

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

**Efeito da restrição calórica e da rapamicina sobre o envelhecimento ovariano
em camundongos**

Driele Neske Garcia

Pelotas, 2018

Driele Neske Garcia

**Efeito da restrição calórica e da rapamicina sobre o envelhecimento ovariano
em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof. Augusto Schneider

Co-orientador: Prof. Carlos Castilho de Barros

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G216e Garcia, Driele Neske

Efeito da restrição calórica e da rapamicina sobre o envelhecimento ovariano em camundongos / Driele Neske Garcia ; Augusto Schneider, orientador ; Carlos Castilho de Barros, coorientador. — Pelotas, 2018.

64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Sirolimo. 2. Foxo3a. 3. Reserva ovariana. 4. Mtor. I. Schneider, Augusto, orient. II. Barros, Carlos Castilho de, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Maria Inez Figueiredo Figs Machado CRB: 10/1612

Efeito da restrição calórica e da rapamicina sobre o envelhecimento ovariano em camundongos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição.

Data da Defesa: 06/08/2018

Banca examinadora:

Prof.Dr. Augusto Schneider (Orientador) Doutor em biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Prof.Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel Doutor em fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Profa.Dra. Monique Tomazele Rovani Doutora em medicina veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Agradecimentos

A minha família, aos que me apoiaram e incentivaram, aos que confiaram em mim, em especial à minha irmã Diuly Garcia e às minhas avós Biolange Xavier, Darli Neske e bisavó Maria Hirdes que me deram todo o apoio para chegar até aqui e que são minha fonte de inspiração para a vida.

Ao meu orientador, Augusto Schneider, por toda a paciência, incentivo, apoio e aprendizado compartilhado.

Ao Laboratório de Histologia do Instituto de Biologia – UFPel – pelo espaço cedido para realização do meu trabalho, ao Professor Rafael Gianella Mondadori e aos técnicos, Eliane, Luis Augusto e Luis Otávio, que estiveram presente me dando apoio sempre que precisei.

Ao Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição – UFPel pelo espaço cedido para realização do meu trabalho e por todo auxílio, em especial à técnica Renata Ramires por ter sido atenciosa e prestativa para tudo o que precisei.

Ao meu co-orientador Carlos Castilho de Barros, por estar sempre disposto a ajudar.

Às minhas amigas queridas, Tatiana Saccon, Valeria Amann, Clédia Flores, com vocês o meu mestrado foi mais alegre e com certeza será recordado como um momento muito especial em minha vida ao qual tive contato com pessoas maravilhosas e um vasto aprendizado compartilhado. À Tatiana, obrigada por ter sido minha orientadora do coração e pela ajuda em todo o momento que precisei.

A todos os que colaboraram para a realização desse trabalho em especial à Phd Monique Rovani e à Jorgea Pradiee, por serem atenciosas, dedicadas e por todo apoio que me foi dado. Aos doutorandos Joao Rincón e à Maiara Soares, juntamente com a professora Francielli Stefanello por toda a ajuda e atenção. Ao aluno da graduação Ruan Andrade por toda atenção, ajuda durante a realização desse projeto.

A todos, muito obrigada !

Resumo

GARCIA, Drielle Neske. Efeito da restrição calórica e da rapamicina sobre o envelhecimento ovariano em camundongos. 2018. 64f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A restrição calórica (RC) é conhecida por aumentar a preservação da reserva ovariana. Do mesmo modo o fármaco rapamicina tem demonstrado ter efeitos semelhantes aos da RC com relação à reserva ovariana. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da rapamicina e da RC na reserva folicular, no estresse oxidativo e na expressão gênica ovariana e também no metabolismo da glicose em camundongos. Foram utilizados 36 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 mantidos com dieta padrão e água *ad libitum* e sob condições controladas de luz e temperatura. Os camundongos foram distribuídos em 3 grupos de 12 animais cada (grupo controle; grupo tratado com rapamicina intraperitoneal a cada 2 dias na dose de 4mg/kg de peso e o grupo submetido à RC de 30% em relação ao grupo controle). Aos 85 dias de tratamento, realizou-se o teste de tolerância à insulina (TTI) e o teste de tolerância à glicose (TTG). Aos 93 dias de tratamento os camundongos foram eutanasiados, e os ovários foram coletados, um para análise histológica e o outro para a expressão gênica e análise da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 6. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Não houve diferença quanto ao consumo e o ganho de peso entre os grupos controle e rapamicina ($P > 0,05$). No TTI, as fêmeas da rapamicina foram mais resistentes à insulina, enquanto que as da RC apresentaram maior sensibilidade à insulina ($P = 0,003$). No TTG, as fêmeas da rapamicina foram mais intolerantes à glicose quando comparadas com as da RC e controle ($P = 0,04$). Na quantificação de EROs, as fêmeas do grupo rapamicina tiveram maiores níveis de EROs quando comparadas aos do grupo controle ($P < 0,05$). Na contagem de folículos, as fêmeas da RC e da rapamicina tiveram maior número de folículos primordiais ($P = 0,02$ e $0,04$) e menor número de folículos primários ($P < 0,001$). Na expressão gênica, as fêmeas da RC e rapamicina tiveram maior expressão do fator de transcrição Foxo3a ($P = 0,01$) e as fêmeas da RC tiveram menor nível de expressão de Akt1 do que as da rapamicina ($P < 0,05$). Portanto, as fêmeas da rapamicina e da RC tiveram uma maior reserva ovariana e maior expressão da Foxo3a, porém as fêmeas da rapamicina foram mais intolerantes à glicose, enquanto que as da RC foram mais sensíveis à insulina em relação ao grupo controle e o rapamicina, não havendo diferença no ganho de peso e consumo das fêmeas da rapamicina. Isto indica que a expressão de Foxo3a foi um fator comum entre os tratamento e que resultou em reduzida ativação de folículos primordiais.

Palavras-chave: sirolimo, reserva ovariana, Mtor, Foxo3a

Abstract

GARCIA, Driele Neske. Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice. 2018. 64f. Dissertation (Master Degree in Nutrition and Food), Nutrition College, Federal University of Pelotas, 2018.

Caloric restriction (CR) is known to increase the preservation of the ovarian reserve. Likewise, rapamycin has been shown to have similar effects to CR regarding the ovarian reserve. The aim of this study was to evaluate the effects of rapamycin and caloric restriction on follicular reserve, oxidative stress, ovarian gene expression and also on glucose metabolism in mice. Thirty-six female mice of C57BL/6 lineage maintained with standard diet, water ad libitum and under controlled light and temperature conditions were used. The mice were allocated into 3 groups of 12 animals each (control group, group treated with intraperitoneal rapamycin every 2 days at a dose of 4mg/kg body weight and the group submitted to CR of 30% compared to the control group). At 85 days of treatment, an insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT) were performed. At 93 days of treatment the mice were euthanized, and the ovaries were collected, one for histological analysis, and the other for gene expression and analysis of reactive oxygen species (ROS). Statistical analyzes were performed using Graphpad Prism 6 software. Values of $P < 0.05$ were considered significant. There was no difference in consumption and weight gain between the control and rapamycin ($P > 0.05$). In the ITT, mice of the rapamycin were more resistant to insulin whereas those of the CR had higher insulin sensitivity ($P = 0.003$). In the GTT, from females of the rapamycin group were more intolerant to glucose when compared with RC and control groups ($P = 0,04$). Females of the rapamycin group had higher levels of ROS when compared to the control group ($P < 0.05$). The females, CR and rapamycin had a higher number of primordial follicles ($P = 0.02$ and 0.04) and a lower number of primary follicles ($P < 0.001$) and both had greater expression of the transcription factor Foxo3a ($P = 0.01$). CR mice had lower level of expression of Akt1 than those of rapamycin ($P < 0.05$). Therefore, females of rapamycin and CR had a greater ovarian reserve and higher expression of Foxo3a, but females of rapamycin were more intolerant to glucose whereas those of CR were more sensitive to insulin and there was no difference in weight gain and consumption of the females of the rapamycin. This indicates that the expression of Foxo3a was a common factor between the treatments and that resulted in reduced activation of primordial follicles.

Key-words: sirolimus, ovarian reserve, Mtor, Foxo3a

Lista de figuras

Figura 1	Imagens histológicas detalhadas de cada estágio do folículo (primordial, primário, secundário e terciário) e seções ovarianas inteiras para camundongos normais	19
Figura 2	Esquema dos alvos em que a restrição calórica pode atuar no organismo e que já foram documentados em estudos anteriores	22
Figura 3	Via de sinalização proposta na preservação dos folículos primordiais em estado dormente em oócitos de camundongos submetidos à restrição calórica e à rapamicina	25
Figura 4	Análise do consumo da ração (A), peso corporal (B), Teste de Tolerância à insulina (TTI) (C), Constante de decaimento da glicose (KITT) (D) e Teste de Tolerância à Glicose (TTG) (E) dos grupos restrição calórica (RC), rapamicina e controle comparados ao devido tempo de experimento	36
Figura 5	Análise da quantidade média de folículos em diferentes estágios de crescimento	39
Figura 6	Análise da expressão gênica relativa de diferentes genes ovarianos	46
Figura 7	Análise da expressão gênica relativa de diferentes genes ovarianos	47
Figura 8	Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em ovários de fêmeas do grupo controle (CTL), rapamicina (RAP) e restrição calórica (RC).	49

Lista de Abreviações

β 2m	β -2-microglobulina
β Act	β -Actina
A	Antro
Akt1	Proteína quinase B
Amh	Hormônio anti-mulleriano
Bmp-15	Proteína morfogenética óssea 15
Cat	Catalase
CL	Corpo lúteo
CTL	Controle
CT	Valor limiar do ciclo
DCF	Fluorescente diclorofluoresceína
DCFH – DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DM2	Diabetes melittus 2
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Foxo	Fator de Transcrição Forkhead Box da classe O
Foxo3a	Fator de Transcrição Forkhead Box da classe O3a
GC	Células da granulosa
Gdf9	Fator de diferenciação de crescimento 9
Gh	Hormônio do crescimento
GLUT4	<i>Glucose transporter type 4</i>
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
Igf-1	fator de crescimento semelhante à insulina

Kit	Receptor tirosina quinase
Kitl	<i>Kit Ligand</i>
KITT	Constante de decaimento da glicose
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
Mtor	Alvo de sinalização mamífero da rapamicina
Mtorc1	Alvo de sinalização mamífero da rapamicina complexo 1
Mtorc2	Alvo de sinalização mamífero da rapamicina complexo 2
NAPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
O	Oócito
ON	Núcleos de oócitos
PEG	<i>Sorbitan monolaurate</i>
Pi3k	Fosfoinosítideo-3-quinase
Pten	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RAP	Rapamicina
RC	Restrição Calórica
RTqPCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>
Sod	Superóxido dismutase
Sod2	Superóxido dismutase 2
TAG	Triglicerídeos
TC	Células da teca
TF	Folículo terciário
Tsh	Hormônio estimulante da tireóide
TTI	Teste de tolerância à insulina

TTG

Teste de tolerância à glicose

TWEEN

Polysorbate

Sumário

1	Introdução	13
2	Revisão de Literatura	16
2.1	Envelhecimento	16
2.2	Envelhecimento ovariano	18
2.3	Restrição calórica e o envelhecimento somático e ovariano	21
2.4	Rapamicina e o envelhecimento somático e ovariano	26
2.5	Objetivo geral	28
2.6	Objetivos específicos	28
2.7	Hipótese	29
3	Metodologia	29
3.1	Manejo dos animais	29
3.2	Teste de intolerância à insulina e Teste de Tolerância à Glicose	30
3.3	Contagem de folículos	31
3.4	Extração de RNA	32
3.5	Análise de Expressão Gênica	32
3.6	Determinação de EROs	34
3.7	Análises Estatísticas	35
4	Resultados e Discussões	35
4.1	Consumo e ganho de peso	35
4.2	Teste de Tolerância à Insulina	37
4.3	Teste de Tolerância à Glicose	37
4.4	Contagem de Folículos	38
4.5	Expressão Gênica	42
4.6	Determinação dos níveis de EROs	48
4.7	Limitações do estudo	49
5	Considerações finais	50

6 Referências Bibliográficas	52
Anexos	64
Anexo 1	64

1 Introdução

O envelhecimento ovariano está associado ao esgotamento da reserva folicular ovariana, que é definida durante a vida fetal em mulheres (TE VELDE et al., 1998) e logo após o nascimento em camundongos (PETERS, 1969). A reserva ovariana é constituída principalmente de folículos primordiais contendo o oócito e uma camada de células da pré-granulosa. Os folículos são recrutados da reserva continuamente e podem sofrer ovulação ou tornarem-se atresícos, processo que é irreversível, ou seja, uma vez ativado, o folículo não retorna mais para a reserva (BAKER, 1963). O recrutamento e a ativação dos folículos primordiais levam à depleção da reserva ovariana, culminando com o esgotamento dessa reserva e início da menopausa nas mulheres (LIU et al., 2006). Sendo assim, a ativação dos folículos primordiais é um passo chave para a depleção da reserva ovariana e ocorrem através de sinais específicos e que ainda não estão totalmente compreendidos.

A quantidade decrescente de folículos é acompanhada da diminuição da qualidade do oócito (BROEKMANS et al., 2009) devido ao acúmulo de danos, em parte pelo aumento do estresse oxidativo, à medida que a mulher envelhece e também está associado com uma diminuição da qualidade do embrião e consequente, maior frequência de abortos e o aumento de anormalidades cromossômicas (FUJIMOTO et al., 2011). O efeito dos danos causados no DNA em folículos primordiais é muito significativo para a fertilidade (COLLINS et al., 2016). Concomitantemente, sabe-se que no estilo de vida contemporâneo as mulheres têm optado cada vez mais por terem filhos em idade mais avançada. Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o número de nascimentos de filhos de mães com idade entre 20 e 24 anos em 2005 era de 30,9%. Em 2015, o percentual nessa faixa etária caiu para 25,1%. Coincidentemente à diminuição do número de mães jovens, houve um aumento da representatividade de mães entre 30 e 39 anos de 22,5%, em 2005, chegando a 30,8%, em 2015. Nos EUA, em 2012, a taxa de nascimento para mãe com idade entre 39 e 40 anos foi para 11 a cada 1000 mulheres enquanto que em 1970 essa taxa era de 2,1 segundo dados da NCHS (*National Center for Health Statistics*). Um atraso na depleção de oócitos da reserva ovariana, ou seja, um atraso na ativação de folículos primordiais bem como a manutenção de sua qualidade seriam essenciais para prolongar a fertilidade feminina e para reduzir o risco de anormalidades cromossômicas e morte embrionária precoce que estão

relacionadas com a aproximação da menopausa (TREFF et al., 2016). Isto se torna ainda mais importante considerando a incidência de distúrbios nutricionais como obesidade e diabetes tipo II com o aumento da idade.

A ativação dos folículos primordiais é um processo regulado por diversas vias. Uma das principais vias de sinalização implicadas nesse processo é a fosfoinositídeo-3-quinase (Pi3k) / proteína quinase B (Akt1) e o seu efetor o Fator de Transcrição Forkhead Box da classe O3a (Foxo3a). O Foxo3a está envolvido em uma grande variedade de importantes processos celulares e, no folículo primordial, a fosforilação de Foxo3a está associada ao crescimento de oócitos e a ativação irreversível dos mesmos (CASTRILLON et al., 2003). O *insulin like growth fator 1* (Igf-1) e a insulina, através da via de sinalização Pi3k/Akt1/Foxo, permitem a fosforilação da Foxo3a (BARZILAI et al., 2012). A hiperativação desta via resulta na hiperfosforilação de Foxo3a, acarretando na múltipla ativação de folículos primordiais, levando ao esgotamento prematuro da reserva ovariana (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013). Estudos em camundongos *Ames dwarf (df/df)* deficientes em hormônio do crescimento (Gh) demonstram que esses animais possuem características semelhantes aos animais submetidos à RC (BARTKE et al., 2005), incluindo uma menor ativação de folículos primordiais que foi associada a um aumento na expressão gênica de Foxo3a bem como, uma diminuição na fosforilação de Foxo3a em camundongos *df/df* (SCHNEIDER et al., 2014; SACCON et al., 2016).

Assim como a via da Foxo3a, estudos recentes sugerem que o mechanistic target of rapamycin kinase (Mtor) também pode estar envolvido na ativação dos folículos primordiais (ADHIKARI et al., 2009) e também que a supressão da sinalização de Mtor em oócitos poderia preservar os folículos primordiais em estado latente (ADHIKARI et al., 2009). A via Mtor é essencial para a regulação do processo de envelhecimento ovariano. Ela responde a sinais de fatores de crescimento (insulina/Igf-1), estresse, estado de energia, oxigênio e nutrientes como aminoácidos para processos de controle, incluindo síntese proteica, lipídica e autofagia (WULLSCHLEGER et al., 2006). Em ratas expostas à restrição calórica (RC) houve supressão da atividade de sinalização Mtor e aumento no número dos folículos primordiais quando comparadas a um grupo controle e a um grupo com dieta hiperlipídica sugerindo que a transição do folículo primordial foi diminuída,

representando uma vida reprodutiva mais longa (LI et al., 2015). Portanto, a via de sinalização Mtor também encontra-se diminuída em animais submetidos à restrição calórica e está relacionada com a preservação da reserva ovariana.

Estudos indicam que a RC auxilia na preservação da reserva ovariana. A RC pode ser definida como uma redução da ingestão calórica abaixo do *ad libitum* (à vontade) (GENARO et al., 2009; LI et al., 2011), geralmente entre 20 e 40% de restrição, sem comprometer a ingestão de nutrientes essenciais (CANTÓ et al., 2009). A contagem de folículos em camundongos fêmeas submetidos à RC apresentou maior número total de folículos, maior proporção de folículos primordiais e três vezes maior expressão do hormônio anti-mulleriano (Amh) (SHI et al., 2013). O Amh é conhecido como um marcador da menopausa e da reserva ovariana (BROER et al., 2014).

Além disso, desde 1935 diversos estudos com RC têm sido relacionados com o aumento na longevidade de diferentes espécies como leveduras, *Caenorhabditis elegans* (verme nematoide), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), mamíferos como ratos, camundongos (KENYON, 2010) e macacos Rhesus (COLMAN et al., 2014). Além disso, a RC pode aumentar a longevidade em até 50% sem comprometer a qualidade de vida (BARTKE, 2005).

A rapamicina, por sua vez, é um fármaco imunossupressor (WULLSCHLEGER et al., 2006) com propriedades antiproliferativas (NIKOLAI et al., 2015) e foi reconhecida como mimética da RC (POWERS et al., 2006). Quando fornecida de maneira contínua, promove aumento da longevidade de maneira muito semelhante ao observado em animais submetidos à RC (ANISIMOV et al., 2011). A rapamicina aumenta a média de longevidade e diminui a incidência de tumores em camundongos fêmeas, e ainda diminui o ganho de peso com a idade em fêmeas (BITTO et al., 2016; MAGDALON et al., 2017; YANIK et al., 2015). A rapamicina inibe a via Mtor (SARBASSOV et al., 2006), mais especificamente o complexo Mtorc1, que é sensível à rapamicina (BLAGOSKLONNY, 2010). Estudos feitos com deleção gênica de componentes importantes para a ativação do complexo Mtor, indicam que a ativação do Mtorc1 e o aumento da sinalização Akt estimulam sinergicamente a ativação dos folículos primordiais (CHENG et al., 2015). Logo, a sinalização Mtor e Akt poderiam atuar em conjunto para promover a ativação do folículo primordial. Após 10 dias de tratamento com ativadores da via Akt e Mtor

observou-se aumento no número de folículos antrais/pré-ovulatórios de camundongos *in vivo* e *in vitro*, acompanhados de uma diminuição dos folículos primordiais, confirmando a capacidade de estimuladores de Akt, incluindo inibidores do regulador negativo da via Pi3k, Pten (*Phosphatase and tensin homolog*) e ativadores de Pi3k, para promover o crescimento folicular (CHENG et al., 2015).

Portanto, o objetivo desse estudo é comparar os efeitos da rapamicina e da restrição calórica na reserva folicular, e na expressão gênica ovariana em camundongos C57BL/6.

2 Revisão da literatura

2.1 Envelhecimento

O envelhecimento pode ser definido como uma diminuição progressiva e geral das funções do organismo, que leva a uma menor capacidade de reagir de forma adaptável às alterações e à preservação da homeostase. Esse acúmulo de alterações adversas com a idade aumenta o risco de doenças e, eventualmente, resulta em morte (DE LA FUENTE, 2008b).

Diversas teorias já foram propostas para explicar o processo de envelhecimento (MEDVEDEV, 1990). Segundo a teoria epigenética desenvolvida por HARMAN (1972) e MIQUEL et al. (1980), o envelhecimento é uma consequência do acúmulo de danos (por oxidação deletéria) em biomoléculas causadas pela alta reatividade dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são um grupo de componentes derivados da incompleta redução molecular do oxigênio e incluem o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH\bullet$). A principal fonte fisiológica dessas moléculas são as mitocôndrias durante a respiração celular (DE LA FUENTE, 2002), e o DNA mitocondrial (mtDNA) é provavelmente o primeiro alvo da oxidação (HARMAN, 1972). Assim, o dano mitocondrial causado pelos radicais livres resulta em uma perda da competência bioenergética, que leva ao envelhecimento e morte das células. No entanto, as células possuem diversos mecanismos antioxidantes para, principalmente, estabilizar esses radicais livres formados, não só durante a respiração celular, mas

como consequência de muitas outras funções celulares. Porém, quando a quantidade de EROs excede essa proteção antioxidante, surge uma situação de estresse oxidativo, que resulta em lesão celular (HALLIWELL, 2007), podendo gerar danos não só ao mtDNA, como ao DNA genômico, proteínas e lipídios presentes nas células (BARTKE, 2008). Portanto, as funções do organismo são baseadas em um equilíbrio entre os níveis de EROs e os níveis de antioxidantes; a perda desse equilíbrio pode levar a doenças e ao envelhecimento (DE LA FUENTE, 2008b). A oxidação produzida no estresse oxidativo está na base das múltiplas alterações relacionadas com a idade que afetam morfologia, fisiologia e comportamento em todos os níveis de organização celular, tecidual e orgânica (DE LA FUENTE, 2008b), sendo o envelhecimento, então, acompanhado de um declínio dos sistemas fisiológicos como o sistema nervoso, sistema endócrino e o sistema imunitário (DE LA FUENTE, 2008a). Também é importante ressaltar que há uma diminuição na autofagia com o avançar da idade, diminuindo a apoptose de células defeituosas ou senescentes, que muitas vezes são geradas no estresse oxidativo (MASORO, 2009).

Dentre as alterações metabólicas do processo de envelhecimento estão o aumento da adiposidade, principalmente aumento da gordura visceral (BARZILAI et al., 2012). O envelhecimento está associado a um aumento de citocinas pró-inflamatórias, que são conhecidas por interferirem na ação da insulina e que levam ao aumento na inflamação (TONET et al., 2008). Estas citocinas também são derivadas do acúmulo de gordura visceral (SEPE et al., 2010). Além disso, exames de tomografia computadorizada em homens e mulheres revelam que, à medida que a idade aumenta, a gordura subcutânea diminui, enquanto que a gordura visceral, que é a soma dos depósitos de gordura dentro da cavidade abdominal, aumenta (FOLSOM et al., 1993). Esse acúmulo de gordura visceral está associado à resistência à insulina e ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (BARZILAI et al., 2012). A sensibilidade à insulina diminui normalmente durante o envelhecimento, conduzindo a um aumento compensatório dos níveis de insulina no plasma e reduzida capacidade de eliminar a glicose e limitar as elevações pós-prandiais dos níveis de glicose (FACCHINI et al., 2001), sendo resultado destas alterações no acúmulo de tecido adiposo e aumento das citocinas pró-inflamatórias.

Outra alteração fisiológica importante do envelhecimento é a diminuição progressiva dos níveis do hormônio do crescimento (Gh). O Gh é o principal regulador da biossíntese e liberação de fator de crescimento semelhante à insulina (Igf-1) e um importante modulador das ações da insulina em diferentes órgãos (BARTKE, 2008). Acredita-se que essa secreção reduzida de Gh seja responsável ou contribua para muitos sintomas do envelhecimento, incluindo perda de massa muscular, aumento da adiposidade, diminuição da densidade mineral óssea e declínio dos níveis de energia juntamente com alterações na qualidade de vida (BARTKE et al., 2003). A diminuição da secreção de Gh e concomitante das concentrações de Igf-1 em seres humanos estão associados a um maior risco de várias doenças incluindo DM2, doenças cardiovasculares, sarcopenia e osteoporose (RINCON et al., 2004).

Em suma, dentre os múltiplos fatores que levam ao processo de envelhecimento, um deles é a condição de estresse oxidativo crônico (com mais compostos oxidantes do que antioxidantes) que afeta todas as células, especialmente às dos sistemas reguladores, ou seja, sistema nervoso, endócrino e sistema imunitário, e, portanto, a comunicação entre eles, levando ao acúmulo de células danificadas, a uma homeostase prejudicada e ao aumento da morbidade e mortalidade (DE LA FUENTE, 2008b).

2.2 Envelhecimento Ovariano

O envelhecimento ovariano pode ser definido como um esgotamento da reserva folicular ovariana associada a uma diminuição progressiva da fertilidade (TE VELDE et al., 1998). A reserva ovariana é constituída, principalmente do conjunto de folículos primordiais, que são compostos por um oócito envolto por uma camada de células da pré-granulosa achatadas (PETERS, 1969). Os oócitos que compõem os folículos primordiais permanecem quiescentes até serem recrutados para crescerem durante algum evento da vida reprodutiva feminina (HIRSHFIELD, 1994). A quantidade desses folículos em ovários humanos é limitada e é estabelecida durante a vida fetal e está destinada para toda a vida reprodutiva feminina (TE VELDE et al., 1998), sendo assim, o tempo de vida reprodutiva depende do tamanho da reserva ovariana e a taxa de esgotamento dos mesmos (FORTUNE et al., 2013).

Os oócitos dos folículos primordiais estão dormentes na prófase meiótica I (GLEICHER et al., 2011) e a sua ativação leva ao seu crescimento culminando na ovulação ou atresia em algum momento do ciclo de crescimento. Essa ativação é irreversível, ou seja, uma vez ativado o folículo não retorna mais à reserva (BAKER, 1963). O folículo primordial ativado se torna um folículo primário, que é aquele que contém um oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa cuboides no lugar das achatadas. Um folículo é determinado como sendo um folículo secundário se for rodeado por mais do que uma camada de células da granulosa cuboides, sem antro visível. Um folículo é determinado como sendo um folículo antral ou terciário se possuir um espaço antral claramente definido e preenchido por líquido folicular e uma camada de células da granulosa denominadas cumulus oophorus em torno do oócito (LI et al., 2015). A Figura 1 ilustra as características de cada folículo.

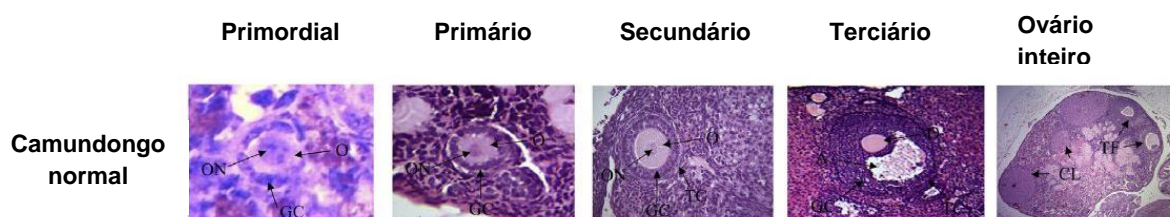


Figura 1. Imagens histológicas detalhadas de cada estágio do folículo (primordial, primário, secundário e terciário) e seções ovarianas inteiras para camundongos normais. O - Oócito, ON - Núcleos de oócitos, GC - Células da granulosa, TC - Células da teca, A - Antro, CL – Corpo lúteo, TF - Folículo terciário. Fonte: Adaptado de SCHNEIDER et al. (2017).

Todo o processo, desde o início do crescimento folicular até a ovulação, ocorre durante todo o período reprodutivo da vida feminina, até que o estoque de folículos em dormência seja esgotado, marcando o início da menopausa que ocorre por volta dos 50 anos de idade (TE VELDE et al., 1998). A quantidade decrescente de conjunto de folículos é acompanhada da diminuição da qualidade do oócito. Essa deterioração da qualidade se dá pelo acúmulo de danos à medida que a mulher envelhece e está associada com maior frequência de abortos e o aumento de anormalidades cromossômicas após os 30 anos de idade (TE VELDE et al., 1998).

Portanto, como já mencionado anteriormente, o estresse oxidativo causado por um excesso de EROs pode afetar todas as células do corpo no processo de

envelhecimento, e tem um papel importante na qualidade do oócito conforme o avançar da idade feminina. Já que o número de oócitos é pré-determinado na vida fetal, o efeito dos danos causados no DNA em folículos primordiais é muito significativo para a fertilidade (COLLINS et al., 2016). Além disso, sabe-se que uma resposta efetiva ao dano do DNA é crucial para todas as células, incluindo os oócitos (COLLINS et al., 2016). Dentre as estratégias que os oócitos utilizam em consequência dos danos ao seu DNA durante a vida adulta está a apoptose de folículos primordiais (COLLINS et al., 2016).

É importante salientar que a ativação de folículos primordiais é um processo estritamente regulado por vários fatores parácrinos e endócrinos (SCHNEIDER et al., 2017). Uma das principais vias de sinalização implicadas nesse processo é a fosfoinosítideo-3-quinase (Pi3k) / proteína quinase B (Akt1) e o seu efetor o Fator de Transcrição Forkhead Box da classe O3a (Foxo3a), que é o fator de transcrição mais importante da via de sinalização do Igf-1 e insulina (DONG et al., 2008). O Foxo3a é uma subfamília dos fatores de transcrição Foxo, que têm por característica possuir um domínio específico que se liga ao DNA (GENIN et al., 2014). Em mamíferos, esta subfamília, Foxo3a, está envolvida em uma grande variedade de importantes processos celulares que regulam a resistência ao estresse oxidativo, o metabolismo, o controle do ciclo celular e apoptose, reparação de DNA, ativando a expressão de genes alvos do Foxo3a. No folículo primordial, a fosforilação de Foxo3a está associada ao crescimento de oócitos e à ativação irreversível dos mesmos.

Os fatores de crescimento (Igf-1 e insulina) desencadeiam uma via intracelular mediada por Pi3k e Akt1, permitindo a fosforilação de Foxo3a em três resíduos conservados por Akt. A fosforilação mediada por Akt1 leva à exclusão nuclear da Foxo3a, e por sua vez, a supressão da transcrição de genes dependentes da Foxo3a (MURPHY et al., 2003). Na ausência de sinalização de fatores de crescimento, a Foxo3a desloca-se para o núcleo e ativa a expressão de genes dependentes (WEBB et al., 2014). Nos folículos ovarianos, quando a Foxo3a é fosforilada sai do núcleo e vai para o citoplasma do oócito, sendo que a Foxo3a não fosforilada (presente no núcleo) é crucial para a manutenção de folículos primordiais em fase quiescente (CASTRILLON et al., 2003). A hiperativação desta via resulta na hiperfosforilação de Foxo3a, acarretando na múltipla ativação de folículos

primordiais, levando ao esgotamento prematuro da reserva ovariana (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013).

2.3 A Restrição Calórica (RC) e o envelhecimento somático e ovariano

A restrição calórica pode ser definida como uma redução da ingestão calórica (GENARO et al., 2009; LI et al., 2011), geralmente entre 20 e 40% a menos quando comparada à ingestão *ad libitum*, sem comprometer a ingestão de nutrientes essenciais (CANTÓ et al., 2009). Estudos anteriores (MCCAY et al., 1989) observaram que a RC com teor adequado de proteínas, vitaminas e minerais em ratos aumentou a longevidade dos mesmos em comparação com ratos alimentados *ad libitum*. Muitos estudos têm demonstrado o efeito benéfico da RC na longevidade de diferentes espécies como leveduras, *Caenorhabditis elegans* (verme nematoide), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e mamíferos como ratos, camundongos (KENYON, 2010) e macacos Rhesus (COLMAN et al., 2014). A RC tem sido praticada como um método para aumentar a longevidade em até 50% sem comprometer a qualidade de vida (BARTKE, 2005). A Figura 2 apresenta alguns efeitos observados em modelos submetidos à RC.

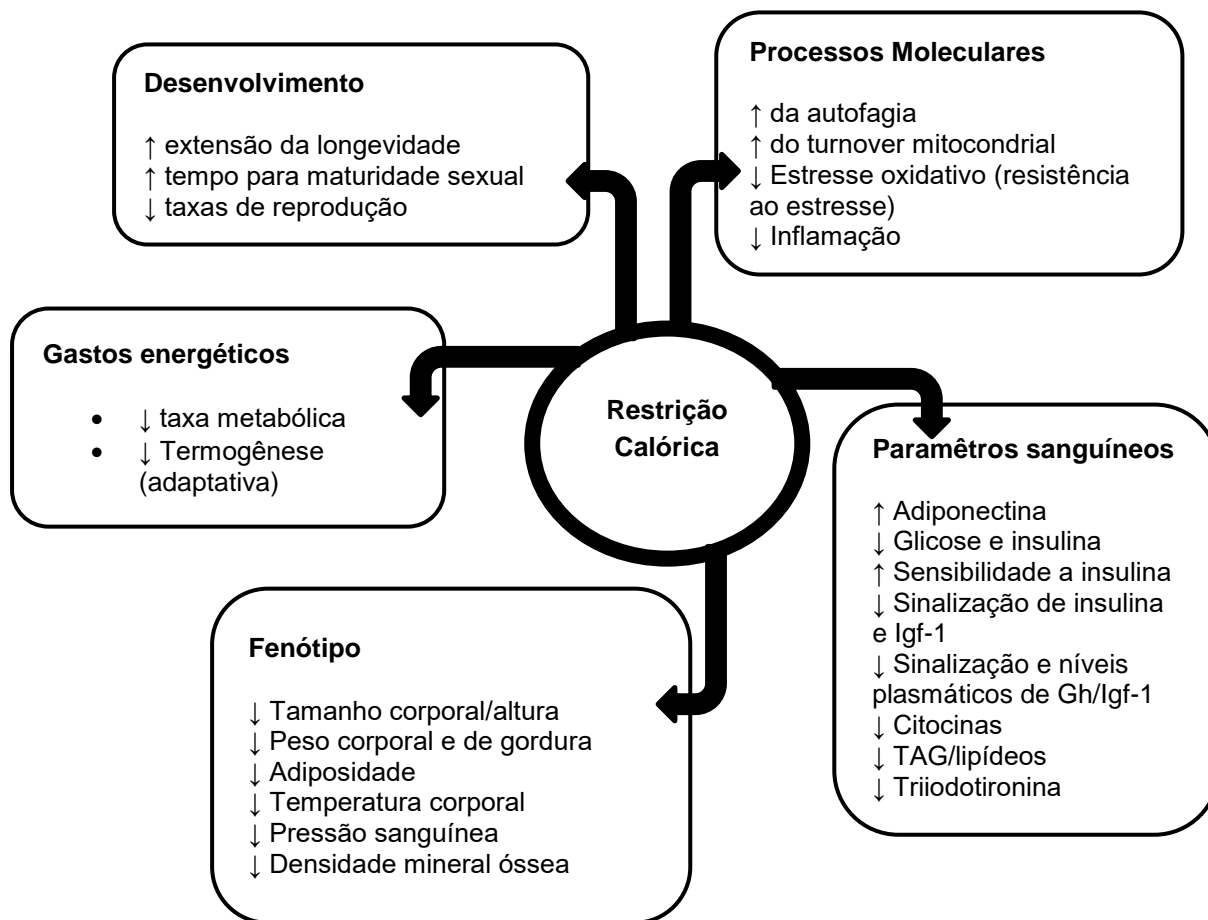


Figura 2 – Esquema dos alvos em que a restrição calórica pode atuar no organismo e que já foram documentados em estudos anteriores. Adaptada de (NIKOLAI et al., 2015). IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1), Gh (hormônio do crescimento) e TAG (triacilglicerídeos).

Além dos diversos estudos relacionando RC com o envelhecimento tardio, estudos também têm avaliado os efeitos da RC sobre a reserva ovariana. A contagem de folículos em camundongos fêmeas submetidas à RC apresentou maior número total de folículos, maior proporção de folículos primordiais e três vezes maior expressão do hormônio anti-mülleriano (Amh) (SHI et al., 2013). O Amh é um marcador da função das células da granulosa, onde é produzido, com importância no processo de recrutamento folicular, e que é usado para avaliar a reserva e o envelhecimento ovariano, um marcador e preditor da menopausa (BROER et al., 2014). Estes estudos sugerem que a RC pode reduzir a depleção da reserva ovariana por supressão do recrutamento de folículos e da ovulação.

Como mencionado anteriormente, a ativação dos folículos primordiais, um passo importante para a depleção da reserva ovariana, é um processo altamente regulado (SCHNEIDER et al., 2017) e que ainda não está totalmente compreendido (LIU et al., 2006). Estudos recentes sugerem que o alvo de sinalização mamífero da rapamicina (Mtor) pode estar envolvido na ativação dos folículos primordiais (ADHIKARI et al., 2009). O Mtor é uma serina/ubíqua treonina quinase regulada por nutrientes, diferentes estressores, fatores de crescimento e hormônios e participa do controle de funções celulares importantes como proliferação, crescimento e metabolismo celular e desempenha um papel essencial em múltiplas cascatas de sinalização como um efetor à jusante da via Pi3k/Akt/Foxo. O Mtor existe em 1 de 2 complexos: Mtorc1 e Mtorc2 (SCHMELZLE et al., 2000). O complexo 1 do Mtor é responsável pela integração de sinais de entrada nutricionais e metabólicos e por fosforilar diretamente uma proteína, P70S6K, que é estritamente sensível à rapamicina (BLAGOSKLONNY, 2010). Estudos têm sugerido que a supressão da atividade de sinalização de Mtor em oócitos poderia preservar os folículos primordiais em estado latente (ADHIKARI et al., 2009). Ratas expostas à restrição calórica (RC) suprimiram a atividade de sinalização Mtor e tiveram maior número de folículos primordiais do que de folículos primários, secundários e atrésicos quando comparadas a um grupo controle e a um grupo com dieta hiperlipídica (LI et al., 2015). Isso sugere que a transição de folículo primordial para o primário foi diminuída quando houve supressão da atividade de Mtor, representando um maior potencial reprodutivo e uma vida reprodutiva mais longa.

Em camundongos submetidos à RC, o número de folículos primordiais foi duas vezes maior que dos camundongos controle, e estes camundongos permaneceram férteis durante um período de tempo muito mais longo comparado aos controles (NELSON et al., 1985). Ratas do grupo RC apresentaram maior porcentagem de folículos primordiais e menores percentuais de folículos primários, secundários e atrésicos, indicando uma diminuição da transição, ativação dos folículos primordiais para os estágios posteriores (LI et al., 2011). Assim sendo, fatores que inibem a transição de um folículo primordial para um folículo primário e fatores que reduzem a atresia folicular podem aumentar a reserva de oócitos ao retardar a depleção de folículos, atrasando o envelhecimento ovariano.

Em suma, os mecanismos pela qual a RC atua ainda não estão totalmente elucidados, porém sabe-se que a RC tem efeito benéfico no atraso do envelhecimento ovariano, assim como na longevidade aumentada. A RC diminui a transição dos folículos primordiais para folículos primários, diminuindo a depleção ovariana e prolongando a vida reprodutiva em camundongos fêmeas e ratas.

Existem alguns camundongos modelos para o estudo do envelhecimento, que apresentam características semelhantes aos modelos de RC: os camundongos *Ames dwarf (df/df)* deficientes em Gh. Enquanto que camundongos normais vivem aproximadamente até 2 anos, camundongos mutantes com hipopituitarismo e resistentes à Gh, frequentemente sobrevivem até 3 anos ou até mais de 4 anos (BARTKE, 2005). Camundongos *Ames dwarf* possuem uma deficiência primária de Gh, prolactina e Tsh (hormônio estimulante da tireoide), assim tem uma reduzida sinalização da via Gh/Igf-1 (BARTKE, 2005). Esses camundongos apresentam características fenotípicas semelhantes a animais com deficiência de Gh incluindo redução do crescimento pós natal e diminuição do tamanho corporal adulto (BARTKE, 2005). Além disso, possuem níveis plasmáticos reduzidos de prolactina, Gh, Tsh, Igf-1, insulina, glicose (NELSON et al., 1985), diminuição do dano oxidativo (em proteínas, lipídios e DNA mitocondrial), diminuição da produção de EROs, melhora na sensibilidade à insulina e nas defesas antioxidantes (BROWN-BORG et al., 2001), secreção aumentada de adiponectina (AL-REGAIEY et al., 2005), aumento da resistência ao estresse, diminuição da temperatura corporal (HUNTER et al., 1999), esterilidade devido à falha luteal (BARTKE, 2005) e puberdade tardia. Apesar das fêmeas *df/df* serem inférteis, elas possuem ciclos hormonais normais, porém reduzidos e são capazes de ovular (CHANDRASHEKAR et al., 2004) e manter a gestação frente a estímulo hormonal. Os *Ames dwarf*, bem como os camundongos submetidos à RC, apresentam um aumento no número de folículos primordiais por conta de um atraso na depleção ovariana.

O eixo Gh/Igf-1 desempenha funções reguladoras na reprodução, aumenta a sensibilidade dos ovários para as gonadotropinas, aumentando assim, a estimulação e o desenvolvimento folicular (MAHRAN et al., 2015). Além dos efeitos supostamente relacionados com a longevidade, camundongos *df/df* apresentaram um número aumentado de folículos primordiais em comparação com camundongos

normais, verificou-se a diminuição da transição dos folículos primordiais para os estágios posteriores através da diminuição do número de folículos primários, secundários e terciários nesses camundongos, indicando um atraso no envelhecimento ovariano em camundongos *df/df* por conta da diminuição de ativação dos folículos primordiais, isso foi acompanhado pela redução da fosforilação de Foxo3a e caracterizado pela reduzida expressão de fatores de crescimento e inflamatórios (SACCON et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2017).

Os mecanismos propostos para explicar as vias pelo qual a RC e modelos *df/df* atuam na longevidade e na reserva ovariana ainda não estão totalmente elucidados. A Figura 3 ilustra uma possível via de sinalização envolvida na preservação dos folículos primordiais em camundongos fêmeas submetidas à RC e à rapamicina.

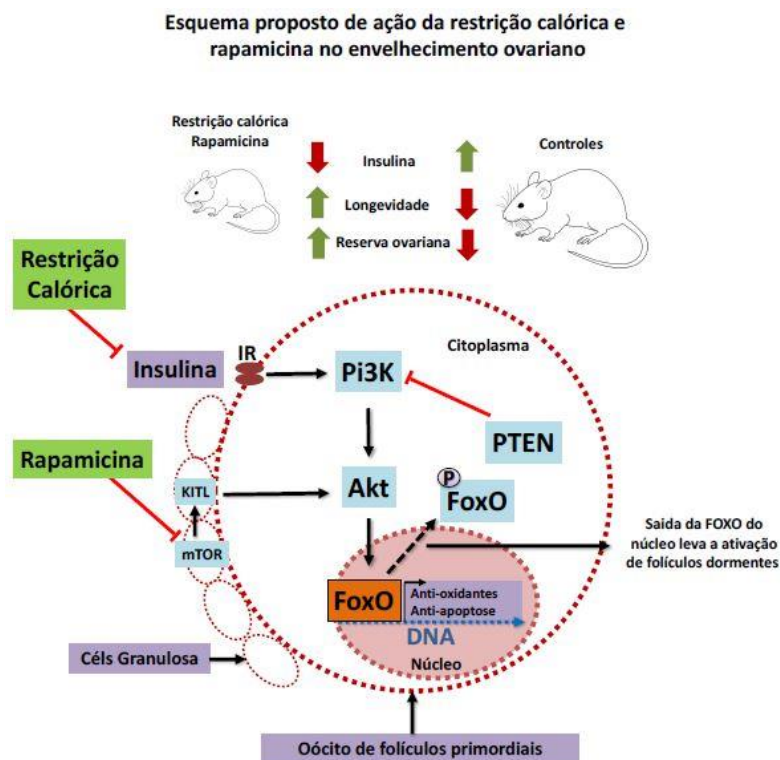


Figura 3. Via de sinalização proposta na preservação dos folículos primordiais em estado dormente em oócitos de camundongos submetidos à restrição calórica e à rapamicina. A ligação da insulina ao seu receptor no oócito leva à ativação de fosfoinositideo-3-quinase (Pi3k), que ativa proteína B quinase (Akt) que leva à fosforilação do fator de transcrição forkhead box (Foxo), mais especificamente o Foxo3a, fator de transcrição presente no núcleo do oócito. Uma vez

fosforilado. Foxo3a sai do núcleo para o citoplasma da célula, o que leva a ativação de folículos dormentes. Em camundongos normais, essa via seria a responsável pela depleção ovariana que ocorre durante a vida reprodutiva das fêmeas, por conta do aumento nos níveis de insulina; porém, em camundongos submetidos à restrição calórica (RC), que possuem uma diminuição dos níveis de insulina, supõe-se que esta via seja menos ativada ocasionando um atraso da ativação de folículos primordiais, mantendo assim a reserva ovariana e atrasando o envelhecimento ovariano. O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (Igf-1) também pode se ligar ao receptor da insulina desencadeando a ativação da via (não mostrado na figura). Da mesma forma, a rapamicina inibe a via do alvo mamífero da rapamicina (Mtor) que, através do receptor quinase Kit e seu ligante Kitl presente nas células da granulosa que rodeiam o ócito, também leva à ativação da Akt e fosforilação de Foxo3a. O Foxo3a presente no núcleo mantém as suas funções anti-oxidantes e anti-apoptóticas, protegendo o ócito de danos oxidativos.

2.4 Rapamicina e o envelhecimento somático e ovariano

Devido a limitações do uso da restrição calórica por um período prolongado para aumentar a longevidade, limitações estas como frio e diminuição da densidade mineral óssea, a busca por miméticos da RC que apresentem os mesmos efeitos sobre a longevidade e que possam ajudar a elucidar as vias envolvidas nesse processo se tornaram interessantes (NIKOLAI et al., 2015). A rapamicina é um fármaco imunossupressor (WULLSCHLEGER et al., 2006), muito utilizado na prática clínica em casos de transplantes de órgãos e devido às suas propriedades anti-proliferativas, no tratamento do câncer (NIKOLAI et al., 2015) e foi reconhecida como mimética da RC (POWERS et al., 2006). Sabe-se que a rapamicina quando fornecida de maneira contínua promove aumento da longevidade de maneira muito semelhante ao observado para animais submetidos à RC e animais deficientes em GH (ANISIMOV et al., 2011). A rapamicina aumenta a média de longevidade e diminuiu a incidência de tumores em camundongos fêmeas, além de diminuir o ganho de peso com a idade em fêmeas (BITTO et al., 2016; MAGDALON et al., 2017; YANIK et al., 2015). Outro estudo que analisou ovários envelhecidos de humanos e de camundongos mostrou hiperativação da sinalização Mtor em lesões patológicas da superfície do epitélio ovariano (BAJWA et al., 2016). A supressão da sinalização Mtor inibiu o desenvolvimento dessas lesões nos camundongos tratados com rapamicina, indicando que o tratamento de células humanas de câncer ovariano

com inibidores de Mtor diminuiu significativamente o crescimento e a viabilidade destas células (BAJWA et al., 2016).

A rapamicina inibe a via Mtor (SARBASSOV et al., 2006), mais especificamente o complexo Mtorc1, que é sensível à rapamicina (BLAGOSKLONNY, 2010). A via Mtor é essencial para a regulação do processo de envelhecimento ovariano. Ela responde a sinais de fatores de crescimento (insulina/Igf-1), estresse, estado de energia, oxigênio e nutrientes como aminoácidos para processos de controle incluindo síntese protéica e lipídica (WULLSCHLEGER et al., 2006). Em estudo recente com ovários de camundongos *Ames dwarf* (SCHNEIDER et al., 2017) o sequenciamento de RNA mostrou que vários genes da via Mtor são regulados entre genótipos neste modelo, associados a um reduzido envelhecimento ovariano.

Estudos feitos com deleção gênica de componentes importantes para a ativação do complexo Mtor indicam que a ativação do Mtorc1 e o aumento da sinalização Akt estimulam sinergicamente o crescimento dos folículos primordiais (CHENG et al., 2015). Logo, a sinalização Mtor e Akt poderia atuar em conjunto para promover a ativação do folículo primordial. Utilizando um estimulador da via Mtor para promover o crescimento folicular ovariano de camundongos *in vivo* e *in vitro* em ovários, após 10 dias de tratamento com ativadores de Mtor e Akt, os resultados indicaram aumento no número de folículos antrais/pré-ovulatórios, acompanhados de uma diminuição dos folículos primordiais, confirmando a capacidade de estimuladores de Akt, incluindo inibidores de Pten (regulador negativo da via Pi3k) e ativadores de Pi3k, para promover o crescimento do folículo secundário (CHENG et al., 2015). Assim, espera-se que a rapamicina, por inibir a via Mtor, tenha um efeito de diminuir a taxa de ativação de folículos primordiais.

Além disso, estudos associando o uso de rapamicina para o tratamento de obesidade em ratos com dieta hiperlipídica concluíram que o tratamento com rapamicina por 14 semanas diminuiu significativamente o peso corporal, a ingestão de calorias, os níveis séricos de leptina, níveis de glicose em jejum e a quantidade de tecido adiposo no grupo com dieta hiperlipídica (BRUCE et al., 2015). A administração crônica da rapamicina em ratos submetidos à dieta hiperlipídica diminuiu a ingestão de alimentos, aumentou a perda de peso e a perda específica de

massa gorda, porém também a intolerância à glicose e hiperinsulinemia (DEBLON et al., 2012).

Os processos envolvidos no envelhecimento somático e no envelhecimento ovariano, nos efeitos da RC e da rapamicina sobre a longevidade, bem como os efeitos já demonstrados da RC sobre o envelhecimento ovariano ainda não estão totalmente esclarecidos. As vias envolvidas e a forma como esses processos ocorrem no organismo ainda precisam ser elucidados, a fim de que possam surgir novas perspectivas quanto a fármacos ou tratamentos dietéticos como métodos de atraso do envelhecimento ovariano e aumento da fertilidade na vida tardia.

2.5 Objetivo Geral

Comparar os efeitos da rapamicina e da restrição calórica na reserva folicular, e na expressão gênica ovariana em camundongos C57BL/6.

2.6 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o consumo e o ganho de peso em camundongos fêmeas submetidas à RC e à rapamicina;
- ✓ Avaliar a sensibilidade à insulina e à glicose em camundongos fêmeas submetidas à RC e à rapamicina;
- ✓ Avaliar a contagem de folículos primordiais, em transição, primários, secundários e terciários em camundongos fêmeas submetidas à RC e à rapamicina;
- ✓ Avaliar a expressão gênica ovariana de genes relacionados com a atividade, ativação de folículos primordiais e crescimento folicular em camundongos fêmeas submetidas à RC e à rapamicina;
- ✓ Quantificar EROs em ovários de camundongos fêmeas submetidas à RC e à rapamicina;

2.7 Hipótese

A rapamicina diminui a ativação de folículos primordiais de maneira semelhante ao observado em fêmeas submetidas à RC e ambas mediadas pela expressão da Foxo3a.

3 Metodologia

Esse estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal, número 23110.009349/2016-31 (Anexo 1). Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e mantidos no Laboratório Experimental da Faculdade de Nutrição da UFPel. Foram utilizados 36 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade de 30 dias, mantidos em condições controladas de temperatura, luz e umidade (22 ± 2 °C, ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro e 40%-60%) respectivamente. Os camundongos foram mantidos em caixas com as seguintes características: medidas 65x25x15 cm, feita de prolipropileno com tampa em arame galvanizado, com bebedouro em prolipropileno com capacidade de 700 ml, rolha cônica de borracha e bico de aço inoxidável. O assoalho foi coberto por maravalha. Os animais foram alojados em grupos de 4 animais por gaiola conforme recomendações com presença de tubo PVC e algodão na caixa.

3.1 Manejo dos animais

Os 36 camundongos foram distribuídos em três grupos de 12 animais cada de maneira que a média de peso dos grupos fossem semelhantes: grupo controle, grupo tratamento com rapamicina e grupo submetido à restrição calórica de 30%. Todos animais foram alimentados com ração padrão para roedores (Nuvilab[®] CR-1), e com água *ad libitum*, sendo o grupo controle e o da rapamicina com ração *ad libitum* e para o grupo RC foi calculada uma quantidade 30% menor, levando-se em consideração a média do consumo da semana anterior do grupo controle. Optou-se por uma RC de 30%, visto que estudos têm mostrado que a RC de até 40% é bem tolerada por camundongos, não causando nenhum problema de desnutrição e, inclusive, aumentando a saúde e longevidade desses animais (WEINDRUCH et al., 1986). Todos os animais passaram por uma semana de adaptação *ad libitum* para

ração e água e logo após foram tratados segundo seu grupo. As fêmeas da RC começaram a semana após o período de adaptação com uma RC de 10%, na semana seguinte passou para 20% e na terceira semana em diante, uma RC de 30%, conforme já validado (RIBEIRO et al., 2009).

Os animais do grupo tratamento receberam a rapamicina (InLab, Brasil), previamente diluída em DMSO e com devido ajuste de concentração preparado seguindo o protocolo de diluição com PEG, TWEEN 80% e DMSO (FANG et al., 2013). A rapamicina foi aplicada intraperitonealmente a cada dois dias durante 93 dias com uma dose de 4mg/kg de peso corporal (FANG et al., 2013; WILKINSON et al., 2012). Para os animais do grupo controle e da RC foi administrado intraperitonealmente a cada dois dias durante 93 dias uma solução placebo feita com os mesmos veículos da solução de rapamicina (PEG, TWEEN 80% e DMSO), porém sem a rapamicina.

Os dados de consumo da ração de todos os grupos foram coletados todos os dias durante os 93 dias, sendo que todos os dias foi reposta a quantidade de ração calculada para um dia para o grupo da RC. Os dados de peso corporal foram coletados uma vez na semana.

Ao final do período de 93 dias, todos os animais foram eutanasiados após jejum de 4 horas, anestesiados por via inalatória com isoflurano, após feita exsanguinação por punção cardíaca, seguida de deslocamento cervical. O procedimento foi realizado em sala específica e isolada, localizada anexa ao local onde os animais foram mantidos. Os camundongos foram dissecados e os ovários coletados e estocados: um ovário a -80°C e outro em solução de formol a 10% para análises histológicas.

3.2 Teste de Tolerância à Insulina e Teste de Tolerância à Glicose

Aos 85 dias do experimento, uma semana anterior a eutanásia, foi realizado o Teste de Tolerância à Insulina (TTI) e o Teste de Tolerância à Glicose (TTG). Os camundongos de cada grupo foram divididos e metade fez o TTI e outra metade o TTG. O TTI foi feito para avaliar a sensibilidade periférica à insulina e o metabolismo da glicose. Foi administrada a dose de 1 UI/kg de peso corporal de insulina intraperitonealmente após duas horas de jejum. O sangue foi coletado através de uma pequena incisão na ponta da cauda nos seguintes tempos: 0,5 e 20 minutos

após a injeção de insulina e os níveis de glicose foram mensurados com um glicosímetro (AccuChek Activ, Roche Diagnostics®, USA) (FANG et al., 2013). O TTG foi feito para avaliar a resistência à insulina e o metabolismo da glicose. Administrou-se 2g de glicose/kg de peso corporal intraperitonealmente após 12h de jejum. O sangue também foi coletado através de uma pequena incisão na ponta da cauda nos seguintes tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção de insulina e os níveis de glicose foram mensurados com um glicosímetro (BENNIS et al., 2017).

3.3 Contagem de folículos

Os ovários foram retirados do formol tamponado 10%, desidratados em álcool, clareados em xilol e incluídos em parafina. Os ovários incluídos em parafina foram sequencialmente cortados a uma espessura de 5µm no micrótomo semi-automático Leica modelo RM2245 (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK). Foram selecionados 1 a cada 6 cortes e colocados em lâminas histológicas padrão. Todo o ovário foi cortado e utilizado. As lâminas, após secagem na estufa a 56°C por 24 horas, foram coradas por hematoxilina-eosina e montadas com lamínulas e resina sintética (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, EUA). As imagens dos cortes ovarianos foram capturadas por uma câmera digital Moticam 5.0 (Motic®, Hong Kong, China) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation, Japan), utilizando objetivas de 4, 10 e 40X. Os folículos quantificados foram aqueles que apresentaram o núcleo dos oócitos claramente visível. A quantidade final de folículos foi multiplicada duas vezes, mimetizando a quantidade de folículos dos dois ovários e foi multiplicada por seis para contabilizar a amostragem por seção. O total de ovários contados por grupo foi de 5. O protocolo utilizado foi baseado em MYERS et al. (2004).

Foi classificado como folículo primordial aquele em que o oócito é rodeado por uma única camada de células da granulosa achatadas. O folículo em transição foi classificado como aquele em que ao menos uma célula da granulosa em formato cuboide. O folículo primário foi classificado como aquele em que um oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa em formato cuboide. Um folículo foi determinado como sendo um folículo secundário quando rodeado por mais do que uma camada de células da granulosa cuboide, sem antro visível, e um folículo foi determinado como sendo um de folículos terciário se um espaço antral estiver

claramente definido e preenchido por líquido folicular e uma camada de células da granulosa em torno do oócito (MYERS et al., 2004).

3.4 Extração de RNA

A extração de RNA total do ovário foi realizada utilizando protocolo com reagente isotiocianato de guanidina (Trizol, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) associado a um kit de purificação por coluna (Quiagen, Hilden, Alemanha), conforme o protocolo do fabricante. Brevemente, foi utilizado Trizol para homogeneizar o tecido usando um homogeneizador de tecidos. Após centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos à 4°C, foi coletado o sobrenadante descartando os restos celulares e eventual porção gordurosa. As amostras foram incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente a fim de completar a dissociação das nucleoproteínas complexas. Após adição de clorofórmio, o tubo foi manualmente agitado por 15 segundos e incubado por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e depois centrifugado a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Neste procedimento foram separadas 3 fases. A fase aquosa contendo o RNA foi removida e armazenada em um novo tubo livre de ribonucleases. Para a precipitação do RNA, foi adicionado isopropanol 100% para cada amostra, as quais foram incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos e transferidos para a coluna. O RNA foi então eluído em 20 µL de H₂O livre de ribonucleases e sua concentração foi aferida utilizando espectrofotômetro (NanoDrop Lite, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), em que a pureza das amostras foi verificada através da taxa de absorbância 260/280 nm. Todas as amostras foram ajustadas para 200 ng/µL. As amostras obtidas foram guardadas à -80°C até sua utilização.

3.5 Análise da Expressão Gênica

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando kit comercial (iScript cDNA Synthesis Kit, Biorad, Hercules, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A PCR em tempo real (RTq-PCR) foi conduzida usando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) no equipamento StepOne 7500 RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para cada ensaio foram corridos 45 ciclos (95°C durante 15s e 60 °C durante 60s) e uma curva de dissociação foi incluída no final da reação para verificar a amplificação de um

único produto de PCR. Os genes β -2-microglobulina (β 2m) e β Actina (β Act) foram utilizados como controles endógenos.

Foram analisados os genes relacionados à reserva ovariana: fator de diferenciação de crescimento 9 (Gdf9), hormônio anti-mulleriano (Amh), proteína morfogenética óssea 15 (Bmp-15), genes relacionados à ativação de folículos primordiais: proteína quinase B (Akt1), fosfoinositídeo-3-quinase (Pi3k), alvo de sinalização mamífero da rapamicina (Mtor), Fator de Transcrição Forkhead Box da classe O3a (Foxo3a), receptor tirosina quinase Kit de células da granulosa e *Kit Ligand* (Kitl). A sequência de primers dos genes analisados encontram-se na Tabela 1.

A expressão relativa foi calculada a partir da equação $2^{A-B}/2^{C-D}$ (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra analisada; C, a média geométrica dos valores de Ct para os genes β 2m e β act na primeira amostra do controle e D, a média do Ct para os genes β 2m e β act na amostra analisada). A primeira amostra do controle foi expressa como 1,00 por esta equação, e todas as outras amostras foram calculadas em relação a este valor. Depois disso, os resultados do grupo controle foram ponderados, e todos os outros resultados foram divididos pelo valor médio da expressão relativa no grupo controle, para se obter a mudança na expressão dos genes de interesse em comparação com o grupo controle (Fold change) (MASTERNAK et al., 2005).

Tabela 1. Pares de primers (*forward* e *reverse*) utilizados no experimento.

Gene	Primers	Tamanho	Código
β-2-microglobulina (β2m)	F: AAGTATACTCACGCCACCCA R: CAGGCGTATGTATCAGTCTC	217	NM_00935.3
β-Actina (βact)	F: GAGACCTTCAACACCCCAGC R: ATGTCACGCACGATTTCCC	263	NM_007393.5
Proteína quinase B (Akt1)	F: CCGGTTCTTTGCCAACATCG R: ACACACTCCATGCTGTCATCTT	168	NM_001331107.1
Fosfoinosítido-3-quinase (Pi3k)	F: TAGCTGCATTGGAGCTCCTT R: TACGAACTGTGGGAGCAGAT	119	XM_006507441.3
Alvo de sinalização mamífero da rapamicina (Mtor)	F: CGGCAACTTGACCATCCTCT R: TGCTGGAAGGCGTCAATCTT	101	XM_006539077.2
Fator de Transcrição Forkhead Box da classe O3a (Foxo3a)	F: CGGCTCACTTTGTCCCAGAT R: GCCGGATGGAGTTCTTCCA	106	XM_006512806.1
Fator de diferenciação de crescimento 9 (Gdf9)	F: AATACCGTCCGGCTCTTCAG R: GGTAAACAGCAGGTCCACCAT	97	XM_006532220.3
Hormônio anti-mulleriano (Amh)	F: TCCTACATCTGGCTGAAGTGATATG R: CAGGTGGAGGCTCTTGGAAGT	66	XM_006513119.3
Proteína morfogenética óssea 15 (Bmp-15)	F: GAGCGAAAATGGTGAGGCTG R: GGCGAAGAACAACACTCCGTCC	342	NM_009757.5
Receptor tirosina quinase Kit	F: CTCCCCAACAGTGTATTAC R: TAGCCCGAAATCGAAATCTT	90	NC_000071.6
Kit Ligand (Kitl)	F: TTCGCACAGTGGCTGGTAAC R: TTCACAGCGAAGCACTCTGC	163	NM_013598.3
Superóxido dismutase 2 (Sod2)	F: AAGGAGCAAGGTCGCTTACA R: ACACATCAATCCCCAGCAGT	94	NM_013671.3
Catalase (Cat)	F: AGGAGGCAGAACTTTCCCAT R: TTTGCCAACTGGTATAAGAGGGTA	86	NM_009804.2
Phosphatase and tensin homolog (Pten)	F: TGGATTCGACTTAGACTTGACCT R: GCGGTGTCATAATGTCTCTCAG	180	NM_008960.2

3.6 Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Os ovários foram homogeneizados em tampão Tris-HCL (10mM) pH 7,4. Para dosagem dos níveis de EROs, os homogeneizados foram diluídos no mesmo tampão de homogeneização na proporção de 1:9. Em seguida, os níveis de proteína foram determinados segundo o método de (LOWRY et al., 1951) utilizando albumina sérica como solução padrão.

A formação de EROs foi determinada conforme descrito anteriormente (ALI et al., 1992) com algumas modificações. O método foi baseado na oxidação de Diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) em fluorescente diclorofluoresceína (DCF). A fluorescência de DCF foi medida utilizando excitação a 485 nm e emissão a 520 nm

30 minutos após a adição de DCFH-DA na amostra. Os níveis de EROs foram expressos em $\mu\text{mol DCF/mg}$ de proteína.

3.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 6.0. O teste estatístico One Way ANOVA foi utilizado para as análises de variáveis contínuas (EROs, contagem de folículos e expressão gênica), utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas para a análise do consumo, peso corporal, TTI e TTG. Quando significativo, o teste de t foi utilizado para comparar as médias individuais. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4 Resultados e Discussões

4.1 Consumo da ração e ganho de peso

O consumo da ração foi maior no grupo rapamicina em relação ao grupo RC ($P < 0,0001$) a partir da terceira semana de experimento. A partir da sétima semana até o final do experimento o consumo do grupo RC foi menor que no grupo controle (Figura 4A). Não houve diferença entre o consumo do grupo rapamicina e controle.

O peso corporal foi menor no grupo RC ($P < 0,0001$). O peso corporal das fêmeas do grupo RC foi menor que no grupo controle entre a terceira semana até o final do experimento, sendo que a partir da quarta semana foi menor que no grupo rapamicina. Não houve diferença no peso corporal entre o grupo rapamicina e controle (Figura 4B). Importante ressaltar que a partir da metade do experimento, o grupo RC, apesar de apresentar o menor peso comparado aos demais grupos não sofreu perda de peso, mas sim as fêmeas mantiveram o seu peso até o final do experimento.

O ganho de peso e o consumo foram menores no grupo RC, como esperado, já que houve a diminuição intencional na oferta de ração e, portanto, no consumo. Não houve diferença entre o ganho de peso do grupo rapamicina comparado ao grupo controle, o que pode ser justificado pelo consumo semelhante entre os grupos, pela dosagem de rapamicina utilizada e pela duração do tratamento com rapamicina. Estudos anteriores demonstraram efeito sobre o peso e o consumo dependente da

duração do tratamento com rapamicina (FANG et al., 2013). No entanto, foi observado que a taxa de ganho de peso diminuiu de forma diretamente proporcional à dose de rapamicina (8mg/kg) (JOHNSON et al., 2015), sendo administrado o dobro do utilizado no presente experimento.

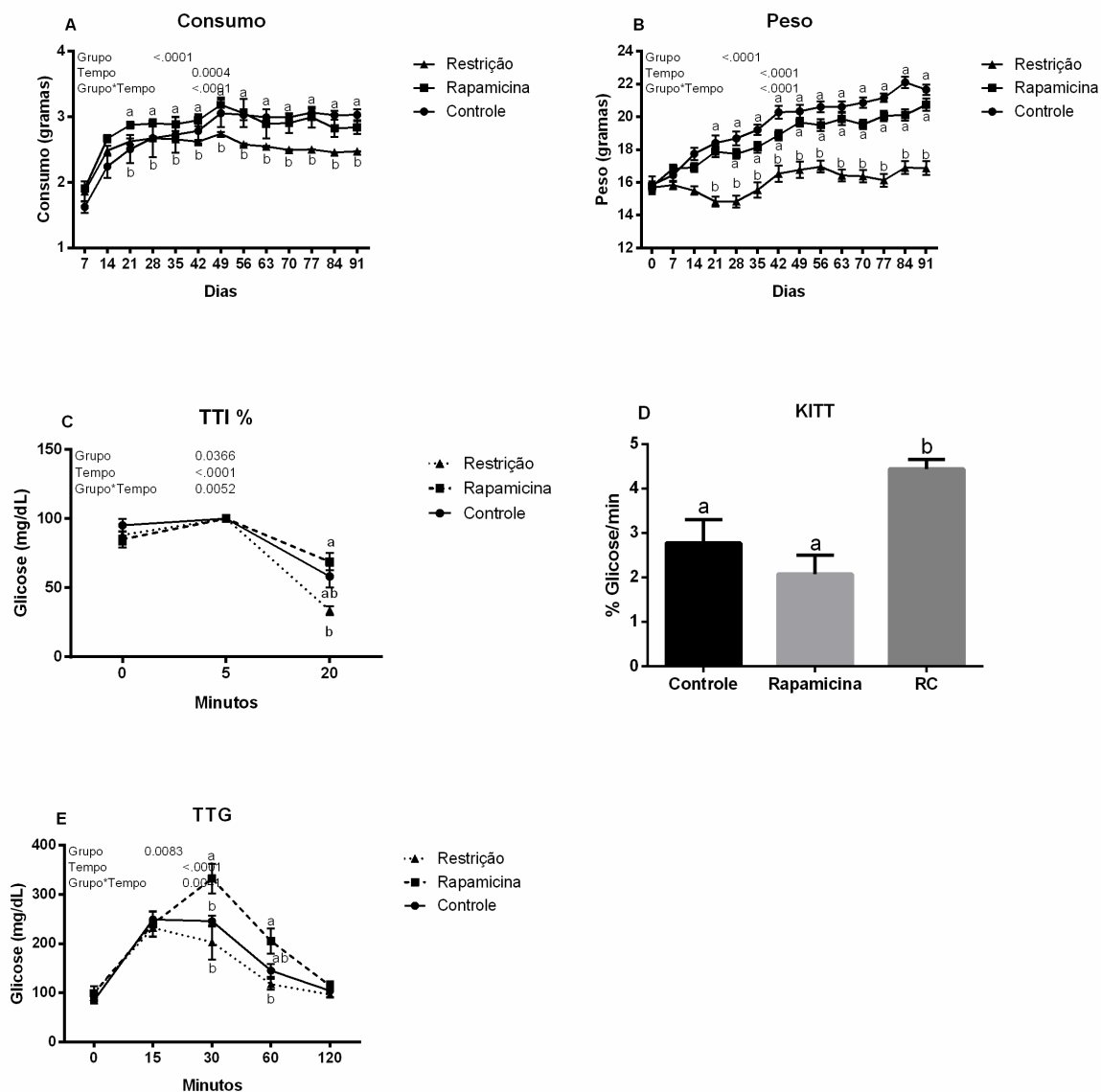


Figura 4. Análise do consumo da ração (A), peso corporal (B), Teste de Tolerância à insulina (TTI) (C), Constante de decaimento da glicose (KITT) (D) e Teste de Tolerância à Glicose (TTG) (E) dos grupos restrição calórica (RC), rapamicina e controle comparados ao devido tempo de experimento. Letras diferentes representam diferença entre os grupos ($P < 0,05$). Valores foram representados como média \pm erro padrão.

4.2 Teste de Tolerância à Insulina

Quanto ao TTI, os menores níveis glicêmicos foram observados para o grupo RC ($P = 0,0067$). O grupo RC apresentou menor nível glicêmico no tempo 20 que o grupo rapamicina (Figura 4C). Quanto a (KITT), (Figura 4D), o grupo RC apresentou uma porcentagem de decaimento de glicose por minuto duas vezes maior que o grupo rapamicina e 1,5 vezes maior que o grupo controle ($P = 0,0006$ e $P = 0,0115$, respectivamente). Não houve diferença entre as porcentagens entre os grupos controle e rapamicina ($P = 0,3187$). Assim, as fêmeas do grupo RC tiveram maior sensibilidade à insulina durante o teste comparado ao grupo controle e ao rapamicina. Já foi encontrada maior expressão de GLUT4, transportador de glicose, no músculo de camundongos submetidos à RC comparado com controle *Ad libitum*, aumentando a eficiência em levar a glicose para dentro da célula (WIESENORN et al., 2014). Além disso, aumento dos níveis plasmáticos de adiponectina, hormônio envolvido com a sensibilidade à insulina, devido à diminuição da gordura corporal podem contribuir para este efeito (NIKOLAI et al., 2015).

4.3 Teste de Tolerância à Glicose

Os maiores níveis glicêmicos no TTG foram observados para o grupo rapamicina ($P = 0,0083$), quando comparada ao grupo controle e RC no tempo 30 e ao grupo RC nos 60 minutos do teste (Figura 4E). Portanto, as fêmeas do grupo rapamicina apresentaram maior intolerância à glicose. Resultado semelhante foi encontrado quando o tratamento foi de 2, 6 e 20 semanas, porém a partir da vigésima semana notou-se uma metabolização mais rápida da glicose, embora a glicemia ainda fosse maior no grupo rapamicina comparado ao controle (FANG et al., 2013). Estudos têm associado o efeito da rapamicina sobre a resistência à insulina à inibição de via de sinalização dependente de insulina que leva a expressão de transportadores de glicose GLUT 4, que contribuem para esse efeito sobre o músculo e o aumento da lipólise hepática também parece contribuir (DEBLON et al., 2012).

4.4 Contagem de folículos

A análise da quantidade média de folículos está representada na Figura 5. Tanto as fêmeas do grupo rapamicina quanto as do grupo RC tiveram duas vezes mais folículos primordiais quando comparadas ao grupo controle ($P = 0,0422$ e $0,0223$ respectivamente) (Figura 5A). Nos folículos em transição, não houve diferença no número de folículos entre os grupos ($P = 0,0802$); porém, o grupo rapamicina teve uma tendência de menor número de folículos em transição em comparação com o controle ($P = 0,0601$) (Figura 5B). O número de folículos primários foi duas vezes menor nos grupos rapamicina e RC quando comparados ao grupo controle ($P = 0,0005$) (Figura 5C). Observou-se que tanto o grupo rapamicina quanto o grupo RC apresentou quase duas vezes menor o número de folículos secundários quando comparado ao grupo controle ($P = 0,0008$) (Figura 5D). O grupo RC apresentou aproximadamente duas vezes menos folículos terciários que o grupo controle ($P = 0,0051$); já o grupo rapamicina apresentou uma tendência em ser menor que o controle ($P = 0,0633$) e no grupo RC houve uma tendência a ter menor número de folículos que o grupo rapamicina ($P = 0,0669$), (Figura 5E). Quanto ao número total de folículos (Figura 5F), não houve diferença entre os grupos controle, rapamicina e RC ($P = 0,6843$), demonstrando que a quantidade média de folículos por fêmea de cada grupo não variou, mas sim a distribuição dos diferentes folículos e seus estágios de crescimento entre os grupos.

Foi observado o dobro de folículos primordiais no grupo rapamicina e no RC quando comparado ao grupo controle, corroborando com outros estudos (ZHANG et al., 2017, 2013), em que também observaram maior número de folículos primordiais em ratas, quando submetidas à rapamicina com dose de 5mg/kg de peso durante o período de 10 semanas de tratamento. Porém, diferentemente desse estudo, encontraram diferença entre o peso corporal e consumo de ração, em que as fêmeas do grupo rapamicina tiveram menor consumo e menor ganho de peso quando comparadas ao grupo controle (ZHANG et al., 2013). Com relação à rapamicina no presente estudo, os efeitos no ovário foram vistos mesmo sem aparecer os efeitos sobre o metabolismo, ou seja, independentemente, como visto que nesse estudo a rapamicina não alterou o peso corporal e o consumo das fêmeas, mas ainda assim demonstrou um efeito benéfico sobre a preservação da

reserva ovariana, indicando que mesmo doses menores, sem intenso efeito sistêmico, podem ajudar na preservação dos folículos ovarianos.

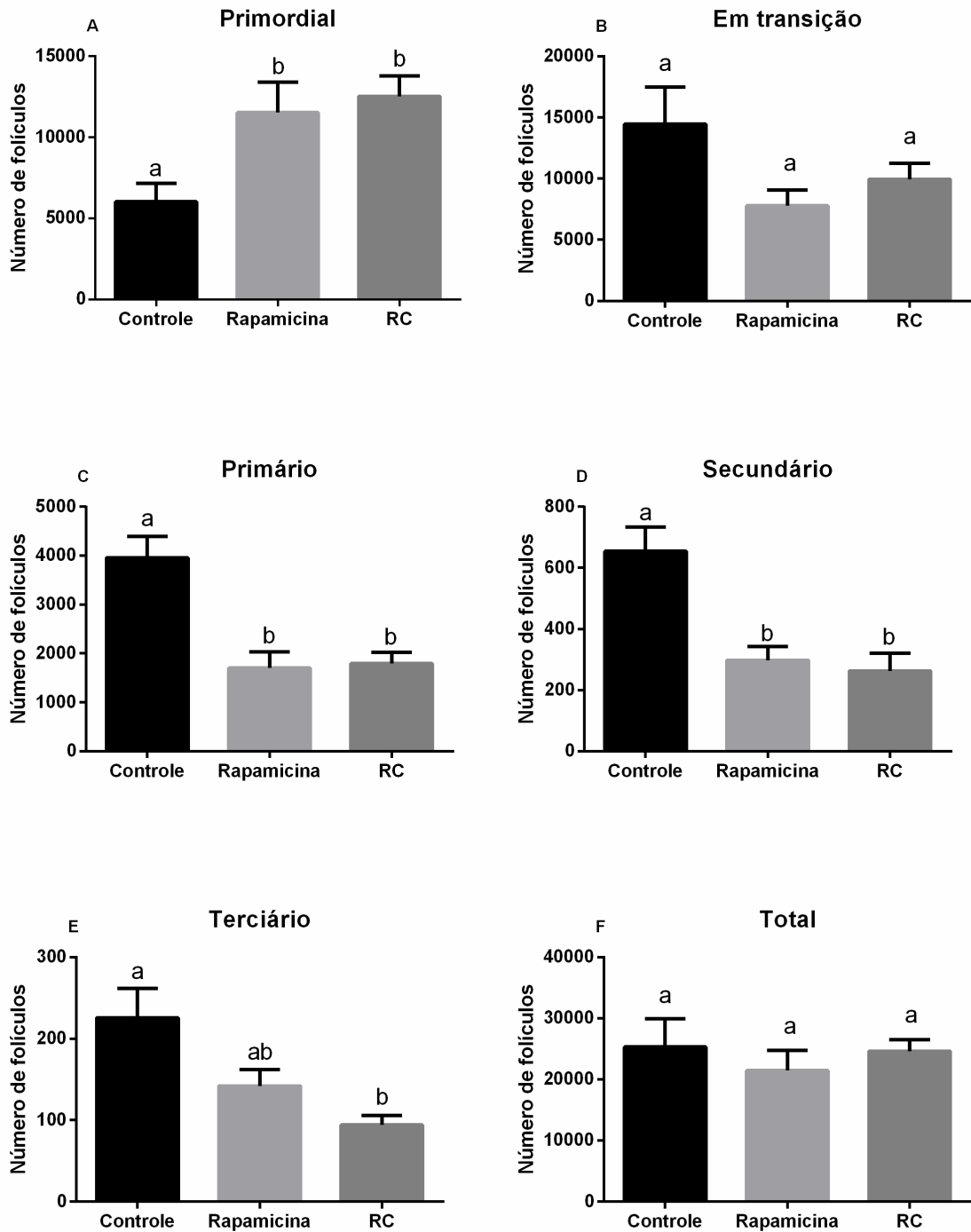


Figura 5. Análise da quantidade média de folículos em diferentes estágios de crescimento. Folículos primordiais (A), em transição (B), primários (C), secundários (D), terciários (E) e o total de

folículos (F) por grupo: controle, rapamicina e restrição calórica. Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$). RC (restrição calórica). Valores foram representados como média \pm erro padrão.

Em relação à RC, estudos têm demonstrado um aumento significativo nos folículos primordiais em fêmeas submetidas a esse tratamento (LI et al., 2011, 2015; WANG et al., 2014; XIANG et al., 2012), o que concorda com o observado no presente estudo, em que as fêmeas apresentaram duas vezes mais folículos primordiais do que as fêmeas do grupo controle. É interessante comentar que efeitos contrários são observados em ovários submetidos a tratamento com dieta hiperlipídica, onde está é responsável por diminuir os níveis de folículos primordiais. Ao submeter um grupo de ratas à RC e compará-lo com um grupo controle e um grupo com dieta hiperlipídica obteve-se como resultado que as fêmeas que estavam com a dieta hiperlipídica tiveram duas vezes menos folículos primordiais comparado ao grupo RC e metade do número desses folículos quando comparados ao grupo controle (WANG et al., 2014). Quanto aos folículos primários e secundários foram observados um número duas vezes menor nos grupos rapamicina e RC quando comparados com o grupo controle e isso confere com resultados anteriores para RC (LI et al., 2011; WANG et al., 2014). No entanto, diferentemente do presente estudo, (ZHANG et al., 2013) em seu estudo com a rapamicina, não encontraram diferença estatística no número de folículos primários e secundários em ratos. No presente estudo, considerou-se separadamente os folículos em transição e os primários, o que não foi observado em outros estudos. Nesses estudos, os folículos em transição foram considerados juntamente ao grupo de folículos primários. Embora não tenha sido observada diferença estatística entre os grupos no número de folículos em transição, no presente estudo, houve uma tendência a um menor número desses folículos no grupo rapamicina em comparação ao controle.

O número de folículos terciários no presente estudo foi duas vezes menor no grupo RC em comparação com o grupo controle, porém para o grupo rapamicina, observou-se uma tendência em ser menor que o grupo controle e maior que no grupo RC. LI et al. (2011) não encontraram diferença no número de folículos antrais de ratos entre o grupo controle e RC de 45%. De maneira semelhante, LI et al. (2015), não encontraram diferença entre o número de folículos antrais de ratos do

grupo RC entre um grupo controle e um grupo com dieta hiperlipídica, isso contrasta com os resultados do presente estudo. Entretanto, deve-se levar em consideração a diferença de idade e tempo de tratamento utilizados entre os estudos. Nos estudos citados, a idade dos ratos era de 8 semanas de idade e 10 semanas de tratamento, enquanto que no presente estudo as fêmeas tinham aproximadamente 4 semanas de idade e duração de quase 13 semanas.

Era esperado que a RC diminuísse o número de folículos antrais, visto que ela diminui a ativação de folículos primordiais para o seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, a diminuição dos níveis de Igf-1 e insulina na RC poderiam prejudicar o crescimento de folículos antrais, que necessitam desses hormônios para manterem o seu crescimento e sobrevivência (ARMSTRONG, 1997). Quanto ao número de folículos terciários do grupo rapamicina, diferentemente dos resultados observados no presente estudo, (ZHANG et al., 2013) encontraram menor número de folículos antrais de ratos no grupo rapamicina quando comparado ao grupo controle. Também é importante lembrar a diferença na dosagem utilizada no estudo citado (5mg/kg de peso corporal), o tempo de tratamento (10 semanas) e a idade das fêmeas (8 semanas). Era esperado que o número de folículos antrais no grupo rapamicina fosse maior que no grupo RC, afinal diferentemente da RC, os níveis de Igf-1 e insulina não deveriam ser alterados com a rapamicina, assim mantendo o crescimento e sobrevivência desse folículo.

Nota-se que, com exceção do número de folículos terciários, em que houve uma tendência a ser menor no grupo RC quando comparado ao rapamicina, não houve diferença na quantidade dos demais folículos entre o grupo rapamicina e RC, demonstrando que ambos os tratamentos tiveram efeitos semelhantes sobre o número de folículos. Portanto, esse estudo permite observar a comparação entre os efeitos semelhantes da rapamicina e da RC no ovário.

Por fim, vale citar os modelos de camundongos *Ames dwarf (df/df)*, que são camundongos com deficiência primária de GH e com isso apresentam níveis baixos de Igf-1 e uma série de características físicas e metabólicas que se assemelham ao animais submetidos à RC. Já foi demonstrado anteriormente que esse modelo apresenta efeitos semelhantes à RC também no ovário, apresentando um número três vezes maior de folículos primordiais quando comparado a um controle sem a

deficiência e uma diminuição nos folículos primários, secundários e terciários (SACCON et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2017).

4.5 Expressão gênica

Os gráficos da análise da expressão gênica estão representados nas Figuras 6 e 7. Não houve regulação em nível de expressão gênica dos seguintes genes analisados: Amh ($P = 0,3310$), Gdf9 ($P = 0,5126$), Bmp-15 ($P = 0,2482$), Kit ($P = 0,4737$), Kitl ($P = 0,3550$), Mtor ($P = 0,5138$), Pi3k ($P = 0,1348$), Sod2 ($P = 0,2728$), Cat ($P = 0,2610$) e Sirt1 ($P = 0,2847$) (Figura 6A, B C, D, E, F e Figura 7A, 7D, 7E e 7F respectivamente) entre os grupos. Diferença estatística foi observada na expressão dos genes Foxo3a e Akt1, em que no grupo RC e rapamicina a expressão gênica de Foxo3a foi maior quando comparada ao grupo controle ($P = 0,0199$ e $0,0149$, respectivamente). Houve uma tendência da expressão de Foxo3a ser maior no grupo RC em relação à rapamicina ($P = 0,0640$). Em relação ao gene Akt1, a expressão foi menor no grupo RC quando comparado ao grupo rapamicina ($P = 0,0094$) e não houve diferença entre o grupo controle e rapamicina ($P = 0,8212$) e entre o grupo controle e RC ($P = 0,1694$).

Esperava-se que os níveis de Amh fossem maiores nos grupos rapamicina e RC, porém no presente estudo não houve diferença nesses grupos comparado ao controle. É importante lembrar que foi utilizado o ovário inteiro para a expressão gênica e que se sabe que o Amh é um hormônio liberado não só pelos folículos primordiais, mas também por primários e secundários (SKAŁBA et al., 2008) e isso poderia compensar os valores, não sendo, portanto um marcador específico para a reserva ovariana que seriam os folículos primordiais. Uma outra consideração importante é a respeito da limitação do uso da análise de expressão gênica, pois nem sempre a quantidade de mRNA refletirá na quantidade de proteína produzida e muitas vezes, mesmo com uma menor quantidade de mRNA, a quantidade de proteína pode ser maior, enquanto que uma superexpressão de determinado gene pode não refletir em uma maior quantidade de proteína.

De maneira semelhante, não foi observada diferença na expressão gênica de Gdf9 e Bmp-15 entre os grupos no presente estudo. SCHNEIDER et al. (2014) encontraram diferença na expressão desses genes e também do Amh em camundongos *df/df* e

normais apenas em relação à idade, em que animais mais velhos apresentaram menores níveis dos referidos genes. Houve maior expressão gênica de *Amh* e *Gdf9* somente em relação a idade mesmo quando comparando um grupo controle com um grupo de dieta hiperlipídica, em que as fêmeas mais jovens apresentavam maior expressão dos genes (GARCIA et al., 2016). Desta forma, indicando que estes genes reduzem sua expressão com a idade, mas não são bons marcadores do estado da reserva de folículos primordiais. Além disso, a própria variação dentro dos grupos pode ter influenciado para tais resultados no presente estudo.

Não houve diferença na regulação gênica do receptor *Kit* e de *Kitl* entre os grupos no presente estudo. Sabe-se que o *Kit* e o *Kitl* são expressos em ovários humanos durante o desenvolvimento folicular (CARLSSON et al., 2006), e que o *Kitl* é um fator de crescimento pluripotente envolvido na diferenciação e crescimento de certas linhagens de células-tronco como células germinativas primordiais (GALLI et al., 1993). Além disso, é responsável pela sobrevivência, proliferação, diferenciação celular (ROSKOSKI, 2005) e controle da apoptose de células da granulosa e oócitos, bem como ativação do folículo primordial (CELESTINO et al., 2009).

Em estudos que testaram o bloqueio do gene *Kit* houve perturbações na formação de folículos primários a partir de primordiais (YOSHIDA et al., 1997), mostrando papel essencial do sistema *Kit/Kitl* na transição de folículos. O método pelo qual o *Kitl* atua no crescimento de folículos ainda não está totalmente claro, trata-se de um processo complexo que envolve vários fatores de crescimento e diferentes vias de sinalizações. Esperava-se que houvesse uma menor expressão de *Kitl* no grupo rapamicina já que é suposto de que a via *Mtor/Kitl/Akt/Foxo3a* esteja diminuída após inibir *Mtor* o que seria responsável pela menor ativação de folículos primordiais, acredita-se que o tempo de tratamento e a grande variação dentro dos grupos possa ter influenciado no presente resultado, além disso, é provável que o *Kitl* atue de modo diferente dependendo do estágio de desenvolvimento do oócito (CELESTINO et al., 2009), sendo assim o uso do ovário inteiro para a análise de expressão gênica também poderia ter influenciado. No entanto, é importante ressaltar que mesmo assim pode-se observar os resultados esperados na diminuição da transição folicular do primordial para o primário nos grupos rapamicina e RC, ou seja, na menor ativação de folículos primordiais.

Também não houve regulação em nível de expressão gênica de Mtor entre os grupos no presente estudo. SIDDAPPA et al. (2014), em seu estudo com cultivo de ovários inteiros verificou que uma dose única de 10µg/g de rapamicina diminuiu a atividade da Mtor mesmo em ovários recolhidos após 24h de estímulo com gonadotropinas, que estimulam o crescimento folicular, ou seja a rapamicina se mostrou efetiva em inibir a atividade da Mtor mesmo após estímulo hormonal para o desenvolvimento do folículo. Porém, esse mesmo estudo comprovou que a redução da atividade de Mtor em folículos pré-ovulatórios pode estar relacionada com a atividade compensatória de outra via, a via de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK) e isso pôde ser confirmado quando foi utilizado um inibidor específico para uma proteína fosforilada da via descrita concomitantemente com a rapamicina e notou-se anovulação após o tratamento. Isso poderia explicar porque no presente estudo não houve diferença entre o número de folículos terciários entre o grupo controle e rapamicina como observado em outros folículos em estágios diferentes de crescimento e porque não notou-se diferença em nível de regulação da expressão gênica ovariana de Mtor entre os grupos controle e rapamicina. Hipotetiza-se que a via compensatória estaria mantendo os níveis de Mtor, já que o gene engloba os dois complexos do Mtor, c1 e c2, sendo somente o Mtorc1 sensível à rapamicina.

Como esperado, a expressão de Foxo3a foi maior no grupo rapamicina e no grupo RC quando comparados ao grupo controle. Esse resultado é consistente com a literatura, sabendo que a Foxo3a na sua forma não fosforilada, ou seja, dentro do núcleo e ativa, é crucial para manter os folículos primordiais e em estado de repouso, preservando a reserva ovariana (JOHN et al., 2009). O aumento na Foxo3a explicaria o aumento da preservação de folículos primordiais observada no presente estudo tanto para o grupo RC quanto para o grupo submetido a rapamicina. Interessante que os resultados obtidos da expressão da Foxo3a com o ovário inteiro também já foram observados para camundongos *df/df* em que o aumento de folículos primordiais em *df/df* comparados aos controles sem a deficiência foi acompanhado de um aumento na expressão gênica de Foxo3a e ao mesmo tempo uma diminuição da forma fosforilada da Foxo3a (SCHNEIDER et al., 2017), lembrando que a fosforilação da Foxo3a leva a sua saída do núcleo e consequente ativação irreversível dos folículos primordiais para o seu crescimento (LIU et al.,

2014). Além disso, outro aspecto interessante é que três modelos para o estudo de envelhecimento ovariano: *df/df*, RC e rapamicina apresentam atraso na depleção ovariana e aumento na expressão de Foxo, mesmo que por vias de sinalização intracelulares diferentes tem como efetor a Foxo, reforçando ainda mais o papel essencial desse fator de transcrição em relação à preservação da reserva ovariana.

O gene Akt1 foi menos expresso no grupo RC quando comparado ao grupo rapamicina. A diminuição da atividade da Akt1 era esperado para a RC, afinal esta via supostamente deve estar diminuída nesse grupo. Além disso, é suposto que a RC atua através de duas vias que envolvem Akt1 diminuindo sua atividade: via Pi3k/Akt1/Foxo e via Mtor/Akt1/Foxo. Uma menor atividade da via poderia explicar a menor expressão gênica de Akt1 e também uma menor fosforilação da Foxo3a, isso manteria o fator de transcrição Foxo3a dentro do núcleo exercendo a sua função quiescente e antioxidante sobre o oócito. No presente estudo encontrou-se um maior número de folículos primordiais e menor número de folículos em outros estágios de crescimento nos grupos RC e rapamicina, indicando a quiescência dos folículos primordiais mantida pela Foxo3a .

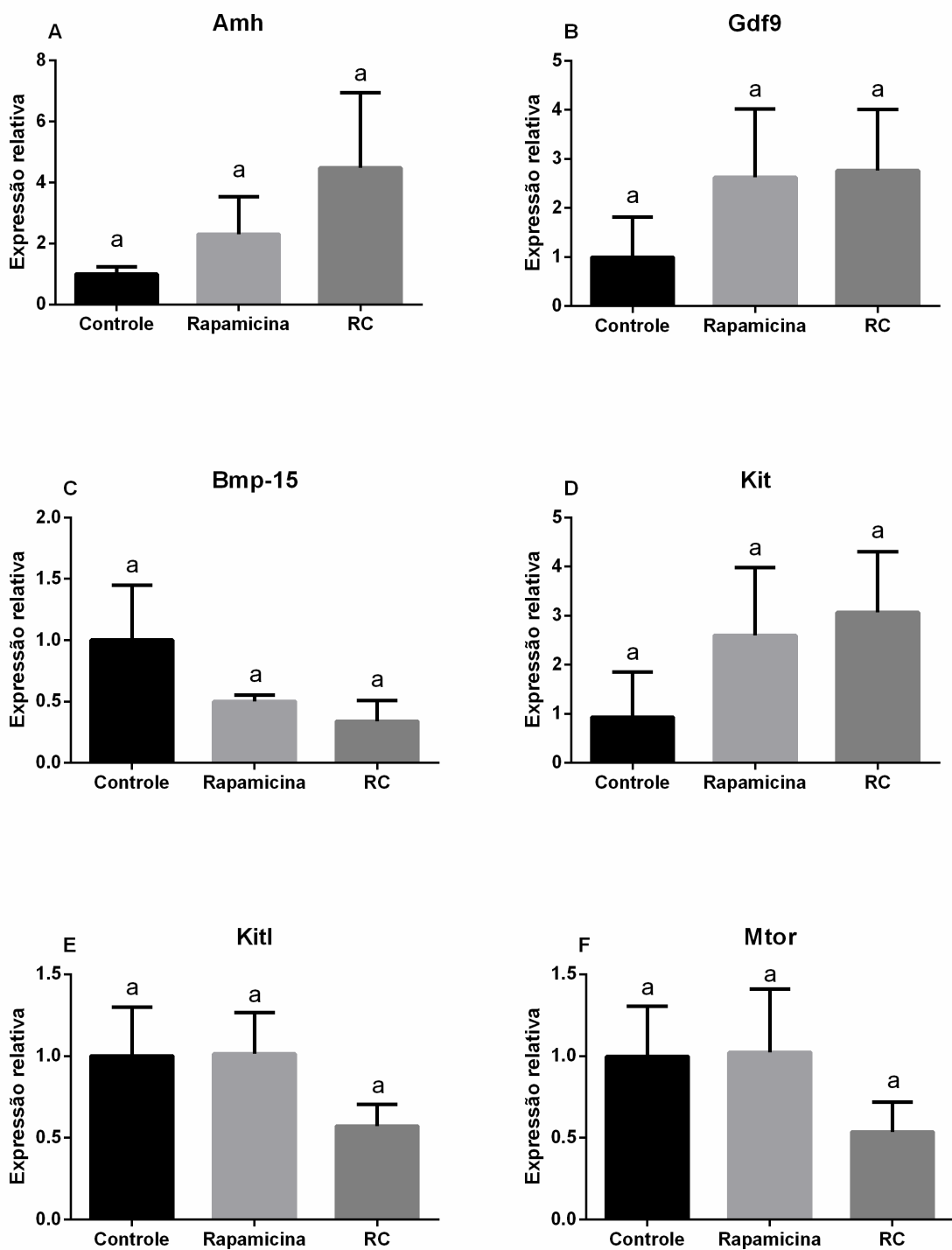


Figura 6. Análise da expressão gênica relativa de diferentes genes ovarianos. (A) Hormônio anti-mulleriano (Amh) gene marcador da reserva ovariana, (B) Fator de crescimento e diferenciação 9 (Gdf9) e (C) Proteína morfogênica óssea 15 (Bmp-15) genes relacionados com o crescimento e desenvolvimento do oócito, (D) receptor das células da granulosa Kit e (E) seu ligante Kitl genes relacionados com o desenvolvimento folicular, (F) Alvo mamífero da Rapamicina (Mtor) gene relacionado com o complexo proteico Mtorc1 que é sensível a inibição de rapamicina envolvido com a

ativação de folículos primordiais através do fator de transcrição Foxo. Letras diferentes representam diferença entre os grupos ($P < 0,05$). Valores foram representados como média \pm erro padrão.

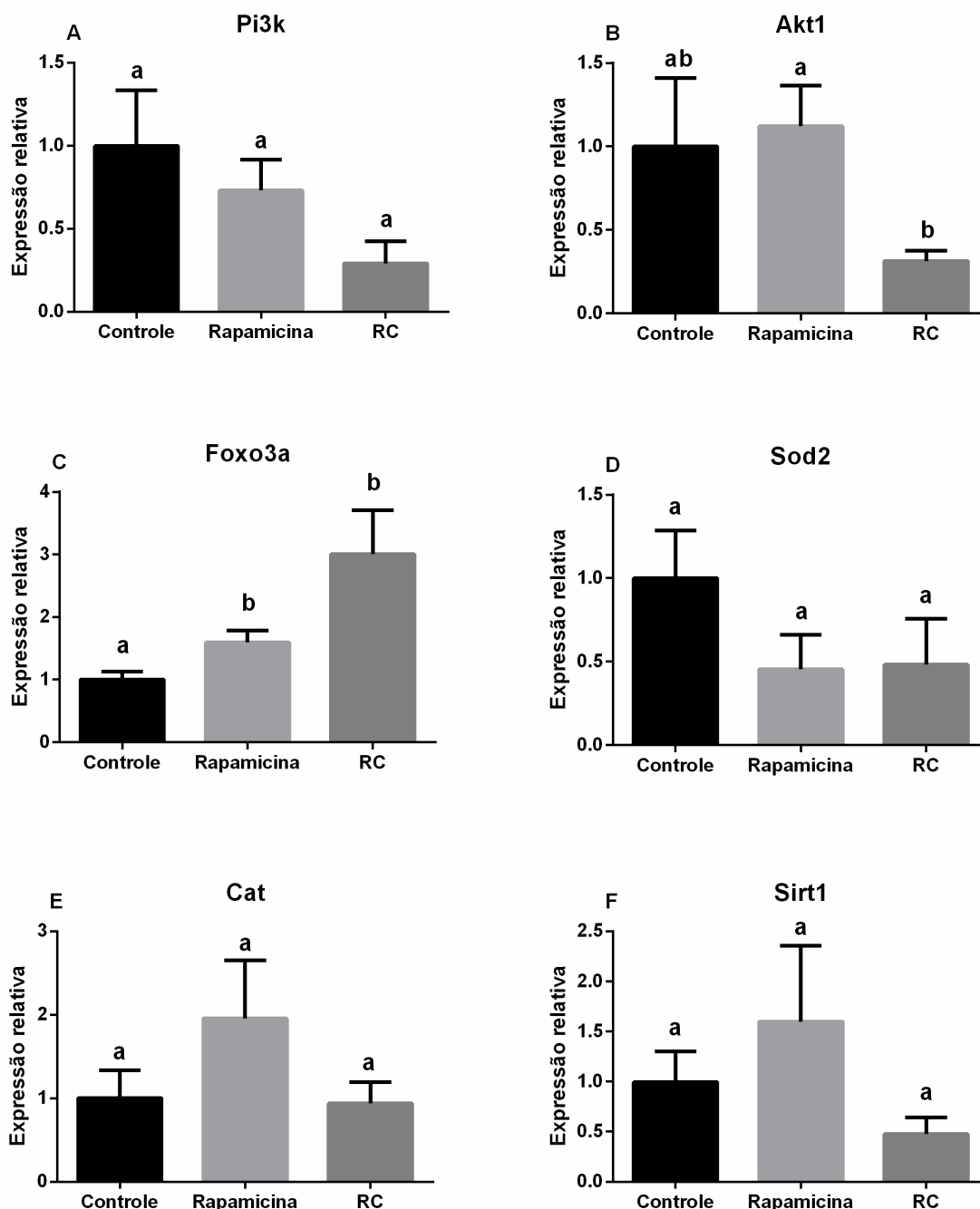


Figura 7. Análise de expressão gênica relativa de diferentes genes ovarianos. (A) Fosfoinositídeo-3-quinase (Pi3k), (B) Proteína quinase B (Akt1) e seu efector (C) Fator de transcrição Forkhead Box da classe O3a (Foxo3a) componentes de uma das principais vias de sinalização intracelular relacionadas com a ativação de folículos primordiais para seu crescimento, (D) Superóxido dismutase 2 (Sod2), (E) Catalase (Cat) e Sirtuína 1 (Sirt1) enzimas antioxidantes. Letras

diferentes representam diferença entre os grupos ($P < 0,05$). Valores foram representados como média \pm erro padrão.

4.6 Determinação dos níveis de EROs

Na quantificação de EROs as fêmeas do grupo rapamicina tiveram maiores níveis de EROs quando comparadas ao grupo controle ($P < 0,05$) e não houve diferença entre os níveis de EROS nas fêmeas do grupo controle e RC (Figura 8). Não foram encontrados estudos anteriores determinando o nível de EROs em ovários após tratamento com rapamicina. Existem estudos avaliando a produção de EROs após tratamento com rapamicina em outros tecidos como: tecido cerebral, mitocondrial, em células cancerígenas e endoteliais, dentre outros (JIN et al., 2014; MIWA et al., 2014, 2016; SHIN et al., 2011). Esses estudos concluem que a rapamicina diminuiu a formação de EROs, o que contraria os resultados encontrados nesse estudo. Porém, ao analisar a produção de EROs em células cancerígenas ovarianas após tratamento com rapamicina, não foi observado nenhum efeito da rapamicina sobre a produção de EROs e notou-se atividade diferente dos complexos do Mtor, enquanto que a inativação do complexo Mtorc1 não teve efeito na migração de células cancerígenas já a inativação do Mtorc2 (complexo de proteínas que constitui o Mtor e que não é sensível a rapamicina), mostrou-se efetiva impedindo a migração celular, demonstrando que as atividades dos complexos são diferentes (JIN et al., 2014). Sabe-se que os níveis de Igf-1 não são alterados com o tratamento de rapamicina, diferente do que acontece na RC, e sugere-se que o Igf-1 possa induzir a geração de EROs através da via de sinalização Pi3k/Akt/Mtorc2/NADPH oxidase, ou seja o maior nível de EROs observado no grupo rapamicina poderia estar relacionado com outra via de sinalização (JIN et al., 2014). Outra hipótese para a maior quantidade de EROS no grupo rapamicina seria devido a maior atresia de folículos terciários, já que foi utilizado o ovário inteiro para as análises e isso levaria a um aumento de EROs, visto que a rapamicina está relacionada com anovulação (SIDDAPPA et al., 2014), ela não oferece papel benéfico para esses folículos.

Não houve efeito da RC nos níveis de EROs nesse estudo. Não foram encontrados artigos avaliando a quantidade de EROS após RC no tecido ovariano, a maioria dos estudos que avaliam os efeitos da RC em EROs é em tecido mitocondrial e cerebral

(CIVITARESE et al., 2007; RIBEIRO et al., 2012). Esses estudos concluem que a RC tem efeito na melhora da função mitocondrial, na diminuição de EROs, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat) e assim, diminuindo o estresse oxidativo nesses tecidos. No entanto, no estudo onde testaram o efeito da RC no córtex cerebral de ratos wistar através de uma RC de 40% e a suplementação concomitante de 50mg/kg de peso corporal/dia de quercetina (antioxidante), observaram que o tratamento combinado se mostrou eficaz em atenuar os níveis de EROs, peroxidação lipídica, óxido nítrico e lipofuscina no tecido. Além disso, a RC acompanhada da suplementação de quercetina melhorou o declínio de enzimas antioxidantes como a Sod e Cat, sugerindo que a associação de RC com suplementação antioxidante possa ser um caminho para diminuir a produção de EROs no córtex cerebral e seria interessante mais estudos a fim de descobrir se esse efeito pode se aplicar a outros tecidos como o ovário (ALUGOJU et al., 2018).

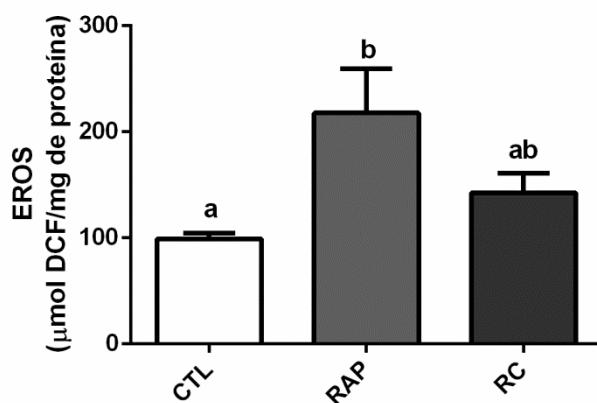


Figura 8. Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em ovários de fêmeas do grupo controle (CTL), rapamicina (RAP) e restrição calórica (RC). Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$). Valores foram representados como média \pm erro padrão.

4.7 Limitações do estudo

É importante citar algumas limitações do presente estudo: 1) o tempo, embora a duração do tratamento (93 dias) no presente estudo tenha mostrado efeitos significativos na reserva ovariana, tanto para o grupo rapamicina quanto para o

grupo RC, sabe-se que os efeitos metabólicos e provavelmente na regulação da expressão gênica são dependentes e diferentes conforme o tempo de tratamento, como já demonstrado por estudos citados anteriormente (FANG et al., 2013); 2) a dosagem de rapamicina, optou-se por utilizar uma dosagem baixa a fim de evitar os possíveis efeitos colaterais da rapamicina, incluindo imunossupressão, porém é importante avaliar os efeitos da combinação de diferentes dosagens de rapamicina com diferentes durações do tratamento, como foi observado por FANG et al. (2013) e JOHNSON et al. (2015), é importante a dosagem e o tempo para os efeitos da rapamicina sobre o metabolismo da glicose, consumo da ração e ganho de peso corporal em camundongos. No entanto, a dose utilizada no presente estudo se mostrou efetiva quanto à preservação da reserva ovariana; 3) dominância de fêmeas da RC, foi observado durante o experimento que algumas fêmeas da mesma caixa onde estavam alojadas apresentavam um comportamento dominante e poderiam ter vantagem sobre o consumo de ração, embora não tenha alterado a média de peso das fêmeas do grupo RC, é interessante pensar em estratégias que possam diminuir essa limitação.

5 Considerações finais

Concluindo, com esse estudo foi possível observar que as fêmeas tratadas com rapamicina apresentaram aumento na preservação da reserva ovariana mesmo que não tenham tido alterações no consumo da ração, no ganho de peso e que tenham sido mais intolerantes à glicose. A rapamicina se mostrou semelhante à RC em relação ao aumento no número de folículos primordiais e diminuição da ativação dos mesmos para seu crescimento, porém as fêmeas da RC tiveram menor peso e mantiveram seu peso até o fim do experimento acompanhado de maior sensibilidade à insulina. Ambos os tratamentos aumentaram a expressão gênica da Foxo3a. Curiosamente a rapamicina apresentou maior quantidade de EROs no ovário.

Estudos que investiguem estratégias dietéticas ou farmacológicas envolvidas na longevidade e no atraso do envelhecimento ovariano são de grande importância para que seja possível descobrir quais são as vias de sinalização alteradas nesses processos. Também, a fim de aumentar as perspectivas de novos fármacos e outros

métodos que possam ser mais específicos em atuar nas vias desejadas, como por exemplo, o avanço em estudos com microRNAs, que são capazes de modular a expressão gênica de maneira seletiva. Espera-se que com o presente estudo tenha sido possível dar mais um passo em direção às novas descobertas para atrasar a depleção da reserva ovariana e aumentar a fertilidade feminina.

O evento da menopausa em mulheres está envolvido com o aumento de risco para doenças cardiovasculares, ósseas, câncer ovariano e de outras alterações na saúde feminina que não só relacionados a reprodução (GROUP GROUP CANCER, 2015; NEWSON, 2018; PRESTWOOD et al., 2002). O atraso da menopausa pode levar à longevidade e maior qualidade de vida, sabe-se que o ovário participa ativamente contribuindo e influenciando em outros aspectos que não só na reprodução como no envelhecimento (MASON et al., 2009). Esses autores observaram que o transplante de ovários de camundongos com 60 dias em camundongos receptores de 11 meses isso resultou em aumento na expectativa de vida dos receptores. Acredita-se que essa linha de estudo tenha bastante potencial, pois são produzidos poucos estudos tendo como enfoque a saúde e a fertilidade da fêmea durante o envelhecimento e a confirmação de hipóteses em camundongos é de suma importância para guiar estudos com seres humanos.

6 Referências Bibliográficas

ADHIKARI, D.; ZHENG, W.; SHEN, Y.; GORRE, N.; HAMALAIMEN, T.; COONEY, A. J.; RUHTAMIEMI, I.; LAN, Z. J.; LIU, K. Tsc/Mtorc1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 3, p. 397–410, 2009.

AL-REGAIEY, K. A.; MASTERNAK, M. M.; BONKOWSKI, M.; SUN, L.; BARTKE, A. Long-Lived Growth Hormone Receptor Knockout Mice: Interaction of Reduced Insulin-Like Growth Factor I/Insulin Signaling and Caloric Restriction. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 851–860, 2005.

ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, p. 637–648, 1992.

ALUGOJU, P.; V.K.D., K. S.; PERIYASAMY, L. Effect of Short-term Quercetin, Caloric Restriction and Combined Treatment on Age-related Oxidative Stress Markers in the Rat Cerebral Cortex. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 17, n. 2, p. 119–131, 2018.

ANISIMOV, V. N.; ZABEZHINSKI, M. A.; POPOVICH, I. G.; PISKUNOVA, T. S.; SEMENCHENKO, A. V.; TYNDYK, M. L.; YUROVA, M. N.; ROSENFELD, S. V.; BLAGOSKLONNY, M. V. Rapamycin increases lifespan and inhibits spontaneous tumorigenesis in inbred female mice. **Cell Cycle**, v. 10, n. 24, p. 1–7, 2011.

ARMSTRONG, D. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 139–146, 1997.

BAJWA, P.; NAGENDRA, P. B.; NIELSEN, S.; SAHOO, S. S.; BIELANOWICZ, A.; LOMBARD, J. M.; WILKINSON, J. E.; MILLER, R. A.; TANWAR, P. S. Age related increase in Mtor activity contributes to the pathological changes in ovarian surface epithelium. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 214–227, 2016.

BAKER, T. G. A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 158, n. 972, p. 417–33, 1963.

BARTKE, A.; CHANDRASHEKAR, V.; DOMINICI, F.; TURYN, D.; KINNEY, B.; STEGER, R.; KOPCHICK, J. J. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and aging: controversies and new insights. **Biogerontology**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2003.

BARTKE, A. Role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 3718–3723, 2005.

BARTKE, A. Insulin and aging. **Cell Cycle**, v. 7, n. 21, p. 3338–3343, 2008.

BARZILAI, N.; HUFFMAN, D. M.; MUZUMDAR, R. H.; BARTKE, A. The critical role of metabolic pathways in aging. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1315–1322, 2012.

BENNIS, M. T.; SCHNEIDER, A.; VICTORIA, B.; DO, A.; WIESEBORN, D. S.; SPINEL, L.; GESING, A.; KOPCHICK, J. J.; SIDDIQI, A. S.; MASTERNAK, M. M. The role of transplanted visceral fat from the long-lived growth hormone receptor knockout mice on insulin signaling. **Geroscience**, v. 39, n. 1, p. 51–59, 2017.

BITTO, A.; ITO, T. K.; PINEDA, V. V.; LETEXIER, N. J.; HUANG, H. Z.; SUTLIEF, E.; TUNG, H.; VIZZINI, N.; CHEN, B.; SMITH, K.; MEZA, D.; YAJIMA, M.; BEYER, R. P.; KERR, K. F.; DAVIS, D. J.; GILLESPIE, C. H.; SNYDER, J. M.; TREUTING, P. M.; KAEBERLEIN, M. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. **Elife**, v. 5, n. 23, p. 1–17, 2016.

BLAGOSKLONNY, M. V. Calorie restriction: Decelerating Mtor-driven aging from cells to organisms (including humans). **Cell Cycle**, v. 9, n. 4, p. 683–688, 2010.

BROEKMANS, F. J.; SOULES, M. R.; FAUSER, B. C. Ovarian aging: Mechanisms and clinical consequences. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 5, p. 465–493, 2009.

BROER, S. L.; BROEKMANS, F. J.; LAVEN, J. S.; FAUSER, B. C. Anti-Müllerian hormone: Ovarian reserve testing and its potential clinical implications. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 5, p. 688–701, 2014.

BROWN-BORG, H.; JOHNSON, W. T.; RAKOCZY, S.; ROMANICK, M. Mitochondrial oxidant generation and oxidative damage in ames dwarf and GH transgenic mice. **Journal of the American Aging Association**, v. 24, n. 3, p. 85–96, 2001.

BRUCE, E.; SAKARYA, Y.; MATHENY, M.; KIRICHENKO, N.; TOKLU, H.; MORGAN, D.; TUMER, N.; CARTER, C.; SCARPACE, P. Rapamycin as a Potential

Treatment for Obesity | The FASEB Journal. **Physiology**, v. 29, n. 1, p. 816, 2015.

CANTÓ, C.; AUWERX, J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 7, p. 325–331, 2009.

CARLSSON, I. B.; LAITINEN, M. P.; SCOTT, J. E.; LOUHIO, H.; VELENTZIS, L.; TUURI, T.; AALTONEN, J.; RITVOS, O.; WINSTON, R. M.; HOVATTA, O. Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. **Reproduction**, v. 131, n. 4, p. 641–649, 2006.

CASTRILLON, D. H.; MIAO, L.; KOLLIPARA, R.; HORNER, J. W.; DEPINHO, R. A. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5630, p. 215–8, 2003.

CELESTINO, J. J. H.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; FIGUEIREDO, J. R. Regulation of ovarian folliculogenesis by Kit Ligand and the c-Kit system in mammals. **Animal Reproduction / Colegio Brasileiro de Reproducao Animal**, v. 6, n. 3, p. 431–439, 2009.

CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The Consequences of Altered Somatotropic System on Reproduction¹. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 17–27, 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**, v. 10, n. 2, p. 1–9, 2015.

CIVITARESE, A. E.; CARLING, S.; HEILBRONN, L. K.; HULVER, M. H.; UKROPCOVA, B.; DEUTSCH, W. A.; SMITH, S. R.; RAVUSSIN, E.; CALERIE P. T. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 3, p. 485–494, 2007.

COLLINS, J. K.; JONES, K. T. DNA damage responses in mammalian oocytes. **Reproduction**, v. 152, n. 1, p. R15–R22, 2016.

COLMAN, R. J.; BEASLEY, T. M.; KEMNITZ, J. W.; JOHNSON, S. C.; WEINDRUCH, R.; ANDERSON, R. M. Caloric restriction reduces age-related and

all-cause mortality in rhesus monkeys. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 3557, 2014.

DE LA FUENTE, M. Effects of antioxidants on immune system ageing. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S5–S8, 2002.

DE LA FUENTE, M. Role of Neuroimmunomodulation in Aging. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 4–6, p. 213–223, 2008. a.

DE LA FUENTE, M. Role of the immune system in aging. **Inmunologia**, v. 27, n. 4, p. 176–191, 2008. b.

DEBLON, N.; BOURGOIN, L.; VEYRAT-DUREBEX, C.; PEYROU, M.; VINCIGUERRA, M.; CAILLON, A.; MAEDER, C.; FOURNIER, M.; MONTET, X.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; FOTI, M. Chronic Mtor inhibition by rapamycin induces muscle insulin resistance despite weight loss in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 7, p. 2325–2340, 2012.

DONG, X. C.; COPPS, K. D.; GUO, S.; LI, Y.; KOLLIPARA, R.; DEPINHO, R. A.; WHITE, M. F. Inactivation of Hepatic Foxo1 by Insulin Signaling Is Required for Adaptive Nutrient Homeostasis and Endocrine Growth Regulation. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 65–76, 2008.

FACCHINI, F. S.; HUA, N.; ABBASI, F.; REAVEN, G. M. Insulin Resistance as a Predictor of Age-Related Diseases. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 8, p. 3574–3578, 2001.

FANG, YimiY.; WESTBROOK, R.; HILL, C.; BOPARAI, R. K.; ARUM, O.; SPONG, A.; WANG, F.; JAVORS, M. A.; CHEN, J.; SUN, L. Y.; BARTKE, A. Duration of Rapamycin Treatment Has Differential Effects on Metabolism in Mice. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 3, p. 456–462, 2013.

FOLSOM, A. R.; KAYE, S. A.; SELLERS, T. A.; HONG, C. P.; CERHAN, J. R.; POTTER, J. D.; PRINEAS, R. J. Body fat distribution and 5-year risk of death in older women. **Jama**, v. 269, n. 4, p. 483–487, 1993.

FORTUNE, J. E.; YANG, M. Y.; ALLEN, J. J.; HERRICK, S. L. Triennial Reproduction Symposium: The ovarian follicular reserve in cattle: What regulates its formation and

size? **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 7, p. 3041–3050, 2013.

FUJIMOTO, V. Y.; BLOOM, M. S.; HUDDLESTON, H. G.; SHELLEY, W. B.; OCQUE, A. J.; BROWNE, R. W. Correlations of follicular fluid oxidative stress biomarkers and enzyme activities with embryo morphology parameters during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 6, p. 1357-1361, 2011.

GALLI, S. J.; ZSEBO, K. M.; GEISSLER, E. N. The kit Ligand, Stem Cell Factor. **Advances in Immunology**, v. 55, p. 1–96, 1993.

GARCIA, D. N.; PRIETSCH, L. A.; RINCÓN, J. A.; MOREIRA, I. L.; VALLE, S. C.; BARROS, C. C.; HELBIG, E.; CORRÊA, M. N.; SCHNEIDER, A. Differential effects of a high-fat diet on serum lipid parameters and ovarian gene expression in young and aged female mice. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 24, n. 5, p. 1–8, 2016.

GENARO, P. D. S.; SARKIS, K. S.; MARTINI, L. A. O efeito da restrição calórica na longevidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 667–672, 2009.

GENIN, E. C.; CARON, N.; VANDENBOSCH, R.; NGUYEN, L.; MALGRANGE, B. Concise Review: Forkhead Pathway in the Control of Adult Neurogenesis. **Stem Cells**, v. 32, n. 6, p. 1398–1407, 2014.

GLEICHER, N.; WEGHOFER, A.; BARAD, D. H. Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 7, p. 1–11, 2011.

COLLABORATIVE GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF OVARIAN CANCER.; BERAL, V.; GAITSKELL, K.; HERMON, C.; MOSER, K.; REEVES, G.; PETO, R. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: Individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. **The Lancet**, v. 385, n. 9980, p. 1835–1842, 2015.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147–1150, 2007.

HARMAN, D. The biologic clock: the mitochondria? **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 20, n. 4, p. 145–147, 1972.

HIRSHFIELD, A. N. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 2, p. 421–428, 1994.

HUNTER, W. S.; CROSON, W. B.; BARTKE, A.; GENTRY, M. V.; MELISKA, C. J. Low body temperature in long-lived Ames dwarf mice at rest and during stress. **Physiology and Behavior**, v. 67, n. 3, p. 433–437, 1999.

JIN, S. Y.; LEE, H. S.; KIM, E. K.; HA, J. M.; KIM, Y. W.; BAE, S. Reactive oxygen species and Pi3k/Akt signaling in cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 75, p. S34–S35, 2014.

JOHN, G. B.; GALLARDO, T. D.; SHIRLEY, L. J.; CASTRILLON, D. H. Foxo3 is a Pi3k-Dependent Molecular Switch Controlling the Initiation of Oocyte Growth. **Cancer**, v. 321, n. 1, p. 197–204, 2009.

JOHNSON, S. C.; YANOS, M. E.; BITTO, A.; CASTANZA, A.; GAGNIDZE, A.; GONZALEZ, B.; GUPTA, K.; HUI, J.; JARVIE, C.; JOHNSON, B. M.; LETEXIER, N.; MCCANTA, L.; SANGESLAND, M.; TAMIS, O.; UHDE, L.; VAN, D. E. A.; RABINOVITCH, P. S.; SUH, Y.; KAEBERLEIN, M. Dose-dependent effects of Mtor inhibition on weight and mitochondrial disease in mice. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 22, p. 1–8, 2015.

KALICH-PHILOSOPH, L.; RONESS, H.; CARMELY, A.; FISHEL-BARTAL, M.; LIGUMSKY, H.; PAGLIN, S.; WOLF, I.; KANETY, H.; SREDNI, B.; MEIROW, D. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 185, p. 162–185, 2013.

KENYON, C. J. The genetics of ageing. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 504–512, 2010.

LI, L.; FU, Y. C.; XU, J. J.; CHEN, X. C.; LIN, X. H.; LUO, L. L. Caloric restriction promotes the reproductive capacity of female rats via modulating the level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1). **General and Comparative Endocrinology**, v. 174, n. 2, p. 232–237, 2011.

LI, L.; FU, Y. C.; XU, J. J.; LIN, X. H.; CHEN, X. C.; ZHANG, X. M.; LUO, L. L. Caloric restriction promotes the reserve of follicle pool in adult female rats by inhibiting the

activation of mammalian target of rapamycin signaling. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 1, p. 60–67, 2015.

LIU, K.; RAJAREDDY, S.; LIU L.; JAGARLAMUDI, K.; BOMAN, K.; SELSTAM, G.; REDDY, P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. **Developmental Biology**, v. 299, n. 1, p. 1–11, 2006.

LIU, K.; ZHANG, H.; RISAL, S.; GORRE, N.; BUSAYAVALLASA, K.; LI, X.; SHEN, Y.; BOSBACH, B.; BRÄNNSTRÖM, M. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. **Current Biology**, v. 24, n. 21, p. 2501–2508, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

MAGDALON, J.; FESTUCCIA, W. T. Regulation of adiposity by Mtorc1. **Einstein (São Paulo)**, v. 15, n. 4, p. 507–511, 2017.

MAHRAN, Y. F.; EL-DEMERDASH, E.; AHMED, S. N.; REEM, N. EL-N.; ALI, A. A.; ABDEL-NAIM, A. B. Growth hormone ameliorates the radiotherapy-induced ovarian follicular loss in rats: Impact on oxidative stress, apoptosis and IGF-1/IGF-1R Axis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–22, 2015.

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. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1207–1211, 2009.

MASORO, Edward J. Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: A critique of proposed mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 10, p. 1040–1048, 2009.

MASTERNAK, M. M.; AL-REGAIEY, K. A.; DEL ROSARIO, L. M. M.; BONKOWSKI, M. S.; PANICI, J. A.; PRZYBYLSKI, G. K.; BARTKE, A. Caloric restriction results in decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor superfamily in muscle of normal and long-lived growth hormone receptor/binding protein knockout

mice. **Journals of gerontology Biological sciences and medical sciences**, v. 60, n. 10, p. 1238–45, 2005.

MCCAY, C. M.; CROWELL, M. F.; MAYNARD, L. A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. **Nutrition**, v. 5, n. 3, p. 155–171, 1935.

MEDVEDEV, Z. A. An attempt at rational classification of theories of ageing. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 65, n. 3, p. 375–398, 1990.

MIQUEL, J.; ECONOMOS, A. C.; FLEMING, J.; JOHNSON, J. E. JR. Mitochondrial role in cell aging. **Experimental Gerontology**, v. 15, n. 6, p. 575–591, 1980.

MIWA, S.; JOW, H.; BATY, K.; JOHNSON, A.; CZAPIEWSKI, R.; SARETZKI, G.; TREUMANN, A.; VON ZGLINICI, T. Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–12, 2014.

MIWA, S.; CZAPIEWSKI, R.; WAN, T.; BELL, A.; HILL, K. N.; VON ZGLINICKI, T.; SARETZKI, G. Decreased Mtor signalling reduces mitochondrial ROS in brain via accumulation of the telomerase protein TERT within mitochondria. **Aging**, v. 8, n. 10, p. 2551–2567, 2016.

MURPHY, C. T.; MCCARROLL, S. A.; BARGMANN, C. I.; FRASER, A.; KAMATH, R. S.; AHRINGER, J.; LI, H.; KENYON, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277–284, 2003.

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

NELSON, J. F.; GOSDEN, R. G.; FELICIO, L. S. Effect of Dietary Restriction on Estrous Cyclicity and Follicular Reserves in Aging C57BL/6J Mice. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 515–522, 1985.

NEWSON, L. Menopause and cardiovascular disease. **Post Reproductive Health**,

v. 24, n. 1, p. 44–49, 2018.

NIKOLAI, S.; PALLAUF, K.; HUEBBE, P.; RIMBACH, G. Energy restriction and potential energy restriction mimetics. **Nutrition Research Reviews**, v. 28, n. 2, p. 100–120, 2015.

PETERS, H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. **Acta endocrinology**, v. 62, n. 1, p. 98–116, 1969.

POWERS, R. W.; R.; KAEBERLEIN, M.; CALDWELL, S. D.; KENNEDY, B. K.; FIELDS, S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. **Genes and Development**, v. 20, n. 2, p. 174–184, 2006.

PRESTWOOD, K. M.; RAISZ, L. G. Prevention and treatment of osteoporosis. **Clinical Cornerstone**, v. 4, n. 6, p. 34–44, 2002.

RIBEIRO, L. C.; RODRIGUES L.; QUINCOZES-SANTOS, A.; TRAMONTINA, A. C.; BAMBINI-JUNIOR, V.; ZANOTTO, C.; DIEHL, L. A.; BIASIBETTI, R.; KLEINKAUF-ROCHA, J.; DALMAZ, C.; GONÇALVES, C. A.; GOTTFRIED, C. Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of Wistar rats. **Brain Research**, v. 1472, n. 7, p. 11–19, 2012.

RIBEIRO, L. C.; QUINCOZES-SANTOS A.; LEITE, M. C.; ABIB, R. T.; KLEINKAUF-ROCHA, J.; BIASIBETTI, R.; ROTTA, L. N.; WOFCHUK, S. T.; PERRY, M. L.; GONÇALVES, C. A.; GOTTFRIED, C. Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. **Neuroscience Research**, v. 64, n. 3, p. 330–334, 2009.

RINCON, M.; MUZUMDAR, R.; ATZMON, G.; BARZILAI, N. The paradox of the insulin/IGF-1 signaling pathway in longevity. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, n. 6, p. 397–403, 2004.

ROSKOSKI, R. JR. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase - The stem cell factor receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 3, p. 1307–1315, 2005.

SACCON, T. D.; MOREIRA, F.; CRUZ, L. A.; MONDADORI, R. G.; FANG, Y.; BARROS, C. C.; SPINEL, L.; BARTKE, A.; MASTERNAK, M. M.; SCHNEIDER, A.

Ovarian aging and the activation of the primordial follicle reserve in the long-lived Ames dwarf and the short-lived bGH transgenic mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 455, n. 5, p. 23–32, 2017.

SARBASSOV, D. D.; ALI, S. M.; SENGUPTA, S.; SHEEN, J. H.; HSU, P. P.; BAGLEY, A. F.; MARKHARD, A. L.; SABATINI, D. M. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits Mtorc2 Assembly and Akt/PKB. **Molecular Cell**, v. 22, n. 2, p. 159–168, 2006.

SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 253–262, 2000.

SCHNEIDER, A.; ZHI, X.; MOREIRA, F.; LUCIA, T.; MONDADORI, R. G. JR.; MASTERNAK, M. M. Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014.

SCHNEIDER, A.; MATKOVICH, S. J.; SACCON, T.; VICTORIA, B.; SPINEL, L.; LAVASANI, M.; BARTKE, A.; GOLUSINSKI, P.; MASTERNAK, M. M. Ovarian transcriptome associated with reproductive senescence in the long-living Ames dwarf mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 439, n. 5, p. 328–336, 2017.

SEPE, A.; TCHKONIA T, THOMOU, T.; ZAMBONI, M.; KIRKLAND, J. L. Aging and regional differences in fat cell progenitors - A mini-review. **Gerontology**, v. 57, n. 1, p. 66–75, 2010.

SHI, L. Y.; LUO, A.Y; TIAN, Y.; LAI, Z. W.; ZHANG, J. J.; WANG, S. X. Protective effects of caloric restriction on ovarian function. **Zhonghua fu chan ke za zhi**, v. 48, n. 10, p. 745–9, 2013.

SHIN, Y. J.; CHO, D. Y.; CHUNG, T. Y.; HAN, S. B.; HYON, J. Y.; WEE, W. R. Rapamycin reduces reactive oxygen species in cultured human corneal endothelial cells. **Current Eye Research**, v. 36, n. 12, p. 1116–1122, 2011.

SIDDAPPA, D.; KALAISELVANRAJA, A.; BORDIGNON, V.; DUPUIS, L.; GASPERIN, B. G.; ROUX, P. P.; DUGGAVATHI, R. Mechanistic target of rapamycin (Mtor) signaling during ovulation in mice. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 7, p. 655–665, 2014.

SKAŁBA, P.; CYGAL, A.; DABKOWSKA-HUĆ, A. The influence of anti-Mullerian hormone on folliculogenesis. **Ginekologia polska**, v. 79, n. 2, p. 137–140, 2008.

TE VELDE, E. R.; SCHEFFER, G. J.; DORLAND, M.; BROEKMANS, F. J.; FAUSER, B. C. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1–2, p. 67–73, 1998.

TONET, A. C.; NÓBREGA, O. T. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 11, n. 2, p. 259–273, 2008.

TREFF, N. R.; KRISHER, R. L.; TAO, X.; GARNSEY, H.; BOHRER, C.; SILVA, E.; LANDIS, J.; TAYLOR, D.; SCOTT, R. T.; WOODRUFF, T. K.; DUNCAN, F. E. Next Generation Sequencing-Based Comprehensive Chromosome Screening in Mouse Polar Bodies, Oocytes, and Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 4, p. 76, 2016.

WANG, N.; LUO, L. L.; XU, J. J.; XU, M. Y.; ZHANG, X. M.; ZHOU, X. L.; LIU, W. J.; FU, Y. C. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 63, n. 1, p. 94–103, 2014.

WEBB, A. E.; BRUNET, A. FOXO transcription factors: Key regulators of cellular quality control. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 159–169, 2014.

WEINDRUCH, R.; WALFORD, R. L.; FLIGIEL, S.; GUTHRIE, D. The Retardation of Aging in Mice by Dietary Restriction: Longevity, Cancer, Immunity and Lifetime Energy Intake. **Journal Nutrition**, v. 116, n. 4, p. 641–654, 1986.

WIESENBORN, D. S.; MENON, V.; ZHI, X.; DO, A.; GESING, A.; WANG, Z.; BARTKE, A.; ALTOMARE, D. A.; MASTERNAK, M. M. The effect of calorie restriction on insulin signaling in skeletal muscle and adipose tissue of Ames dwarf mice. **Aging**, v. 6, n. 1, p. 900–912, 2014.

WILKINSON, J. E.; BURMEISTER, L.; BROOKS, S. V.; CHAN, C. C.; FRIEDLINE, S.; HARRISON, D. E.; HEJTMANCIK, J. F.; NADON, N.; STRONG, R.; WOOD, L. K.; WOODWARD, M. A.; MILLER, R. A. Rapamycin slows aging in mice. **Aging Cell**, v. 11, n. 4, p. 675–682, 2012.

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

XIANG, Y.; XU J, LI, L.; LIN, X.; CHEN, X.; ZHANG, X.; FU, Y.; LUO, L. Calorie restriction increases primordial follicle reserve in mature female chemotherapy-treated rats. **Gene**, v. 493, n. 1, p. 77–82, 2012.

YANIK, E. L.; SIDDIQUI, K.; ENGELS, E. A. Sirolimus effects on cancer incidence after kidney transplantation: A meta-analysis. **Cancer Medicine**, v. 4, n. 9, p. 1448–1459, 2015.




YOSHIDA, H.; TAKAKURA, N.; KATAOKA, H.; KUNISADA, T.; OKAMURA, H.; NISHIKAWA, S. I. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. **Developmental Biology**, v. 184, n. 1, p. 122–137, 1997.

ZHANG, J.; LIU, W.; SUN, X.; KONG, F.; ZHU, Y.; LEI, Y.; SU, Y.; SU, Y.; LI, J. Inhibition of Mtor Signaling Pathway Delays Follicle Formation in Mice. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 3, p. 585–595, 2017.

ZHANG, X. M.; LI, L.; XU, J. J.; WANG, N.; LIU, W. J.; LIN, X. H.; FU, Y. C.; LUO, L. L. Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating Mtor activation and sirtuin expression. **Gene**, v. 523, n. 1, p. 82–87, 2013.

Anexos

Anexo 1

		
Pelotas, 15 de dezembro de 2016		
Certificado		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da restrição calórica e da rapamicina sobre o envelhecimento ovariano em camundongos" registrada com o nº 23110.009349/2016-31, 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 em Experimentação Animal, em reunião de 12/12/2016.</p>		
Finalidade	(X) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	01/03/2017 a 01/12/2018	
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /C57Bl/6	
Nº de animais	36	
Idade	28 dias	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Biotério Central - UFPEL	
<p>Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.</p> <p>Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao <i>COBALTO</i> para posterior registro no <i>COCEPE</i> (código para cadastro nº CEEA 7340-2016).</p>		
		
M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix <i>Presidente da CEEA</i>		
Cliente em: ____ / ____ / 2016		