% restriction was imposed, based on the average intake during the previous week in the control group of the same age. CR females started the week after the adaptation period with a 10% CR, the next week 20% CR, and from the third week forward, a 30% CR (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). The food intake and body weight data were collected weekly during the experiment.

At the end of the 4-month period, the animals were synchronized with injections of eCG (72 hours before) and hCG (24 hours before) euthanasia. After a 12-hour fast, the mice were anesthetized with isoflurane and subjected to exsanguination via cardiac puncture, followed by cervical dislocation. The mice were dissected, and both the abdominal visceral adipose tissue and ovaries were collected. One of the ovaries was preserved in a 10% formalin solution for histological analysis.

Insulin tolerance test

The insulin tolerance test (ITT) was performed a week before euthanasia. All mice were used. For this, 0.5 IU/kg body weight of insulin was administered i.p. after a 12 hr fasting. Blood was collected through a small incision at the tip of the tail 0, 15, 30 and 60 min after insulin injection, and glucose levels were measured with a glucose meter (AccuChek Activ, Roche Diagnostics®, USA) (FANG; WESTBROOK; HILL; BOPARAI *et al.*, 2013). The constant rate for glucose disappearance (KITT) was calculated by converting glucose values to percentage, considering glucose level at 0 min as 100% for each mouse, then applying the formula $(T15 - T0)/15$ (ISOLA; ZANINI; HENSE; ALVARADO-RINCON *et al.*, 2022). KITT was expressed as percentage of glucose decay per minute.

Histological analysis

The ovaries were removed from the 10% buffered formaldehyde, dehydrated in alcohol, cleared in xylol, and embedded in paraffin. The paraffin-embedded ovaries were sequentially cut into a 5-µm thickness in a semi-automatic microtome (RM2245, Leica Biosystems

Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, UK). All ovaries were serially cut, and one of every six sections was selected and placed on a standard histological slide (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). The slides, after drying at 56 °C for 24 h, were stained with hematoxylin-eosin and mounted with coverslips and synthetic resin (Sigma Chemical Company®, St. Louis, USA). Images of the ovarian sections were captured by a digital camera (Moticam 5.0, Motic®, Hong Kong, China) coupled to a microscope (Nikon Eclipse E200, and classification. Only follicles with a clearly visible oocyte nucleus were counted. The final number of follicles was divided by the number of sections counted to establish the average number of follicles per section. The protocol used for follicle classification was based on a previous paper (MYERS; BRITT; WREFORD; EBLING *et al.*, 2004). Briefly, a primordial follicle was considered the one containing an oocyte surrounded by a single layer of squamous granulosa cells. The transition follicle had at least one cuboid granulosa cell. The primary follicle had an oocyte surrounded by a single layer of cuboid granulosa cells. A follicle was determined to be a secondary when surrounded by more than one layer of granulosa cuboid cells without visible antrum and as tertiary if an antral space was clearly defined and a follicular layer of granulosa cells surrounded the oocyte.

Statistical analysis

The results are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical analysis was performed on GraphPad Prism 8.0 software. One-way ANOVA was used for analysis of continuous variables (body weight gain, adipose tissue weight, follicle count and KITT) with the Tukey post-hoc test to compare individual means. The repeated measures Two-way ANOVA test was used for the analysis of food intake, body weight, and glucose levels during TTI, also using the Tukey post-hoc test to compare individual means. P values lower than 0.05 were considered as significant.

Results

The percentage of weight loss was similar in the CR group at both 3-7 and 7-11 months (Figure 1 A). In this way, the 7-11 month CR group obtained a final body weight similar to the 3-7 month CTL mice (Figure 1 B). Weight gain from the beginning to the end of the intervention was also lower in the CR groups, indicating a reduction in body weight during the restriction

period (Figure 1 C). Considering the weight loss that CR caused, these mice also had a lower amount of abdominal adipose tissue (Figure 1 D). Overall an increased amount of fat tissue was observed in older mice. Average food intake also increased with age (Figure 1E).

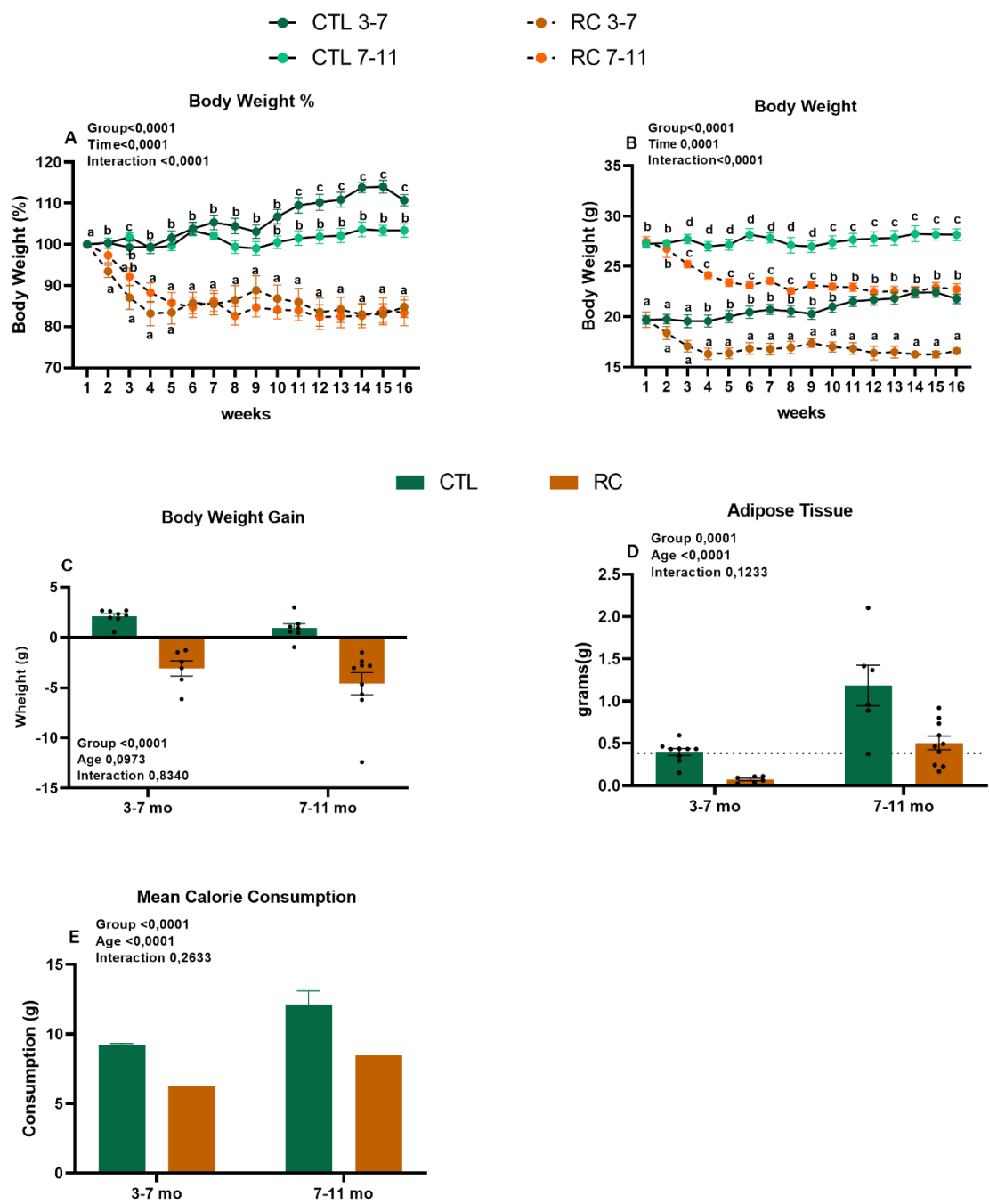


Figure 1 – Percentage of body weight (A), body weight (B), body weight gain (C), visceral fat (D) and average caloric intake (E) for caloric restriction (CR) and control (CTL) groups from 3 to 7 and from 7 to 11 months of age. The dashed line represents the 3-month control group.

Different letters indicate differences between groups ($P < 0.05$). Values were entered as mean $\pm$ standard error of the mean. All animals were used for this analysis.

Regarding insulin sensitivity, there was only a difference between the CTL and CR from 7-11 months groups at 15 minutes ($P=0.0142$; Figure 2 A). The glucose metabolism rate was almost twice as high in both CR groups (Figure 2 B) and similar according to age. No statistically significant difference was observed between the groups or with respect to ages (Figure 2 C).

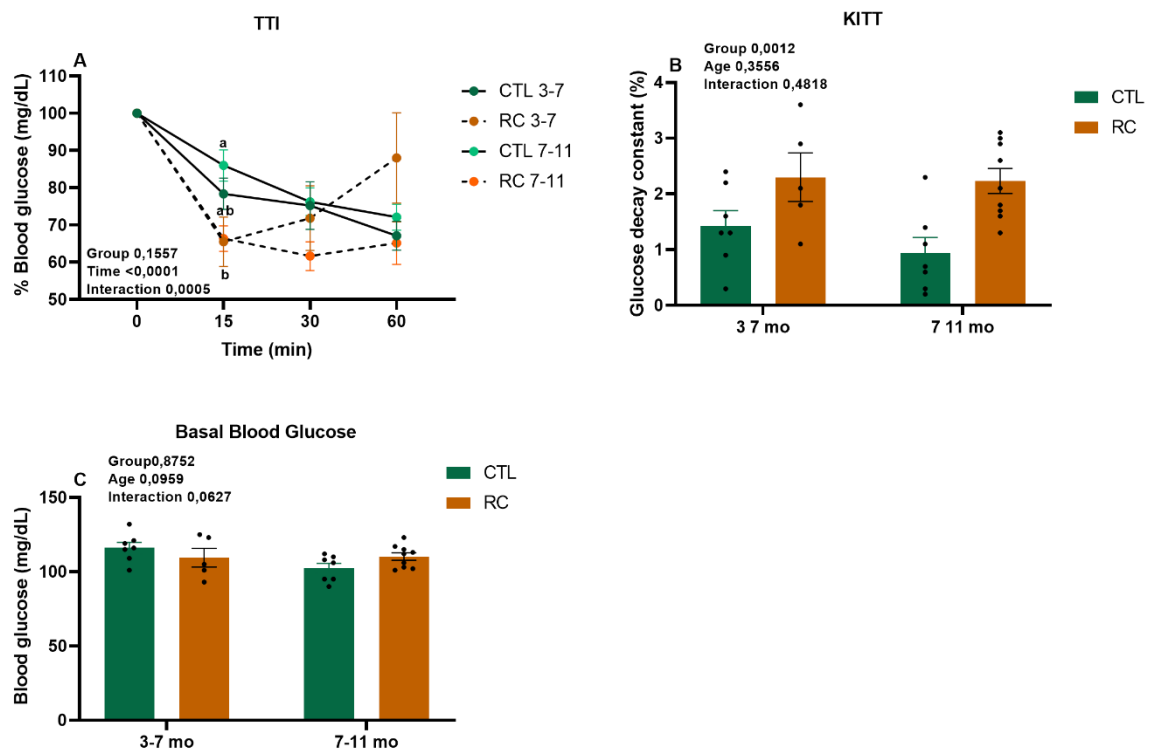


Figure 2 – Insulin tolerance test (A), glucose decay rate (B), and basal blood glucose (C) for calorie restriction (CR) and control (CTL) groups from 3 to 7 and from 7 to 11 months of age. Different letters indicate differences between groups ($P < 0.05$). Values were entered as mean $\pm$ standard error of the mean. All animals were used for this analysis.

The analysis of ovarian reserve is shown in Figure 3. Mice from both CR groups had a greater number of primordial follicles (Figure 3 A; $P=0.0384$). For transition (Figure 3 B), primary (Figure 3 C) and secondary (Figure 3 D) follicles, there was no effect of CR. However, age reduced the number of primordial, primary and secondary follicles. The number of tertiary follicles (Figure 3 E) showed a significant interaction ($P=0.0032$). The CR 3-7 group had a lower number of follicles compared to its control (CTL3-7), while the same difference was not

observed in the 7-11 months group. The number of total follicles (Figure 3 F) was not different between groups ($P=0.1639$), despite reducing with age ($P<0.0010$).

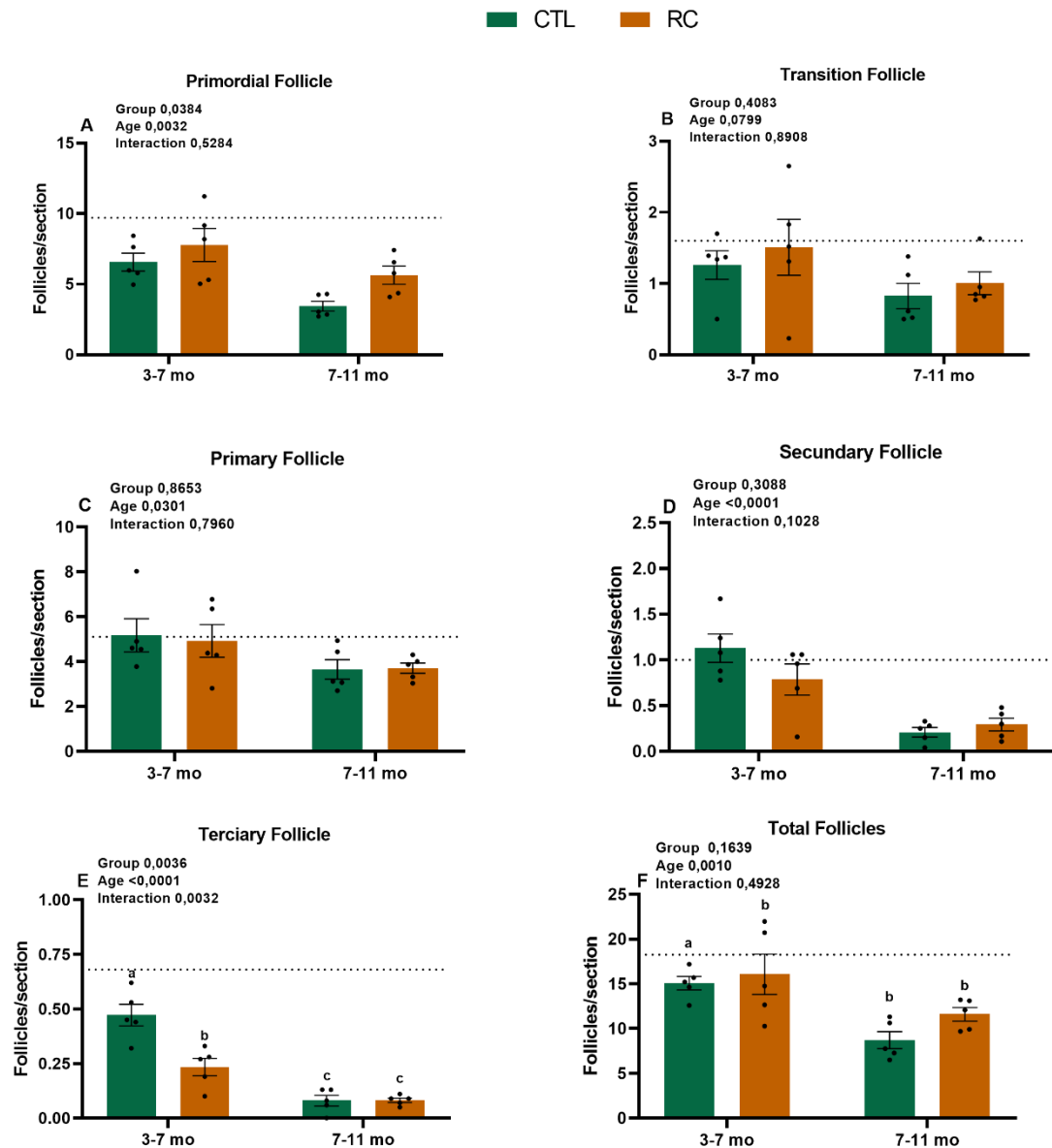


Figure 3 - Number of follicles/section in different growth phases. Primordial (A), transition (B), primary (C), secondary (D), tertiary (E) and total (F) follicles for control and calorie restriction (CR) groups. The dashed line represents the 3-month control group. Different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$). Values were entered as mean $\pm$ standard error of the mean. The dashed line refers to the control group euthanized at 3 months of age. Five mice/group were used for this analysis.

Discussion

In the present study, we investigated the effects of CR in different age groups, with an early start at 3 months and a later start at 7 months, on ovarian reserve and metabolic parameters. We observed a greater number of primordial follicles in both groups subjected to CR. These findings corroborate previous studies in mice that demonstrated the benefits of CR on ovarian reserve, whether applied in the short term (for 3 months, starting at 30 days of age) (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019), or long term (from 3 months to 8 months of age) (SELESNIEMI; LEE; TILLY, 2008). CR from 3 to 15 months of age in mice has also been shown to play a crucial role in promoting fertility, fecundity and offspring survival, especially when a refeeding period follow the CR episode (SELESNIEMI; LEE; TILLY, 2008).

The CR demonstrated a positive impact on preserving ovarian reserve, delaying the decline in primordial follicle number over time. This beneficial effect is attributed to the CR effect on inhibiting the mTORC1 complex, FoxO3a expression, and SIRT1 activity, all playing crucial roles in regulating ovarian reserve and female reproductive health (SCHNEIDER; SACCON; GARCIA; ZANINI *et al.*, 2021). Inhibition of mTORC1 is associated with the regulation of cell growth and proliferation (SAXTON; SABATINI, 2017), promoting longevity and improving metabolic health (DEBLON; BOURGOIN; VEYRAT-DUREBEX; PEYROU *et al.*, 2012). Moreover, negative modulation of mTORC1 in ovarian follicles slows the depletion of ovarian reserve (CHENG; KIM; LI; HSUEH, 2015). CR also positively influences FoxO3a expression, essential in oxidative stress response and cell cycle regulation, promoting ovarian cell survival and function during aging (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019; XIANG; XU; LI; LIN *et al.*, 2012). CR has been associated with increased FoxO3a expression in the ovary, providing protection against premature depletion of ovarian reserve (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). Activation of SIRT1 by CR protects against oxidative damage (CANTO; AUWERX, 2009), positively regulates FoxO3a, and preserves ovarian function (LONG; YANG; XU; NI *et al.*, 2019). Thus, CR can indirectly activate SIRT1 in the ovary, delaying ovarian reserve depletion (LIU; ZHANG; WANG; ZHOU *et al.*, 2015). These mechanisms represent a complex network of molecular signaling modulated by CR to promote reproductive health and prolong ovarian function. Furthermore, CR can prevent depletion of ovarian reserve also qualitatively, preserving genes expressed in the ovaries with fertility-related functions (SHAROV; FALCO; PIAO; POOSALA *et al.*, 2008).

It is important to notice that CR has demonstrated efficacy at different levels, and can be more effective in reducing follicular activation at a 10% level when compared to a 30% restriction. This 10% CR resulted in an increase in the total number of follicles in the mice in previous studies (ISOLA; ZANINI; HENSE; ALVARADO-RINCON *et al.*, 2022). This finding is relevant, considering the low human adherence to robust CR regimes, usually between 25% and 30% (FLANAGAN; MOST; MEY; REDMAN, 2020). Moreover, CR exhibited promising results in preserving ovarian reserve in mice undergoing chemotherapy (XIANG; XU; LI; LIN *et al.*, 2012). Considering the adverse effects of early menopause and infertility resulting from cancer treatments, CR may play a significant role in mitigating these negative effects (OKTEM; OKTAY, 2007). Our current data also suggest that, regardless of the age of onset, CR has beneficial effects on preservation of the ovarian reserve.

Furthermore, CR mimetics also have the ability to preserve the number of primordial follicles. A study using chemotherapy to induce depletion of the ovarian reserve found that rapamycin can prevent activation of primordial follicles induced by cyclophosphamide through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway (ZHOU; XIE; LI; LIANG *et al.*, 2017). These results are consistent with those found previously using CR as an intervention (XIANG; XU; LI; LIN *et al.*, 2012). Moreover, rapamycin demonstrates similar results to CR in preserving ovarian reserve when compared side by side (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). However, it does not exhibit metabolic effects such as decreased weight gain, accumulation of adipose tissue, and insulin sensitivity (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). Rapamycin exhibits a protective effect by delaying menopause, even when used for only 2 weeks, as it allowed preservation of the ovarian reserve (DOU; SUN; LI; ZHANG *et al.*, 2017). On the other hand, metformin, another CR mimetic, when used in 6-month-old mice for 6 months, resulted in an increased number of primordial follicles (QIN; DU; CHEN; WU *et al.*, 2019), corroborating our findings regarding the benefit of late CR. Furthermore, CR mimetics not only preserve ovarian reserve but also improve other ovarian parameters. Metformin resulted in decreased ovarian fibrosis, even when the mice were already 14 months old at the start of treatment and presented a marked increase in ovarian fibrosis (LANDRY; YAKUBOVICH; COOK; FASIH *et al.*, 2022). These evidence indicate that effective interventions, both metformin and CR, are positive regardless of the age at which they are initiated.

The number of transition, primary, and secondary follicles was not different between groups, only decreasing with age. However, the younger group subjected to CR had less tertiary

follicles. CR can cause this difference in two distinct ways: first, due to lower follicular activation, resulting in a smaller number of pre-antral follicles ready for growth (LIU; ZHANG; WANG; ZHOU *et al.*, 2015), second, because mice under CR have lower secretion of the follicle-stimulating hormone (FSH), necessary for the growth of small tertiary follicles (SHI; ZHANG; YI; WANG *et al.*, 2016). Furthermore, the reduction in energy reserve due to CR results in a decrease in insulin-like growth factor (IGF), important in regulating reproductive functions (LI; FU; XU; CHEN *et al.*, 2011; ONAGBESAN; BRUGGEMAN; DECUYPERE, 2009). The IGF-I pathway and other growth factors are also involved in the recruitment of primordial follicles (SLOT; KASTELIJN; BACHELOT; KELLY *et al.*, 2006). Additionally, IGF potentiates FSH signaling and steroidogenesis, resulting in increased growth of antral follicles (ZACZEK; HAMMOND; SUEN; WANDJI *et al.*, 2002). The production of FSH and luteinizing hormone (LH) can influence the estrous cycle of mice, with CR reducing the secretion of these hormones and prolonging the diestrus period (ONAGBESAN; BRUGGEMAN; DECUYPERE, 2009; VEIGA; ZANINI; GARCIA; HENSE *et al.*, 2024). Moreover, the reduction in fat leads to a decrease in leptin, which in turn reduces follicular growth (SUN; SHEN; LIU; LU *et al.*, 2021). Thus, once again, the efficacy of CR in modulating different phases of ovarian activity depending on the age it is started is evident.

CR has the ability to control body weight gain at both 30% (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019) and 10% (ISOLA; ZANINI; HENSE; ALVARADO-RINCON *et al.*, 2022) restriction levels. The resulting reduction in body weight results mainly from a decrease in the amount of adipose tissue, which has favorable metabolic implications. Adipose tissue, by modulating adipocyte structure, plays a crucial role in inflammatory status. Increased adiponectin, for example, not only improves insulin sensitivity but also promotes fatty acid oxidation, acting as an anti-inflammatory adipokine (SHENG; XIA; CHEN; LV *et al.*, 2021). This is similar to our findings, where the glucose decay constant was nearly twice as high in both CR groups, in addition to the lower total abdominal adipose tissue in the CR groups. Other studies support our findings, showing that in older rhesus macaques CR was associated with a reduction in age-related diseases and mortality, especially notable in the incidence of diabetes (COLMAN; BEASLEY; KEMNITZ; JOHNSON *et al.*, 2014). Moreover, CR at different ages in mice (6, 13, and 19 months) had a significant impact on reversing aging-related phenotypes in middle-aged and older mice. Improvement in cardiac function, reduction in inflammation, decrease in mitochondrial damage, preservation of telomere length, and attenuation of markers associated with senescence were observed in middle-aged and elderly

mice. Notably, these beneficial effects were not observed in younger mice subjected to CR. Gene expression analyses indicated that the AMP activated pathway, AMPK, and FoxO play a fundamental role in the differential regulation of the effects of CR initiated at different ages (SHENG; LV; HUANG; LV *et al.*, 2017). Furthermore, a comparative study in young (7 months) and old (27 months) mice subjected to CR showed that older mice had a higher expression of inflammatory proteins, and CR was able to decrease this pro-inflammatory status (CAO; DHAHBI; MOTE; SPINDLER, 2001). The results of our study indicate that age did not significantly affect insulin sensitivity despite the increase in visceral fat. This may be because despite a significant reduction in ovarian reserve, the mice are still relatively young. Significant effects on many general aging variables are observed after 18 months, although at this age reproductive function is already absent.

In conclusion, the results obtained demonstrate that mice subjected to CR, both in the 3-7 months and 7-11 months periods, exhibited a significant reduction in follicular activation. CR also provided improvements in metabolic aspects, including body weight control, reduction of visceral adipose tissue, and improvement in glucose metabolism. These findings suggest that CR is an effective intervention in promoting reproductive longevity, through the improvement of metabolic aspects, possibly prolonging the onset of menopause. These findings have significant implications not only for understanding the underlying mechanisms of aging but also for the development of therapeutic strategies aimed at improving fertility and health throughout the reproductive aging process.

References

- Ansere, V. A., Ali-Mondal, S., Sathiaselvan, R., Garcia, D. N., Isola, J. V. V., Henseb, J. D., Saccon, T. D., Ocanas, S. R., Tooley, K. B., Stout, M. B., Schneider, A., & Freeman, W. M. (2021). Cellular hallmarks of aging emerge in the ovary prior to primordial follicle depletion. *Mech Ageing Dev*, 194, 111425. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111425>
- Bitto, A., Altavilla, D., Bonaiuto, A., Polito, F., Minutoli, L., Di Stefano, V., Giuliani, D., Guarini, S., Arcoraci, V., & Squadrito, F. (2009). Effects of aglycone genistein in a rat experimental model of postmenopausal metabolic syndrome. *J Endocrinol*, 200(3), 367-376. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0206>

- Broekmans, F. J., Soules, M. R., & Fauser, B. C. (2009). Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*, 30(5), 465-493. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0006>
- Canto, C., & Auwerx, J. (2009). Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends Endocrinol Metab*, 20(7), 325-331. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.008>
- Cao, S. X., Dhahbi, J. M., Mote, P. L., & Spindler, S. R. (2001). Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10630-10635. <https://doi.org/10.1073/pnas.191313598>
- Cheng, Y., Kim, J., Li, X. X., & Hsueh, A. J. (2015). Promotion of ovarian follicle growth following mTOR activation: synergistic effects of AKT stimulators. *PLoS One*, 10(2), e0117769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117769>
- Colman, R. J., Beasley, T. M., Kemnitz, J. W., Johnson, S. C., Weindruch, R., & Anderson, R. M. (2014). Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun*, 5, 3557. <https://doi.org/10.1038/ncomms4557>
- Deblon, N., Bourgoin, L., Veyrat-Durebex, C., Peyrou, M., Vinciguerra, M., Caillon, A., Maeder, C., Fournier, M., Montet, X., Rohner-Jeanrenaud, F., & Foti, M. (2012). Chronic mTOR inhibition by rapamycin induces muscle insulin resistance despite weight loss in rats. *Br J Pharmacol*, 165(7), 2325-2340. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01716.x>
- Dou, X., Sun, Y., Li, J., Zhang, J., Hao, D., Liu, W., Wu, R., Kong, F., Peng, X., & Li, J. (2017). Short-term rapamycin treatment increases ovarian lifespan in young and middle-aged female mice. *Aging Cell*, 16(4), 825-836. <https://doi.org/10.1111/accel.12617>
- Fang, Y., Westbrook, R., Hill, C., Boparai, R. K., Arum, O., Spong, A., Wang, F., Javors, M. A., Chen, J., Sun, L. Y., & Bartke, A. (2013). Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. *Cell Metab*, 17(3), 456-462. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.008>
- Flanagan, E. W., Most, J., Mey, J. T., & Redman, L. M. (2020). Calorie Restriction and Aging in Humans. *Annu Rev Nutr*, 40, 105-133. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-122319-034601>
- Garcia, D. N., Saccon, T. D., Pradiee, J., Rincon, J. A. A., Andrade, K. R. S., Rovani, M. T., Mondadori, R. G., Cruz, L. A. X., Barros, C. C., Masternak, M. M., Bartke, A., Mason, J. B., & Schneider, A. (2019). Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian

- aging in mice. *Geroscience*, 41(4), 395-408. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00087-x>
- Gonzalez, O., Tobia, C., Ebersole, J., & Novak, M. J. (2012). Caloric restriction and chronic inflammatory diseases. *Oral Dis*, 18(1), 16-31. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01830.x>
- Isola, J. V. V., Zanini, B. M., Hense, J. D., Alvarado-Rincon, J. A., Garcia, D. N., Pereira, G. C., Vieira, A. D., Oliveira, T. L., Collares, T., Gasperin, B. G., Stout, M. B., & Schneider, A. (2022). Mild calorie restriction, but not 17alpha-estradiol, extends ovarian reserve and fertility in female mice. *Exp Gerontol*, 159, 111669. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111669>
- Isono, W., Wada-Hiraike, O., Kawamura, Y., Fujii, T., Osuga, Y., & Kurihara, H. (2018). Administration of Oral Contraceptives Could Alleviate Age-Related Fertility Decline Possibly by Preventing Ovarian Damage in a Mouse Model. *Reprod Sci*, 25(9), 1413-1423. <https://doi.org/10.1177/1933719117746758>
- Landry, D. A., Yakubovich, E., Cook, D. P., Fasih, S., Upham, J., & Vanderhyden, B. C. (2022). Metformin prevents age-associated ovarian fibrosis by modulating the immune landscape in female mice. *Sci Adv*, 8(35), eabq1475. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq1475>
- Li, L., Fu, Y. C., Xu, J. J., Chen, X. C., Lin, X. H., & Luo, L. L. (2011). Caloric restriction promotes the reproductive capacity of female rats via modulating the level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1). *Gen Comp Endocrinol*, 174(2), 232-237. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.09.005>
- Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(4), 183-203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>
- Liu, W.-J., Zhang, X.-M., Wang, N., Zhou, X.-L., Fu, Y.-C., & Luo, L.-L. (2015). Calorie restriction inhibits ovarian follicle development and follicle loss through activating SIRT1 signaling in mice. *European Journal of Medical Research*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s40001-015-0114-8>
- Long, G. Y., Yang, J. Y., Xu, J. J., Ni, Y. H., Zhou, X. L., Ma, J. Y., Fu, Y. C., & Luo, L. L. (2019). SIRT1 knock-in mice preserve ovarian reserve resembling caloric restriction. *Gene*, 686, 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.040>

- Maidarti, M., Anderson, R. A., & Telfer, E. E. (2020). Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt Signalling and DNA Damage in the Oocyte: Implications for Primordial Follicle Activation, Oocyte Quality and Ageing. *Cells*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/cells9010200>
- Montefusco, L., D'Addio, F., Loretelli, C., Ben Nasr, M., Garziano, M., Rossi, A., Pastore, I., Plebani, L., Lunati, M. E., Bolla, A. M., Porta, M. D., Piuri, G., Rocchio, F., Abdelsalam, A., Assi, E., Barichella, M., Maestroni, A., Usuelli, V., Loreggian, L., Muzio, F., Zuccotti, G. V., Cazzola, R., & Fiorina, P. (2021). Anti-inflammatory effects of diet and caloric restriction in metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest*, 44(11), 2407-2415. <https://doi.org/10.1007/s40618-021-01547-y>
- Myers, M., Britt, K. L., Wreford, N. G., Ebling, F. J., & Kerr, J. B. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 127(5), 569-580. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00095>
- Oktem, O., & Oktay, K. (2007). A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. *Cancer Res*, 67(21), 10159-10162. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2042>
- Onagbesan, O., Bruggeman, V., & Decuypere, E. (2009). Intra-ovarian growth factors regulating ovarian function in avian species: a review. *Anim Reprod Sci*, 111(2-4), 121-140. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.09.017>
- Qin, X., Du, D., Chen, Q., Wu, M., Wu, T., Wen, J., Jin, Y., Zhang, J., & Wang, S. (2019). Metformin prevents murine ovarian aging. *Aging (Albany NY)*, 11(11), 3785-3794. <https://doi.org/10.18632/aging.102016>
- Saccon, T. D., Rovani, M. T., Garcia, D. N., Mondadori, R. G., Cruz, L. A. X., Barros, C. C., Bartke, A., Masternak, M. M., & Schneider, A. (2020). Primordial follicle reserve, DNA damage and macrophage infiltration in the ovaries of the long-living Ames dwarf mice. *Exp Gerontol*, 132, 110851. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110851>
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960-976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Schneider, A., Saccon, T. D., Garcia, D. N., Zanini, B. M., Isola, J. V. V., Hense, J. D., Alvarado-Rincon, J. A., Cavalcante, M. B., Mason, J. B., Stout, M. B., Bartke, A., & Masternak, M. M. (2021). The Interconnections Between Somatic and Ovarian Aging in Murine Models. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 76(9), 1579-1586. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa258>

- Selesniemi, K., Lee, H. J., & Tilly, J. L. (2008). Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age. *Aging Cell*, 7(5), 622-629. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00409.x>
- Shadyab, A. H., Macera, C. A., Shaffer, R. A., Jain, S., Gallo, L. C., Gass, M. L., Waring, M. E., Stefanick, M. L., & LaCroix, A. Z. (2017). Ages at menarche and menopause and reproductive lifespan as predictors of exceptional longevity in women: the Women's Health Initiative. *Menopause*, 24(1), 35-44. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000710>
- Sharov, A. A., Falco, G., Piao, Y., Poosala, S., Becker, K. G., Zonderman, A. B., Longo, D. L., Schlessinger, D., & Ko, M. (2008). Effects of aging and calorie restriction on the global gene expression profiles of mouse testis and ovary. *BMC Biol*, 6, 24. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-24>
- Sheng, Y., Lv, S., Huang, M., Lv, Y., Yu, J., Liu, J., Tang, T., Qi, H., Di, W., & Ding, G. (2017). Opposing effects on cardiac function by calorie restriction in different-aged mice. *Aging Cell*, 16(5), 1155-1167. <https://doi.org/10.1111/accel.12652>
- Sheng, Y., Xia, F., Chen, L., Lv, Y., Lv, S., Yu, J., Liu, J., & Ding, G. (2021). Differential Responses of White Adipose Tissue and Brown Adipose Tissue to Calorie Restriction During Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 76(3), 393-399. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa070>
- Shi, H., Zhang, T., Yi, Y., Wang, H., & Luo, J. (2016). Long form PRLR (IPRLR) regulates genes involved in the triacylglycerol synthesis in goat mammary gland epithelial cells. *Small Ruminant Research*, 139, 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.04.008>
- Slot, K. A., Kastelijn, J., Bachelot, A., Kelly, P. A., Binart, N., & Teerds, K. J. (2006). Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. *Reproduction*, 131(3), 525-532. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00946>
- Sun, J., Shen, X., Liu, H., Lu, S., Peng, J., & Kuang, H. (2021). Caloric restriction in female reproduction: is it beneficial or detrimental? *Reprod Biol Endocrinol*, 19(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00681-1>
- Tal, R., & Seifer, D. B. (2017). Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol*, 217(2), 129-140. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.02.027>

- Veiga, G. B., Zanini, B. M., Garcia, D. N., Hense, J. D., Barreto, M. M., Isola, J. V. V., Mondadori, R. G., Masternak, M. M., Stout, M. B., & Schneider, A. (2024). Effects of calorie, protein, and branched chain amino acid restriction on ovarian aging in mice. *Reprod Biol*, 24(1), 100856. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2024.100856>
- Wang, S., Huang, M., You, X., Zhao, J., Chen, L., Wang, L., Luo, Y., & Chen, Y. (2018). Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice. *Sci Rep*, 8(1), 13037. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31353-1>
- Wilkosz, P., Greggains, G. D., Tanbo, T. G., & Fedorcsak, P. (2014). Female reproductive decline is determined by remaining ovarian reserve and age. *PLoS One*, 9(10), e108343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108343>
- Xiang, Y., Xu, J., Li, L., Lin, X., Chen, X., Zhang, X., Fu, Y., & Luo, L. (2012). Calorie restriction increases primordial follicle reserve in mature female chemotherapy-treated rats. *Gene*, 493(1), 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.019>
- Zaczek, D., Hammond, J., Suen, L., Wandji, S., Service, D., Bartke, A., Chandrashekar, V., Coschigano, K., & Kopchick, J. (2002). Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. *Biol Reprod*, 67(4), 1115-1124. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1115>
- Zhou, L., Xie, Y., Li, S., Liang, Y., Qiu, Q., Lin, H., & Zhang, Q. (2017). Rapamycin Prevents cyclophosphamide-induced Over-activation of Primordial Follicle pool through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in vivo. *J Ovarian Res*, 10(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0350-3>

5. Discussão

No presente estudo, investigamos os efeitos da restrição calórica em diferentes faixas etárias, com um início precoce aos 3 meses e um início mais tardio aos 7 meses, sobre a reserva ovariana e parâmetros metabólicos. Observamos um número significativamente maior de folículos primordiais em ambos os grupos submetidos à restrição calórica. Esses achados corroboram com estudos anteriores que demonstraram os benefícios da restrição calórica na reserva ovariana, tanto aplicada a curto prazo (por 3 meses, iniciada aos 30 dias de idade) (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019), ou longo prazo (dos 3 meses até os 8 meses de idade). 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; LEE; TILLY, 2008).

A restrição se mostrou positiva na preservação da reserva ovariana, pois o decaimento do número de folículos que pode ser observado nos grupos controle dos 3 para os 7 e dos 7 aos 11 meses foi menos acentuado no grupo RC. Isto porque, os benefícios que a RC causa na preservação da reserva ovariana são devido seu efeito sobre inativação de mTORC1, expressão de FoxO3a e atividade de SIRT1, que desempenham papéis cruciais na modulação da reserva ovariana e na saúde reprodutiva da mulher (SCHNEIDER; SACCON; GARCIA; ZANINI *et al.*, 2021). A inibição do mTORC1 desempenha um papel crucial na regulação do crescimento e da proliferação celular (SAXTON; SABATINI, 2017), está associada à promoção da longevidade e à melhoria da saúde metabólica (DEBLON; BOURGOIN; VEYRAT-DUREBEX; PEYROU *et al.*, 2012). Além disso, a modulação negativa da atividade do mTORC1 no folículo ovariano (CHENG; KIM; LI; HSUEH, 2015), resulta em uma desaceleração do esgotamento da reserva ovariana. O esgotamento da reserva ovariana está intimamente ligado à menopausa, que, por sua vez, aumenta a incidência de doenças crônicas (BITTO; ALTAVILLA; BONAIUTO; POLITO *et al.*, 2009). Além disso, estudos mostram que este benefício da RC está relacionado pelo seu efeito na expressão do fator de transcrição FoxO3a, que é regulado negativamente pelo mTORC1, desempenhando um papel crítico na resposta ao estresse oxidativo e na regulação do ciclo celular (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019; XIANG; XU; LI; LIN *et al.*, 2012). A proteína FoxO3a está

relacionada à promoção da sobrevivência das células ovarianas e à manutenção da função ovariana durante o envelhecimento. A RC tem sido associada ao aumento da expressão de FoxO3a no ovário, o que proporciona proteção contra o esgotamento prematuro da reserva ovariana (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). Ademais, a atividade da enzima SIRT1, um regulador metabólico e de longevidade que modula a expressão de genes relacionados ao metabolismo energético e à resposta ao estresse celular, também pode ser influenciada pela RC (CANTO; AUWERX, 2009). A ativação de SIRT1 tem sido associada à proteção contra danos oxidativos, à regulação positiva de FoxO3a e à preservação da função ovariana (LONG; YANG; XU; NI *et al.*, 2019). Assim, a RC pode ativar indiretamente SIRT1 no ovário, promovendo uma resposta adaptativa que retarda o esgotamento da reserva ovariana (LIU; ZHANG; WANG; ZHOU *et al.*, 2015). Em conjunto, os mecanismos de inibição do mTORC1, expressão de FoxO3a e atividade de SIRT1 representam uma rede complexa de sinalização molecular que pode ser modulada pela RC para promover a saúde reprodutiva e prolongar a função ovariana, como pode ser visto pelo número maior de folículos primordiais. Por fim a RC pode prevenir a depleção da reserva ovariana não só quantitativamente, como em aspectos qualitativos, como preservação de genes expressos nos ovários que tem função na fertilidade (SHAROV; FALCO; PIAO; POOSALA *et al.*, 2008).

A RC também se mostra efetiva em diferentes níveis de restrição. Quando comparada a RC de 30% a RC de 10% se mostrou mais efetiva em diminuir a ativação folicular, conseqüentemente, os animais apresentaram maior número de folículos totais (ISOLA; ZANINI; HENSE; ALVARADO-RINCON *et al.*, 2022). Isso é um aspecto positivo, considerando que, apesar dos benefícios comprovados da RC na preservação da reserva ovariana, a taxa de adesão humana a um regime de RC robusto, geralmente definido entre 25% e 30%, é significativamente baixa (FLANAGAN; MOST; MEY; REDMAN, 2020). Também, a RC apresenta resultados positivos na reserva ovariana em animais tratados com quimioterapia (XIANG; XU; LI; LIN *et al.*, 2012). Pois, apesar dos avanços na quimioterapia multiagente, que têm melhorado as taxas de cura do câncer em adultos e crianças, uma das conseqüências mais significativas a longo prazo dos tratamentos de câncer em mulheres jovens é a ocorrência de menopausa precoce (POF) e infertilidade (OKTEM; OKTAY, 2007). Desta maneira a RC pode se mostrar efetiva na preservação de efeitos negativos

desta terapia, inclusive nossos dados atuais mostram que independentemente da idade de início a RC tem efeitos benéficos na reserva ovariana.

Além disso, os miméticos da RC também demonstram capacidade de manter o número de folículos primordiais, o que reforça a importância da via mTOR na reserva ovariana. Um estudo que utilizou de um quimioterápico para induzir a depleção da reserva ovariana, observou que a rapamicina pode prevenir a ativação do folículo primordial induzida pela ciclofosfamida através da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR e, portanto, desempenha um papel na preservação do pool folicular (ZHOU; XIE; LI; LIANG *et al.*, 2017). Estes resultados são similares ao encontrado anteriormente utilizando a RC como intervenção (XIANG; XU; LI; LIN *et al.*, 2012). Além do mais a rapamicina, como mimético da RC, demonstra resultados semelhantes na preservação da reserva ovariana quando comparada lado a lado (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). No entanto, não apresenta efeitos metabólicos, como diminuição do ganho de peso, acúmulo de tecido adiposo e sensibilidade à insulina (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). A rapamicina exibe um efeito protetor ao retardar a menopausa, pois mesmo quando utilizada como tratamento por apenas 2 semanas permitiu a preservação da reserva ovariana (DOU; SUN; LI; ZHANG *et al.*, 2017). Já a metformina, outro mimético da RC, quando foi utilizada em animais de 6 meses de idade, tratados durante 6 meses com metformina, resultou em um maior número de folículos primordiais (QIN; DU; CHEN; WU *et al.*, 2019), o que corrobora com nossos achados do benefício da RC tardia. Além do mais os miméticos da RC não apenas preservam a reserva ovariana, como também melhoram a qualidade desta reserva. A metformina resultou em diminuição da fibrose ovariana, sendo válido mencionar que os camundongos já apresentavam 14 meses de idade no início do tratamento, e já apresentavam aumento acentuada da fibrose ovariana (LANDRY; YAKUBOVICH; COOK; FASIH *et al.*, 2022). Esta evidências nos indicam que intervenções efetivas, tanto a metformina como a RC, são positivas independentemente da idade qual são iniciadas.

O número de folículos em transição, primários e secundários não demonstrou diferenças significativas entre os grupos, apenas diminuiu com o avançar da idade. No entanto, observou-se que o grupo RC apresentou um menor número de folículos terciários. A RC pode levar a essa diferença de duas maneiras distintas: primeiro, devido à menor ativação folicular (LIU; ZHANG; WANG; ZHOU *et al.*, 2015),

resultando em um menor número de folículos pré-antrais aptos a serem recrutados para crescimento. Segundo, porque os animais submetidos à RC apresentam uma menor secreção do hormônio FSH (hormônio folículo-estimulante), necessário para o crescimento de folículos terciários pequenos (SHI; ZHANG; YI; WANG *et al.*, 2016). Além disso, a redução na reserva energética devido à RC resulta em uma diminuição do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (LI; FU; XU; CHEN *et al.*, 2011), o qual desempenha um papel importante na regulação das funções reprodutivas (ONAGBESAN; BRUGGEMAN; DECUYPERE, 2009). A via IGF-I e outros fatores de crescimento também estão envolvidos no recrutamento de folículos primordiais, como evidenciado pelo maior número de folículos primordiais em camundongos fêmeas knockout GHR/GHBP (SLOT; KASTELIJN; BACHELOT; KELLY *et al.*, 2006). Além disso, o IGF possui um efeito potencializador da sinalização do FSH e esteroidogênese (ZACZEK; HAMMOND; SUEN; WANDJI *et al.*, 2002), resultando em maior crescimento de folículos antrais. A produção de FSH e hormônio luteinizante (LH) pode influenciar o ciclo estral de camundongos, assim como em outros mamíferos. A RC reduz a secreção desses hormônios, afetando consequentemente o ciclo estral dos camundongos, o que influencia a maturação dos folículos ovarianos e a ovulação. Isso pode resultar em ciclos estrais alterados, com prolongamento do período de diestro (a fase do ciclo estral caracterizada pela inatividade ovariana) (ONAGBESAN; BRUGGEMAN; DECUYPERE, 2009; VEIGA; ZANINI; GARCIA; HENSE *et al.*, 2024). Além do mais, a redução da gordura leva a uma diminuição da leptina, que por sua vez diminui o crescimento folicular (SUN; SHEN; LIU; LU *et al.*, 2021). Portanto, mais uma vez, observa-se a eficácia da RC em atuar e modular diferentes fases da atividade ovariana.

A promoção que a RC promove na longevidade (ACOSTA-RODRIGUEZ; RIJO-FERREIRA; IZUMO; XU *et al.*, 2022) demonstrado pelo controle efetivo do ganho de peso tanto em níveis de restrição de 30% (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019) quanto de 10% (ISOLA; ZANINI; HENSE; ALVARADO-RINCON *et al.*, 2022). Resulta na diminuição na quantidade de tecido adiposo, o que possui implicações metabólicas favoráveis. O tecido adiposo, ao modular a estrutura do adipócito, desempenha um papel crucial no status inflamatório. O aumento da adiponectina, por exemplo, não apenas melhora a sensibilidade à insulina, mas também promove a oxidação de ácidos graxos, atuando como uma adipocina anti-

inflamatória (SHENG; XIA; CHEN; LV *et al.*, 2021). Além do mais é válido mencionar que a curva glicêmica dos animais RC, ocorre devido gliconeogênese hepática rebote da glicose (HAGOPIAN; RAMSEY; WEINDRUCH, 2003). Resultado semelhante ao encontrado por nós, onde a constante de decaimento da glicose foi quase duas vezes maior em ambos os grupos RC, além da menor quantidade de tecido adiposo abdominal total no grupos RC. Outros estudos corroboram com nossos achados, onde os efeitos da RC em macacos rhesus mais velhos indicaram que a RC estava associada a uma redução na incidência de doenças relacionadas à idade e na mortalidade, especialmente notável na incidência de diabetes (COLMAN; BEASLEY; KEMNITZ; JOHNSON *et al.*, 2014). Além do mais, a RC em diferentes idades de camundongos (6, 13 e 19 meses) teve um impacto significativo na reversão de fenótipos relacionados ao envelhecimento em camundongos de meia-idade e idosos. Foi observada melhora na função cardíaca, redução da inflamação, diminuição do dano mitocondrial, preservação do comprimento telomérico e atenuação de marcadores associados à senescência nos camundongos de meia-idade e idosos. Notavelmente, esses efeitos benéficos não foram observados em camundongos mais jovens submetidos RC. As análises de expressão gênica indicaram que a via AMP ativada, AMPK e FoxO desempenham papel fundamental na regulação diferencial dos efeitos da CR iniciada em diferentes idades (SHENG; LV; HUANG; LV *et al.*, 2017). Além do mais um estudo comparativo em camundongos novos (7 meses) e velhos (27 meses) submetidos a RC, mostrou que os animais velhos apresentam maior presença de proteínas expressas inflamatórias, e a restrição calórica foi capaz de diminuir este status inflamatório (CAO; DHAHBI; MOTE; SPINDLER, 2001). Os resultados do nosso estudo indicam que a idade não afetou muito a sensibilidade a insulina apesar do aumento da gordura visceral com a idade. Isto pode ser pois apesar de redução significativa da reserva ovariana, os camundongos ainda são relativamente jovens. Efeitos significativos em muitas variáveis de envelhecimento geral são observadas após os 18 meses, apesar de nesta idade a função reprodutiva já ser inexistente.

6. Conclusão

Em síntese, os resultados deste estudo oferecem contribuições significativas para o entendimento dos efeitos da RC sobre o envelhecimento reprodutivo feminino e os aspectos metabólicos associados. A observação de uma redução na ativação folicular em camundongos submetidos à RC em diferentes estágios da vida, juntamente com o declínio progressivo na reserva ovariana, destaca a relevância da RC na modulação dos processos fisiológicos relacionados ao envelhecimento reprodutivo. Ademais, os efeitos positivos da RC sobre os parâmetros metabólicos, tais como controle do peso corporal, redução do tecido adiposo visceral e aumento na taxa de decaimento da glicose, reforça os benefícios desta intervenção na promoção da longevidade e saúde em geral. Tais achados sustentam a noção de que a restrição calórica pode modular os processos de envelhecimento de forma abrangente, influenciando também a saúde reprodutiva feminina, possivelmente retardando a menopausa e atenuando o declínio da reserva ovariana.

Diante da complexidade do processo de envelhecimento e das evidências que apontam para a RC como um promotor da longevidade, graças às alterações metabólicas que desempenham um papel crucial, é fundamental compreender os mecanismos que ligam a RC, o metabolismo e a saúde reprodutiva. Os achados apresentados lançam as bases para futuras investigações, com o objetivo de esclarecer não somente os mecanismos moleculares envolvidos, mas também de explorar intervenções potenciais capazes de influenciar positivamente esses processos, visando aprimorar a qualidade de vida durante o envelhecimento. A integração desses resultados indica novas direções na procura por estratégias preventivas e terapêuticas que almejam atenuar os impactos negativos do envelhecimento reprodutivo feminino, favorecendo uma transição mais suave para a menopausa e estendendo a saúde reprodutiva ao longo da vida.

7. Referências

- ABBATECOLA, A. M.; FERRUCCI, L.; GRELLA, R.; BANDINELLI, S. *et al.* Diverse effect of inflammatory markers on insulin resistance and insulin-resistance syndrome in the elderly. **J Am Geriatr Soc**, 52, n. 3, p. 399-404, Mar 2004.
- ACCILI, D.; ARDEN, K. C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. **Cell**, 117, n. 4, p. 421-426, May 14 2004.
- 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.
- ANISIMOV, V. N. Metformin: do we finally have an anti-aging drug? **Cell Cycle**, 12, n. 22, p. 3483-3489, Nov 15 2013.
- ANSERE, V. A.; ALI-MONDAL, S.; SATHIASEELAN, R.; GARCIA, D. N. *et al.* Cellular hallmarks of aging emerge in the ovary prior to primordial follicle depletion. **Mech Ageing Dev**, 194, p. 111425, Mar 2021.
- ANSON, R. M.; GUO, Z.; DE CABO, R.; IYUN, T. *et al.* Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 10, p. 6216-6220, May 13 2003.
- ANSTEAD, G. M.; CARLSON, K. E.; KATZENELLENBOGEN, J. A. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. **Steroids**, 62, n. 3, p. 268-303, Mar 1997.
- AUSTAD, S. N.; BARTKE, A. Sex Differences in Longevity and in Responses to Anti-Aging Interventions: A Mini-Review. **Gerontology**, 62, n. 1, p. 40-46, 2015.
- BABAYEV, E.; DUNCAN, F. E. Age-associated changes in cumulus cells and follicular fluid: the local oocyte microenvironment as a determinant of gamete quality. **Biol Reprod**, 106, n. 2, p. 351-365, Feb 22 2022.
- BARTKE, A. Can growth hormone (GH) accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice. **Neuroendocrinology**, 78, n. 4, p. 210-216, Oct 2003.
- BARTKE, A. Impact of reduced insulin-like growth factor-1/insulin signaling on aging in mammals: novel findings. **Aging Cell**, 7, n. 3, p. 285-290, Jun 2008.

BENEDUSI, V.; MARTINI, E.; KALLIKOURDIS, M.; VILLA, A. *et al.* Ovariectomy shortens the life span of female mice. **Oncotarget**, 6, n. 13, p. 10801-10811, May 10 2015.

BERTOLDO, M. J.; LISTIJONO, D. R.; HO, W. J.; RIEPSAMEN, A. H. *et al.* NAD(+) Repletion Rescues Female Fertility during Reproductive Aging. **Cell Rep**, 30, n. 6, p. 1670-1681 e1677, Feb 11 2020.

BHARDWAJ, J. K.; PALIWAL, A.; SARAF, P.; SACHDEVA, S. N. Role of autophagy in follicular development and maintenance of primordial follicular pool in the ovary. **J Cell Physiol**, 237, n. 2, p. 1157-1170, Feb 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.

BROWN-BORG, H. M.; BORG, K. E.; MELISKA, C. J.; BARTKE, A. Dwarf mice and the ageing process. **Nature**, 384, n. 6604, p. 33, Nov 7 1996.

CAMPBELL, J. M.; BELLMAN, S. M.; STEPHENSON, M. D.; LISY, K. Metformin reduces all-cause mortality and diseases of ageing independent of its effect on diabetes control: A systematic review and meta-analysis. **Ageing Res Rev**, 40, p. 31-44, Nov 2017.

CANTO, C.; AUWERX, J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. **Trends Endocrinol Metab**, 20, n. 7, p. 325-331, Sep 2009.

CAO, S. X.; DHAHBI, J. M.; MOTE, P. L.; SPINDLER, S. R. Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 19, p. 10630-10635, Sep 11 2001.

CARR, M. C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. **J Clin Endocrinol Metab**, 88, n. 6, p. 2404-2411, Jun 2003.

CASTRILLON, D. H.; MIAO, L.; KOLLIPARA, R.; HORNER, J. W. *et al.* Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. **Science**, 301, n. 5630, p. 215-218, Jul 11 2003.

CHAIX, A.; ZARRINPAR, A.; MIU, P.; PANDA, S. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. **Cell Metab**, 20, n. 6, p. 991-1005, Dec 2 2014.

CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. **Biol Reprod**, 71, n. 1, p. 17-27, Jul 2004.

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.

COLMAN, R. J.; BEASLEY, T. M.; KEMNITZ, J. W.; JOHNSON, S. C. *et al.* Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. **Nat Commun**, 5, p. 3557, Apr 1 2014.

DEBLON, N.; BOURGOIN, L.; VEYRAT-DUREBEX, C.; PEYROU, M. *et al.* Chronic mTOR inhibition by rapamycin induces muscle insulin resistance despite weight loss in rats. **Br J Pharmacol**, 165, n. 7, p. 2325-2340, Apr 2012.

DOU, X.; SUN, Y.; LI, J.; ZHANG, J. *et al.* Short-term rapamycin treatment increases ovarian lifespan in young and middle-aged female mice. **Aging Cell**, 16, n. 4, p. 825-836, Aug 2017.

DU, S.; ZHENG, H. Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases. **Cell Biosci**, 11, n. 1, p. 188, Nov 2 2021.

EHNINGER, D.; NEFF, F.; XIE, K. Longevity, aging and rapamycin. **Cell Mol Life Sci**, 71, n. 22, p. 4325-4346, Nov 2014.

ELLULU, M. S.; PATIMAH, I.; KHAZA'AI, H.; RAHMAT, A. *et al.* Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. **Arch Med Sci**, 13, n. 4, p. 851-863, Jun 2017.

FANG, Y.; WESTBROOK, R.; HILL, C.; BOPARAI, R. K. *et al.* Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. **Cell Metab**, 17, n. 3, p. 456-462, Mar 5 2013.

FLANAGAN, E. W.; MOST, J.; MEY, J. T.; REDMAN, L. M. Calorie Restriction and Aging in Humans. **Annu Rev Nutr**, 40, p. 105-133, Sep 23 2020.

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 69 Suppl 1, p. S4-9, Jun 2014.

FURAT RENCBER, S.; KURNAZ OZBEK, S.; ERALDEMIR, C.; SEZER, Z. *et al.* Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study. **J Ovarian Res**, 11, n. 1, p. 55, Jun 29 2018.

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.

GARRATT, M.; LEANDER, D.; PIFER, K.; BOWER, B. *et al.* 17-alpha estradiol ameliorates age-associated sarcopenia and improves late-life physical function in male mice but not in females or castrated males. **Aging Cell**, 18, n. 2, p. e12920, Apr 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.

GREEN, C. L.; LAMMING, D. W.; FONTANA, L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 23, n. 1, p. 56-73, Jan 2022.

GRZYBOWSKA, M.; BOBER, J.; OLSZEWSKA, M. [Metformin - mechanisms of action and use for the treatment of type 2 diabetes mellitus]. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, 65, p. 277-285, May 6 2011.

GUO, J.; ZHANG, T.; GUO, Y.; SUN, T. *et al.* Oocyte stage-specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 23, p. E5326-E5333, Jun 5 2018.

HAGOPIAN, K.; RAMSEY, J. J.; WEINDRUCH, R. Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. **Exp Gerontol**, 38, n. 3, p. 267-278, Mar 2003.

HANSEN, K. R.; KNOWLTON, N. S.; THYER, A. C.; CHARLESTON, J. S. *et al.* A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. **Hum Reprod**, 23, n. 3, p. 699-708, Mar 2008.

HARRISON, D. E.; STRONG, R.; ALLISON, D. B.; AMES, B. N. *et al.* Acarbose, 17-alpha-estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males. **Aging Cell**, 13, n. 2, p. 273-282, Apr 2014.

HATORI, M.; VOLLMERS, C.; ZARRINPAR, A.; DITACCHIO, L. *et al.* Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. **Cell Metab**, 15, n. 6, p. 848-860, Jun 6 2012.

HEILBRONN, L. K.; RAVUSSIN, E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. **Am J Clin Nutr**, 78, n. 3, p. 361-369, Sep 2003.

HOUTKOOPE, R. H.; CANTO, C.; WANDERS, R. J.; AUWERX, J. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. **Endocr Rev**, 31, n. 2, p. 194-223, Apr 2010.

ISOLA, J. V. V.; OCANAS, S. R.; HUBBART, C. R.; KO, S. *et al.* A single-cell atlas of the aging murine ovary. **bioRxiv**, Sep 6 2023.

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.

ISONO, W.; WADA-HIRAIKE, O.; KAWAMURA, Y.; FUJII, T. *et al.* Administration of Oral Contraceptives Could Alleviate Age-Related Fertility Decline Possibly by Preventing Ovarian Damage in a Mouse Model. **Reprod Sci**, 25, n. 9, p. 1413-1423, Sep 2018.

JAMES, D. E.; STOCKLI, J.; BIRNBAUM, M. J. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 22, n. 11, p. 751-771, Nov 2021.

JOHNSON, S. C.; RABINOVITCH, P. S.; KAEBERLEIN, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. **Nature**, 493, n. 7432, p. 338-345, Jan 17 2013.

JOUYANDEH, Z.; NAYEBZADEH, F.; QORBANI, M.; ASADI, M. Metabolic syndrome and menopause. **J Diabetes Metab Disord**, 12, n. 1, p. 1, Jan 3 2013.

KATEWA, S. D.; AKAGI, K.; BOSE, N.; RAKSHIT, K. *et al.* Peripheral Circadian Clocks Mediate Dietary Restriction-Dependent Changes in Lifespan and Fat Metabolism in *Drosophila*. **Cell Metab**, 23, n. 1, p. 143-154, Jan 12 2016.

KEVENAAR, M. E.; MEERASAHIB, M. F.; KRAMER, P.; VAN DE LANG-BORN, B. M. *et al.* Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. **Endocrinology**, 147, n. 7, p. 3228-3234, Jul 2006.

KITADA, M.; OGURA, Y.; MONNO, I.; KOYA, D. Sirtuins and Type 2 Diabetes: Role in Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 10, p. 187, 2019.

KORDOWITZKI, P. Oxidative Stress Induces Telomere Dysfunction and Shortening in Human Oocytes of Advanced Age Donors. **Cells**, 10, n. 8, Jul 23 2021.

KUK, J. L.; SAUNDERS, T. J.; DAVIDSON, L. E.; ROSS, R. Age-related changes in total and regional fat distribution. **Ageing Res Rev**, 8, n. 4, p. 339-348, Oct 2009.

KULIEV, A.; CIESLAK, J.; VERLINSKY, Y. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. **Cytogenet Genome Res**, 111, n. 3-4, p. 193-198, 2005.

LANDRY, D. A.; YAKUBOVICH, E.; COOK, D. P.; FASIH, S. *et al.* Metformin prevents age-associated ovarian fibrosis by modulating the immune landscape in female mice. **Sci Adv**, 8, n. 35, p. eabq1475, Sep 2 2022.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **J Cell Sci**, 122, n. Pt 20, p. 3589-3594, Oct 15 2009.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. **J Cell Sci**, 126, n. Pt 8, p. 1713-1719, Apr 15 2013.

LEE, S.; DONG, H. H. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. **J Endocrinol**, 233, n. 2, p. R67-R79, May 2017.

LERIDON, H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. **Hum Reprod**, 19, n. 7, p. 1548-1553, Jul 2004.

LI, L.; FU, Y. C.; XU, J. J.; CHEN, X. C. *et al.* Caloric restriction promotes the reproductive capacity of female rats via modulating the level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1). **Gen Comp Endocrinol**, 174, n. 2, p. 232-237, Nov 1 2011.

LI, L.; FU, Y. C.; XU, J. J.; LIN, X. H. *et al.* Caloric restriction promotes the reserve of follicle pool in adult female rats by inhibiting the activation of mammalian target of rapamycin signaling. **Reprod Sci**, 22, n. 1, p. 60-67, Jan 2015.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clin Interv Aging**, 13, p. 757-772, 2018.

LIU, G. Y.; SABATINI, D. M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 21, n. 4, p. 183-203, Apr 2020.

LIU, W.-J.; ZHANG, X.-M.; WANG, N.; ZHOU, X.-L. *et al.* Calorie restriction inhibits ovarian follicle development and follicle loss through activating SIRT1 signaling in mice. **European Journal of Medical Research**, 20, n. 1, 2015.

LONG, G. Y.; YANG, J. Y.; XU, J. J.; NI, Y. H. *et al.* SIRT1 knock-in mice preserve ovarian reserve resembling caloric restriction. **Gene**, 686, p. 194-202, Feb 20 2019.

LOPEZ-OTIN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M. *et al.* The hallmarks of aging. **Cell**, 153, n. 6, p. 1194-1217, Jun 6 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.

MANCUSO, P.; BOUCHARD, B. The Impact of Aging on Adipose Function and Adipokine Synthesis. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 10, p. 137, 2019.

MARTIN-MONTALVO, A.; MERCKEN, E. M.; MITCHELL, S. J.; PALACIOS, H. H. *et al.* Metformin improves healthspan and lifespan in mice. **Nat Commun**, 4, p. 2192, 2013.

MARTIN, B.; GOLDEN, E.; CARLSON, O. D.; EGAN, J. M. *et al.* Caloric restriction: impact upon pituitary function and reproduction. **Ageing Res Rev**, 7, n. 3, p. 209-224, Jul 2008.

MASON, J. B.; CARGILL, S. L.; ANDERSON, G. B.; CAREY, J. R. Transplantation of young ovaries to old mice increased life span in transplant recipients. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 64, n. 12, p. 1207-1211, Dec 2009.

MASORO, E. J. Overview of caloric restriction and ageing. **Mech Ageing Dev**, 126, n. 9, p. 913-922, Sep 2005.

MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, 130, n. 6, p. 791-799, Dec 2005.

MIHAYLOVA, M. M.; SHAW, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. **Nat Cell Biol**, 13, n. 9, p. 1016-1023, Sep 2 2011.

MILAN-MATTOS, J. C.; ANIBAL, F. F.; PERSEGUINI, N. M.; MINATEL, V. *et al.* Effects of natural aging and gender on pro-inflammatory markers. **Braz J Med Biol Res**, 52, n. 9, p. e8392, 2019.

MITCHELL, S. J.; MADRIGAL-MATUTE, J.; SCHEIBYE-KNUDSEN, M.; FANG, E. *et al.* Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. **Cell Metab**, 23, n. 6, p. 1093-1112, Jun 14 2016.

MONNIAUX, D.; CLEMENT, F.; DALBIES-TRAN, R.; ESTIENNE, A. *et al.* The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? **Biol Reprod**, 90, n. 4, p. 85, Apr 2014.

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.

MOUCHIROUD, L.; HOUTKOOPE, R. H.; MOULLAN, N.; KATSYUBA, E. *et al.* The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. **Cell**, 154, n. 2, p. 430-441, Jul 18 2013.

MUNOZ-ESPIN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 7, p. 482-496, Jul 2014.

MYERS, M.; BRITT, K. L.; WREFORD, N. G.; EBLING, F. J. *et al.* Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Reproduction**, 127, n. 5, p. 569-580, May 2004.

NA, H. J.; PARK, J. S.; PYO, J. H.; LEE, S. H. *et al.* Mechanism of metformin: inhibition of DNA damage and proliferative activity in Drosophila midgut stem cell. **Mech Ageing Dev**, 134, n. 9, p. 381-390, Sep 2013.

OERTELT-PRIGIONE, S. The influence of sex and gender on the immune response. **Autoimmun Rev**, 11, n. 6-7, p. A479-485, May 2012.

OKTEM, O.; OKTAY, K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. **Cancer Res**, 67, n. 21, p. 10159-10162, Nov 1 2007.

ONAGBESAN, O.; BRUGGEMAN, V.; DECUYPERE, E. Intra-ovarian growth factors regulating ovarian function in avian species: a review. **Anim Reprod Sci**, 111, n. 2-4, p. 121-140, Apr 2009.

OSTAN, R.; MONTI, D.; GUERESI, P.; BUSSOLOTTO, M. *et al.* Gender, aging and longevity in humans: an update of an intriguing/neglected scenario paving the way to a gender-specific medicine. **Clin Sci (Lond)**, 130, n. 19, p. 1711-1725, Oct 1 2016.

PATEL, S. A.; CHAUDHARI, A.; GUPTA, R.; VELINGKAAR, N. *et al.* Circadian clocks govern calorie restriction-mediated life span extension through BMAL1- and IGF-1-dependent mechanisms. **FASEB J**, 30, n. 4, p. 1634-1642, Apr 2016.

POWERS, R. W., 3rd; KAEBERLEIN, M.; CALDWELL, S. D.; KENNEDY, B. K. *et al.* Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. **Genes Dev**, 20, n. 2, p. 174-184, Jan 15 2006.

PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. ELECTRONIC ADDRESS, a. a. o.; PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE, M. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. **Fertil Steril**, 114, n. 6, p. 1151-1157, Dec 2020.

QIN, X.; DU, D.; CHEN, Q.; WU, M. *et al.* Metformin prevents murine ovarian aging. **Aging (Albany NY)**, 11, n. 11, p. 3785-3794, Jun 10 2019.

ROBERTS, M. N.; WALLACE, M. A.; TOMILOV, A. A.; ZHOU, Z. *et al.* A Ketogenic Diet Extends Longevity and Healthspan in Adult Mice. **Cell Metab**, 26, n. 3, p. 539-546 e535, Sep 5 2017.

ROCHA, J. S.; BONKOWSKI, M. S.; DE FRANCA, L. R.; BARTKE, A. Effects of mild calorie restriction on reproduction, plasma parameters and hepatic gene expression in mice with altered GH/IGF-I axis. **Mech Ageing Dev**, 128, n. 4, p. 317-331, Apr 2007.

SACCON, T. D.; ROVANI, M. T.; GARCIA, D. N.; MONDADORI, R. G. *et al.* Primordial follicle reserve, DNA damage and macrophage infiltration in the ovaries of the long-living Ames dwarf mice. **Exp Gerontol**, 132, p. 110851, Apr 2020.

SANADA, F.; TANIYAMA, Y.; MURATSU, J.; OTSU, R. *et al.* Source of Chronic Inflammation in Aging. **Front Cardiovasc Med**, 5, p. 12, 2018.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, 307, n. 5712, p. 1098-1101, Feb 18 2005.

SARTORELLI, V.; CARETTI, G. Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis. **Curr Opin Genet Dev**, 15, n. 5, p. 528-535, Oct 2005.

SAUL, D.; KOSINSKY, R. L. Epigenetics of Aging and Aging-Associated Diseases. **Int J Mol Sci**, 22, n. 1, Jan 2 2021.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, 168, n. 6, p. 960-976, Mar 9 2017.

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.

SCHNEIDER, A.; ZHI, X.; MOREIRA, F.; LUCIA, T., Jr. *et al.* Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. **J Ovarian Res**, 7, p. 120, Dec 29 2014.

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.

SELMAN, C.; LINGARD, S.; CHOUDHURY, A. I.; BATTERHAM, R. L. *et al.* Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. **FASEB J**, 22, n. 3, p. 807-818, Mar 2008.

SHADYAB, A. H.; MACERA, C. A.; SHAFFER, R. A.; JAIN, S. *et al.* Ages at menarche and menopause and reproductive lifespan as predictors of exceptional longevity in women: the Women's Health Initiative. **Menopause**, 24, n. 1, p. 35-44, Jan 2017.

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.

SHARPLES, A. P.; HUGHES, D. C.; DEANE, C. S.; SAINI, A. *et al.* Longevity and skeletal muscle mass: the role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake. **Aging Cell**, 14, n. 4, p. 511-523, Aug 2015.

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.

SHERMAN, H.; GENZER, Y.; COHEN, R.; CHAPNIK, N. *et al.* Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. **FASEB J**, 26, n. 8, p. 3493-3502, Aug 2012.

SHI, H.; ZHANG, T.; YI, Y.; WANG, H. *et al.* Long form PRLR (IPRLR) regulates genes involved in the triacylglycerol synthesis in goat mammary gland epithelial cells. **Small Ruminant Research**, 139, p. 7-14, 2016.

SHIMOKAWA, I. Mechanisms underlying retardation of aging by dietary energy restriction. **Pathol Int**, 73, n. 12, p. 579-592, Dec 2023.

SKAZNIK-WIKIEL, M. E.; SWINDLE, D. C.; ALLSHOUSE, A. A.; POLOTSKY, A. J. *et al.* High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice. **Biol Reprod**, 94, n. 5, p. 108, May 2016.

SLOT, K. A.; KASTELIJN, J.; BACHELOT, A.; KELLY, P. A. *et al.* Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. **Reproduction**, 131, n. 3, p. 525-532, Mar 2006.

SLUCZANOWSKA-GLABOWSKA, S.; LASZCZYNSKA, M.; PIOTROWSKA, K.; GLABOWSKI, W. *et al.* Morphology of ovaries in laron dwarf mice, with low circulating plasma levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and in bovine GH-transgenic mice, with high circulating plasma levels of IGF-1. **J Ovarian Res**, 5, p. 18, Jul 2 2012.

SON, W. Y.; DAS, M.; SHALOM-PAZ, E.; HOLZER, H. Mechanisms of follicle selection and development. **Minerva Ginecol**, 63, n. 2, p. 89-102, Apr 2011.

STALLONE, G.; INFANTE, B.; PRISCIANDARO, C.; GRANDALIANO, G. mTOR and Aging: An Old Fashioned Dress. **Int J Mol Sci**, 20, n. 11, Jun 6 2019.

STOUT, M. B.; STEYN, F. J.; JURCZAK, M. J.; CAMPOREZ, J. G. *et al.* 17alpha-Estradiol Alleviates Age-related Metabolic and Inflammatory Dysfunction in Male Mice Without Inducing Feminization. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 72, n. 1, p. 3-15, Jan 2017.

SUN, J.; SHEN, X.; LIU, H.; LU, S. *et al.* Caloric restriction in female reproduction: is it beneficial or detrimental? **Reprod Biol Endocrinol**, 19, n. 1, p. 1, Jan 4 2021.

SUN, L. Y.; FANG, Y.; PATKI, A.; KOOPMAN, J. J. *et al.* Longevity is impacted by growth hormone action during early postnatal period. **Elife**, 6, Jul 4 2017.

SWARUP, S.; GOYAL, A.; GRIGOROVA, Y.; ZELTSER, R. Metabolic Syndrome. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Amandeep Goyal declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Yulia Grigorova declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Roman Zeltser declares no relevant financial relationships with ineligible companies., 2023.

TAL, R.; SEIFER, D. B. Ovarian reserve testing: a user's guide. **Am J Obstet Gynecol**, 217, n. 2, p. 129-140, Aug 2017.

TCHKONIA, T.; MORBECK, D. E.; VON ZGLINICKI, T.; VAN DEURSEN, J. *et al.* Fat tissue, aging, and cellular senescence. **Aging Cell**, 9, n. 5, p. 667-684, Oct 2010.

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.

TITUS, S.; LI, F.; STOBESKI, R.; AKULA, K. *et al.* Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. **Sci Transl Med**, 5, n. 172, p. 172ra121, Feb 13 2013.

UNNIKRISHNAN, A.; KURUP, K.; SALMON, A. B.; RICHARDSON, A. Is Rapamycin a Dietary Restriction Mimetic? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 75, n. 1, p. 4-13, Jan 1 2020.

VEIGA, G. B.; ZANINI, B. M.; GARCIA, D. N.; HENSE, J. D. *et al.* Effects of calorie, protein, and branched chain amino acid restriction on ovarian aging in mice. **Reprod Biol**, 24, n. 1, p. 100856, Jan 30 2024.

WANG, S.; HUANG, M.; YOU, X.; ZHAO, J. *et al.* Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 13037, Aug 29 2018.

WEICHHART, T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. **Gerontology**, 64, n. 2, p. 127-134, 2018.

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.

WU, D.; REN, Z.; PAE, M.; GUO, W. *et al.* Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. **J Immunol**, 179, n. 7, p. 4829-4839, Oct 1 2007.

WU, H.; BALLANTYNE, C. M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. **J Clin Invest**, 127, n. 1, p. 43-54, Jan 3 2017.

WU, H.; BALLANTYNE, C. M. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. **Circ Res**, 126, n. 11, p. 1549-1564, May 22 2020.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, 124, n. 3, p. 471-484, Feb 10 2006.

XIANG, Y.; XU, J.; LI, L.; LIN, X. *et al.* Calorie restriction increases primordial follicle reserve in mature female chemotherapy-treated rats. **Gene**, 493, n. 1, p. 77-82, Feb 1 2012.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

YOON, M. S. The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling. **Nutrients**, 9, n. 11, Oct 27 2017.

ZACZEK, D.; HAMMOND, J.; SUEN, L.; WANDJI, S. *et al.* Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. **Biol Reprod**, 67, n. 4, p. 1115-1124, Oct 2002.

ZHANG, H.; RISAL, S.; GORRE, N.; BUSAYAVALLASA, K. *et al.* Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. **Curr Biol**, 24, n. 21, p. 2501-2508, Nov 3 2014.

ZHANG, X. M.; LI, L.; XU, J. J.; WANG, N. *et al.* Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression. **Gene**, 523, n. 1, p. 82-87, Jul 1 2013.

ZHOU, L.; XIE, Y.; LI, S.; LIANG, Y. *et al.* Rapamycin Prevents cyclophosphamide-induced Over-activation of Primordial Follicle pool through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in vivo. **J Ovarian Res**, 10, n. 1, p. 56, Aug 16 2017.

Parecer CEEA



PARECER Nº
PROCESSO Nº

174/2022/CEUA/REITORIA
23110.033054/2022-23

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos da restrição calórica e persistência do seu efeito na preservação da fertilidade em diferentes faixas etárias de camundongos”, registrada com o nº 23110.033054/2022-23, sob a responsabilidade de **Augusto Schneider** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, em reunião de 26/10/2022.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início: 01/12/2022 Término: 31/12/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / C57BL/6
Nº de animais	108 (90 fêmeas com 3 meses + 18 fêmeas com 7 meses)
Idade	3 meses e 7 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEUA 033054/2022-23

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON, Professor do Magistério Superior**, em 31/10/2022, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1921020** e o código CRC **10CAC638**.

Referência: Processo nº 23110.033054/2022-23

SEI nº 1921020