

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de pós-graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação de mestrado

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA, DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS
RAMIFICADOS NO ENVELHECIMENTO OVARIANA DE CAMUNDONGOS
FÊMEAS**

Gabriel Barreto Veiga

Pelotas, 2023

GABRIEL BARRETO VEIGA

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA, DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS
RAMIFICADOS NO ENVELHECIMENTO OVARIANA DE CAMUNDONGOS
FÊMEAS**

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. Dr. Augusto Schneider

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

V426e Veiga, Gabriel

Efeitos da restrição calórica, de proteínas e aminoácidos ramificados no envelhecimento ovariana de camundongos fêmeas / Gabriel Veiga ; Augusto Schneider, orientador. — Pelotas, 2023.

45 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Intervenções dietéticas. 2. BCAAs. 3. Envelhecimento ovariano. 4. mTORC1. I. Schneider, Augusto, orient. II. Título.

CDD : 641.1

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

Gabriel Veiga

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA, DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS
RAMIFICADOS NO ENVELHECIMENTO OVARIANA DE CAMUNDONGOS
FÊMEAS**

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

Data da Defesa: 29/08/2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Augusto Schneider (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília

Dr. José Victor Vieira Isola

Doutor em Ciências – Sanidade animal pela Universidade Federal de Pelotas

Lista de figuras

- Figura 1 Vias intracelulares relacionadas ao recrutamento folicular ovariano
- Figura 2 Efeitos da restrição calórica em vias intracelulares em células somáticas
- Figura 3 Ganho de peso corporal no início e final do tratamento, peso corporal pelo período de tratamento do estudo entre os grupos
- Figura 4 Consumo alimentar em calorias por dia/grama de peso corporal, consumo de calorias oriundas de proteínas/grama de peso corporal e gramas de bcaa/grama de peso corporal entre os grupos
- Figura 5 Percentual de gordura visceral, periovariana e perirenal em relação ao peso corporal entre os grupos
- Figura 6 Concentrações séricas de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) entre os grupos
- Figura 7 Glicose em jejum dos animais entre os grupos
- Figura 8 Número de dias em estro, número de ciclos completos e percentual de tempo em cada fase do ciclo estral entre os grupos
- Figura 9 Número de folículos primordiais, de transição, primários, secundários, terciários e totais entre os grupos
- Figura 10 Tamanho do óócito em folículos primordiais, primários e secundários entre os grupos

Lista de tabelas

Tabela 1 Composição das dietas controle, restrição de proteínas e restrição de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs)

RESUMO

VEIGA, Gabriel Barreto. **Efeitos da restrição de caloria, proteínas e aminoácidos de cadeia ramificada no envelhecimento ovariano de camundongos fêmeas**. Orientadora: Augusto Schneider. 2023. 45 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de pós graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A restrição calórica (RC) é uma intervenção dietética consolidada na literatura que está relacionada a efeitos promotores da longevidade, retardo do aparecimento de doenças crônicas e preservação da reserva ovariana feminina. Estes efeitos são atribuídos ao controle do estresse oxidativo, status inflamatório, diferenciação celular, danos no DNA e regulação de vias intracelulares como a mTORC1 e FOXO3. Contudo, recentemente alguns estudos observaram que os impactos positivos da RC podem ser atrelados à restrição de proteínas, e especificamente à restrição do consumo de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), ocasionada pela estratégia. Assim o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da restrição de proteínas e de BCAAs sobre a ativação de folículos primordiais e o envelhecimento ovariano em comparação com a restrição calórica de 30%. Foram utilizados 35 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 randomizados em 4 grupos e tratados por 90 dias em: grupo controle (CTL; n = 8), grupo restrição calórica de 30% (CR; n = 9), grupo restrição de proteínas (PR; restrição de 15%; n = 9) e grupo restrição de BCAAs (BCAAR; restrição de 32% dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina; n = 9). Foram analisados ganho de peso, composição corporal, ingestão alimentar, níveis séricos de BCAAs, metabolismo da glicose, reserva ovariana e ciclicidade estral. Foi observado que a restrição calórica, proteica e de BCAAs preveniram o ganho de peso e alteraram a composição corporal dos animais em comparação ao controle. Além disso a restrição de BCAAs resultou em aumento da ingestão calórica. Ainda, foi observado que a restrição calórica e de proteínas demonstraram prevenir a ativação de folículos ovarianos e aumentar o tempo de duração do ciclo estral, não sendo observadas diferenças para a restrição de BCAAs. Os resultados encontrados no presente estudo mostram que a restrição de proteínas tem efeitos similares à restrição calórica na reserva ovariana, ao passo que a restrição de BCAAs somente não foi capaz de ocasionar os mesmos efeitos. Isso ocorreu apesar do PR não ter reduzidos a ingestão de calorias e o RC não ter reduzido a ingestão de proteínas em níveis semelhantes ao PR.

Palavras-chave: Intervenções dietéticas, BCAAs, envelhecimento ovariano e mTORC1

ABSTRACT

VEIGA, Gabriel Barreto. **Effects of calorie, protein and branched chain amino acid restriction on ovarian aging in female mice**. Advisor: Augusto Schneider. 2023. 45 f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) – Graduate Program in Nutrition and Food, Nutrition university, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

ABSTRACT

Calorie restriction (CR) is a dietary intervention that promote longevity, delays the onset of chronic diseases and preserves the ovarian reserve in females. These effects are attributed to the control of oxidative stress, inflammatory status, cell differentiation, DNA damage and regulation of intracellular pathways such as mTORC1 and FOXO3. However, some studies have observed that the positive impacts of CR can be linked to restriction of protein and branched-chain amino acids (BCAAs) caused by the strategy. The aim of this study was to evaluate the effects of protein and BCAA restriction on primordial follicle activation compared to 30% calorie restriction in mice. For so, 35 female C57BL/6 mice were randomized into 4 groups and treated for 4 months: control group (CTL; n = 8), 30% calorie restriction (CR; n = 9), protein restriction (PR; 15% restriction; n = 9) and BCAA restriction group (BCAAR; 32% restriction of the amino acids leucine, isoleucine and valine; n = 9). Body mass, body composition, food intake, serum levels of BCAAs, glucose metabolism, ovarian reserve and estrous cyclicity were evaluated. We observed that calorie, protein and BCAA restriction prevented mass gain and changed body composition compared to the control. BCAA restriction resulted in increased calorie intake compared to control mice. Interestingly, we observed that calorie and protein restriction prevented activation of primordial follicles and increased the duration of the estrous cycle. No differences were observed for BCAA restriction regarding cyclicity and ovarian reserve. Our data indicates that protein restriction has similar effects to calorie restriction on preservation of ovarian reserve, whereas BCAA restriction alone did not affect it. This occurred despite PR did not reducing calorie intake and CR did not reducing protein intake in levels similar to PR.

Keywords: Dietary interventions, BCAAs, ovarian aging and mTORC1

SUMÁRIO

1. RESUMO	7
2. ABSTRACT	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
4. OBJETIVOS	21
a. OBJETIVO GERAL	21
b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. HIPÓTESES	21
6. ABSTRACT	22
7. INTRODUCTION	23
8. METHODS	24
a. <i>ANIMALS AND DIETS</i>	24
b. <i>PLASMA CONCENTRATIONS OF BCAAS</i>	26
c. <i>GLUCOSE METABOLISM</i>	26
d. <i>HISTOLOGY AND FOLLICLE COUNTS</i>	26
e. <i>VAGINAL CYTOLOGY</i>	27
f. <i>STATISTICAL ANALISYS</i>	27
9. RESULTS	27
a. <i>BODY WEIGHT</i>	27
b. <i>FOOD CONSUMPTION AND BODY COMPOSITION</i>	28
c. <i>PLASMA CONCENTRATIONS OF BCAAS</i>	29
d. <i>GLUCOSE METABOLISM</i>	30
e. <i>VAGINAL CYTOLOGY</i>	31
f. <i>OVARIAN RESERVE</i>	31
10. DISCUSSION	33
11. REFERENCES	37
12. CONCLUSÃO DA TESE	41
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As últimas décadas foram marcadas pelo avanço na expectativa e de vida, em que o desenvolvimento das ciências médicas possibilitou redução das taxas de mortalidade em idades avançadas, entretanto, houve um aumento da incidência e prevalência de doenças crônicas [1]. Dessa forma, equalizar o aumento da expectativa de vida ao mesmo passo em que se beneficia a qualidade de vida tornou-se uma questão de interesse científico, estimulando pesquisas para melhor compreender os mecanismos do envelhecimento a fim de elaborar medidas protetivas.

O envelhecimento pode ser compreendido como um processo natural que ocorre em todos indivíduos e que está associado a uma série de alterações em âmbito molecular, celular e fisiológico, caracterizado pelo declínio gradual da função orgânica e menor capacidade de sustentar a homeostase corporal [2]. Dentre essas alterações, o envelhecimento está relacionado ao maior acúmulo de danos no DNA, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), encurtamento dos telômeros e instabilidade genética [3]. Como resultados destes processos temos o aumento senescência com o envelhecimento, processo em que há parada da proliferação celular e aquisição de um padrão secretório pró-inflamatório [4]. O acúmulo de células senescentes favorece o quadro de inflamação crônica de baixo grau e disfunção tecidual [4]. Consequentemente, a literatura aponta que o acúmulo de células senescentes com o avanço da idade resulta em menor função pancreática, maior resistência à insulina e fibrose tecidual contribuindo para a incidência de doenças do envelhecimento [4-6]. Dessa forma, é possível observar que o processo de envelhecimento cursa com uma vasta gama de alterações biológicas em que alguns fatores como acúmulo de danos, estresse oxidativo e senescência celular estão ligados ao desenvolvimento de inúmeros distúrbios patológicos. Esses processos estão associados ao desenvolvimento de patologias do envelhecimento como câncer, diabetes, aterosclerose, doença pulmonar obstrutiva crônica e Alzheimer [7].

No mesmo sentido, o aumento da expectativa de vida e intensas alterações em diversos aspectos da sociedade favoreceram que cada vez mais

mulheres adiem o projeto de maternidade para após os 35 anos de idade, uma faixa etária na qual a fertilidade já começa a declinar em muitas mulheres [8]. As alterações fisiopatológicas com o progresso da idade levam ao maior risco obstétrico e perinatal independentemente de outros fatores [9]. Dentro deste contexto, a redução da fertilidade com o avanço da idade é sobretudo apontada como um reflexo do declínio de aspectos quali-quantitativos da reserva ovariana [10, 11].

A reserva ovariana é constituída de folículos primordiais, cujo número é determinado antes mesmo do nascimento da mulher, e o constante recrutamento destes folículos leva ao esgotamento da reserva ovariana [12]. Ainda, outros aspectos como o acúmulo de danos e estresse oxidativo, fatores relacionados a condições ambientais de alimentação, avanço da idade e estilo de vida, podem impactar no processo de envelhecimento ovariano e ativação folicular [13]. O esgotamento da reserva ovariana leva à drástica redução das concentrações de estrógenos e ao término dos ciclos menstruais, caracterizando um importante marco na vida da mulher, conhecido como menopausa e o término da vida reprodutiva feminina [14]. Contudo as consequências do esgotamento da reserva ovariana vão muito além do ovário e da fertilidade, em que a redução das concentrações de estrogênio na menopausa acarreta uma série de alterações fisiológicas associadas ao maior risco cardiovascular, metabólico, redução da saúde óssea, maior incidência de transtornos mentais, além de diversas outras patologias [15-18]. Dado isso, a reposição hormonal (TRH) é uma possível medida terapêutica para evitar e/ou amenizar as consequências da menopausa. Contudo, o tema foi alvo de inúmeras polêmicas em cenário científico e clínico, no qual os primeiros estudos demonstraram não só a ausência de efeitos protetivos da TRH como também o maior risco para desenvolvimento de neoplasias em mulheres [19]. Atualmente, estudos demonstram que a TRH é uma estratégia eficaz para reduzir a presença de sintomas da menopausa, reduzir o risco cardiovascular e até mesmo aumentar a expectativa de vida [20]. No entanto, ainda que positiva à saúde, esta estratégia não é capaz de aumentar a vida reprodutiva da mulher, sendo que até o momento fica claro que a otimização da reserva ovariana ainda é a melhor medida para estender a fertilidade feminina.

A reserva ovariana é formada ainda durante a vida intrauterina da mulher e pode ser entendida como o conjunto de todos folículos ovarianos potencialmente disponíveis para fertilização durante a vida adulta [21]. Por sua vez, a reserva ovariana é principalmente representada por folículos primordiais, os quais são oócitos rodeados de uma única camada achatada de células da granulosa que permanecem quiescentes até que sejam recrutados [22]. Dessa forma, o processo de recrutamento e ativação folicular ocorre ao decorrer da vida feminina a fim de ocasionar fenômenos reprodutivos [23]. Em meio disto, a via intracelular da fosfatidinositol 3 quinase (PI3K)/proteína quinase B (AKT) parece ser a principal via de sinalização a determinar o recrutamento e crescimento de folículos primordiais, além de regular o metabolismo, proliferação e sobrevivência da célula [24]. Assim, quando ativa no interior do oócito, a PI3K converte fosfatidinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) em fosfatidinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃), o que por sua vez leva a proteína quinase do tipo B (AKT) a migrar para o núcleo celular, onde por meio da fosforilação do fator de transcrição Forkhead box O3a (FOXO3a) estimula a ativação e desenvolvimento do folículo primordial (Figura 1)[25].

Ainda nesse sentido, o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR; do inglês mammalian target of rapamycin) é uma proteína quinase que atua no organismo humano via 2 complexos proteicos, conhecidos como mTORC1 e mTORC2 [26], que entre inúmeros papéis também demonstra estar relacionada ao controle da ativação de folículos primordiais. A sinalização da mTORC1 nas células da granulosa do folículo primordial regulam a expressão do KITL, que se liga ao receptor KIT na superfície de oócitos, ativando a via da PI3K/AKT e ativação do folículo primordial [27] (Figura 1). Não surpreendentemente, modelos animais knockout para a expressão de mTOR em folículos primordiais evidenciaram um papel crucial do complexo mTOR nos processos de ativação e maturação celular [28]. Por outro lado, a atividade da mTOR será determinada pela interação entre diversos fatores que incluem desde a sinalização de outras vias celulares a até mesmo a presença de nutrientes como aminoácidos [29]. Nesse sentido, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é um importante sensor energético intracelular que demonstra ser a principal via antagônica do complexo mTOR [30]. Especificamente, estudos mostram que a AMPK estimula

a maior atividade do complexo proteico TSC1/2 e da proteína SIRT1, inibindo diretamente a sinalização da mTOR [31]. Por sua vez, dentro do folículo ovariano a sinalização da AMPK parece inibir a ativação folicular justamente por impedir a sinalização da via da mTOR e da PI3K/AKT [32]. Assim, de maneira similar ao visto anteriormente, estudos evidenciaram que a maior sinalização AMPK conduz a dormência da reserva folicular [33]. Desse modo, pode-se notar que a ativação folicular e seu desenvolvimento será um processo dependente da ação e comunicação de diversas vias metabólicas sensoras dos níveis de nutrientes e energia [34].

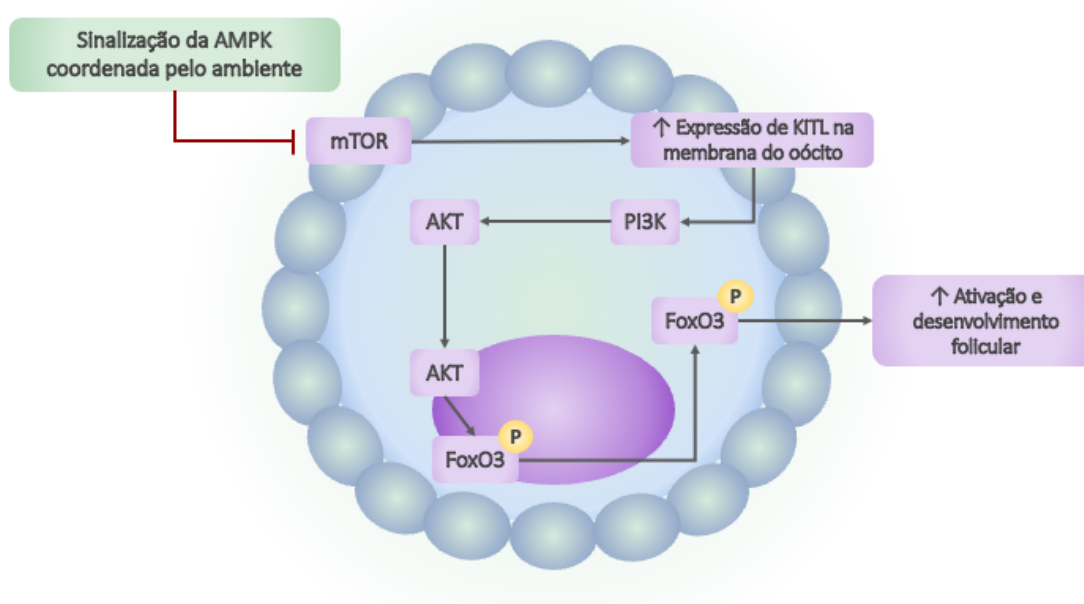


Figura 1 – Vias intracelulares relacionadas ao recrutamento folicular ovariano; AMPK – Proteína quinase ativada por AMP, MTOR – Proteína alvo da Rapamicina, KITL – Ligante do receptor KIT, PI3K – Fosfatidil-inositol 3 quinase, AKT – Proteína quinase B, FOXO3 – Forkhead box O3.

Nesse contexto, a restrição calórica (RC) é uma estratégia nutricional marcada pela redução da ingestão alimentar sem que ocorra desnutrição [35]. Esta intervenção dietética é consolidada na literatura como promotora da longevidade e redutora do desenvolvimento de doenças relacionadas ao envelhecimento [35]. Quando aplicada em estudos pré-clínicos realizados com diversos modelos animais, a RC de 30 a 50% demonstrou promover extensão do período de vida em 50 a 300% [36]. Estudos clínicos chegam a sugerir que a RC possa aumentar de 1 a 5 anos a longevidade de humanos [35]. Tal efeito

pode ser considerado uma consequência da modulação de diversas vias metabólicas e fisiológicas que ocorre frente a RC, onde é possível observar impactos positivos da RC em promover menor estresse cardiovascular, melhora do status inflamatório, adiposidade, massa corporal, estresse oxidativo e sensibilidade à nutrientes [35, 36].

Os mecanismos de ação da RC ainda não estão totalmente elucidados, entretanto os impactos da RC no ambiente celular são principalmente relacionados a mudanças no status energético celular representados pela razão NAD⁺/NADH, modulando o funcionamento de diversas vias intracelulares [37]. Dentre elas, o aumento da razão NAD⁺/NADH em virtude da RC leva a maior sinalização da AMPK, que além dos mecanismos descritos anteriormente, também parece regular processos de diferenciação e crescimento celular, biogênese mitocondrial, reparo ao DNA e estresse oxidativo [38]. Além disso, as alterações da razão NAD⁺/NADH também parecem impactar na expressão de um grupo de proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina e expressão gênica conhecido como sirtuínas (SIRTs) [39]. Tanto a atividade AMPK como SIRTs são apontadas como reguladores do envelhecimento e da homeostase celular por sua capacidade de modular o fator de transcrição FoxO [31]. Nesse sentido, evidências indicam que os fatores de transcrição da família FoxO são importantes determinantes do envelhecimento e longevidade, sendo envolvidos em uma ampla gama de processos celulares relacionados a resistência ao estresse, ciclo celular e apoptose [40]. Por outro lado, enquanto a RC demonstra favorecer a sinalização AMPK, outras vias intracelulares como da PI3K/AKT/mTOR também parecem ser impactadas [41]. A mTOR atua no ambiente intracelular como um ponto central de integração entre vias bioquímicas relacionadas a disponibilidade de nutrientes e energia, direcionando processos como a síntese proteica, crescimento e diferenciação celular, sendo um importante regulador da homeostase metabólica [29]. Assim, as alterações do status energético celular promovidas pela RC parecem inibir a atividade do complexo mTOR por favorecer maior predominância de vias antagônicas, como a sinalização da AMPK descrita previamente [42]. Consequentemente, inúmeros estudos demonstram que a RC é uma potente ferramenta para modular vias fisiológicas e assim promover benefícios a saúde e longevidade [43].

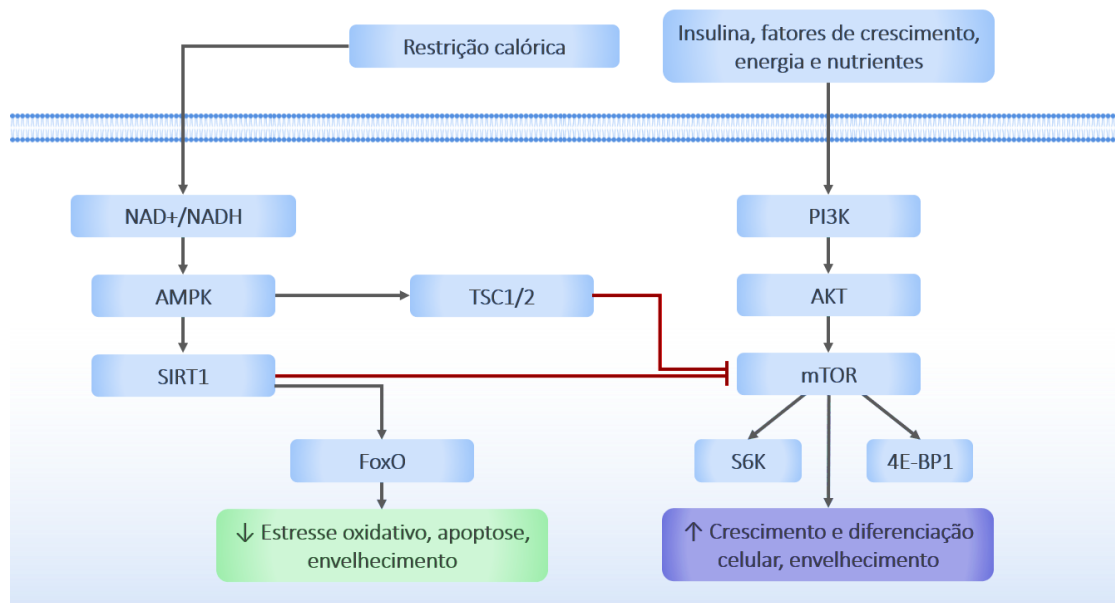


Figura 2 – Efeitos da restrição calórica em vias intracelulares em células somáticas; NAD⁺ - Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidada, NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida, AMPK – Proteína quinase ativada por AMP, SIRT1 – Sirtuínas do tipo 1, FOXO – Forkhead box O, PI3K – Fosfatidil-inositol 3 quinase, AKT – Proteína quinase B, MTOR – Proteína alvo da Rapamicina, S6K.- Proteína ribossômica S6, 4E-BP1 – Proteína 1 de ligação fator 4E de iniciação da tradução eucariótica, TSC1/2 – Complexo de esclerose tuberosa 1/2.

Além da longevidade, a RC também demonstra impactar na reserva ovariana e vida reprodutiva feminina. Desde início do século passado, os primeiros estudos realizados com animais em restrição energética reportaram que a redução da ingestão alimentar em roedores fêmeas resultava em maior sustentabilidade da fertilidade [44]. Logo após disso, a RC continuou sendo estudada e atualmente sabe-se que quando aplicada em intensidades de até 30% a estratégia já é capaz de reduzir a ativação de folículos primordiais e promover extensão da vida reprodutiva feminina [33]. Contudo, grande parte dos estudos avaliando os impactos da RC na reserva ovariana foram realizados em animais logo após o desmame, o que pareceu retardar o crescimento e maturação dos animais [45], impactando o desenvolvimento ovariano. Porém contornando isso, estudos posteriores avaliaram a aplicação da RC de 40% durante 4 meses em camundongos já adultos e evidenciaram que a estratégia

foi eficaz para reduzir o recrutamento folicular, uma vez que as fêmeas do grupo RC apresentavam reserva ovariana duas vezes maior que os animais do grupo controle [46]. Ainda, o mesmo estudo expôs que as fêmeas do grupo RC demonstravam fertilidade e taxa de sobrevivência das proles notavelmente maior que os animais em dieta *ad libitum* após 15 meses de idade [46]. Nesse sentido, nosso grupo também mostrou que tanto camundongos em RC de 30% como tratados com rapamicina, um inibidor da mTOR, durante 90 dias apresentavam maior número de folículos primordiais e totais [47]. No mesmo sentido, outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo demonstrou que a RC de apenas 10% já foi suficiente para impactar positivamente a preservação da reserva ovariana, enquanto outras intervenções como a administração exógena de 17-alfa-estradiol (17 α -E2) falharam em alcançar o mesmo resultado no período de seis meses de estudo [48]. Além disso, a RC de 35% ainda demonstrou proteger a reserva ovariana contra o tratamento quimioterápico em roedores, evidenciando maior número de folículos primordiais no grupo RC após 8 semanas de intervenção [49]. Assim sendo, torna-se clara a capacidade da RC em modular fatores atrelados ao envelhecimento ovariano em diferentes intensidades e fases da vida.

Aprofundando-se nos mecanismos pelo qual a RC atua sobre a reserva ovariana, podemos observar similaridade com as vias que regulam envelhecimento e longevidade. Por exemplo, grande parte dos estudos apontam que a maior expressão de FoxO3 e SIRT1 seria o principal efeito da RC favorecendo menor ativação da reserva ovariana, visto que são vias relacionadas à dormência folicular [33, 47, 49]. No entanto, estudos anteriores que avaliaram os efeitos de intervenções relacionadas à sinalização mTOR, antagônica a via da FoxO/SIRTs e inibida pela RC, demonstram que a maior atividade do complexo mTOR leva ao maior recrutamento folicular e esgotamento precoce da reserva ovariana [50]. Reforçando essa ideia, estudos que utilizaram ativadores de SIRTs reportaram prolongamento da vida reprodutiva e preservação da reserva ovariana por suprimir a sinalização mTOR pela obesidade induzida por dieta [51]. Ainda, outro estudo apontou que a obesidade está relacionada à maior expressão de mTOR no ovário e isso associado ao recrutamento acelerado de folículos ovarianos, onde novamente

animais obesos quando expostos a RC de 30% apresentaram maior sinalização de proteínas do grupo SIRT6 e manutenção da reserva folicular ovariana [52]. Desta maneira, fica claro que a via mTOR tem um papel central como mediadora dos efeitos do estado nutricional sobre a reserva ovariana.

Alguns estudos têm atrelado os efeitos positivos da RC à restrição de proteínas, e mais especificamente de alguns aminoácidos, imposta pela estratégia dietética. Nesse cenário, a importância da proteína como um fator dietético modulador do envelhecimento e da longevidade já vem sendo estudado, onde dietas de baixo aporte proteico mostraram promover maiores taxas de sobrevivência [53]. De maneira mais recente, um estudo que avaliou os efeitos de mais de 25 padrões dietéticos em camundongos apontou que a longevidade e saúde metabólica seriam determinadas principalmente pela quantidade total de proteínas consumidas na alimentação e não a oferta energética, em que a substituição de proteínas por carboidratos, mesmo em dietas isocalóricas, favoreceu maior longevidade e otimização de marcadores de saúde [54]. Somando-se a isso, outros estudos também realizados em roedores demonstraram que a restrição de proteínas promove alterações na via do hormônio do crescimento (GH, do inglês *growth hormone*) relacionadas ao aumento do tempo de vida saudável, enfatizando que a disponibilidade de proteínas da dieta exerce uma função reguladora na extensão de vida [55]. Por sua vez, a redução das concentrações séricas de GH e outros intermediários de sua sinalização, como os fatores de crescimento similares à insulina (IGF, do inglês *insulin-like growth factors*) está associada com o retardo do aparecimento de doenças e aumento da longevidade [56]. Assim, a restrição do consumo de proteínas de 1,67g/kg/dia para 0,95g/kg/dia foi uma estratégia eficaz para reduzir os níveis sanguíneos de IGF-1 em humanos em apenas três semanas [57]. Fora isso, um recente estudo de revisão apontou para a restrição de proteínas como uma potente moduladora do envelhecimento, no qual novamente mesmo em cenários de dietas isocalóricas, a simples redução do proteínas seria capaz de mimetizar os efeitos da RC [58]. Ainda, em outro estudo de revisão a restrição de proteínas foi citada como uma estratégia nutricional alternativa para efeitos anti-envelhecimento, atrelando esses impactos a inibição da via mTOR [59]. Por fim, a restrição de proteínas em uma ingestão de 10% do total de calorias diárias

resultou em uma série de alterações metabólicas em ratos, marcada pelo aumento do gasto energético, diminuição da síntese de ácidos graxos no fígado e indução de autofagia hepática no período de 14 dias de intervenção [60].

Interessantemente, os efeitos da restrição de proteínas também podem ser observado a partir da restrição de apenas alguns aminoácidos, como os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs, do inglês *branched chain amino acids*), triptofano e metionina [59]. Especialmente, os BCAAs são um grupo de aminoácidos essenciais (leucina, isoleucina e valina), caracterizados pela ramificação do grupamento R na estrutura do aminoácido [61], que desempenham papéis essenciais na regulação da homeostase energética, atuam na sinalização ao metabolismo da glicose, lipídeos e síntese de proteínas principalmente em decorrência de sua capacidade em modular a via PI3K/AKT/mTOR [62]. Nesse contexto, a alta disponibilidade crônica de BCAAs leva à hiperativação do complexo mTORC1 resultando na tentativa de estabilização da via por feedback negativo, induzindo a resistência à insulina [63]. A partir disso vários estudos surgem na literatura científica indicando efeitos metabólicos benéficos da restrição de proteínas e BCAAs. Por exemplo, a menor ingestão proteica (total de calorias provenientes de proteínas de 7%) e de BCAAs está relacionada à menor adiposidade e maior sensibilidade à insulina em humanos e roedores [64]. Além disso, outro estudo evidenciou que vias de detecção de nutrientes, como mTOR e SIRT1, foram influenciadas pelos padrões dietéticos em cérebros de camundongo, concluindo que a dieta pobre em proteínas e ricas em carboidratos reproduz alguns benefícios da RC no envelhecimento cerebral [65]. Assim, dietas ricas em BCAAs parecem interferir no comportamento alimentar reduzindo a percepção de saciedade, resultando em camundongos em obesidade e encurtamento da longevidade [66].

Além disso, a ativação de folículos ovarianos foi reduzida pela restrição de proteínas (9% da ingestão energética total) e acelerada pelo consumo proteico aumentando (56% da energia proveniente de proteínas) quando comparados à dieta controle (22% da energia proveniente de proteínas), no qual a restrição ou excesso da ingestão de proteínas resultou em preservação ou declínio, respectivamente, do número de folículos ovarianos ao decorrer do envelhecimento [67]. Por sua vez, os efeitos da restrição de proteínas na reserva

ovariana pareceram ser principalmente atrelados a alterações na sinalização mTORC1 ovariana e de agente metabólicos periféricos como o fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) e adiponectina [67]. Por outro lado, outro estudo demonstrou que o número total de folículos ovarianos foi maior em fêmeas alimentadas em dietas com razão proteína:carboidrato de 3:1, contudo esse resultado não foi descrito para cada categoria folicular [68]. Ainda, cabe salientar que ambos os estudos anteriormente citados tiveram diferenças em sua metodologia, no qual os ovários foram cortados em sequências de 5 e 20 micrometros respectivamente para cálculo quantitativo total de folículos ovarianos. Ainda, é importante destacar que esses foram os únicos 2 estudos encontrados na literatura científica que avaliaram os efeitos da restrição de proteínas no envelhecimento ovariano.

O mecanismo de ação pelo qual a redução de proteínas e de BCAAs na dieta impactaria nos processos de envelhecimento é vinculado à modulação da via mTOR [59]. Nesse contexto, o efeito da disponibilidade de aminoácidos na longevidade é devido a ativação do mTORC1, que integra informações sobre a disponibilidade de nutrientes, direcionando além do balanço entre anabolismo e catabolismo celular, a sensibilidade à insulina, lipogênese, adipogênese, neurodegeneração, carcinogênese e envelhecimento celular [69]. Dessa forma, a menor oferta de aminoácidos e principalmente de BCAAs, levaria à menor da atividade do complexo mTOR, favorecendo efeitos positivos como o retardo do envelhecimento e menor risco para doenças metabólicas [59, 64]. No entanto, além do mTOR, outras vias metabólicas como do fator de crescimento 21 dos fibroblastos (FGF21) também parecem estar relacionadas aos efeitos positivos da restrição de proteínas e BCAAs. O FGF21 é um hormônio principalmente sintetizado no fígado mas também expresso em diversos outros tecidos que parece sinalizar vias fisiológicas relacionadas à proliferação celular, autofagia, senescência celular, estresse oxidativo, sensibilidade à insulina e até mesmo expressão de proteínas desacopladoras de membrana no tecido adiposo [70]. Recentemente um estudo demonstrou que o knockout hepático do FGF21 em camundongos reduziu em cerca de 87% as concentrações séricas, anulando os efeitos da restrição de proteínas sobre a preservação da reserva ovariana [67].

Além disso, até o momento não foram encontrados estudos na literatura referentes aos efeitos da restrição de BCAAs na reserva ovariana.

Dessa forma, é possível observar que mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos fisiológicos pelo qual a restrição de proteínas e de BCAAs podem impactar no envelhecimento e preservação da reserva ovariana, visto que há poucos estudos sobre o tema.

OBJETIVOS

- Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar os efeitos da restrição de proteínas e de BCAAs sobre a ativação de folículos primordiais e o envelhecimento ovariano em comparação com a restrição calórica de 30%.

- Objetivos específicos

Entre os objetivos específicos deste estudo destaca-se a análise dos efeitos da restrição de proteínas e de BCAAs em camundongos quanto a/ao:

- Avaliar o desenvolvimento de peso
- Nível de glicose
- Ativação da reserva folicular
- Ciclicidade estral

HIPÓTESES

A restrição de proteínas e/ou de BCAAs reduz a ativação de folículos ovarianos, mimetizando os efeitos da restrição calórica.

ARTIGO A SER ENVIADO A REVISTA REPRODUCTION

EFFECTS OF CALORIE, PROTEIN AND BRANCHED CHAIN AMINO ACID RESTRICTION ON OVARIAN AGING IN FEMALE MICE

Autores

Veiga GB¹, Zanini BM¹, Garcia DN¹, Hense JD¹, Barreto M¹, Isola JV², Mandadori RG¹, Stout, MB², Schneider A¹

¹Universidade federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas – RS - Brazil

²Oklahoma Medical research Foundation, Oklahoma City – OK - USA

ABSTRACT

Calorie restriction (CR) is a dietary intervention that promote longevity, delays the onset of chronic diseases and preserves the ovarian reserve in females. These effects are attributed to the control of oxidative stress, inflammatory status, cell differentiation, DNA damage and regulation of intracellular pathways such as mTORC1 and FOXO3. However, some studies have observed that the positive impacts of CR can be linked to restriction of protein and branched-chain amino acids (BCAAs) caused by the strategy. The aim of this study was to evaluate the effects of protein and BCAA restriction on primordial follicle activation compared to 30% calorie restriction in mice. For thi, 35 female C57BL/6 mice were randomized into 4 groups and treated for 4 months: control group (CTL; n = 8), 30% calorie restriction (CR; n = 9), protein restriction (PR; 15% restriction; n = 9) and BCAA restriction group (BCAAR; 32% restriction of the amino acids leucine, isoleucine and valine; n = 9). Body mass gain, body composition, food intake, serum levels of BCAAs, glucose metabolism, ovarian reserve and estrous cyclicity were evaluated. We observed that calorie, protein and BCAA restriction prevented weight gain and changed body composition compared to the control. BCAA restriction resulted in increased calorie intake compared to control mice. Interestingly, we observed that calorie and protein restriction prevented activation of primordial follicles and increased the duration of the estrous cycle. No differences were observed for BCAA restriction regarding cyclicity and ovarian reserve. Our data indicates that protein restriction has similar effects to calorie restriction on the ovarian reserve, whereas BCAA restriction alone did not affect it. This occurred despite PR did not reducing calorie intake and CR did not reducing protein intake in levels similar to PR.

Keywords: Dietary interventions, BCAAs, ovarian aging and mTORC1

INTRODUCTION

The ovarian reserve is composed by a finite number of primordial follicles and established during intrauterine life [21]. Once activated, primordial follicles develop irreversibly until ovulation or atresia [12]. The progressive decline in the ovarian reserve results in fertility decline during midlife, and later in life, once the ovarian reserve is depleted, in menopause [12]. Genetic and environmental factors such as body composition, physical activity, diseases and eating habits can influence the size of the ovarian reserve [13]. Activation of mTOR in granulosa cells and phosphorylation of FOXO3 in the oocyte are key steps in primordial follicular activation, and the main targets for ovarian reserve preservation [24, 25, 28]. Therefore, strategies that preserve the ovarian reserve are essential for maintaining female fertility and delaying the onset of menopause [14, 71].

Calorie restriction (CR) is a well-known strategy where the reduced food intake promotes weight and fat loss and is associated with increased health and lifespan [35]. CR also reduces the activation of primordial follicles, preserving the ovarian reserve and extending fertility in mice, through modulation of mTOR and FOXO3 pathways [33, 44, 46]. Some studies suggest that beneficial effects of CR are due the reduced protein intake [54, 64]. In this sense, protein-restricted diets also result in weight loss, improved body composition, increased insulin sensitivity, and consequently, increased longevity [64, 65]. More specifically, mice on branched-chain amino acids (BCAAs) restricted diets also live longer [72], even though protein and calorie intake are similar to control mice. BCAAs play important roles in regulating energy homeostasis, signaling nutrient metabolism, insulin sensitivity and mTOR pathway activity [62]. Lower protein intake, and consequently low BCAAs intake, reduces adiposity, increases insulin sensitivity, promote weight gain control, and modulate aging-related pathways in mice and humans [64, 66].

In the ovary, activation of primordial follicles was reduced by protein restriction (9% of total energy intake) and accelerated by increased protein intake (56% of energy from protein) when compared to a control diet (22% of energy

from protein) [67]. The effects of protein restriction in the ovarian reserve were linked to mTORC1 signaling and endocrine signals, such as fibroblast growth factor 21 (FGF21) and adiponectin [67]. However, the literature about protein restriction and ovarian aging is still unclear. The total number of ovarian follicles was greater in mice fed protein/carbohydrates ratio of 3:1 compared to low-protein diets [68]. Therefore, our study aimed to elucidate the effects of protein and energy supply, and the role of BCAAs, in preservation of the ovarian reserve. We hypothesize that BCAA restriction prevents the activation of primordial follicles similarly to calorie/protein restriction.

METHODS

Animals and diets

This study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Pelotas (UFPEL) under the number 024998/2021-29. For this study, 3-month-old C57/BL6 mice (n=35) were used under controlled temperature and light conditions (22± 2°C, 12-hour light/12-hour dark cycle) with water *ad libitum*. Mice were randomized into 4 groups: control (CTL, n = 8), 30% calorie restriction (CR; n = 9), protein restriction (PR; n = 9) and branched-chain amino acid restriction (BCAAR; n = 9).

Mice were monitored for weight gain and food consumption throughout the study. For this, each mouse was weighed individually on a precision scale weekly. Food consumption was verified from the weekly difference between food offered and leftovers. The food offered for CR mice was determined by the daily equivalent of the weekly average of mice in the control group, with a reduction of 10% in the first week, 20% in the second week and 30% from the third week of study onwards [73]. Meanwhile, CTL, PR and BCAAR mice had *ad libitum* access to diets. Diet composition is shown in Table 1. Mice received the diets for a period of four months. At the end of the experiment, estrous cycle was synchronized by injection of eCG (2.5 U) and hCG (5 U), 48 and 12 hs before euthanasia, respectively. So, the females were euthanized during the estrus phase. After a 4-hour fast, mice were euthanized by exsanguination via cardiac puncture under isoflurane, followed by cervical dislocation. Mice were dissected and the ovaries collected and stored, one ovary frozen at -80°C and the other in a 4%

formaldehyde solution for histological analysis. The blood was centrifuged and the serum separated for storage at -80°C.

Table 1 – Diet composition for the control/calorie restriction groups, protein and BCAA restriction groups.

Aminoacids	Control/CR (g/kg)	PR (g/kg)	BCAAR (g/kg)
Branched-chain aminoacids			
L-isoleucine	7.80	2.54	2.54
L-leucine	25.4	8.27	8.27
L-Valine	8.40	2.73	2.73
Other aminoacids			
L-alanine	9.38	3.05	11.81
L-arginine	6.30	2.05	6.30
L-asparagine	20.58	6.70	22.38
L- aspartic Acid	20.58	6.70	24.22
L-cisteine	7.20	2.34	7.20
L-glucaminic acid	28.97	9.43	32.99
L-glutamine	33.77	11.0	35.78
Glycine	2.96	0.96	5.01
L-histidine	4.60	1.50	4.60
L-ysine	20.38	6.64	20.38
L-methionine	6.70	2.18	6.70
L-phenylalanine	6.60	2.15	6.60
L-proline	7.41	2.41	10,55
L-serine	7.41	2.41	10,12
L-theonine	9.70	3.16	9,70
L-tryptophan	3.40	1.10	3,40
L-Tirosine	6.90	2.25	6,90
% energy from			
Protein	22,0	7,00	21,9
Carbohydrates	59,4	74,0	59,6
Fats	18,6	19,0	18,5

Kcal/g

3,9

3,9

3,9

Plasma concentrations of BCAAs

The serum BCAA levels were measured using a Leucine Standard BCAA Assay Kit (MAK003; Sigma-Aldrich, U.K.). The reaction product results in a colorimetric change proportional to the amount of BCAA present in the sample [74].

Glucose metabolism

Glucose metabolism was evaluated by measuring the fasting glucose before euthanasia, using a glucometer (AccuCheck Active, Roche Diagnostics®, USA) [75].

Histology and follicle counts

For histological evaluation, ovaries samples were removed from 4% paraformaldehyde and subjected to dehydration in alcohol, cleared in xylol and embedded in Paraplast Plus (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA). Subsequently, the ovaries already included in Paraplast Plus were sequentially cut in a Leica automatic microtome model RM2245 (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK) at a thickness of 5 µm, and 1 out of 6 cuts was removed and placed on slides standard histology slides. After drying the slides in an oven at 55°C, the slides were stained with hematoxylin-eosin, mounted with coverslips and synthetic resin (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA). Images of ovarian sections were evaluated in a microscope (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan) using 10 and 40X magnification. The classification of ovarian follicles was determined as follows: primordial when surrounded by a layer of flattened granulosa cells; transition when surrounded by at least one cuboidal granulosa cell; primaries when surrounded by a layer of cuboidal granulosa cells; secondaries when surrounded by two or more layers of cuboidal granulosa cells; tertiary when the presence of antrum and cumulus oophorus complex is observed, only nucleated follicles were considered [76]. The total number of follicles was divided by the total number of histological sections. Finally, The size of the oocytes was evaluated based on the average of the vertical and horizontal length by measurement in a microscope (Nikon Eclipse

E200, Nikon Corporation, Japan) on 3 oocytes from each category were analyzed per animal [77].

Vaginal cytology

For cytological analysis vaginal cells were collected with a micropipette. This procedure was repeated daily for 12 consecutive days at the same time. After that, the material was transferred to a slide and subsequently stained with a fast panopticon for visualization under a microscope (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan). The stages of the estrous cycle were defined by the cell types present in the slide according to previous references [78]. In addition, the duration between cycles was defined from the interval between two estrus phases and the relative percentage of each phase adjusted for the total period of 12 days.

Statistical analysis

To perform the statistical analyses, the Graphpad Prism 6.0 software was used, in which the One-Way ANOVA test was used followed by a Tukey post-hoc to evaluate absolute body mass gain, food consumption, body composition, BCAA levels, blood glucose and estrous cycle. Weight gain between months was analyzed by Two-way ANOVA for repeated measures. In addition, was performed parametric tests to analyze variables with normal distribution and a non-parametric test to variables with non-normal distribution evaluated by Shapiro-Wilk test. P values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Body mass

We observed that calorie, protein and BCAA restriction prevented body mass gain compared to control mice (Figure 3A, $p < 0.05$). The CR group had the lowest body mass throughout the experiment (Figure 3B, $p < 0.05$)

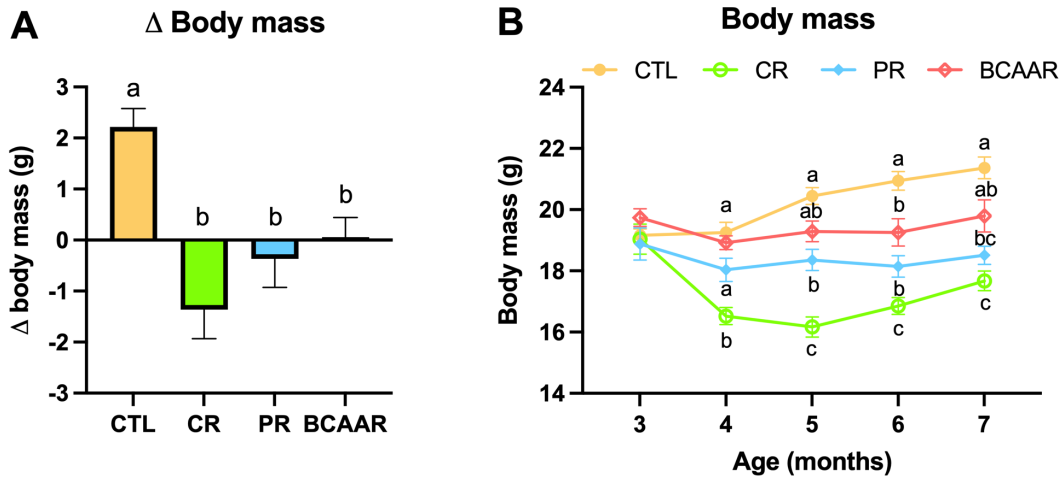


Figure 3 – A) Body mass gain between the beginning and end of treatment; B) body mass throughout the experiment in the control (CTL), calorie restriction (CR), protein restriction (PR) and branched-chain amino acid restriction (BCAAR) groups. Different letters indicate statistical differences with $p < 0.05$. The P-value was calculated by a One-Way Anova parametric test.

Food consumption and body composition

As expected we observed that CR mice consumed less calories adjusted to body mass (Figure 4A, $p = 0.002$). In addition, CR mice had lower energy intake from protein (Figure 4B, $p = 0.0003$) and lower consumption of BCAA (Figure 4C, $p < 0.0001$). Mice in the PR group had similar energy intake to the control group, but less energy intake from protein (Figure 4B, $p < 0.0001$). In addition, BCAAR mice consumed more calories than the other groups (Figure 4A, $p = 0.0324$), including more energy from protein (Figure 4B, $p = 0.0083$), despite the reduction in BCAA intake (Figure 4C, $p < 0.0001$). BCAA consumption relative to body mass was lower in the PR and BCAAR groups compared to the control and CR groups (Figure 4C).

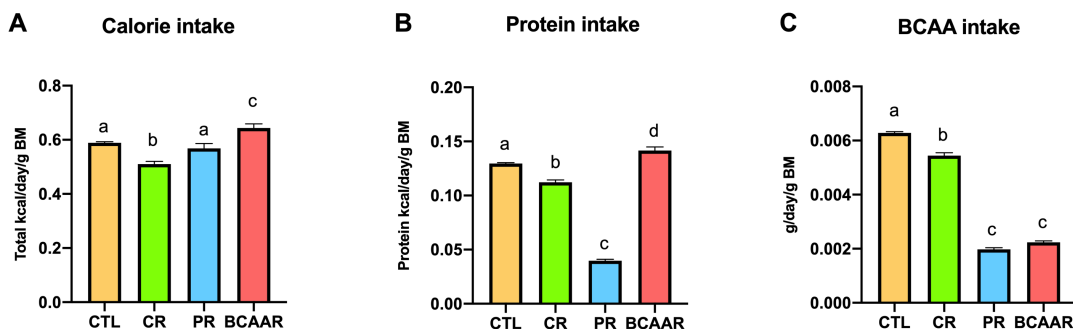


Figure 4 – A) Total calorie intake per day/gram of body mass; B) Calorie intake from protein per day/gram of body mass; C) Intake of branched chain amino acids (BCAA) per day/gram of body mass in the control (CTL), calorie restriction (CR), protein restriction (PR) and branched chain amino acid restriction (BCAAR) groups. Different letters indicate statistical differences with $p < 0.05$. The P-value was calculated by a One-Way Anova parametric test.

The normalized weight of visceral, periovarian and perirenal adipose tissue showed a similar pattern between groups. We observed a reduction of fat mass in CR mice, an increase in PR mice and no changes in the BCAAR mice compared to CTL mice (Figure 5).

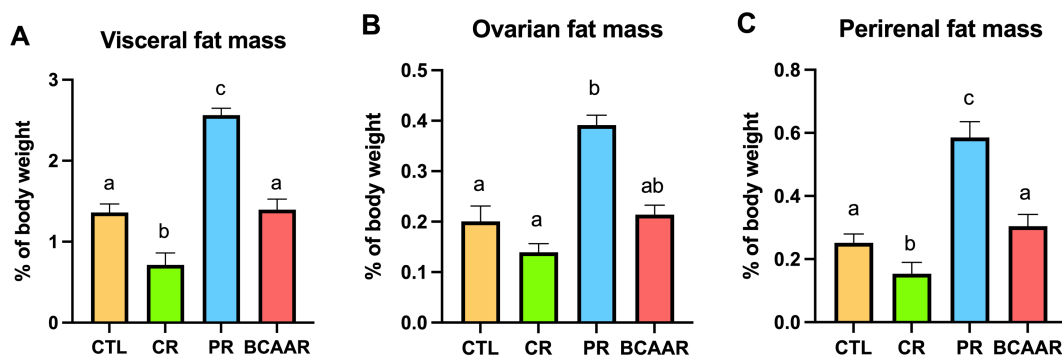


Figure 5 – A) Percentage of visceral fat normalized to body mass; B) percentage of periovarian fat normalized to body mass; C) percentage of perirenal fat normalized to body mass in the control (CTL), calorie restriction (CR), protein restriction (PR) and branched-chain amino acid restriction (BCAAR) groups. Different letters indicate statistical differences with $p < 0.05$. The P-value was calculated by a non-parametric t-test.

Plasma concentrations of BCAAs

The analysis of plasma BCAA levels indicates that PR mice had lower concentrations of BCAAs compared to the other groups (Figure 6, $P < 0.05$).

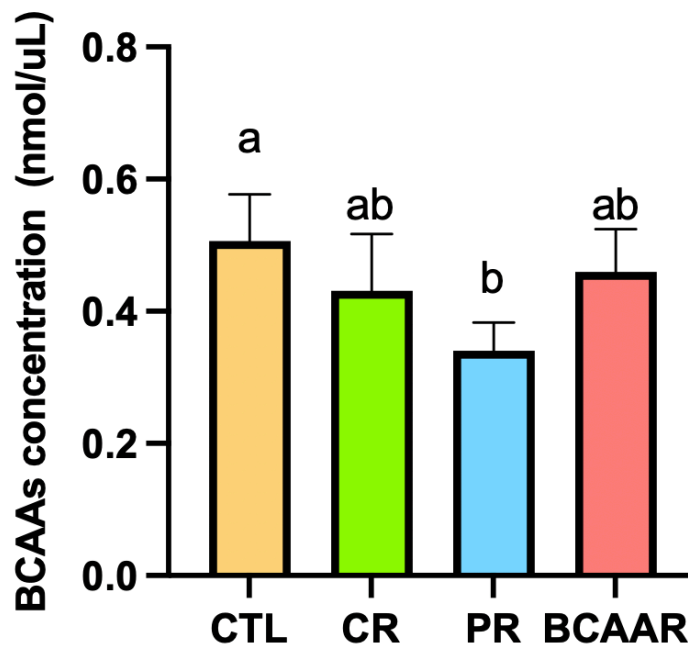


Figure 6 – Serum concentrations of branched chain amino acids in control (CTL), calorie restriction (CR), protein restriction (PR) and branched chain amino acid restriction (BCAAR) groups. Different letters indicate statistical differences with $p < 0.05$. The P-value was calculated by a non-parametric t-test.

Glucose metabolism

There was no difference for fasting glucose between groups (Figure 7, $P > 0.05$).

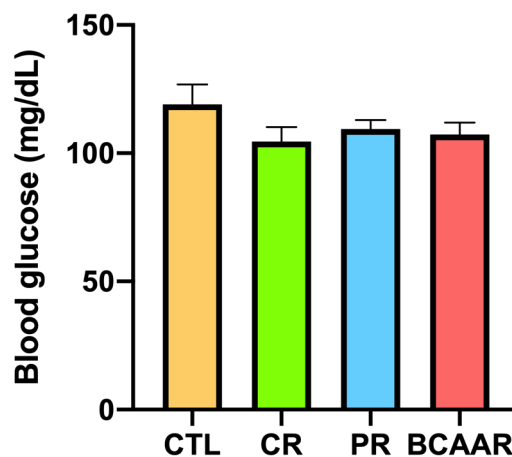


Figure 7 – Fasting blood glucose in animals in the control (CTL), calorie restriction (CR), protein restriction (PR) and branched-chain amino acid

restriction (BCAAR) groups. Different letters indicate statistical differences with $p < 0.05$. The P-value was calculated by a One-Way Anova parametric test.

Vaginal cytology

Mice from CR and PR groups were less days in estrus and had less complete cycles compared to CTL group (Figure 8A and B). In addition, CR and PR mice remained longer in the diestrus stage compared to the CTL group (Figure 8C). BCAAR mice did not have significant reduction in the number of days in estrus and duration of cycle ($p > 0.05$).

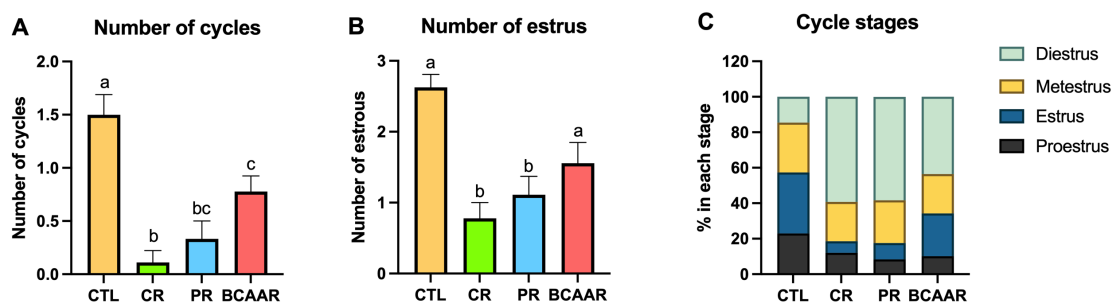


Figure 8 – A) Number of days in estrus; B) number of complete cycles; C), percentage of time in each stage for control (CTL), calorie restriction (CR), protein restriction (PR) and branched-chain amino acid restriction (BCAAR) groups. Different letters indicate statistical differences with $p < 0.05$. The P-value was calculated by a One-Way Anova parametric test.

Ovarian reserve

As expected, we observed that CR and PR mice had more primordial follicles compared to CTL mice (Figure 9A; $p < 0.05$). However, RBCAA mice were not different from the control mice (Figure 9A). Furthermore, PR mice had more transition follicles and a lower number of secondary follicles when compared to the control group (Figure 9B, D; $p < 0.05$). As regards to other follicle classes, no differences were observed (Figure 9B-C, E-F).

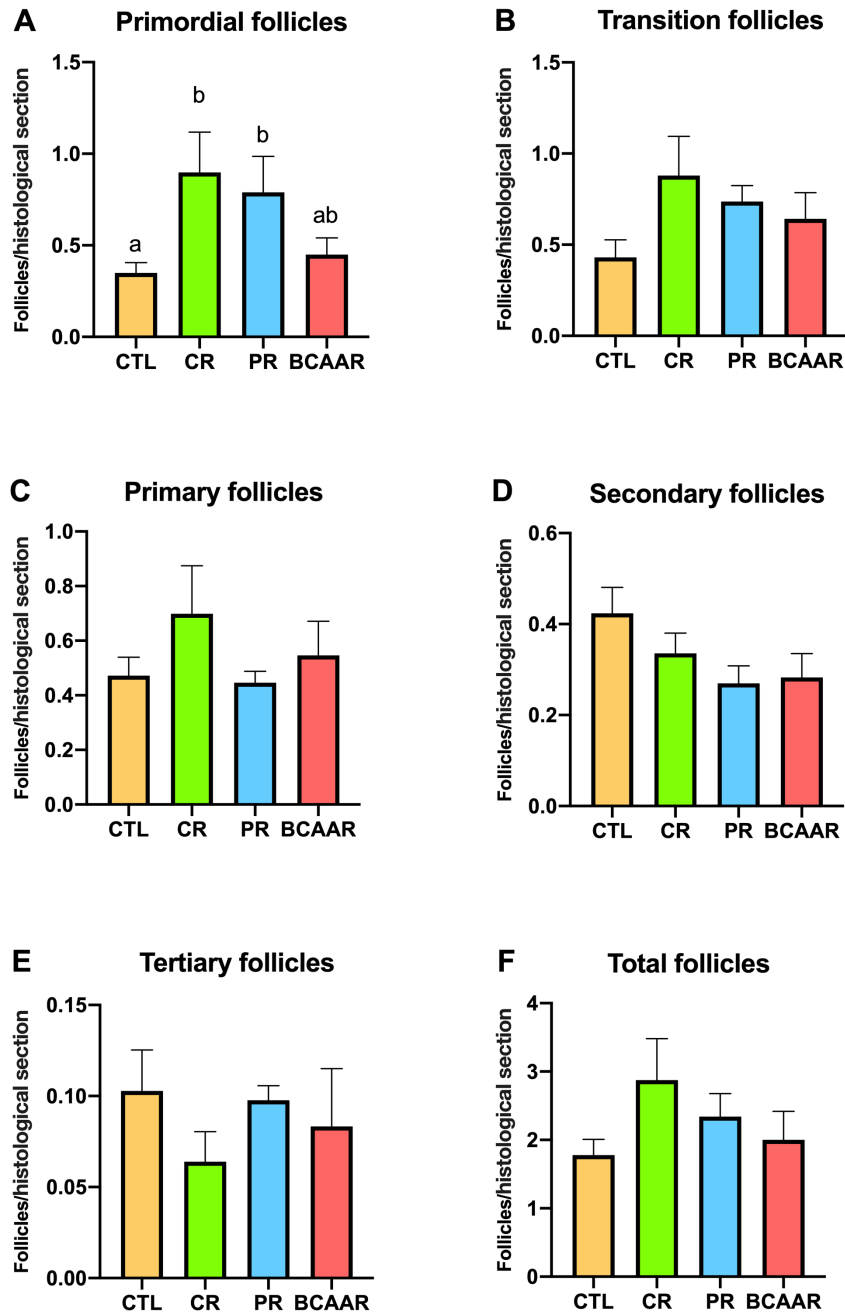


Figure 9 – Number of A) primordial; B) transition; C) primary; D) secondary; E) tertiary; F) total follicles between control (CTL), calorie restriction (RC), protein restriction (PR) and branched-chain amino acid restriction (BCAAR) groups. Different letters indicate statistical differences with $p < 0.05$. The P-value was calculated by a non-parametric t-test.

Regarding the size of oocytes, we observed that PR mice had smaller oocytes in primordial and primary follicles compared to control mice (Figure 10, $p < 0.05$). No other differences were found between groups for oocyte size.

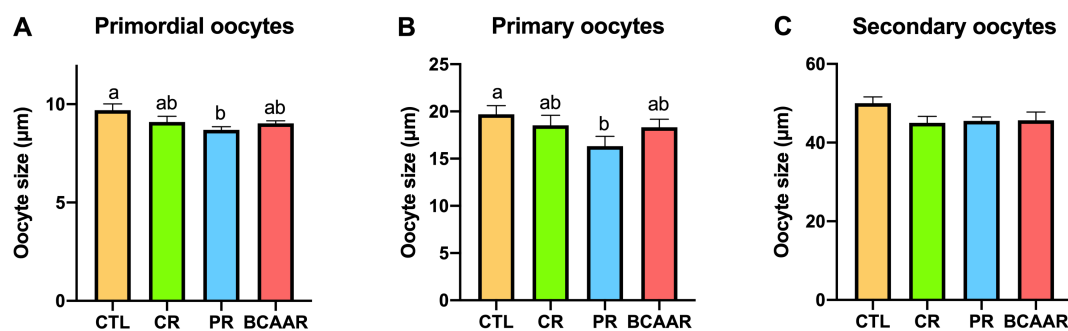


Figure 10 – Oocyte size in A) primordial; B) primary; C) secondary follicles between control (CTL), calorie restriction (RC), protein restriction (PR) and branched-chain amino acid restriction (BCAAR). Different letters indicate statistical differences with $p < 0.05$. The P-value was calculated by a One-Way Anova parametric test.

DISCUSSION

In this study, we observed that calorie and protein restriction reduced body mass gain and cyclicity and preserved the ovarian reserve. However, the same was not observed with BCAAs restriction only. Interestingly, serum BCAA levels were decreased only in the protein restriction group, despite a similar reduction in BCAA intake.

As expected, CR was an efficient strategy to preserve the ovarian reserve, as CR mice had twice the number of primordial follicles compared to control females. Others had already observed that reducing calorie intake in female rodents resulted in greater sustainability of fertility [44]. We have previously shown that 30% CR for three months can increase the number of primordial follicles in mice [47]. Similarly, 10% CR was enough to positively impact the ovarian reserve after six months of treatment [48]. The effects of CR seem to be mediated by FOXO3 and mTOR activation in the ovary [33, 50, 71]. Interestingly, we shown that PR can preserve the ovarian reserve similarly to CR mice. Previous studies observed that activation of ovarian follicles was reduced by protein restriction (9% of total energy intake) and accelerated by increasing protein intake (56% of energy from protein) when compared to a control diet (22% of energy from protein) (67). These effects were mediated by ovarian mTORC1

signaling and circulating hormones, such as fibroblast growth factor 21 (FGF21) and adiponectin (67). Despite a similar effect in the preservation of the ovarian reserve, the reduction of protein intake imposed by CR is small compared to PR mice, and the total calorie intake in PR mice is greater than that of CR mice. Therefore, calorie and protein restriction can promote the same effects, despite divergent intake profiles. Furthermore, our study shows that BCAA restriction has no effect in the ovarian reserve of young female mice. Despite BCAA restriction being effective in reducing body mass gain compared to control mice, this reduction was not as intense as in CR and PR mice. Also, adjusted calorie and protein intake was higher in the BCAAR mice compared to control mice, which may indicate the activation of divergent pathways to promote ovarian reserve preservation. On other hand, a low BCAA diet shows to promote ceramides pathway inducing to increases on levels of reactive oxygen species (ROS), impair ovarian granulosa cell function and reducing the number of primordial on young female C57BL/6J mice [79]. However, the same study also observed that low BCAA diets leads to decreased of body mass and serum BCAAs levels [79]. Finally, on our study the plasma BCAAs concentration was reduced only in PR mice, once again indicating that divergent pathways may be regulating the effect of restrictive diets on ovarian reserve.

We observed that CR was an effective strategy to control body mass gain, as CR mice maintained a lower body mass than the other groups for most of the study. Protein and BCAA restriction also reduced body mass gain, even though these mice had a higher adjusted energy intake. These results are similar to previous observations, where even with higher adjusted calorie intake, reducing proteins and BCAAs intake prevents weight gain in mice [72, 80]. Similarly, studies have also shown in humans that moderate protein restriction can reduce body and fat mass gain [64]. BCAA-rich diets change eating behavior, leading to hyperphagia by depleting serotonin levels associated with tryptophan depletion, resulting in obesity in rodents [66]. In contrast, very low-protein diets decrease food intake and promote weight loss, associated to hypothalamic inhibition of mTOR signaling in mice [81]. Our results are similar, PR mice were not different from control in terms of adjusted calorie intake, however BCAAR mice had a 10% higher adjusted calorie intake compared to CTL mice. Interestingly, even in the

absence of severe reductions in protein and BCAA intake, CR mice still had the strongest influence in body mass gain. BCAAR mice, despite reduced BCAA intake, similar to PR mice, had slightly higher AAs intake than CTL mice, resulting in increased body mass gain compared to PR mice. Previous studies have shown that BCAA restriction has different effects in male and female mice, as lifelong restriction of BCAAs increased longevity only in males [72]. Additionally, female mice fed lifelong low BCAA diets demonstrated lower body mass only after 10 months of age, while male mice showed significant differences already at 5 months [72]. Thus, our findings indicate that BCAA restriction has moderate effects in body mass gain in young female mice compared to PR and CR.

Regarding serum levels of BCAAs, we observed that only PR mice had a reduction in serum concentrations of BCAAs compared to control mice. These results suggest that BCAA levels are regulated post-ingestion, given that even with the same levels of dietary BCAA restriction for PR and BCAAR, only PR mice had reduced serum BCAAs levels. Similarly, mice fed diets with double the amount of BCAAs did not show increased plasma levels of BCAAs, reinforcing the hypothesis that serum concentrations are regulated post ingestion [66]. Furthermore, total daily protein intake is positively correlated with plasma BCAAs concentrations, whereas other AAs appear to be negatively correlated with protein intake [54], suggesting a direct effect of protein intake on whole body BCAA catabolism. This is in agreement with our observations, as only PR mice had a reduction in serum levels of BCAAs, and total AAs intake was even slightly higher in BCAAR mice. The metabolism of BCAAs is complex and influenced by several factors, such as body composition, insulin sensitivity, gut microbiota and inflammation [61], therefore future studies should observed the effects of BCAA restriction in different conditions, such as in obese mice.

No differences were observed in fasting glucose between groups. The association between BCAA intake and insulin resistance seems to be mediated by the negative feedback of mTOR signaling hyperactivation, as well as mitochondrial dysfunction, oxidative stress and pancreatic beta cells [63, 82]. Numerous studies have demonstrated an improvement in the metabolic profile by increasing insulin sensitivity and beta-pancreatic function in rodents and humans [64, 80, 83]. However, diets moderate in BCAAs improve glucose

metabolism in mice fed high-fat diets by reducing fasting insulin and glucose levels [84]. In addition, a recent study showed that response to protein restriction is influenced by sex, genetic background and degree of restriction, and that adiposity, insulin sensitivity and levels of circulating hormones have a high degree of variability between sex and mice strains [85]. Therefore, this should be taken into consideration as we used only young female mice in this study. In addition, it is important to highlight that CR is an effective strategy to improve insulin sensitivity and homeostasis of glucose metabolism [86], however, a limitation on our study was that only fasting glucose was evaluated.

The importance of the pattern of body fat distribution as a modulator of the metabolic profile in humans and rodents is well known [87]. Different dietary patterns have also been shown to change body composition [88, 89]. Rodents fed high-fat diets have increased visceral fat deposition, hyperinsulinemia, and insulin resistance within just four weeks [90]. Conversely, CR can improve body composition, insulin resistance and inflammatory profile in mammals [91, 92]. We have previously shown that 30% CR for three months was able to prevent body mass gain and visceral fat deposition, associated to increased insulin sensitivity in young female mice [47]. We again observed a reduction in body mass and visceral adipose mass in CR mice. However, while others suggest that diets restricted in protein and BCAAs reduced fat mass and benefited glucose metabolism [64, 83, 93], the same was not observed in our study. PR mice had increased deposition of visceral fat and no changes in fasting glycemia. BCAA restriction did not seem to affect fat deposition compared to control mice in our study, with the exception of slightly increased perirenal adipose tissue deposition. Such differences can be explained by the carbohydrate:protein intake ratio in the diet and by the amino acid distribution pattern. The PR group had a strong reduction in total AA intake and, consequently, increased deposition of body fat.

The different dietary pattern of mice in our study affected estrous cycles. We observed that CR mice spent less time in estrus and had less complete cycles. It is well known that CR affects female fertility via hypothalamic and peripheral mediators associated to energy homeostasis. At the same time that CR can preserve the ovarian reserve of preantral follicle, it can negatively affect growth of tertiary follicles, ovulation and fertility [94]. In addition, we observed that

PR mice also less days in estrus and had less complete cycles, similarly to CR mice. Rodents fed low-protein diets (4% of total energy intake from protein) had disruption of estrous cyclicity and inhibition of follicular development, mainly associated with impaired expression of hypothalamic proteins and this was associated with changes on FGF21 levels [95]. Disturbances related to the estrous cycle in rats fed low-protein diets were reversed after a period of refeeding with normal-protein diets (18% of energy from protein) [95]. However, we observed that dietary restriction of BCAAs only did not interfere with cyclicity. This may be related to the higher energy intake and the lower impact of this diet on body mass gain, which seems to be a hallmark effect of these restrictive diets regarding preservation of the ovarian reserve. Thus, our findings highlight the importance of total calories intake for regulation of the estrous cycle, but also macronutrient ratio, helping to optimize diets that aim not only to preserve the ovarian reserve, but also cyclicity and reproductive longevity.

In conclusion, our results show that protein restriction has similar effects to calorie restriction on preservation of the primordial follicle reserve. This happened even though the two strategies had divergent effects in calorie and protein intake. In turn, BCAA restriction alone was not able to preserve the ovarian reserve, resulting in greater energy intake and less impact on body mass. More studies are needed to understand the mechanisms by which these diets affect metabolism and preserve the ovarian reserve of reproductive age females.

The development of our study was limited by the impossibility of accommodating the animals in single-houses due to the physical space of our laboratory. Furthermore, the ad libitum supply of feed to animals of control, PR and BCAAR group allowed changes in the animals eating behavior as a result of nutritional strategies.

REFERENCES

1. Findlay, J.K., et al., *How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established?*1. *Biology of Reproduction*, 2015. **93**(5): p. 111-111.
2. Monget, P., et al., *The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. **356**(1-2): p. 2-12.

3. Moslehi, N., et al., *Current Evidence on Associations of Nutritional Factors with Ovarian Reserve and Timing of Menopause: A Systematic Review*. *Adv Nutr*, 2017. **8**(4): p. 597-612.
4. Maidarti, M., R.A. Anderson, and E.E. Telfer, *Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt Signalling and DNA Damage in the Oocyte: Implications for Primordial Follicle Activation, Oocyte Quality and Ageing*. *Cells*, 2020. **9**(1): p. 200.
5. Shah, J.S., et al., *Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review*. *J Assist Reprod Genet*, 2018. **35**(7): p. 1135-1148.
6. Guo, J., et al., *Oocyte stage-specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(23): p. E5326-E5333.
7. te Velde, E.R., et al., *Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging*. *Mol Cell Endocrinol*, 1998. **145**(1-2): p. 67-73.
8. Selesniemi, K., H.J. Lee, and J.L. Tilly, *Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age*. *Aging Cell*, 2008. **7**(5): p. 622-9.
9. Flanagan, E.W., et al., *Calorie Restriction and Aging in Humans*. *Annu Rev Nutr*, 2020. **40**: p. 105-133.
10. Osborne, T.B., L.B. Mendel, and E.L. Ferry, *THE EFFECT OF RETARDATION OF GROWTH UPON THE BREEDING PERIOD AND DURATION OF LIFE OF RATS*. *Science*, 1917. **45**(1160): p. 294-5.
11. Liu, W.J., et al., *Calorie restriction inhibits ovarian follicle development and follicle loss through activating SIRT1 signaling in mice*. *Eur J Med Res*, 2015. **20**: p. 22.
12. Selesniemi, K., H.-J. Lee, and J.L. Tilly, *Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age*. *Aging Cell*, 2008. **7**(5): p. 622-629.
13. Solon-Biet, M., Samantha, et al., *The Ratio of Macronutrients, Not Caloric Intake, Dictates Cardiometabolic Health, Aging, and Longevity in Ad Libitum-Fed Mice*. *Cell Metabolism*, 2014. **19**(3): p. 418-430.
14. Fontana, L., et al., *Decreased Consumption of Branched-Chain Amino Acids Improves Metabolic Health*. *Cell Rep*, 2016. **16**(2): p. 520-530.
15. Wahl, D., et al., *Comparing the Effects of Low-Protein and High-Carbohydrate Diets and Caloric Restriction on Brain Aging in Mice*. *Cell Reports*, 2018. **25**(8): p. 2234-2243.e6.
16. Richardson, N.E., et al., *Lifelong restriction of dietary branched-chain amino acids has sex-specific benefits for frailty and lifespan in mice*. *Nat Aging*, 2021. **1**(1): p. 73-86.
17. Nie, C., et al., *Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. **19**(4): p. 954.
18. Solon-Biet, S.M., et al., *Branched chain amino acids impact health and lifespan indirectly via amino acid balance and appetite control*. *Nat Metab*, 2019. **1**(5): p. 532-545.
19. Zhuo, Y., et al., *Fibroblast growth factor 21 coordinates adiponectin to mediate the beneficial effects of low-protein diet on primordial follicle reserve*. *EBioMedicine*, 2019. **41**: p. 623-635.

20. Solon-Biet, S.M., et al., *Macronutrient balance, reproductive function, and lifespan in aging mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(11): p. 3481-6.
21. Ribeiro, L.C., et al., *Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats*. Neuroscience Research, 2009. **64**(3): p. 330-334.
22. Zemdegs, J., et al., *Metformin Promotes Anxiolytic and Antidepressant-Like Responses in Insulin-Resistant Mice by Decreasing Circulating Branched-Chain Amino Acids*. J Neurosci, 2019. **39**(30): p. 5935-5948.
23. Bennis, M.T., et al., *The role of transplanted visceral fat from the long-lived growth hormone receptor knockout mice on insulin signaling*. GeroScience, 2017. **39**(1): p. 51-59.
24. Myers, M., et al., *Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary*. Reproduction, 2004. **127**(5): p. 569-580.
25. Cora, M.C., L. Kooistra, and G. Travlos, *Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears*. Toxicol Pathol, 2015. **43**(6): p. 776-93.
26. Cummings, N.E., et al., *Restoration of metabolic health by decreased consumption of branched-chain amino acids*. J Physiol, 2018. **596**(4): p. 623-645.
27. Wu, Y., et al., *Very-low-protein diets lead to reduced food intake and weight loss, linked to inhibition of hypothalamic mTOR signaling, in mice*. Cell Metab, 2021. **33**(6): p. 1264-1266.
28. Neinast, M., D. Murashige, and Z. Arany, *Branched Chain Amino Acids*. Annu Rev Physiol, 2019. **81**: p. 139-164.
29. Lynch, C.J. and S.H. Adams, *Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(12): p. 723-36.
30. Yoon, M.S., *The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Insulin Resistance and Metabolism*. Nutrients, 2016. **8**(7).
31. Yu, D., et al., *The adverse metabolic effects of branched-chain amino acids are mediated by isoleucine and valine*. Cell Metab, 2021. **33**(5): p. 905-922.e6.
32. Roquette, A.R., et al., *Moderate intake of BCAA-rich protein improves glucose homeostasis in high-fat-fed mice*. J Nutr Biochem, 2020. **80**: p. 108332.
33. Green, C.L., et al., *Sex and genetic background define the metabolic, physiologic, and molecular response to protein restriction*. Cell Metab, 2022. **34**(2): p. 209-226.e5.
34. Wetter, T.J., et al., *Effect of calorie restriction on in vivo glucose metabolism by individual tissues in rats*. Am J Physiol, 1999. **276**(4): p. E728-38.
35. McLaughlin, T., et al., *Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(11): p. E1756-60.
36. Smith, N.J., et al., *A Comparison of Dietary and Caloric Restriction Models on Body Composition, Physical Performance, and Metabolic Health in Young Mice*. Nutrients, 2019. **11**(2).

37. Kim, J.Y., et al., *High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(6): p. R2057-65.
38. Han, D.H., et al., *Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation*. Diabetes, 1997. **46**(11): p. 1761-7.
39. Barzilai, N., et al., *Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1353-61.
40. Sbierski-Kind, J., et al., *Association between Subcutaneous Adipose Tissue Inflammation, Insulin Resistance, and Calorie Restriction in Obese Females*. J Immunol, 2020. **205**(1): p. 45-55.
41. Garcia, D.N., et al., *Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice*. GeroScience, 2019. **41**(4): p. 395-408.
42. Zhou, Z., et al., *A fifty percent leucine-restricted diet reduces fat mass and improves glucose regulation*. Nutr Metab (Lond), 2021. **18**(1): p. 34.
43. Isola, J.V.V., et al., *Mild calorie restriction, but not 17 α -estradiol, extends ovarian reserve and fertility in female mice*. Exp Gerontol, 2022. **159**: p. 111669.
44. Silva, J.R., J.R. Figueiredo, and R. van den Hurk, *Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis*. Theriogenology, 2009. **71**(8): p. 1193-208.
45. Sun, J., et al., *Caloric restriction in female reproduction: is it beneficial or detrimental?* Reprod Biol Endocrinol, 2021. **19**(1): p. 1.
46. Cao, Y., et al., *Dietary Protein Regulates Female Estrous Cyclicity Partially via Fibroblast Growth Factor 21*. Nutrients, 2023. **15**(13).

CONCLUSÃO DA TESE

Em conclusão, os resultados encontrados em nosso estudo demonstraram que a restrição de proteínas pode apresentar efeitos similares a restrição calórica na reserva ovariana, principalmente marcados pela preservação do número de folículos primordiais. Por sua vez, tais efeitos podem ser observados mesmo as duas estratégias demonstrando repercussões divergentes na redução da ingesta calórica e proteica ajustada. Em contrapartida, a restrição de BCAAs somente não mostrou ser capaz de preservar a reserva ovariana, resultando em maior ingesta energética e menor impacto no ganho de peso. Assim os resultados encontrados nesse estudo auxiliam para elucidar os efeitos da restrição de proteínas e de BCAAs ao envelhecimento ovariano, ao passo que permite comparar seus impactos com os efeitos da restrição calórica, uma estratégia consolidada na literatura científica. Dessa forma, espera-se que esse estudo seja utilizado como base científica para favorecer o desenvolvimento de mais estudos na área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aburto, J.M., et al., *Dynamics of life expectancy and life span equality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(10): p. 5250-5259.
2. Knapowski, J., K. Wieczorowska-Tobis, and J. Witowski, *Pathophysiology of ageing*. J Physiol Pharmacol, 2002. **53**(2): p. 135-46.
3. Kim, S., *Molecular biology of aging*. Arch Surg, 2003. **138**(10): p. 1051-4.
4. Childs, B.G., et al., *Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy*. Nature Medicine, 2015. **21**(12): p. 1424-1435.
5. Mchugh, D. and J. Gil, *Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues*. Journal of Cell Biology, 2018. **217**(1): p. 65-77.
6. Campisi, J., *Ageing, Cellular Senescence, and Cancer*. Annual Review of Physiology, 2013. **75**(1): p. 685-705.
7. Barnes, R.P., E. Fouquerel, and P.L. Opresko, *The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis*. Mechanisms of Ageing and Development, 2019. **177**: p. 37-45.
8. Benli, A.R., et al., *Effect of maternal age on pregnancy outcome and cesarean delivery rate*. J Clin Med Res, 2015. **7**(2): p. 97-102.
9. Pinheiro, R.L., et al., *Advanced Maternal Age: Adverse Outcomes of Pregnancy, A Meta-Analysis*. Acta Med Port, 2019. **32**(3): p. 219-226.
10. Vollenhoven, B. and S. Hunt, *Ovarian ageing and the impact on female fertility*. F1000Research, 2018. **7**: p. 1835.
11. Liu, K., A. Case, and R.E.A.I. COMMITTEE, *Advanced reproductive age and fertility*. J Obstet Gynaecol Can, 2011. **33**(11): p. 1165-1175.
12. Monget, P., et al., *The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **356**(1-2): p. 2-12.
13. Moslehi, N., et al., *Current Evidence on Associations of Nutritional Factors with Ovarian Reserve and Timing of Menopause: A Systematic Review*. Adv Nutr, 2017. **8**(4): p. 597-612.
14. te Velde, E.R., et al., *Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging*. Mol Cell Endocrinol, 1998. **145**(1-2): p. 67-73.
15. Newson, L., *Menopause and cardiovascular disease*. Post Reproductive Health, 2018. **24**(1): p. 44-49.
16. Carr, M.C., *The emergence of the metabolic syndrome with menopause*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2404-11.
17. Karlamangla, A.S., S.-A.M. Burnett-Bowie, and C.J. Crandall, *Bone Health During the Menopause Transition and Beyond*. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America, 2018. **45**(4): p. 695-708.
18. El Khoudary, S.R., et al., *The menopause transition and women's health at midlife: a progress report from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN)*. Menopause, 2019. **26**(10): p. 1213-1227.
19. Johnson, S.R., *Menopause and hormone replacement therapy*. Med Clin North Am, 1998. **82**(2): p. 297-320.
20. Lobo, R.A., *Hormone-replacement therapy: current thinking*. Nature Reviews Endocrinology, 2017. **13**(4): p. 220-231.
21. Findlay, J.K., et al., *How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established?1*. Biology of Reproduction, 2015. **93**(5): p. 111-111.
22. Chikazawa, K., S. Araki, and T. Tamada, *Morphological and endocrinological studies on follicular development during the human menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 1986. **62**(2): p. 305-13.

23. Liu, K., et al., *Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer*. *Developmental Biology*, 2006. **299**(1): p. 1-11.
24. Maidarti, M., R.A. Anderson, and E.E. Telfer, *Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt Signalling and DNA Damage in the Oocyte: Implications for Primordial Follicle Activation, Oocyte Quality and Ageing*. *Cells*, 2020. **9**(1): p. 200.
25. Shah, J.S., et al., *Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review*. *J Assist Reprod Genet*, 2018. **35**(7): p. 1135-1148.
26. Szwed, A., E. Kim, and E. Jacinto, *Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2*. *Physiol Rev*, 2021. **101**(3): p. 1371-1426.
27. Zhang, H., et al., *Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice*. *Curr Biol*, 2014. **24**(21): p. 2501-8.
28. Guo, J., et al., *Oocyte stage-specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(23): p. E5326-E5333.
29. Liu, G.Y. and D.M. Sabatini, *mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020. **21**(4): p. 183-203.
30. Lu, X., et al., *Stimulation of ovarian follicle growth after AMPK inhibition*. *Reproduction*, 2017. **153**(5): p. 683-694.
31. Sharples, A.P., et al., *Longevity and skeletal muscle mass: the role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake*. *Aging Cell*, 2015. **14**(4): p. 511-23.
32. Bhardwaj, J.K., et al., *Role of autophagy in follicular development and maintenance of primordial follicular pool in the ovary*. *J Cell Physiol*, 2021.
33. Liu, W.J., et al., *Calorie restriction inhibits ovarian follicle development and follicle loss through activating SIRT1 signaling in mice*. *Eur J Med Res*, 2015. **20**: p. 22.
34. Son, W.Y., et al., *Mechanisms of follicle selection and development*. *Minerva Ginecol*, 2011. **63**(2): p. 89-102.
35. Flanagan, E.W., et al., *Calorie Restriction and Aging in Humans*. *Annu Rev Nutr*, 2020. **40**: p. 105-133.
36. Heilbronn, L.K. and E. Ravussin, *Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans*. *Am J Clin Nutr*, 2003. **78**(3): p. 361-9.
37. Lin, S.-J., et al., *Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH*. *Genes & Development*, 2004. **18**(1): p. 12-16.
38. Mihaylova, M.M. and R.J. Shaw, *The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism*. *Nature Cell Biology*, 2011. **13**(9): p. 1016-1023.
39. Sartorelli, V. and G. Caretti, *Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2005. **15**(5): p. 528-535.
40. Martins, R., G.J. Lithgow, and W. Link, *Long live*

FOXO

: unraveling the role of

FOXO

proteins in aging and longevity. *Aging Cell*, 2016. **15**(2): p. 196-207.

41. Speakman, J.R. and S.E. Mitchell, *Caloric restriction*. *Mol Aspects Med*, 2011. **32**(3): p. 159-221.
42. Kezic, A., L. Popovic, and K. Lalic, *mTOR Inhibitor Therapy and Metabolic Consequences: Where Do We Stand?* *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. **2018**: p. 1-8.
43. Golbidi, S., et al., *Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction*. *Current Diabetes Reports*, 2017. **17**(12).

44. Osborne, T.B., L.B. Mendel, and E.L. Ferry, *THE EFFECT OF RETARDATION OF GROWTH UPON THE BREEDING PERIOD AND DURATION OF LIFE OF RATS*. *Science*, 1917. **45**(1160): p. 294-5.
45. Martin, B., et al., *Caloric restriction: Impact upon pituitary function and reproduction*. *Ageing Research Reviews*, 2008. **7**(3): p. 209-224.
46. Selesniemi, K., H.-J. Lee, and J.L. Tilly, *Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age*. *Aging Cell*, 2008. **7**(5): p. 622-629.
47. Garcia, D.N., et al., *Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice*. *GeroScience*, 2019. **41**(4): p. 395-408.
48. Isola, J.V.V., et al., *Mild calorie restriction, but not 17 α -estradiol, extends ovarian reserve and fertility in female mice*. *Exp Gerontol*, 2022. **159**: p. 111669.
49. Xiang, Y., et al., *Calorie restriction increases primordial follicle reserve in mature female chemotherapy-treated rats*. *Gene*, 2012. **493**(1): p. 77-82.
50. Silva, J.R., J.R. Figueiredo, and R. van den Hurk, *Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis*. *Theriogenology*, 2009. **71**(8): p. 1193-208.
51. Zhou, X.-L., et al., *SIRT1 activator (SRT1720) improves the follicle reserve and prolongs the ovarian lifespan of diet-induced obesity in female mice via activating SIRT1 and suppressing mTOR signaling*. *Journal of Ovarian Research*, 2014. **7**(1).
52. Wang, N., et al., *Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats*. *Metabolism*, 2014. **63**(1): p. 94-103.
53. McCay, C.M., F.C. Bing, and W.E. Dilley, *FACTOR H IN THE NUTRITION OF TROUT*. *Science*, 1928. **67**(1731): p. 249-50.
54. Solon-Biet, M., Samantha, et al., *The Ratio of Macronutrients, Not Caloric Intake, Dictates Cardiometabolic Health, Aging, and Longevity in Ad Libitum-Fed Mice*. *Cell Metabolism*, 2014. **19**(3): p. 418-430.
55. Fontana, L., L. Partridge, and V.D. Longo, *Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans*. *Science*, 2010. **328**(5976): p. 321-326.
56. Berryman, D.E., et al., *Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: Lessons from animal models*. *Growth Hormone & IGF Research*, 2008. **18**(6): p. 455-471.
57. Fontana, L., et al., *Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans*. *Aging Cell*, 2008. **7**(5): p. 681-687.
58. Brandhorst, S. and V.D. Longo, *Protein Quantity and Source, Fasting-Mimicking Diets, and Longevity*. *Advances in Nutrition*, 2019. **10**(Supplement_4): p. S340-S350.
59. Lee, M.B., et al., *Antiaging diets: Separating fact from fiction*. *Science*, 2021. **374**(6570): p. eabe7365.
60. Henagan, T.M., et al., *Hepatic autophagy contributes to the metabolic response to dietary protein restriction*. *Metabolism*, 2016. **65**(6): p. 805-815.
61. Neinast, M., D. Murashige, and Z. Arany, *Branched Chain Amino Acids*. *Annu Rev Physiol*, 2019. **81**: p. 139-164.
62. Nie, C., et al., *Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. **19**(4): p. 954.
63. Yoon, M.S., *The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Insulin Resistance and Metabolism*. *Nutrients*, 2016. **8**(7).
64. Fontana, L., et al., *Decreased Consumption of Branched-Chain Amino Acids Improves Metabolic Health*. *Cell Rep*, 2016. **16**(2): p. 520-530.
65. Wahl, D., et al., *Comparing the Effects of Low-Protein and High-Carbohydrate Diets and Caloric Restriction on Brain Aging in Mice*. *Cell Reports*, 2018. **25**(8): p. 2234-2243.e6.
66. Solon-Biet, S.M., et al., *Branched chain amino acids impact health and lifespan indirectly via amino acid balance and appetite control*. *Nat Metab*, 2019. **1**(5): p. 532-545.

67. Zhuo, Y., et al., *Fibroblast growth factor 21 coordinates adiponectin to mediate the beneficial effects of low-protein diet on primordial follicle reserve*. EBioMedicine, 2019. **41**: p. 623-635.
68. Solon-Biet, S.M., et al., *Macronutrient balance, reproductive function, and lifespan in aging mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(11): p. 3481-6.
69. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **168**(6): p. 960-976.
70. Tezze, C., V. Romanello, and M. Sandri, *FGF21 as Modulator of Metabolism in Health and Disease*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 419.
71. Selesniemi, K., H.J. Lee, and J.L. Tilly, *Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age*. Aging Cell, 2008. **7**(5): p. 622-9.
72. Richardson, N.E., et al., *Lifelong restriction of dietary branched-chain amino acids has sex-specific benefits for frailty and lifespan in mice*. Nat Aging, 2021. **1**(1): p. 73-86.
73. Ribeiro, L.C., et al., *Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats*. Neuroscience Research, 2009. **64**(3): p. 330-334.
74. Zemdegs, J., et al., *Metformin Promotes Anxiolytic and Antidepressant-Like Responses in Insulin-Resistant Mice by Decreasing Circulating Branched-Chain Amino Acids*. J Neurosci, 2019. **39**(30): p. 5935-5948.
75. Bennis, M.T., et al., *The role of transplanted visceral fat from the long-lived growth hormone receptor knockout mice on insulin signaling*. GeroScience, 2017. **39**(1): p. 51-59.
76. Myers, M., et al., *Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary*. Reproduction, 2004. **127**(5): p. 569-580.
77. Saccon, T.D., et al., *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, 2017. **455**: p. 23-32.
78. Cora, M.C., L. Kooistra, and G. Travlos, *Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears*. Toxicol Pathol, 2015. **43**(6): p. 776-93.
79. Guo, X., et al., *BCAA insufficiency leads to premature ovarian insufficiency via ceramide-induced elevation of ROS*. EMBO Mol Med, 2023. **15**(4): p. e17450.
80. Cummings, N.E., et al., *Restoration of metabolic health by decreased consumption of branched-chain amino acids*. J Physiol, 2018. **596**(4): p. 623-645.
81. Wu, Y., et al., *Very-low-protein diets lead to reduced food intake and weight loss, linked to inhibition of hypothalamic mTOR signaling, in mice*. Cell Metab, 2021. **33**(6): p. 1264-1266.
82. Lynch, C.J. and S.H. Adams, *Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(12): p. 723-36.
83. Yu, D., et al., *The adverse metabolic effects of branched-chain amino acids are mediated by isoleucine and valine*. Cell Metab, 2021. **33**(5): p. 905-922.e6.
84. Roquette, A.R., et al., *Moderate intake of BCAA-rich protein improves glucose homeostasis in high-fat-fed mice*. J Nutr Biochem, 2020. **80**: p. 108332.
85. Green, C.L., et al., *Sex and genetic background define the metabolic, physiologic, and molecular response to protein restriction*. Cell Metab, 2022. **34**(2): p. 209-226.e5.
86. Wetter, T.J., et al., *Effect of calorie restriction on in vivo glucose metabolism by individual tissues in rats*. Am J Physiol, 1999. **276**(4): p. E728-38.
87. McLaughlin, T., et al., *Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(11): p. E1756-60.

88. Smith, N.J., et al., *A Comparison of Dietary and Caloric Restriction Models on Body Composition, Physical Performance, and Metabolic Health in Young Mice*. *Nutrients*, 2019. **11**(2).
89. Kim, J.Y., et al., *High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000. **279**(6): p. R2057-65.
90. Han, D.H., et al., *Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation*. *Diabetes*, 1997. **46**(11): p. 1761-7.
91. Barzilai, N., et al., *Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(7): p. 1353-61.
92. Sbierski-Kind, J., et al., *Association between Subcutaneous Adipose Tissue Inflammation, Insulin Resistance, and Calorie Restriction in Obese Females*. *J Immunol*, 2020. **205**(1): p. 45-55.
93. Zhou, Z., et al., *A fifty percent leucine-restricted diet reduces fat mass and improves glucose regulation*. *Nutr Metab (Lond)*, 2021. **18**(1): p. 34.
94. Sun, J., et al., *Caloric restriction in female reproduction: is it beneficial or detrimental?* *Reprod Biol Endocrinol*, 2021. **19**(1): p. 1.
95. Cao, Y., et al., *Dietary Protein Regulates Female Estrous Cyclicity Partially via Fibroblast Growth Factor 21*. *Nutrients*, 2023. **15**(13).