

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Tese

**Restrição calórica e tratamento com senolíticos em camundongos fêmeas
jovens em estropausa induzida.**

Bianca Machado de Ávila

Pelotas, 2023.

BIANCA MACHADO DE ÁVILA

**Restrição calórica e tratamento com senolíticos em camundongos fêmeas
jovens em estropausa induzida.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica e
Bioprospecção da Universidade Federal
de Pelotas como requisito para obtenção
do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof.Dr. Augusto Schneider

Pelotas, 2023.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

A956r Avila, Bianca Machado de

Restrição calórica e tratamento com senolíticos em camundongos fêmeas jovens em estropausa induzida [recurso eletrônico] / Bianca Machado de Avila ; Augusto Schneider, orientador. — Pelotas, 2023.
116 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Menopausa. 2. Estresse oxidativo. 3. Restrição calórica. 4. Senolíticos. I. Schneider, Augusto, orient. II. Título.

CDD 618.175

Bianca Machado de Ávila

Restrição calórica e tratamento com senolíticos em camundongos fêmeas jovens em estropausa induzida.

Tese aprovada, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 19/12/2023.

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **AUGUSTO SCHNEIDER**
Data: 29/02/2024 09:12:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Augusto Schneider (orientador). Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Documento assinado digitalmente
 **FRANCIELI MORO STEFANELLO**
Data: 03/03/2024 18:33:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello. Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Documento assinado digitalmente
 **SANDRA COSTA VALLE**
Data: 05/03/2024 22:01:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Sandra Costa Valle. Doutora em Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL GIANELLA MONDADORI**
Data: 06/03/2024 11:01:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori. Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília.

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS CASTILHO DE BARROS**
Data: 06/03/2024 08:58:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Castilhos de Barros. Doutor em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes.

Resumo

ÁVILA, Bianca Machado de. **Restrição calórica e tratamento com senolíticos em camundongos fêmeas jovens em estropausa induzida**. 2023. 116f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A população mundial está envelhecendo e atualmente já se observa um crescimento importante de pessoas com 60 anos ou mais, sendo esta população majoritariamente feminina. No Brasil, a mudança demográfica e epidemiológica, bem como melhorias do sistema de saúde nas últimas décadas, resultaram tanto na progressão do número mulheres idosas, como do tempo que elas vivem em menopausa. A menopausa é comumente associada a alterações e doenças crônicas que se associam ao envelhecimento e senescência celular. Com base nisso, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da restrição calórica (RC) e do tratamento com os senolíticos dasatinibe e quercetina (D+Q) ou fisetina em um modelo de estropausa quimicamente induzida com diepóxido de 4-vinilciclohexano (VCD) em fêmeas jovens. O intuito deste estudo é mimetizar os efeitos do envelhecimento associado ao estado de estropausa. Para isso, aos dois meses de idade as fêmeas foram submetidas a indução química da estropausa com VCD por 20 dias consecutivos e, após confirmação da estropausa por citologia vaginal, foram submetidas a protocolos experimentais distintos, com RC ou tratamento com senolíticos. O protocolo de RC de 30% durou 4 meses e os tratamentos D+Q e fisetina foram realizados por 6 meses. Nossos achados demonstraram que a estropausa se associou com uma maior média de peso corporal, porém não teve efeitos significativos em relação ao acúmulo de gordura em ambos os experimentos. A RC de 30% foi capaz de reduzir significativamente o peso e quantidade de gordura corporal, se apresentando bastante intensa nas fêmeas estropausa submetidas a RC, porém não foram observadas outras influências claras da estropausa na resposta a RC de 30%. Nas fêmeas tratadas com senolíticos não foram observados efeitos relevantes relacionados a alterações metabólicas entre fêmeas cíclicas e estropausa. O estresse oxidativo no tecido adiposo e hepático também foi semelhante entre as fêmeas cíclicas e em estropausa, independente do tratamento senolítico. Entretanto, a estropausa diminuiu a atividade da catalase (CAT) no tecido adiposo em todos os grupos. A fisetina reduziu os níveis de ERO no tecido hepático das fêmeas estropausa em comparação as fêmeas dos grupos placebo

cíclico e estropausa. A estropausa e o tratamento com senolíticos não influenciaram a atividade da beta-galactosidase associada à senescência nos tecidos adiposo e hepático. Nos ovários as fêmeas em estropausa apresentaram o maior percentual de células senescentes comparado as fêmeas cíclicas, reforçando o efeito ovotóxico e localizado do VCD no ovário. No entanto, o tratamento senolítico não foi capaz de diminuir a senescência ovariana induzida pela estropausa e não foram observadas diferenças no percentual de fibrose e macrófagos entre fêmeas estropausa e cíclicas. No geral, nossos achados sugerem que a estropausa gera poucas alterações metabólicas em fêmeas jovens e que a RC e o tratamento com senolíticos não tiveram efeitos protetores em relação ao estresse oxidativo e senescência celular, sugerindo que essas alterações podem estar mais associadas ao processo natural de envelhecimento que o estado de estropausa.

Palavras-chave: Menopausa, estresse oxidativo, restrição calórica, senolíticos.

Abstract

ÁVILA, Bianca Machado de. **Caloric restriction and treatment with senolytics in young female mice in estropause.** 2023. 116f. Thesis (Doctorate in Sciences) - Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

The world population is aging and there is currently a significant increase in the number of people aged 60 or over, with this population being mostly female. In Brazil, demographic and epidemiological change, as well as improvements in the health system in recent decades, have resulted in both in the progression of the number of elderly women, as in the time they live in menopause. Menopause is commonly associated with changes and chronic diseases that are associated with aging and cellular senescence. Based on this, our objective was to evaluate the effects of caloric restriction (CR) and treatment with the senolytics dasatinib and quercetin (D+Q) or fisetin in a model of chemically induced estropause with 4-vinylcyclohexane diepoxide (VCD) in young females. The intention of this study is to mimic the effects of aging associated with the state of estropause. For this, at two months of age the females were subjected to chemical induction of estropause with VCD for 20 consecutive days and, after confirmation of estropause by vaginal cytology, they were applied to different experimental protocols, with CR or treatment with senolytics. The 30% CR protocol lasted 4 months and D+Q and fisetin treatments were performed for 6 months. Our findings revealed that estropause was associated with a higher average body weight, but had no significant effects on fat accumulation in both experiments. A CR of 30% was able to significantly reduce weight and the amount of body fat, appearing quite intense in estropause in females subjected to CR, however no other clear influences of estropause were observed on the response to CR of 30%. In females treated with senolytics, no relevant effects related to metabolic changes were observed between cyclic females and estropause. Oxidative stress in adipose and liver tissue was also similar between cyclic and estropausal females, regardless of senolytic treatment. However, estropause decreases catalase (CAT) activity in adipose tissue in all groups. Fisetin impairs ROS levels in the liver tissue of estropause females compared to females in the cyclic and estropause placebo groups. Estropause and treatment with senolytics did not influence the activity of beta-galactosidase associated with senescence in adipose and liver tissues. The ovaries of females in estropause showed the highest percentage of senescent cells compared to cyclic females, reinforcing the ovotoxic and localized effect of VCD in the ovary. However, senolytic treatment was not able to reduce ovarian senescence caused by estropause and no differences were observed in the percentage of fibrosis and macrophages between estropause and cyclic females. Overall, our results suggest that estropause generates few metabolic changes in young females and that CR and treatment with senolytics did not have protective effects in relation to oxidative stress and cellular senescence, indicating that these changes may be more associated with the natural process of aging than the state of estropause.

Keywords: Menopause, oxidative stress, caloric restriction, senolytics.

Lista de siglas

Amh	Hormônio anti-mulleriano
Akt	Proteína quinase B
CAT	Catalase
COVID-19	Doença do coronavírus
D	Dasatinibe
DM2	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Eph	Receptor tirosina quinase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GO	Glutaciona oxidase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
IL	Interleucina
LB1	Lâmina B1
LH	Hormônio luteinizante
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína C reativa
Pi3K	Fosfoinositídeo-3-quinase
Prxs	Peroxirredoxinas
Q	Quercetina
RC	Restrição calórica
RNS	Espécies reativas de nitrogênio

SASP	Fenótipo secretor associado à senescência
SA- β -gal	Beta-galactosidase associada à senescência
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Treinamento resistido
VCD	Diepóxido de 4-vinilciclohexano

Sumário

1 Introdução	9
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 Referencial teórico	15
3.1 Faces do envelhecimento: biológica, epidemiológica e demográfica	15
3.2 Envelhecimento reprodutivo e menopausa.....	20
3.3 Estresse oxidativo na menopausa	24
3.4 Senescência celular.....	25
3.5 Restrição calórica, envelhecimento somático e reprodutivo	28
3.6 Senolíticos	32
4 Artigo: Effect of calorie restriction on redox status during chemically induced estropause in female mice.....	35
5 Artigo – Effect of senolytic drugs on chemically induced estropause in young female mice.....	58
6 Discussão.....	86
7 Conclusão	93
Referências	95
Anexos	110

1 Introdução

O envelhecimento é um processo complexo e multifatorial caracterizado por uma perda gradual das funções fisiológicas e diminuição progressiva das funções do organismo que se associa a um acúmulo de alterações celulares (JIN, 2010; DA COSTA et al., 2016). O envelhecimento reprodutivo, a menopausa e a senescência celular são processos biológicos subjacentes ao envelhecimento, que estão intimamente ligados, mas não são sinônimos (LEBRASSEUR, TCHKONIA, KIRKLAND, 2015; DI MICCO et al., 2021; LANDRY et al., 2022).

O envelhecimento reprodutivo está atrelado ao processo natural do envelhecimento e, se caracteriza por uma degradação contínua e progressiva da reserva ovariana e da fertilidade (TE VELDE et al., 1998; NEVES, MARQUES, 2008). Nas mulheres, como em outras espécies de mamíferos, a reserva ovariana já apresenta uma quantidade finita de oócitos ao nascimento, que vai sendo gradativamente reduzida com o passar dos ciclos férteis até seu total esgotamento que resulta no que conhecemos como menopausa (FERREIRA et al., 2013; FINCH, 2014) ou estropausa nos roedores (BITTO et al., 2009). Também foi identificado que ambas as espécies compartilham de irregularidades progressivamente crescente nos ciclos ovulatórios e aumento da aneuploidia fetal conforme a depleção de oócitos se torna iminente (FINCH, 2014).

O sistema reprodutor é considerado o primeiro a manifestar o envelhecimento, resultando na diminuição da fertilidade e na disfunção hormonal que pode gerar impactos importantes na saúde (BROEKMANS, SOULES, FAUSER, 2009). As modificações estrogênicas da menopausa levam a alterações metabólicas como ganho de peso, alterações lipídicas, maior resistência à insulina e se associa com maior frequência a sintomas vasomotores, bem como, a um risco aumentado para osteoporose e doenças cardiovasculares (SELBAC et al., 2018; BITTO et al., 2009; LIZCANO, GUZMÁN, 2014). Algumas teorias apontam que a menopausa gera um estado pró-oxidante no organismo, devido à redução da capacidade antioxidante,

aumento das concentrações séricas de citocinas inflamatórias e biomarcadores pró-oxidantes, podendo predispor a diversas alterações metabólicas (DOSHI, AGARWAL, 2013; BOURGONJE et al., 2020; SECOMANDI et al., 2022). Além disso, a redução dos níveis de estrogênio parece se relacionar com a modulação da senescência celular em diferentes tecidos (LIU et al., 2016, FARR et al., 2019; FAUBION et al., 2020).

A senescência celular é uma resposta a diferentes estresses endógenos e exógenos decorrentes do processo natural de envelhecimento, que visa inibir a proliferação de células envelhecidas ou danificadas, levando a um estado de parada permanente do crescimento (CALCINOTTO et al., 2019; SECOMANDI et al., 2022). É um mecanismo que exerce papéis fisiológicos importantes, essencial para a homeostase tecidual e atua como um mecanismo de supressão tumoral (HANAHAHAN, WEINBERG, 2011; MCHUGH, GIL 2018; SECOMANDI et al., 2022; KUDLOVA, DE SANCTIS, HAJDUCH, 2022). Porém, o acúmulo de células senescentes pode gerar inflamação crônica de baixo grau, declínio na resposta e eficácia imunológica (SONG, AN, ZOU, 2020), além de secretar uma variedade de quimiocinas, citocinas e interleucinas pró-inflamatórias, conhecidas como “fenótipo secretor associado à senescência” (SASP) que está associado ao desenvolvimento de disfunções teciduais e doenças crônicas relacionadas à idade (SECOMANDI et al., 2022; KUDLOVA, DE SANCTIS, HAJDUCH, 2022).

Portanto, nesta perspectiva, destaca-se o potencial da restrição calórica (RC) como intervenção dietética e do uso de drogas senolíticas com o intuito de reduzir células senescentes no organismo e, conseqüentemente, reduzir os processos inflamatórios e os sintomas clínicos que tendem a ser acentuados pela modificação hormonal durante a menopausa (ZHU et al., 2015). Estudos apontam efeitos positivos da RC em relação ao prolongamento da vida de diferentes espécies, a preservação da reserva ovariana, melhoria qualidade de vida por meio de modificação de perfis metabólicos e bioquímicos, redução de deposição de gordura visceral e subcutânea e modulação da glicemia e insulinemia (RODRIGUES, 2021; NORMANDIN et al., 2015). Além disso, destaca-se também, seu potencial antioxidante e sua capacidade de reduzir processos inflamatórios, a imunossenescência e o envelhecimento celular em função de sua atividade sobre elevação do nível das sirtuínas (SALMINEN, KAARNIRANTA, 2009; MARTINS, BUCALEN, 2011).

Da mesma forma, a senoterapia tem se tornado uma área de interesse nos últimos anos. Medicamentos e drogas com potencial senolítico passaram a ser estudados com o objetivo de proporcionar a redução seletiva de células senescentes, visando proporcionar melhor qualidade de vida e saúde durante o processo de envelhecimento (KUDLOVA, DE SANCTIS, HAJDUCH, 2022, FANG et al., 2023). Dentre os senolíticos, a fisetina e uma combinação de dasatinibe e quercetina (D+Q) mostraram-se eficientes nesta remoção seletiva de células senescentes (ZHU et al., 2015), retardando distúrbios associados ao envelhecimento e aumentando a expectativa de vida em roedores idosos (BAKER et al., 2011; YOUSEFZADEH et al., 2018; XU et al., 2018) bem como melhorias funcionais em modelos de doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (MUSI et al., 2018; BUSSIAN et al., 2018; KHATOON et al., 2018) e redução da carga de células senescentes em ovários de camundongos obesos (HENSE et al., 2022).

Dentre os modelos experimentais de estropausa em roedores o método de indução mais comumente encontrado ainda é a ovariectomia. Embora seja um modelo funcional, este induz a menopausa de forma mais abrupta, diferente do que naturalmente acontece com humanos (CHEN et al., 2014). Como alternativa, um novo modelo experimental quimicamente induzido com diepóxido de 4-vinilciclohexano (VCD) tem sido utilizado para indução da estropausa em roedores, com o objetivo de mimetizar o processo gradativo do envelhecimento reprodutivo feminino e contribuir com uma melhor compreensão dos efeitos da menopausa (CHEN et al., 2014; DAS et al., 2021). O VCD é uma droga ovotóxica que produz falha ovariana precoce em roedores, e tem sido utilizada como ferramenta para o estudo das alterações neuroendócrinas e comportamentais decorrentes da menopausa, permitindo uma correlação mais fiel ao que acontece com mulheres quando comparado a modelos experimentais com ovariectomia (CHEN et al., 2014; ROMERO-ALESHIRE et al., 2009). Sua atividade ovotóxica acelera a perda de folículos primários e primordiais, resultando em um estado endócrino que reproduz de forma muito semelhante a progressão natural do envelhecimento ovariano e das fases de transição entre o período pré e pós reprodutivo como acontece com humanos, condicionada pela falha gradual da função ovariana e pela depleção folicular (BROOKS, POLLON, HOYER, 2016; BAZILIO, 2015).

Entretanto, a relação dos possíveis efeitos da RC e desses compostos senolíticos a respeito das alterações metabólicas, estresse oxidativo e senescência celular na estropausa quimicamente induzida com VCD ainda foram pouco estudados, principalmente em animais jovens submetidos aos tratamentos antes de uma acumulação significativa de células senescentes. Os efeitos da estropausa sobre marcadores de senescência ovariana ainda é desconhecido. Além disso, é preciso entender se os efeitos sistêmicos da estropausa podem ser prevenidos ou minimizados pela RC ou pelo tratamento senolítico.

Portanto, diante do exposto, considera-se este um modelo bastante interessante para mimetizar o processo natural da menopausa, uma vez que permite fazer comparações mais semelhantes entre estudos pré-clínicos e clínicos com humanos a respeito das modificações e dos impactos que ocorrem no organismo a partir da perda da reserva ovariana independente da idade. Com base nisso, os experimentos deste estudo foram estruturados para examinar os efeitos da RC e do tratamento oral com fisetina ou D+Q em camundongos fêmeas jovens submetidas a indução química da estropausa com VCD, com o objetivo de avaliar as respostas metabólicas, estresse oxidativo e/ou a carga de células senescentes nas fêmeas submetidas a RC ou tratamento senolítico sob a perspectiva da estropausa não associada ao fator de envelhecimento.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da RC 30% e do tratamento senolítico com D+Q ou fisetina em um modelo de estropausa quimicamente induzida com VCD em camundongos fêmeas jovens da linhagem C56BL7.

2.2 Objetivos específicos

- Monitorar o ganho de peso das fêmeas em estropausa e seus controles, submetidas à RC ou ao tratamento com senolíticos.
- Quantificar o número de folículos primordiais, em transição, primários, secundários, terciários e totais das fêmeas em estropausa e seus controles, submetidas à RC ou ao tratamento com senolíticos.
- Quantificar o acúmulo de gordura visceral das fêmeas em estropausa e seus controles, submetidas à RC ou ao tratamento com senolíticos.
- Avaliar a sensibilidade à insulina das fêmeas em estropausa e seus controles, submetidas à RC ou ao tratamento com senolíticos.
- Monitorar o consumo alimentar insulina das fêmeas em estropausa e seus controles, submetidas à RC.
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativos no tecido adiposo e hepático das fêmeas em estropausa e seus controles, submetidas à RC ou ao tratamento com senolíticos.
- Avaliar parâmetros bioquímicos no soro das fêmeas em estropausa e seus controles, submetidas ao tratamento com senolíticos.
- Avaliar a atividade de beta-galactosidase no tecido adiposo e hepático das fêmeas em estropausa e seus controles, submetidas ao tratamento com senolíticos.

- Avaliar marcadores de senescência no ovário das fêmeas em estropausa e seus controles, submetidas ao tratamento com senolíticos.

3 Referencial teórico

3.1 Faces do envelhecimento: biológica, epidemiológica e demográfica

Do ponto de vista biológico, o envelhecimento é um processo natural, multidirecional e complexo, que envolve mudanças celulares e fisiológicas, que se inicia no nascimento e acontece de forma gradativa e irreversível até a morte (TEXEIRA E GUARIENTO, 2010; DA COSTA et al., 2016). É caracterizado por uma diminuição progressiva e geral da integridade fisiológica que leva a uma capacidade reduzida de reagir de forma adaptável às alterações e à preservação da homeostase (DE LA FUENTE, 2008; LOPEZ-ÓTIN et al., 2013). De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 2003) o envelhecimento é um “processo sequencial, individual, acumulativo, irreversível, universal, não patológico, de deterioração de um organismo maduro, próprio a todos os membros de uma espécie, de maneira que o tempo o torne menos capaz de fazer frente ao estresse do meio ambiente e, portanto, aumente sua possibilidade de morte”.

Todo esse processo de envelhecimento vai gradativamente submetendo o organismo a inúmeras alterações anatômicas, fisiológicas e psicossomáticas, afetando sua integridade, permitindo o surgimento das doenças crônicas degenerativas e predispondo uma maior morbimortalidade (TONET, NÓBREGA, 2008). A perda progressiva de homeostase acarreta no comprometimento de funções essenciais à sobrevivência, aumentando a vulnerabilidade do organismo. O acúmulo de danos celulares em diferentes níveis é considerado a principal causa de envelhecimento e decorre de um processo multifatorial sobre o qual atuam tanto fatores externos, ambientais e sociais assim como fatores internos, genéticos e biológicos (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013).

Ao longo do tempo, muitas teorias já foram propostas com o intuito de explicar o processo de envelhecimento. Dentre as teorias biológicas modernas do envelhecimento destacam-se duas categorias principais: teorias programadas e de

dano ou erro. As teorias programadas implicam que o envelhecimento segue um cronograma biológico progressivo pré-determinado, que regula o crescimento e o desenvolvimento ao longo de toda a vida, com base em mudanças na expressão gênica que afetam os sistemas responsáveis pela manutenção, reparo e respostas de defesa. Já a teoria do dano ou do erro, enfatiza que os ataques ambientais a organismos vivos que induzem danos cumulativos em vários níveis, são a causa do envelhecimento (JIN, 2010). De forma geral, essas teorias “examinam o assunto sob a ótica da degeneração da função e estrutura dos sistemas orgânicos e células” (FARINATTI, 2002, p.129).

De acordo com López-Otín e colaboradores (2013), a deterioração fisiológica do organismo proveniente do envelhecimento é o principal fator de risco para as patologias humanas, incluindo câncer, diabetes, distúrbios cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. Ainda parece existir algumas características comuns entre as espécies que permeiam o processo de envelhecimento e, que juntas determinam o fenótipo do envelhecimento, são elas: instabilidade genômica, atrito dos telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, detecção desregulada de nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco e comunicação intercelular alterada (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). Essas características, denominadas pelos autores de marcas do envelhecimento, se relacionam com a perda progressiva da integridade fisiológica, levando ao comprometimento da função e maior vulnerabilidade à morte (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013).

Dentre as teorias já propostas, destaca-se a teoria de Hayflick e Moorhead, proposta em 1965 e, apresentada como a teoria do envelhecimento celular através da hipótese da senescência celular, como um processo que altera a fisiologia, limitando a capacidade de replicação das células normais em cultura (TEXEIRA E GUARIENTO, 2010). Sendo que, a senescência celular seria aquela induzida por estresse e, a senescência replicativa, o resultado da perda dos telômeros, que são estruturas constituídas de uma sequência repetida de ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês: Desoxyribonucleic acid), localizadas nas extremidades dos cromossomos, com a função de preservar a integridade dos genomas e evitar a fusão com outros cromossomos (GAVA; ZANONI, 2005; TEXEIRA E GUARIENTO, 2010; DI MICCO et al., 2021).

Outra teoria importante é a dos radicais livres, proposta por Denham Harmanem 1956, a qual sugere que o envelhecimento celular está associado aos efeitos deletérios nas organelas celulares, causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) as reações de oxidação dos radicais livres nos componentes celulares, provocando disfunções cumulativas, cujo resultado é a morte celular (FARINATTI, 2002; TEXEIRA E GUARIENTO, 2010). Entretanto, existem sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que buscam preservar a integridade celular e neutralizar esses efeitos danosos as células, principalmente para estabilizar esses radicais livres formados, não só durante a respiração celular, mas como consequência de muitas outras funções celulares. Porém, quando este mecanismo não consegue atuar efetivamente, a quantidade de ERO excede essa proteção antioxidante e surge uma situação de estresse oxidativo que resulta em lesão celular, e está comumente relacionada a disfunções, desenvolvimento de doenças e, ao próprio envelhecimento (HALLIWELL, 2007; TEXEIRA E GUARIENTO, 2010; GARCIA, 2018).

Outra alteração importante do envelhecimento que merece destaque é a disfunção do sistema imune associada à idade, que pode refletir maior incidência de doenças infecciosas e crônicas, devido ao aumento de processos inflamatórios no organismo. Esse processo inflamatório de baixo grau, vinculado ao envelhecimento, colabora para o surgimento do estresse oxidativo e desencadeia um aumento na quantidade de radicais livres que têm potencial mutagênico frente ao DNA, o que causa alterações celulares graves (FINKEL, HOLBROOK et al., 2000; ZUO et al., 2019).

Além das disfunções no sistema imune, há também alterações no sistema endócrino que acontecem durante processo de envelhecimento e também contribuem para o aumento de citocinas pró-inflamatórias no organismo (FARIA et al., 2013). Dentre as alterações metabólicas comuns relacionadas ao envelhecimento destaca-se o aumento da adiposidade, principalmente de gordura visceral, e a sensibilidade à insulina (BARZILAI et al., 2012). Esse acúmulo de gordura visceral contribui para o aumento de citocinas pró-inflamatórias, também conhecidas por interferirem na ação da insulina e no aumento de inflamação no organismo (SEPE et al., 2011; TONET, NÓBBREGA, 2008). Além disso, o acúmulo de gordura visceral também está

associado à resistência insulínica, ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e de outras doenças crônicas (BARZILAI et al., 2012).

Em suma, o que se sabe é que biologicamente o envelhecimento é esse processo complexo e multifatorial caracterizado por perda progressiva da integridade fisiológica e alteração das funções celulares (FARINATTI, 2002; TEXEIRA E GUARIENTO, 2010; LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). Essa degradação celular em diferentes níveis afeta todas as células, especialmente às dos sistemas reguladores (sistema nervoso, endócrino e imunitário) e, conseqüentemente, a comunicação entre estes, o que leva ao acúmulo de células danificadas, homeostase prejudicada e ao aumento da morbidade e mortalidade (DE LA FUENTE, 2008).

Outras faces do envelhecimento, que atualmente passaram a exigir cada vez mais atenção, são a transição demográfica e a epidemiologia do envelhecimento, uma vez que essas alterações biológicas e orgânicas se associam a maior carga de doenças crônicas na velhice. O envelhecimento populacional possui uma ligação estreita com os processos de transição demográfica e epidemiológica que o Brasil e o mundo têm vivenciado nas últimas décadas (OLIVEIRA, 2019). Essa modificação observada na estrutura etária da população, caracterizada pelo crescimento progressivo da população idosa, também se relaciona com o aumento da carga de doenças próprias do envelhecimento (LIMA-COSTA, VERAS, 2003; OLIVEIRA, 2019). Isso, por sua vez, tende a impactar fortemente o sistema de saúde, pois, devido ao aumento da expectativa de vida e da melhoria nas condições de acesso à saúde, o idoso passa a consumir mais serviços de saúde e por mais tempo (LIMA-COSTA, VERAS, 2003; OLIVEIRA, 2019).

Essa já é uma preocupação de grandes organizações como a Organização Mundial de Saúde (OMS), que desde a década de 90 já apresenta propostas relacionadas ao envelhecimento saudável e ativo, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida à medida que as pessoas ficam mais velhas (OPAS, 2005; ROMERO, 2022). Atualmente estamos vivenciando a “Década do Envelhecimento Saudável 2021-2030”, uma estratégia declarada pela Assembleia Geral das Nações Unidas em dezembro de 2020, com o objetivo de construir uma sociedade para todas as idades. Essa é uma iniciativa global que reúne os esforços colaborativos de diversas organizações e instituições e se baseia-se em orientações anteriores, como

a Estratégia Global e o Plano de Ação da Organização Mundial da Saúde sobre Envelhecimento e Saúde 2016-2020, a Declaração Política e o Plano de Ação das Nações Unidas de Madrid sobre o Envelhecimento e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 das Nações Unidas para o Desenvolvimento Sustentável para promover um envelhecimento mais saudável (OPAS, 2023).

A pandemia da COVID-19 também gerou um alerta relacionado ao processo de envelhecimento populacional e seus impactos na saúde, uma vez que as populações mais idosas foram afetadas desproporcionalmente. As atuais transições demográficas e epidemiológicas exigem atenção e forçam mudanças na forma de lidar e responder às necessidades e as vulnerabilidades das pessoas idosas, uma vez que esta é a população com maiores taxas de mortalidade associada a comorbidades e comprometimento funcional, especialmente em situações de emergência (OPAS, 2023).

Projeções globais a respeito da população com 65 anos ou mais, apontam para um crescimento duas vezes maior que o atual até 2050 (UNITED NATIONS, 2020). De acordo com as Nações Unidas (2020), até 2030, 1 em cada 6 pessoas no mundo terá 60 anos ou mais e, até 2050, a população mundial de pessoas com 60 anos ou mais duplicará (2,1 mil milhões). Uma mudança populacional semelhante também já é percebida na América Latina, onde a porcentagem da população com 65 anos ou mais quase dobrou nos últimos anos, passando de 5% em 1990 para 9% em 2019 (UNITED NATIONS, 2020). No Brasil, as estimativas indicam que em 2060, o percentual da população com 65 anos ou mais será de 25,5% (58,2 milhões), enquanto, em 2018, essa proporção foi de 9,2% (19,2 milhões) (IBGE, 2018).

Com relação às mulheres com 65 anos ou mais, as projeções indicam que, em 2050, elas representarão 54% da população global (UNITED NATIONS, 2020). Diante das atuais projeções, percebe-se que a população idosa se configura majoritariamente feminina (CEPELLOS, 2021). Este fato deu origem ao fenômeno denominado de “feminização da velhice”, que trata dessa maior proporção de mulheres na população idosa, especialmente em idades mais avançadas (SOUSA et al., 2018; CEPELLOS, 2021), visto que elas tendem a apresentar uma maior expectativa de vida (MOREIRA, 1998, CEPELLOS, 2021). Um ponto que reforça a

importância e a necessidade de pesquisas direcionadas e que considerem o dimorfismo sexual do envelhecimento.

3.2 Envelhecimento reprodutivo e menopausa

O envelhecimento reprodutivo feminino é um processo contínuo, que começa próximo ao nascimento e se estende até a menopausa (HANSEN et al., 2008; NEVES, MARQUES, 2008; WILKOSZ et al., 2014). É caracterizado por uma diminuição progressiva da fertilidade devido a um esgotamento da reserva folicular ovariana (WILKOSZ et al., 2014; NEVES et al., 2008; GARCIA, 2018). Essa depleção progressiva do *pool* folicular é a causa da cessação permanente da menstruação e, é precedida por um período de ciclos reprodutivos irregulares e de fertilidade considerada subótima (NEVES, MARQUES, 2008; ESENCAN, BEROUKHIM, SEIFER, 2022). A reserva ovariana é constituída do conjunto de folículos primordiais formados durante o período de desenvolvimento fetal, que permanecem quiescentes até serem recrutados para o crescimento durante a vida reprodutiva feminina (HIRSHFIELD, 1994, BROEKMANS, SOULES, FAUSER, 2009; PUTTABYATAPPA, PADMANABHAN, 2018). Essa ativação dos folículos primordiais é irreversível e, uma vez que o folículo é ativado não retorna mais à reserva, podendo sofrer atresia em algum momento do ciclo de crescimento ou culminar na ovulação (BAKER, 1963; PUTTABYATAPPA, PADMANABHAN, 2018).

Com a diminuição do número de folículos durante o processo de envelhecimento, há também uma perda de qualidade do oócito. Acredita-se que essa perda de qualidade esteja relacionada a mecanismos subjacentes que podem envolver diferenças entre as células germinativas no momento em que são formadas durante a vida fetal, a danos acumulados aos oócitos ao longo da vida ou a mudanças na qualidade das células da granulosa ao redor do oócito relacionadas à idade (BROEKMANS, SOULES, FAUSER, 2009). O acúmulo de danos ao DNA por fatores externos e internos, principalmente os relacionados ao processo de quebra e falha de reparo na fita dupla, já foi identificado como uma das causas do envelhecimento em oócitos de camundongo e humanos, uma vez que a eficiência de reparo vai diminuindo com a idade (TITUS et al., 2013). O estudo de Titus et al. (2013) apontou que camundongos de 11 a 12 meses de idade já apresentam declínios significativos em

relação a reserva e a qualidade do oócito de forma semelhante ao que acontece com mulheres ao final da terceira década de vida, devido ao acúmulo de danos no DNA.

Nas mulheres, o declínio da fertilidade tem início a partir da terceira década de vida e, apesar das mudanças profundas em relação ao número e qualidade dos oócitos, o processo de envelhecimento tende a passar despercebido no período que compreende da terceira a quarta década de vida (BROEKMANS, SOULES, FAUSER, 2009). Essa deterioração da qualidade se dá pelo acúmulo de danos à medida que a mulher envelhece e, é neste período que os óvulos começam a perder sua capacidade funcional, podendo resultar em uma maior frequência de abortos, aumento de anormalidades cromossômicas, falhas de fertilização, de desenvolvimento do embrião e de sua implantação no útero (ALVIGGI et al., 2009; ESENCAN, BEROUKHIM, SEIFER, 2022).

A diminuição acentuada da função ovariana em mulheres apresenta-se normalmente entre 45 e 50 anos de idade. Após os 45 anos já é esperado o declínio natural da função ovariana que é considerado um período de transição entre o período reprodutivo e pós reprodutivo, chamado de climatério (BROEKMANS, SOULES, FAUSER, 2009; SELBAC et al., 2018). Neste período, os primeiros sinais clínicos de avanço no processo de envelhecimento reprodutivo começam a ser percebidos com uma sutil redução da duração do ciclo menstrual em 2-3 dias, seguido de um avanço progressivo até que os ciclos menstruais se tornam irregulares (BROEKMANS, SOULES, FAUSER, 2009). Esse estágio do envelhecimento se estende até o período menstrual final, e deve ser diferenciado da perimenopausa, que também inclui o primeiro ano após o último sangramento menstrual (BROEKMANS, SOULES, FAUSER, 2009). A menopausa se configura com a cessação definitiva dos ciclos menstruais (amenorreia) por período superior a um ano (WEISMILLER, 2009; SELBAC et al., 2018).

Durante este período de transição os ovários vão se tornando menos sensíveis aos estímulos gonadotróficos e ocorre um aumento do hormônio folículo-estimulante (FSH) associado ao declínio na produção de inibina B e estradiol pelas células da granulosa dos folículos antrais ainda saudáveis no ovário (NEVES, MARQUES, 2008). Isso provoca uma hiperestimulação folicular caracterizada por grande quantidade de folículos primordiais em crescimento, o que está correlacionado com a alta taxa de depleção folicular decorrente de atresia (NEVES, MARQUES, 2008; HANSEN et al.,

2008; SELBAC et al., 2018). Este aumento do FSH ocorre mais em função da queda das concentrações séricas da inibina do que em função da diminuição do estradiol, refletindo de forma importante sobre a reserva folicular ovariana. Nesta fase o hormônio luteinizante (LH) pode permanecer inalterado (SELBAC et al., 2018; ZHU et al., 2023).

A menopausa é um período no qual muitas alterações hormonais se instalam no organismo, principalmente relacionadas à redução de estrógenos, o que tende a induzir repercussões importantes em vários órgãos-alvo e sistemas, se manifestando por meio de alterações cardiovasculares, cutâneas (ressecamento, perda de colágeno, rugas), ósseas como osteoporose e doenças reumáticas, ganho de peso e deposição de gordura, entre outras doenças de caráter crônico inflamatório (ANTUNES, MARCELINO, AGUIAR, 2003; RAINE-FENNING, BRINCAT, MUSCAT-BARON, 2003). Esse hipoestrogenismo ocorre gradativamente durante todo o processo de envelhecimento ovariano e, é acentuado na menopausa (MEDEIROS, MAITELLI, NINCE, 2007). Essa baixa nos níveis de estrogênio, relacionada ao esgotamento da reserva folicular pode ser observada tanto em animais castrados como em mulheres na menopausa (FINCH, 2014).

Camundongos e ratos atingem a maturidade sexual entre 3-6 meses de idade e, por volta de 9-10 meses de idade já é possível se observar uma equivalência endócrina com o período de transição reprodutiva humana, também impulsionada pela depleção folicular (BRINTON, 2012; MOBBS, GEE, FINCH, 1984). De acordo com Finch (2014) o processo de envelhecimento reprodutivo e a menopausa ocorrem de forma semelhante entre roedores e humanos. Ambos compartilham da irregularidade progressiva e crescente nos ciclos ovulatórios, redução da qualidade oocitária e aumento da aneuploidia fetal conforme a depleção de oócitos se torna iminente (FINCH, 2014). Camundongos de 10 meses de idade já apresentam uma redução significativa do número de oócitos quando comparados a camundongos jovens de 2 meses de idade, o que reforça a ideia de que a reserva ovariana de camundongos, como em humanos, se esgota com a idade (FINCH, 2014).

A perda da função ovariana e o declínio nos níveis circulantes de estrogênio resultante dela, aparecerem fortemente relacionados a diversas alterações metabólicas na menopausa como aumento de adiposidade, alterações no metabolismo lipídico, hipertensão, resistência à insulina, além da combinação desses

diferentes fatores que resultam em síndrome metabólica (BITTO et al., 2009). O estudo de Bitto e colaboradores (2009) identificou que ratas ovariectomizadas com 6 meses de idade, demonstraram um ligeiro aumento na pressão arterial sistólica (PAS), peso corporal, resistência à insulina e colesterol plasmático quando comparadas a ratas intactas da mesma idade.

Além das alterações metabólicas, a carência estrogênica resultante da degradação da reserva ovariana, também parece atenuar a resposta imune do organismo predispondo o organismo à invasão microbiana e tornando-o mais suscetível a infecções. Essas alterações no sistema imune e a modificação hormonal da menopausa parecem estar associadas a um aumento dos marcadores séricos pró-inflamatórios (IL-1, IL-6, TNF- α) (OLSEN, KOVACS, 1996; VERTHELYI, KLINMAN, 2000; MEDEIROS, MAITELLI, NINCE, 2007) que resultam em mudanças no perfil lipídico e hematopoiético que potencializam o risco de doenças inflamatórias crônicas (FERNANDEZ, MURILLO, 2016; KOEBELE, BIMONTE-NELSON, 2017). Dentre os processos de desenvolvimento da inflamação crônica de baixo grau durante o processo de envelhecimento feminino e menopausa destaca-se: maior deposição de tecido adiposo, estimulação de genes pró-inflamatórios, aumento do estresse oxidativo, alterações na metilação do DNA, modificações na atividade das sirtuínas e alterações na microbiota intestinal (COELHO, 2017).

Portanto, frente às diversas mudanças que surgem no organismo durante a menopausa e, a sua associação a aumento risco para o desenvolvimento de doenças de caráter crônico, tornam-se imprescindíveis os estudos com modelos experimentais em camundongos e ratos, com o objetivo de mimetizar o processo gradativo do envelhecimento reprodutivo feminino e contribuir com uma melhor compreensão dos efeitos da menopausa. O composto químico VCD é usado para induzir a perda gradativa de folículos ovarianos primordiais e primários, acelerando o processo natural de atresia e induzindo a menopausa de forma semelhante a que acontece na espécie humana e em outras espécies de mamíferos (KAPPELER CJ, HOYER, 2012; BROOKS, POLLON, HOYER, 2016). O VCD é uma droga ovotóxica que produz falha ovariana precoce em roedores, e tem sido utilizada como ferramenta para o estudo das alterações neuroendócrinas e comportamentais decorrentes da menopausa, permitindo uma correlação mais fiel ao que acontece com mulheres quando comparado a modelos experimentais que utilizam a ovariectomia (ROMERO-

ALESHIRE et al., 2009; KAPPELER CJ, HOYER, 2012). Um estudo recente comparou a menopausa induzida cirurgicamente por ovariectomia e pela indução química com VCD, observando que ambos os modelos parecem estar relacionados com maior ganho de peso, aumento dos níveis de glicose, esteatose hepática, e maior quantidade de deposição de gordura mamária e visceral quando comparados aos controles intactos (DAS et al., 2021).

3.3 Estresse oxidativo na menopausa

O processo de estresse oxidativo foi caracterizado por Sies (1997) como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, que potencialmente leva a danos celulares. Esse desequilíbrio em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses, conduz a à oxidação de biomoléculas podendo resultar na perda de suas funções biológicas e no desequilíbrio homeostático, gerando danos em células e tecidos (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

A geração de radicais livres e espécies reativas não radicais é um subproduto do metabolismo do oxigênio, e a mitocôndria é a principal fonte desse processo, por meio da cadeia transportadora de elétrons (BARBOSA et al.; 2010). No organismo, essas espécies desempenham papéis essenciais na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e na síntese de substâncias biologicamente importantes (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006). No entanto, quando em excesso, esses compostos podem ter efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios das membranas, afetando proteínas, enzimas, carboidratos dos tecidos e membranas e, até o DNA (BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006; BARBOSA et al.; 2010). As formas de oxidantes mais abundantes são as espécies reativas de oxigênio (ERO), porém as espécies reativas de nitrogênio (ERN) também apresentam potente capacidade oxidante como o ácido hipocloroso, cloraminas e radicais de enxofre (CERVELLATI, BERGAMINI, 2016; VALKO et al., 2007). A maioria dessas espécies são radicais livres, ou seja, partículas instáveis e altamente reativas devido à falta de um ou dois elétrons (CERVELLATI, BERGAMINI, 2016).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e reduzir os danos causados pela ação de radicais livres ou das espécies reativas não- radicais e se divide em enzimático e não enzimático (BARBOSA et al.; 2010). O sistema enzimático é

constituído, principalmente pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona oxidase (GO), glutathiona redutase (GR) e peroxirredoxinas (Prxs). O não-enzimático é formado por uma variedade de substâncias antioxidantes, que podem ser de origem endógena ou exógena, obtidas através da dieta (BARBOSA et al.; 2010; HE et al., 2017). Nesse contexto, a importância dos antioxidantes se destaca por seu papel na eliminação de oxidantes, uma vez que estes aparecem associados a uma variedade de doenças como câncer, diabetes e doenças crônicas neurodegenerativas (ALI et al., 2020).

Associado a menopausa, o estresse oxidativo tem sido diretamente ligado ao declínio do estrogênio durante o envelhecimento reprodutivo pela redução das defesas antioxidantes e pela produção espécies reativas (DOSHI, AGARWAL, 2013). A perda gradual de estrogênio durante o envelhecimento reprodutivo e a redução das defesas antioxidantes se associa a patologias como doenças cardíacas, distúrbios vasomotores e osteoporose, dentre outros (BOURGONJE et al., 2020; DOSHI, AGARWAL, 2013; BITTNER, 2010; BECKER et al. 1997). Esses efeitos pró-oxidantes da redução estrogênica também se relacionam com o surgimento de sintomas comumente observados na menopausa como as ondas de calor, suores noturnos e irritabilidade pelo aumento temporário da taxa metabólica (DOSHI, AGARWAL, 2013). Esses distúrbios ocorrem de forma repetida durante a transição do estado reprodutivo para menopausa, contribuindo para a formação do estresse oxidativo, reduzindo as defesas antioxidantes e impedindo a neutralização de ERO (KRONENBERG, 1990; DOSHI, AGARWAL, 2013). Entretanto, mesmo com essas alterações da menopausa, ainda parece ser difícil distinguir o efeito do envelhecimento e da menopausa em relação ao estresse oxidativo e a redução das defesas antioxidantes no organismo que tendem a ocorrer naturalmente durante o processo de envelhecimento (DOSHI, AGARWAL, 2013).

3.4 Senescência celular

A senescência celular pode ser caracterizada como um processo que limita a capacidade de replicação das células normais e, é considerada um dos mecanismos de controle da proliferação celular. Ocorre durante o processo de envelhecimento normal em todos os tecidos e, atua como uma resposta celular projetada principalmente para pausar a divisão de células danificadas (URYGA, BENNETT,

2016; LEBRASSEUR, TCHKONIA, KIRKLAND, 2015; VELARDE, MENON, 2016). A indução da senescência é dependente da ativação de vias supressoras tumorais (como a via do p16^{INK4a}/retinoblastoma ou p53/p21^{Cip1/Waf1}) e envolve a parada replicativa essencialmente irreversível (LEBRASSEUR, TCHKONIA, KIRKLAND, 2015; KUMARI, JAT, 2021). Destacam-se como indutores de senescência: replicação celular, encurtamento dos telômeros, alterações metabólicas, aumento da geração de ERO, danos no DNA entre outros agentes causadores de estresse celular associados à mitose e ao metabolismo (TCHKONIA et al., 2013; LEBRASSEUR, TCHKONIA, KIRKLAND, 2015; VELARDE, MENON, 2016).

Todo esse processo envolve muitas alterações fisiológicas, fenotípicas e morfológicas e, concomitante com seu avanço, ocorre declínio da eficiência fisiológica, redução da eficiência da maquinaria de reparo e desequilíbrio homeostático (VAN et al., 2017; REISZ et al., 2018). O acúmulo dessas células senescentes nos tecidos leva à deterioração, hiperproliferação e inflamação, o que afeta negativamente a estrutura e função do tecido, levando ao desenvolvimento de diversas doenças e condições crônicas (LEBRASSEUR, TCHKONIA, KIRKLAND, 2015). As principais doenças crônicas relacionadas à idade são as doenças degenerativas, metabólicas e patologias hiperproliferativas, como câncer, estão vinculadas à inflamação (LEBRASSEUR, TCHKONIA, KIRKLAND, 2015). As células senescentes podem secretar uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, proteases e outros fatores denominados fenótipo secretor associado a senescência (SASP), contribuindo com o surgimento de disfunções locais e sistêmicas em uma série dessas doenças vinculadas ao envelhecimento (XU et al., 2018).

O SASP pode contribuir para a inflamação relacionada à senescência, desregulação metabólica, disfunção de células-tronco, fenótipos de envelhecimento, doenças crônicas, síndromes geriátricas, dentre outras. E, fatores relacionados à inflamação como interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF α) e proteínas de fase aguda, como proteína C reativa (PCR), já são reconhecidos como fatores patogênicos no desenvolvimento de doenças comuns no envelhecimento como cardiovasculares, diabetes, câncer, depressão e demências (COLLERTON et al., 2012; XU et al., 2018).

Dentre os diferentes órgãos e sistemas do organismo humano que sofrem com as alterações do envelhecimento e acúmulo de células senescentes, o sistema imunitário é um dos mais atingidos, sofrendo modificações nas subpopulações celulares, nos padrões de secreção de citocinas, na tolerância imunológica, entre outras funções (TONET, NÓBREGA, 2008). As alterações da funcionalidade do sistema imune decorrentes da imunossenescência tendem a se manifestar clinicamente pelo aumento da frequência e severidade de infecções em idosos (PARISI, 2018). Desta forma, podendo agravar o fenótipo de envelhecimento a nível sistêmico devido à falha do sistema imune em eliminar agentes infecciosos, células infectadas por patógenos, células em transformação neoplásica e as próprias células senescentes (PONNAPPAN, PONNAPPAN, 2011; PARISI, 2018). Os macrófagos são os responsáveis por eliminar as células senescentes, porém com o avançar da idade ocorre aumento do surgimento de células senescentes e diminuição da resposta imune. Desta maneira, há a um acúmulo desproporcional de células senescentes com a idade, gerando excessivo SASP, que como mencionado aumenta a inflamação e risco de doenças crônicas (PARISI, 2018).

Embora processo de envelhecimento afete ambos os ramos da imunidade, as células da imunidade adaptativa sofrem mudanças mais profundas em relação à senescência (MCELHANEY, EFFROS, 2009; PONNAPPAN, PONNAPPAN, 2011; PARISI, 2018). A capacidade de renovação das células do sistema imunológico, a partir das células-tronco hematopoéticas, diminui com a idade e, as alterações nos precursores dos linfócitos B levam à diminuição do número de células maduras que deixam a medula óssea (AGONDI et al., 2012). Já entre as células da imunidade adaptativa, os linfócitos T são as células efetoras da resposta celular que mais sofrem os efeitos do envelhecimento, uma vez que o tecido linfóide passa a ser gradualmente substituído por tecido adiposo, resultando em uma alteração histológica caracterizada pela involução do timo que, conseqüentemente, provoca a diminuição progressiva na capacidade de proliferação de linfócitos T (TONET, NÓBREGA, 2008).

Essa involução tímica pode também levar à diminuição da liberação de linfócitos T regulatórios contribuindo para fenômenos relacionados ao envelhecimento, como o aumento da inflamação e da autoimunidade (AGONDI et al., 2012). Essas alterações são geralmente consideradas como uma deterioração da imunidade, e denominadas imunossenescência. Essa imunossenescência é a

responsável pelo aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas, bem como, pela origem dos mecanismos biológicos responsáveis pelo estado inflamatório crônico relacionado à idade, conhecido como “*inflammaging*”, um estado de atividade inflamatória basal resultante de um estresse antigênico crônico ou de uma maior produção idiopática de citocinas pró-inflamatórias, que pode contribuir com o desenvolvimento das doenças crônicas (TONET, NÓBREGA, 2008; AGONDI et al., 2012).

Em suma, a senescência é um processo multifatorial. Dentre os fatores que a promovem têm-se o acúmulo de mutações que não foram resolvidas durante os pontos de checagem da divisão celular, em especial das mutações relacionadas aos genes do reparo de DNA; encurtamento dos telômeros; constante segregação cromossômica recorrente da proliferação celular para o crescimento dos tecidos; variações numéricas ou estruturais dos cromossomos, além de fatores externos como o estilo de vida adotado (FENECH, BONASSI, 2011). Portanto, atrasar o acúmulo de células senescentes ou reduzir a carga de células senescentes parece estar associado ao retardo, prevenção ou alívio de múltiplas condições associadas à senescência e a doenças relacionadas ao processo de envelhecimento. Um fato que tem instigado pesquisadores a buscar alternativas terapêuticas e intervenções para minimizar os efeitos da senescência celular no organismo (ZHU et al., 2015; XU et al., 2018; HICKSON et al., 2019; SACCON et al., 2021).

3.5 Restrição calórica, envelhecimento somático e reprodutivo

A RC é uma intervenção dietética caracterizada pela limitação do aporte calórico ingerido sem comprometer a ingestão de nutrientes, ou seja, uma redução do número total de calorias ingeridas que mantém o aporte de macro e micronutrientes suficientes para atender as necessidades energéticas (SPEAKMAN, MITCHELL, 2011; NAPOLEÃO et al., 2021). Diversos estudos têm apontado a RC como uma estratégia capaz de aumentar a longevidade e a qualidade de vida em diferentes espécies, incluindo ratos, camundongos, hamsters, cães, peixes, animais invertebrados e leveduras (MASARO, 2005). Estudos com ratos e camundongos demonstraram que, restringir a ingestão de alimentos entre 20 e 40% em relação ao que é ingerido por animais alimentados à vontade é capaz de aumentar significativamente a longevidade, retardar a deterioração fisiológica associada à idade

e, em alguns casos, prevenir doenças comumente associadas à idade (MASARO, 2005; MASARO, 2009; LÓPEZ-LLUCH, NAVAS, 2016).

Embora os mecanismos relacionados à extensão de vida mediada pela RC ainda não se encontrem totalmente elucidados, algumas hipóteses que apontam para seus efeitos positivos na longevidade são: redução da gordura corporal e sinalização da insulina, redução da produção de ERO e atenuação danos teciduais induzidos por essas espécies, proteção contra o envelhecimento associado à deterioração do sistema imune e aumento na expressão de proteínas chaperonas (FONTANA, KLEIN, 2007; GENARO, SARKIS, MARTINI, 2009; PEDROSO, 2013). Esses efeitos da RC parecem ser em parte, mediados pela regulação dos genes envolvidos no reparo celular, na resistência ao estresse e na proteção contra danos oxidativos, bem como, por genes responsáveis pela modulação na concentração de citocinas inflamatórias, resultando em redução da inflamação sistêmica e de baixa intensidade (MASARO, 2005; FONTANA, KLEIN, 2007; GENARO, SARKIS, MARTINI, 2009; PEDROSO, 2013).

Nessa perspectiva, a redução da concentração de glicose no sangue ocasionada pela baixa ingestão de energia proveniente da RC é considerada uma importante alteração fisiológica, pois levará a uma diminuição da produção de insulina pelas células β do pâncreas e, conseqüentemente, a uma diminuição do depósito de tecido adiposo, principalmente do tecido adiposo branco, um órgão endócrino que produz hormônios ativos em todo o organismo como: resistina, adiponectina e leptina (KOUBOVA, GUARENTE, 2003; GENARO, SARKIS, MARTINI, 2009). Essas mudanças endócrino-metabólicas parecem estar relacionadas a uma maior expectativa de vida, uma vez que a RC teria efeitos benéficos sobre a modificação da secreção desses hormônios, melhorando a sensibilidade à insulina em diversos tecidos (YU et al., 2019; NAPOLEÃO et al., 2021). Além disso, a RC também apresenta efeitos benéficos, reduzindo a liberação aguda das citocinas pró-inflamatórias em resposta a endotoxinas e protegendo também da desregulação da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos leucócitos mononucleares estimulados, que estão relacionados ao envelhecimento e aos processos inflamatórios crônicos advindos da idade (PEDROSO, 2013).

O estudo de Ugochukwu e Figgers, (2007) realizado com ratos Wistar machos, demonstrou que a RC tem efeito sobre a perda de peso corporal e na redução na concentração plasmática de TNF- α e IL-6, atenuando os efeitos relacionados com a inflamação sistêmica e de baixa intensidade. Além disso, foi capaz de reduzir as citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-4 e IL-6) e o TNF- α em ratos diabéticos e, aumentou os níveis de mediadores antiinflamatórios, como a haptoglobina e níveis de IL-10 (UGOCHUKWU, FIGGERS, 2007). Isto indica que a RC pode prevenir complicações diabéticas por meio da supressão das respostas inflamatórias.

Em aspecto semelhante, a RC também demonstrou benefícios na redução da morbidade e mortalidade em primatas. Seus efeitos positivos puderam ser observados em relação à redução de peso corporal, composição corporal, função glicorreguladora e indicadores séricos de risco para doença cardiovascular (SCHNEIDER et al., 2017). Essas descobertas tornam-se interessantes para biologia do envelhecimento humano, uma vez que os macacos Rhesus compartilham uma identidade genômica bastante semelhante a humanos, cerca de 93% (BALASUBRAMANIAN, HOWELL, ANDERSON, 2017; ZIMIN et al., 2014; RHOADS et al., 2018).

Em humanos, a RC e a moderação na ingestão alimentar têm sido defendidas por séculos como uma forma de prevenção da obesidade, de melhorar a saúde e prolongar a vida (PIPER, BARTKE, 2008). Estudos têm mostrado que, ao longo dos anos, indivíduos que praticam vários métodos de RC voluntária de longo prazo, bem como participantes de estudos de curto prazo (6 meses) de redução estritamente supervisionada na ingestão de calorias, demonstraram melhorias significativas na pressão arterial, lipídios séricos e função vascular. Esses achados são compatíveis com uma taxa reduzida de envelhecimento e aumento da expectativa de vida (HOLLOSZY, FONTANA, 2007; REDMAN et al., 2007). Além disso, a RC também parece atuar retardando a ocorrência de doenças crônicas como: arteriosclerose, cardiomiopatia, diabetes, doenças autoimunes, câncer, doenças de Alzheimer e Parkinson (GENARO, SARKIS, MARTINI, 2009; WANG et al., 2007; PATEL et al., 2005)

Por outro lado, alguns estudos também têm se dedicado a avaliar os efeitos da RC sobre o envelhecimento da reserva ovariana. Estudos com camundongos jovens demonstraram que uma RC com redução de 20 e 40% do *ad libitum* sem o

comprometimento da ingestão de nutrientes essenciais, tem sido considerada um bom método para preservação da reserva ovariana, por estender a duração do período fértil através da inibição da transição de folículos primordiais para folículos primários e, conseqüentemente, adiar o esgotamento folicular (MASARO, 2005; GARCIA, 2019). A RC iniciada na idade adulta em camundongos também demonstrou resultados positivos em relação a retardar o envelhecimento reprodutivo. No estudo de Selesniemi e colaboradores (2008) foi comprovado que após 4 meses de RC em camundongos adultos, a reserva folicular ovariana era duas vezes maior em comparação com os controles alimentados *ad libitum* e pareados por idade.

Além disso, a contagem de folículos em camundongos fêmea submetidas à RC também apresentou maior número total de folículos, maior proporção de folículos primordiais e uma expressão três vezes maior do que fêmeas alimentadas a vontade do hormônio anti-mulleriano (Amh) (SHI et al., 2013), que é um hormônio produzido nas células da granulosa, utilizado para avaliar a reserva folicular e o envelhecimento ovariano, sendo considerado um marcador e preditor da menopausa (BROER et al., 2014). Também foi observado que camundongos submetidos à RC apresentaram 47% mais folículos primordiais que camundongos submetidos a uma dieta controle, indicando que a RC é benéfica para a preservação ovariana (XIANG et al., 2012). Estes estudos sugerem que a RC pode reduzir a depleção da reserva ovariana por supressão do recrutamento de folículos e da ovulação (XIANG et al., 2012; SHI et al., 2013; BROER et al., 2014).

Nesse aspecto, um estudo que investigou os efeitos da ovariectomia (menopausa induzida cirurgicamente) em ratas sobre as intervenções de treinamento resistido (TR), RC e da associação de ambos (TR+RC) observou que a ovariectomia aumentou a pressão arterial sistólica e promoveu resistência à insulina (LINO et al., 2018). No entanto, tanto o exercício como a RC e sua associação, preveniram o aumento da pressão arterial sistólica e melhoraram os parâmetros clínicos e moleculares, prevenindo o surgimento da hipertensão, melhorando a função vascular, a resposta insulínica, entre outras alterações presentes em ratas ovariectomizadas (LINO et al., 2018).

De forma geral, estudos com animais e humanos indicam que a RC pode aumentar a longevidade em modelos animais e atrasar o aparecimento de doenças

associadas ao envelhecimento. Porém, em relação à menopausa a RC destaca-se mais como uma medida preventiva eficaz, sendo comumente apresentada como uma alternativa para modificação de perfis metabólicos e bioquímicos, manutenção do peso corporal, redução da adiposidade visceral e subcutânea, melhora da função cardíaca e modulação da glicemia e insulinemia (RODRIGUES, 2021; NORMANDIN et al. 2015; CAMERON et al., 2013). Entretanto, vale ressaltar que, não foram encontrados estudos que tenham avaliado os efeitos da RC sobre as alterações metabólicas e o estresse oxidativo em modelos experimentais de menopausa quimicamente induzida com VCD.

3.6 Senolíticos

Os senolíticos são uma nova classe de medicamentos que eliminam seletivamente as células senescentes ao desabilitar transitoriamente as redes pró-sobrevivência que as defendem contra seu próprio ambiente apoptótico (HICKSON et al., 2019; KIRKLAND, TCHKONIA, 2020). O desenvolvimento dos senolíticos foi baseado em drogas e produtos naturais que já eram utilizados para outras indicações em humanos (ZHU et al., 2015; HICKSON et al., 2019). As primeiras moléculas a serem identificadas como senolíticas em 2015 foram dasatinibe (D), um inibidor da tirosina cinase em uso clínico nos Estados Unidos desde 2006 e a quercetina (Q), um flavonoide natural (MYRIANTHOPOULOS, 2018; KIRKLAND, TCHKONIA, 2020). A combinação D+Q foi considerada um potente senolítico que melhora várias condições relacionadas à idade, incluindo fragilidade, osteoporose e doenças cardiovasculares (ZHU et al., 2015; YOUSEFZADEH et al., 2018).

Dentre os senolíticos, a combinação de D+Q, mostrou induzir a morte especificamente em células murinas senescentes e certas células humanas *in vitro*, bem como foi capaz de melhorar a função cardiovascular em camundongos velhos, resistência na esteira em camundongos expostos à radiação e diminuição da fragilidade, disfunção neurológica e perda óssea em camundongos progeróides (ZHU et al., 2015). D+Q mostraram-se particularmente promissores na eliminação das células senescentes (CHANG et al., 2008; XI et al., 2012; ZHU et al., 2015). Os alvos moleculares associados aos efeitos senolíticos observados para D+Q foram tirosina cinases do receptor Eph e da via PI3K/AKT, respectivamente (MYRIANTHOPOULOS, 2018).

A descoberta dessa nova classe de medicamentos abriu caminho para um novo campo de pesquisa, que visa o desenvolvimento de senoterapêutica, ou seja, medicamentos que podem interferir e retardar o processo de envelhecimento através da modulação da senescência (MYRIANTHOPOULOS, 2018). Essas descobertas iniciais com resultados positivos em relação aos efeitos senolíticos de D+Q levaram a novas investigações e descobertas de vários outros compostos com o mesmo potencial. E, dentro desse contexto, destaca-se também a fisetina, um flavonoide natural que compartilha propriedades antioxidantes distintas com uma infinidade de outros polifenóis vegetais que tem potencial como agente antiinflamatório, quimiopreventivo, quimioterápico e, o mais recente deles, senoterápico (GRYNKIEWICZ, DEMCHUK, 2019).

Estudos com camundongos demonstraram que as drogas senolíticas são capazes de aliviar uma série de distúrbios em modelos de doenças em camundongos (ZHU et al., 2015; YOUSEFZADEH et al., 2018). A administração oral intermitente de D+Q foi capaz de aumentar a função cardíaca e vascular em camundongos de 24 meses, e reverter parcialmente os declínios relacionados à idade na fração de ejeção cardíaca, redução na calcificação dos vasos e redução da carga de células cardíacas senescentes (KIRKLAND, TCHKONIA, 2020). O tratamento com D+Q também aumentou a sensibilidade à insulina em camundongos geneticamente obesos que foi manifestada por melhorias na tolerância à glicose e à insulina (PALMER et al., 2019). Ainda, diminuíram várias complicações do diabetes em modelos de camundongos, como por exemplo, o acúmulo de gordura no fígado e a consequente cirrose e insuficiência hepática que são complicações cada vez mais comuns do diabetes e da obesidade (PALMER et al., 2019; KIRKLAND, TCHKONIA, 2020).

Um estudo com camundongos progeróides e velhos, demonstrou que o tratamento agudo ou intermitente com fisetina reduziu os marcadores de senescência em vários tecidos, consistente com um mecanismo senolítico (KIRKLAND, TCHKONIA, 2020). A fisetina também foi capaz de reduzir a senescência em um subconjunto de células no tecido adiposo murino e humano, demonstrando especificidade do tipo celular. Além disso, reduziu patologias relacionadas à idade e estendeu a vida média e máxima em camundongos velhos (YOUSEFZADEH et al., 2018).

Portanto, frente aos resultados promissores com modelos experimentais, percebe-se que os senolíticos têm potencial para retardar, prevenir ou aliviar uma série de fenótipos relacionados à idade e doenças crônicas, incluindo diabetes, osteoporose, fragilidade, doença cardiovascular, fibrose pulmonar e câncer, entre outros (YOUSEFZADEH et al., 2018). Essas são descobertas importantes, pois destacam o potencial extremamente promissor para esta área nova da terapêutica e abrem espaço para novas perspectivas investigativas, tanto em relação a teste de novos medicamentos e compostos senolíticos, como para novas aplicabilidades dos medicamentos com potencial senolítico já comprovados. Até o momento, as diferenças na resposta aos senolíticos entre sexos foram pouco exploradas e, ainda não há nenhum estudo que tenha avaliado a diferença de resposta aos senolíticos em animais acíclicos em estropausa. Isso fortalece a necessidade de mais pesquisas relacionadas a estes aspectos e, motiva essa investigação a buscar se existe efeito ou benefícios do tratamento com senolíticos para fêmeas jovens submetidas a indução química da menopausa com VCD.

4 Artigo: Effect of calorie restriction on redox status during chemically induced estropause in female mice

Artigo publicado online na revista GeroScience.

PMID: 37857995, DOI: [10.1007/s11357-023-00979-z](https://doi.org/10.1007/s11357-023-00979-z)

Autores: Ávila, B. M., Zanini, B. M., Luduvico, K. P., Hense, J. D., Garcia, D. N., Prosczek, J., Stefanello, F. M., Mason, J. B., Masternak, M. M., & Schneider, A.

Effect of calorie restriction on redox status during chemically induced estropause in female mice

Abstract

In females there is a continuous decline of the ovarian reserve with age, which results in menopause in women or estropause in mice. Loss of ovarian function results in metabolic alterations in mice and women. Based on this, we aimed to evaluate the effect of caloric restriction (CR) on redox status and metabolic changes in chemically induced estropause in mice. For this, mice were divided into four groups (n=10): cyclic ad libitum (AL), cyclic 30% CR, AL estropause, and estropause 30% CR. Estropause was induced using 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) for 20 consecutive days in two-month-old females. The CR protocol started at 5 months of age and the treatments lasted for four months. The CR females gained less body weight than AL females ($p < 0.001$) and had lower glycemic curves in response to glucose tolerance test (GTT). The AL estropause females had the highest body weight and body fat, despite having lower food intake. However, the estropause females on 30% CR lost the most body weight and had the lowest amount of body fat compared to all groups. The effect of 30% CR on redox status in fat and liver tissue was similar for cyclic and estropause females. Interestingly, estropause decreased ROS in adipose tissue, while increasing it in the liver. No significant effects of CR on redox status were observed. Chemically induced estropause did not influence the response to 30% CR on glucose tolerance and redox status, however weight loss was exacerbated compared to cyclic females.

Keywords: menopause, ROS, ovary, aging

Introduction

Reproductive aging in females is characterized by a continuous and progressive decline of the ovarian reserve and fertility [1,2,3]. In women, as in other mammalian species, the size of the ovarian reserve is defined at birth, and gradually decreases each cycle, until complete depletion and the beginning of menopause [4,5]. Mice also experience a progressive decline in the ovarian reserve with aging, along with increasing irregularities in estrous cycles, until cessation of cyclicity, known as estropause [5]. Estrogen levels begin to decrease at menopause in women, as also observed in ovariectomized mice [6,7]. Ovariectomy induced menopause in rodents also results in various metabolic alterations, such as increased adiposity, changes in

lipid metabolism, hypertension, insulin resistance, and metabolic syndrome, similar to observed in women [6,7].

Menopause creates a systemic pro-oxidant state in the body due to reduced estrogen levels, which has a well-established antioxidant role [8]. Increased reactive oxygen species (ROS) due to low estrogen levels leads to increased serum concentrations of inflammatory cytokines and pro-oxidant biomarkers [9]. These changes are linked to the development of various pathologies after menopause, such as increased frequency of vasomotor symptoms, increased risk of osteoporosis and cardiovascular diseases [9]. The natural aging process in males and females also leads to increased inflammation and oxidative stress [9,10,11], however the extra burden of reduced estrogen in menopausal females can further increase susceptibility to a variety of age-related pathologies. Therefore, it is important to understand the role of the ovarian function and aging separately in the redox status.

Among experimental models of menopause in rodents, ovariectomy still is the most commonly used method. Despite being a functional model, it induces menopause in a more abrupt manner, unlike what naturally occurs in humans [12]. Additionally, ovarian tissue is lost, different from the observed during natural menopause. As an alternative, a chemically induced experimental model using 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) has been used for menopause induction in rodents, aiming to mimic the gradual decline of hormone secretion and contribute to a better understanding of the effects of menopause [12,13]. VCD is an ovotoxic drug that causes ovarian failure in rodents and has been used as a tool to study the neuroendocrine and behavioral changes resulting from menopause [12,14]. Its ovotoxic activity accelerates the loss of primary and primordial follicles, resulting in an endocrine state that closely replicates the natural menopausal progression seen in humans [15,16]. Interestingly, due to the presence of the ovarian tissue and enzymes for androgens synthesis [17], androstenedione levels were identical in VCD and control intact mice, and much higher than for ovariectomized mice [18]. Therefore, it is important to test the effects of different longevity interventions in VCD induced estropause mouse, which may differ from the responses of ovariectomized mice, and more closely mimick the postmenopausal state.

In this perspective, calorie restriction (CR) is widely studied dietary intervention to prevent age-associated decline [19,20,21,22]. Previous data indicated positive effects of CR on lifespan extension and preservation of the ovarian reserve in different species, associated to a better biochemical profile, reduction of visceral and subcutaneous fat deposition, and increased

insulin sensitivity [19,20]. In addition, CR has antioxidant effects and reduces the pro-inflammatory milieu during aging [21,22]. However, the potential metabolic and oxidative effects of CR during chemically induced menopause are still poorly explored. Although CR is considered a strategy to increase lifespan [23,24,25], it is not understood if CR can benefit females who have already reached end of reproductive life. Based on this, we aimed to evaluate the effect of CR on body weight, glucose metabolism, and redox status in liver/adipose tissue of young mice chemically induced to estropause.

Methods

Animals and treatments

This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation from Universidade Federal de Pelotas (number 20410-2020). Female C57BL/6 mice 2-months-old were used and kept under controlled conditions of temperature, light, and humidity (22 ± 2 °C, 12-hour light/12-hour dark cycles, and 40%-60% humidity). The chemical estropause induction protocol was initiated at 2 months of age. Females (n=20) received i.p. injections of VCD (160 mg/kg) diluted in sesame oil for 20 consecutive days [15,26] or placebo (n=20) during the same period.

Two months after finishing the VCD treatment, acyclicity of the females was confirmed by vaginal cytology, and the CR protocol was initiated in half of the control group (n=10) and half of the VCD group (n=10). CR was gradually implemented, with a 10% reduction in the first week, 20% in the second week, and a 30% reduction compared to the controls, starting from the third week and maintained for four months. The CR was calculated based on the average consumption of the previous week in the control groups (cyclic and estropause). Body weight was evaluated every two weeks.

At the end of the four-month CR treatment, mice were fasted for 4 hours and euthanized by exsanguination immediately after anesthesia with isoflurane. Mice were dissected and fat, ovaries, and liver tissue collected. The amount of body fat was determined by weighing the fat tissue immediately after euthanasia, relative to body weight.

Vaginal Cytology

Vaginal cytology was performed during seven consecutive days to determine if females were acyclic, according to previous protocol [27]. For sample collection, a micropipette containing 10 μ L of saline was inserted into the vaginal canal. The fluid obtained was spread on a slide and stained using rapid panoptic. The slides were observed under a light microscope to determine the stage of the estrous cycle [27,28]. Mice were considered acyclic if continuously in the diestrus stage.

Insulin Tolerance Test and Glucose Tolerance Test

The insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT) were performed two and one week prior to euthanasia, respectively. For the ITT, insulin (0.5 IU/kg) was injected i.p. after a two hour fast. Blood samples to measure glucose levels were collected through a small incision at the tail tip at 0, 5, 20, and 35 min after insulin injection [29]. For the GTT, glucose (2g/kg) was administered i.p. after a four hour fast. Blood samples were collected at 0, 15, 30, 60, and 120 min after glucose injection [30]. A glucometer (AccuChek Activ, Roche Diagnostics®, USA) was used to measure blood glucose levels in both tests.

Follicle Counting

The ovaries were removed from 10% buffered formalin, dehydrated in alcohol, cleared in xylene, embedded in paraffin, and then cut into 5 μ m sections using a semiautomatic microtome (RM2245 38, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK). One out of every six sections was selected and placed on standard histological slide. After drying in a 56°C oven for 24 hours, the slides were stained with hematoxylin and eosin and mounted with coverslips and synthetic resin (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA). Images of the ovarian sections were captured using microscope (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan) with 4x, 10x, and 40x objectives. Follicles with clearly visible oocyte nuclei were quantified. The number of follicles counted was divided by the total number of sections for each ovary. The follicle classification protocol was based on Myers et al. (2004) [31].

Oxidative stress parameters

The liver tissue was homogenized (1/10 w/v) using a 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. The adipose tissue was homogenized (1/10 w/v) using RIPA buffer, pH 7.5, containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 150 mM EDTA. The homogenates were centrifuged at 3500xg using a centrifuge at 4°C for 10 minutes and supernatants were collected and used for oxidative stress analysis.

Reactive Oxygen Species (ROS)

The quantification of ROS levels was determined by the oxidation of DCFH-DA to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Briefly, the DCF fluorescence intensity was measured at excitation wavelengths of 525 nm and 488 nm, 30 minutes after the addition of DCFH-DA to the homogenate. ROS formation was expressed as $\mu\text{mol DCF/mg of protein}$ [32].

Total Thiol Content

The total thiol content was determined by the reduction of DTNB by thiols and the subsequent oxidation (disulfide) to form a yellow-colored derivative compound (TNB), which was measured at 412 nm using a spectrophotometer. The results were expressed as $\text{nmol TNB/mg of protein}$ [33].

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

Lipid peroxidation was determined by estimating the formation of malonaldehyde (MDA). TBA and trichloroacetic acid were added to the supernatant for the reaction. TBARS levels were quantified by measuring the absorbance at 535 nm, and reported as $\text{nmol TBARS/mg of protein}$ [34].

Nitrites

The nitrite was measured with sulfanilamide and N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED), using the Griess reaction. The absorbance was measured at 540 nm. The results were expressed as μM nitrite/mg of protein [35].

Catalase (CAT) Activity

The catalase activity was measured according to Aebi [36]. This assay is based on the decomposition of H_2O_2 at 240 nm. CAT activity was reported as units/mg of protein.

Superoxide Dismutase (SOD) Activity

Superoxide dismutase activity was measured based on the inhibition of adrenaline auto-oxidation at 480 nm. Total SOD activity is expressed as units/mg of protein [37].

Protein Determination

For SOD, CAT, TBARS, and total thiol content, protein was measured using the method described by Lowry et al. [38], and for ROS and nitrite, protein was determined according to Bradford [39].

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.4. Repeated measures ANOVA was used for the analysis of body weight, ITT, and GTT. Two-way ANOVA was used for the analysis of other variables (body weight gain, follicle count, glucose and oxidative stress parameters). P values lower or equal than 0.05 were considered statistically significant.

Results

The AL estropause females had the highest body weight. In general, the CR groups had lower body weight compared to AL groups, and CR estropause females had the lowest body

weight (Figure 1a). However, when analyzing body weight gain only after the start of CR, no significant difference was found between the cyclic and estropause groups. A clear reduction in body weight gain was evident in both groups subjected to CR, as expected (Figure 1b). Despite increased body weight gain, the estropause females had lower food intake than cyclic controls (Figure 1c). Additionally, the CR estropause females had the lowest percentage of body fat (Figure 1d), in agreement with the more severe reduction in body weight in this group.

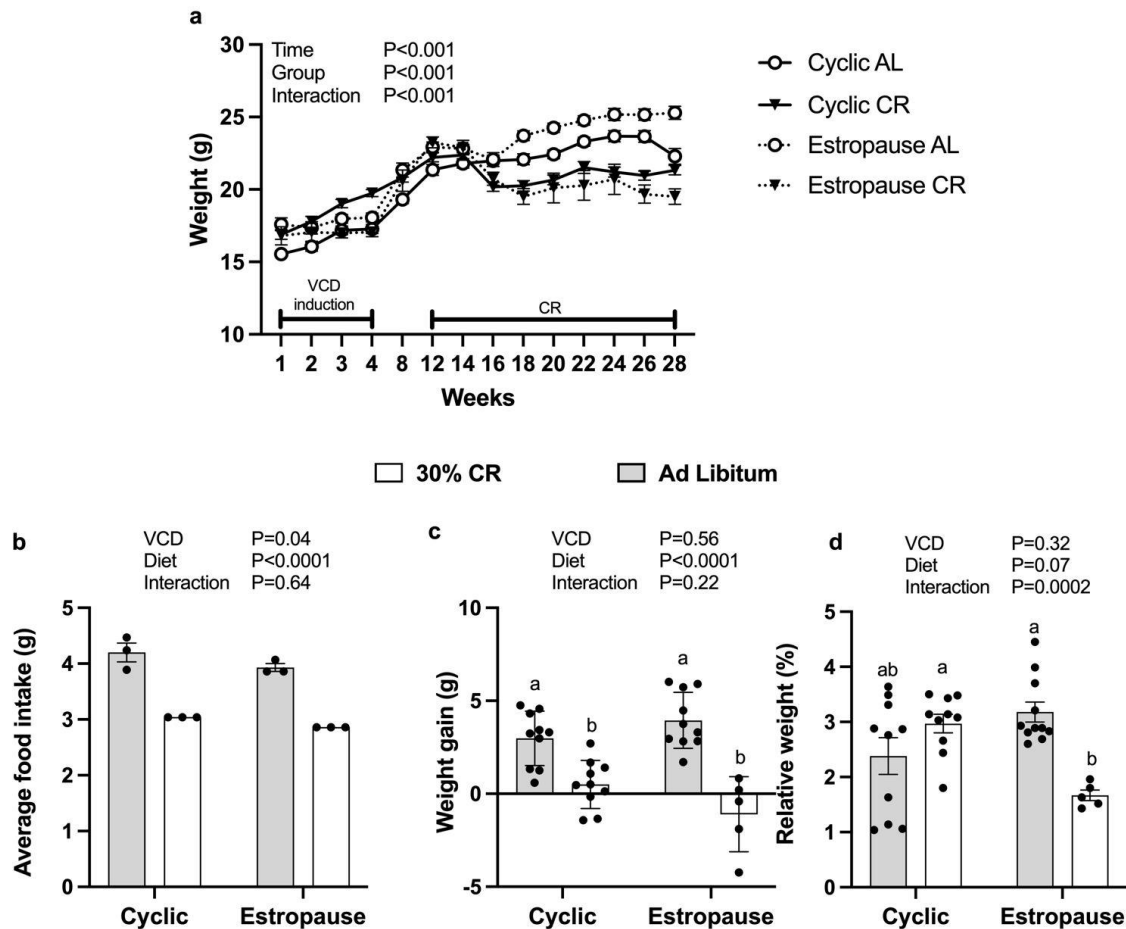


Fig. 1 a) Body weight of females from the start of VCD injection to the end of the experimental period; b) Body weight gain during the period of calorie restriction from 5 to 9 months of age. c) Food intake/mice/day during the period of calorie restriction from 5 to 9 months of age. d) Relative amount of body fat at the time of euthanasia

In the GTT, AL estropause females had a higher glycemic index compared to the other groups (Figure 2a). Overall, the glycemic curves of CR females were lower than AL females

as expected (Figure 2b). There was no difference in insulin tolerance (Figure 2c) and the rate of glucose decay in response to insulin (Figure 2d).

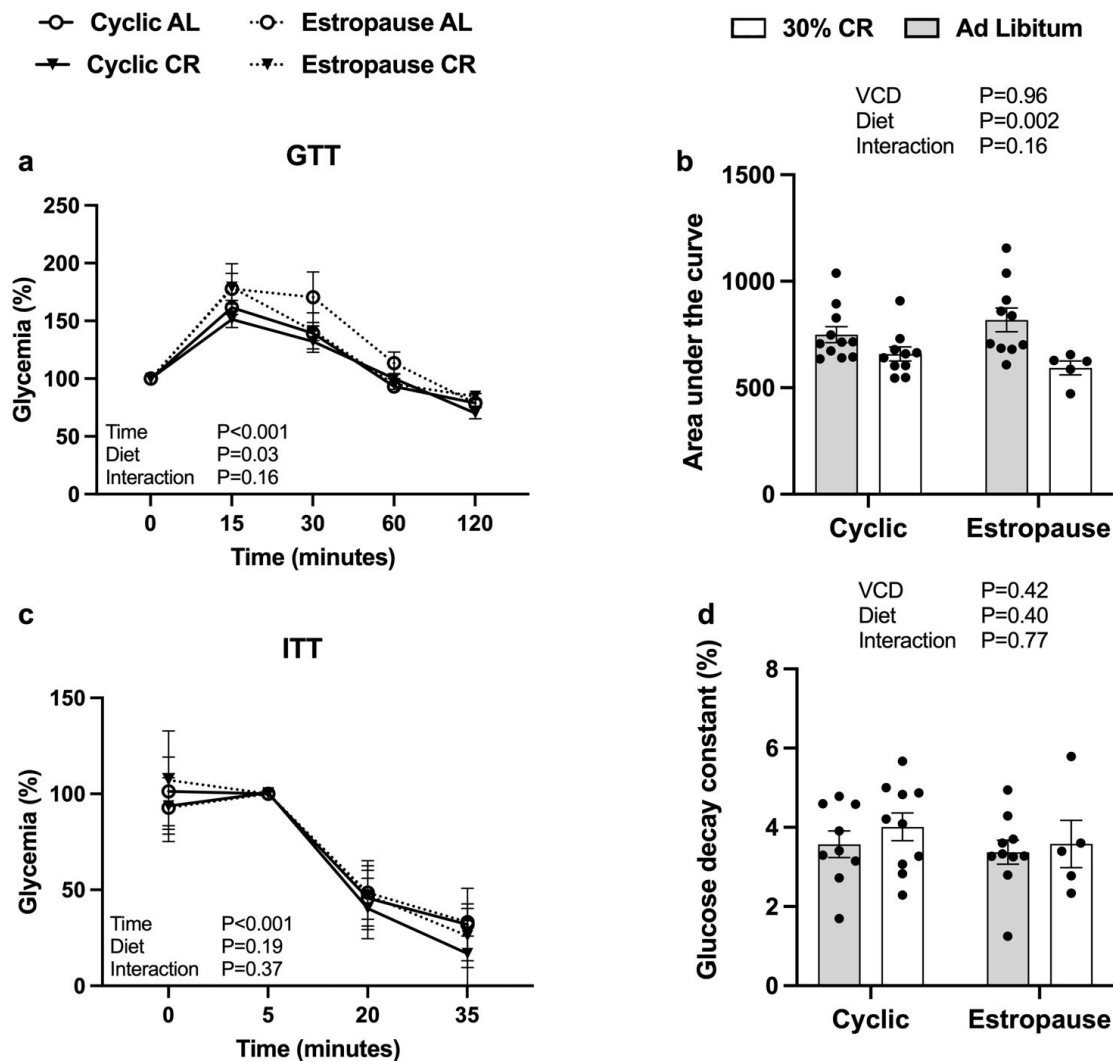


Fig. 2 a) Glucose levels during the glucose tolerance test (GTT); b) Area under the curve (AUC) for the GTT; c) Glucose levels during the insulin tolerance test (ITT); d) Glucose decay constant (KITT) during the first 15 min of the ITT for the AL cyclic, 30% CR cyclic, AL estropause and 30% CR estropause

Regarding ovarian activity, we observed a reduction in the number of follicles at all stages of development in estropause females compared with cyclic controls (Figure 3a-f). This supports the effectiveness of estropause induction with VCD in these groups. Additionally, all VCD injected females were acyclic before the start of CR, as confirmed by vaginal cytology. CR cyclic female tended to have more primordial and transition follicles (Figure 3a and b).

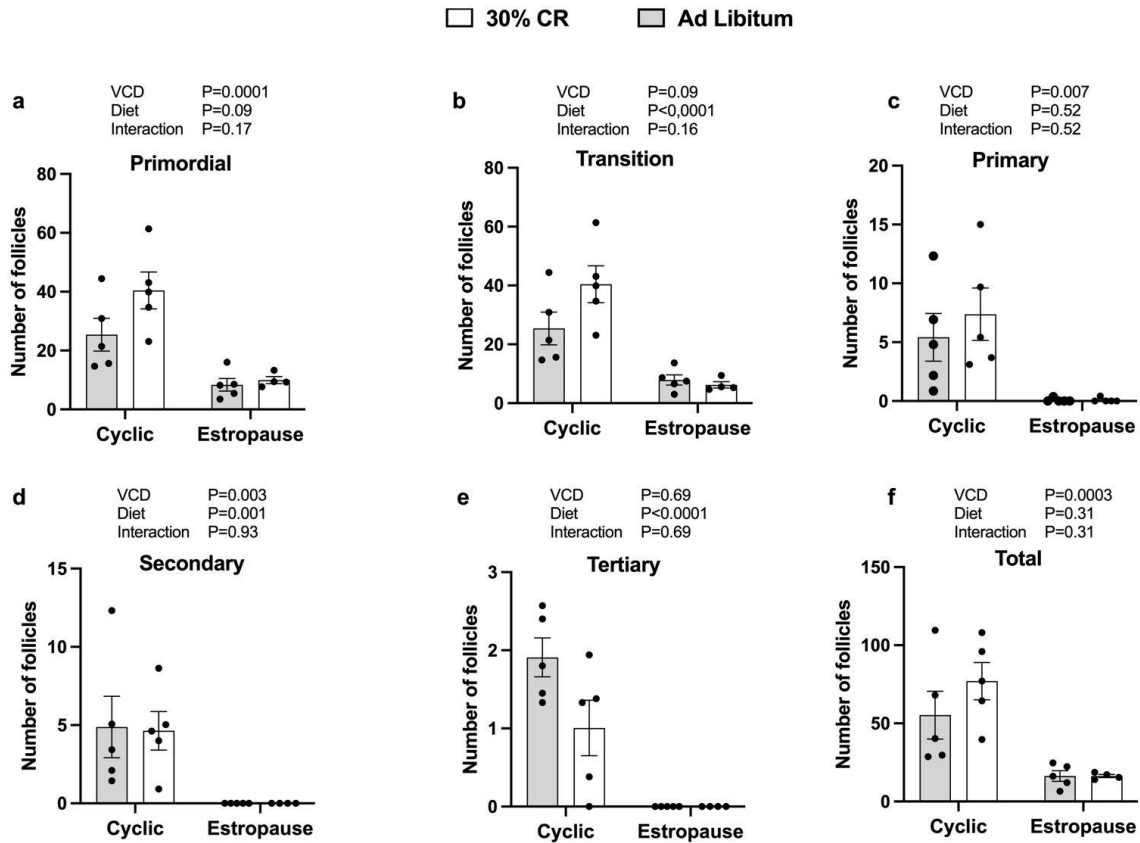


Fig. 3 Number of follicles a) primordial b) transition c) primary d) secondary e) tertiary and f) total, relative to the ovarian area

Regarding oxidative stress parameters, we observed that estropause females had a decrease in ROS levels (Figure 4a) and an increase in nitrite levels (Figure 4b) in adipose tissue. Females subjected to CR had an increase in sulfhydryl levels in adipose tissue (Figure 4d). Interestingly, CR estropause females had reduction in CAT activity in adipose tissue compared to AL estropause females (Figure 4f). There were no differences in TBARS levels (Figure 4c) or SOD activity in adipose tissue (Figure 4e). In the liver, only a slight increase in ROS levels was observed for estropause females (Figure 5a). No differences were found for nitrite (Figure 5b), TBARS (Figure 5c), sulfhydryl (Figure 5d), SOD (Figure 5e) and CAT activity (Figure 5f).

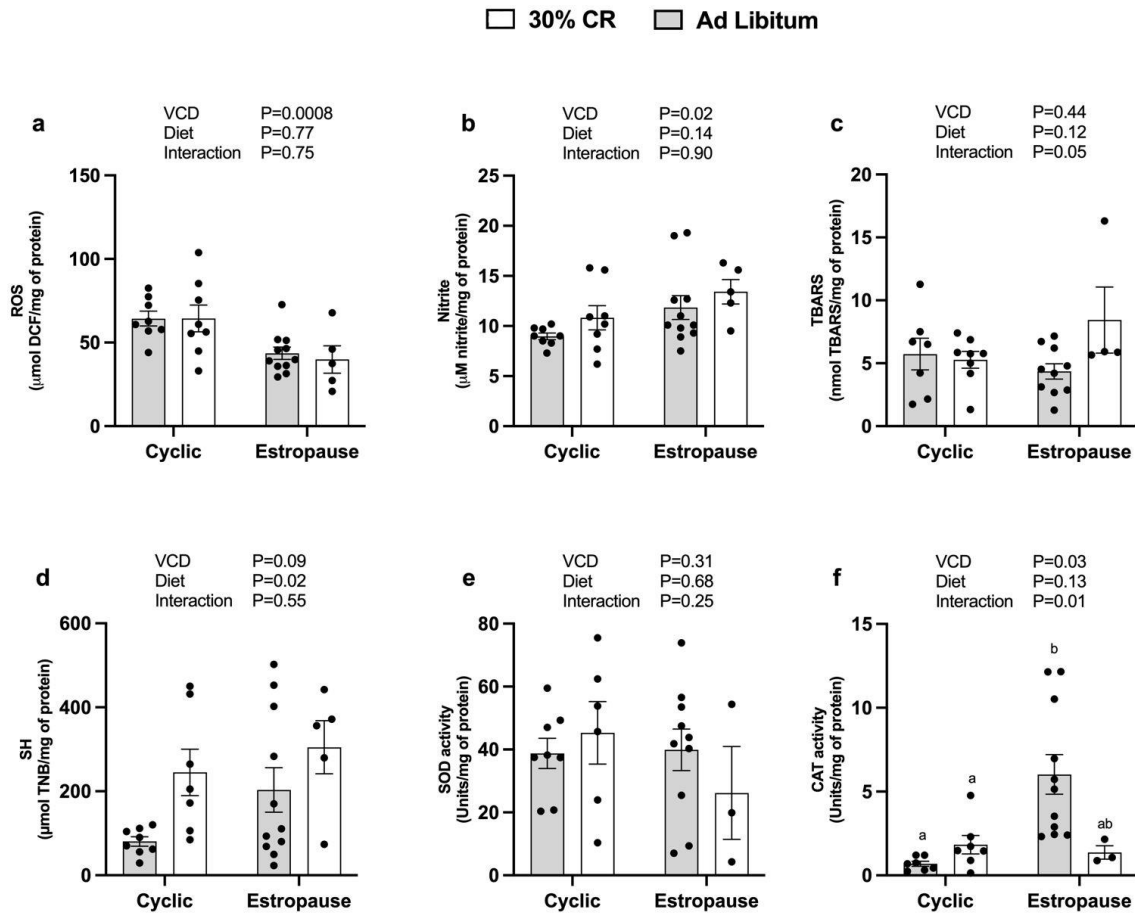


Fig. 4 Redox status in adipose tissue. a) Reactive oxygen species (ROS); b) Nitrites. c) Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS); d) Sulfhydryls (SH); e) Superoxide dismutase (SOD) activity; f) Catalase (CAT) activity for the AL cyclic, 30% CR cyclic, AL estropause and 30% CR estropause

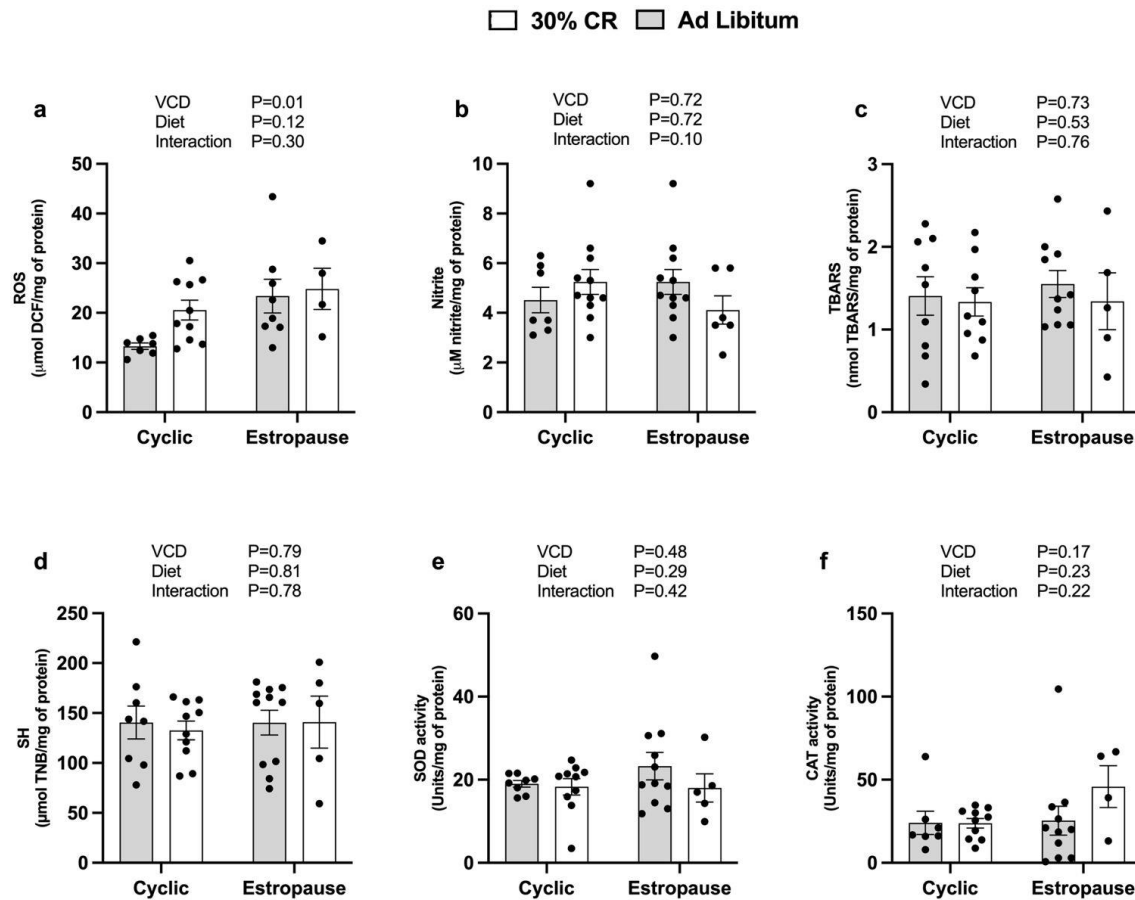


Fig. 5 Redox status in the liver. a) Reactive oxygen species (ROS); b) Nitrites. c) Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS); d) Sulfhydryls (SH); e) Superoxide dismutase (SOD) activity; f) Catalase (CAT) activity for the AL cyclic, 30% CR cyclic, AL estropause and 30% CR estropause

Discussion

We observed that VCD induced an estropause state in females, as evidenced by the severe reduction in preantral follicles and absence of tertiary follicles. Previous studies in rodents using VCD had shown depletion of small pre-antral follicles [12,40,41]. The VCD-induced follicular depletion in rodents is due accelerated atresia of primordial and primary follicles [12,41,42]. We also observed through vaginal cytology that the estropause state was established two months after the end of VCD treatment, when females exhibited a pattern of acyclicity and remained in diestrus. This is in line with previous reports suggesting estropause initiates between two and three months after the end of VCD injections [12,15,41]. Therefore, the CR intervention was started only after estropause was fully established.

Females in estropause had increased body weight gain over time compared to cyclic females. This increased body weight during estropause is consistent with previous studies in mice receiving standard chow [14,43,44]. Previous studies also observed increased body weight gain in ovariectomized mice [43]. Despite increased body weight gain, females in estropause had lower food intake compared to cyclic females. It was previously observed that loss of ovarian function led to decreased 24-hour energy expenditure without changes in the energy intake pattern [43]. Therefore, our data further reinforces that loss of ovarian activity can indeed reduce energy expenditure, since even with lower food intake, estropause females were heavier than their cyclic controls. This suggests metabolic adaptations that could hinder the response to diets such as CR, hence our hypothesis for this study.

Our results revealed a more intense weight loss in estropause compared to cyclic females. Levels of 25% to 40% of CR have been pointed out to increase longevity in several species [23,24]. Although the mechanisms related to lifespan extension mediated by CR are not fully elucidated, there is a strong relationship with changes in energy metabolism, oxidative stress, insulin sensitivity and inflammation [45, 46]. The effects of CR seem to be also partly mediated by increased cellular repair, stress resistance, and protection from oxidative damage [24]. However, there is no data regarding the effects of CR in chemically induced estropause in rodents, only ovariectomy. An intense CR (50%) in rats starting at weaning mitigated the effects of ovariectomy in body weight gain [19]. However, ovariectomy occurred at 90 days of age, after the beginning of CR, suggesting that CR has beneficial effects when initiated before ovariectomy. This is unlike our study, where CR initiated after the establishment of the estropause state. In another study CR was initiated after ovariectomy in rats. As expected, ovariectomized rats exhibited the highest body weight, while 50% CR reduced body weight compared to ovariectomized controls [47]. Ovariectomized females display increased rate of body weight change compared with intact females [48], which seems to be due increased feed efficiency, as rats gain weight even without an increase in food intake [49]. This is similar to our observations, and raises an interesting question regarding the effects of CR on estropause females, as it had the most pronounced reduction in body weight compared to its AL estropause counterparts. Despite increase feed efficiency these females have increase response to CR, suggesting a different metabolic adaptation to food shortage and fasting promoted by this strategy. Further studies are needed to clarify these questions and point for a potential role of ovarian tissue in aging, independent of cyclicity.

Estropause females showed the most significant reduction in body fat in response to CR. A previous study observed that both VCD-treated and cyclic mice receiving a high-fat diet exhibited a significant increase in body fat compared to mice on a standard diet [14]. However, estropause females accumulated less body fat than cyclic females on a high-fat diet [14]. This is similar to our current data, which shows that estropause females did not have increased body fat. Nevertheless, others observed that ovariectomized females had a higher volume of both subcutaneous and visceral fat compared to intact females [50]. Transdermal estradiol replacement was able to reduce both subcutaneous and visceral body fat in ovariectomized females [50], as was the transplantation of young ovarian tissue in naturally estropausal females, even without increased estradiol levels [51]. Therefore, further studies are needed to confirm the role of CR on fat accumulation in response to reduced estradiol levels in the absence or presence of the ovarian tissue.

The glucose tolerance tests indicated lower tolerance in the AL estropause females. Similarly, reduced glucose tolerance was observed in VCD-treated mice on a standard diet [21]. This lower glucose tolerance may be associated with the reduction of estrogen levels in menopause, both in rodents and humans [14,51], and the protective effect of estrogen replacement in postmenopause women [14,52,53,54]. On the other hand, CR females had higher glucose tolerance regardless of estropause. This is consistent with previous studies suggesting improved glucose tolerance and insulin sensitivity in ovariectomized females undergoing 40% CR for 30 days [55]. It is worth noting that insulin sensitivity appears to decrease with age in mice, as shown by several studies. However, as our study used young mice to minimize the confounding effects of age, this may differ from other CR studies using much older mice. Older estropausal-aged mice that received young ovarian tissue transplants displayed improved glucose tolerance compared with age-matched controls [56], further confirming the role of young ovaries in glucose tolerance. It is possible that age may have a more significant effect than cyclicity in females regarding insulin sensitivity.

Oxidative stress is associated with the aging process and age-related diseases such as cancer [57,58], neurodegeneration [59,60], cardiovascular diseases [61,62], and diabetes [63], and CR is considered a protective factor against oxidative stress-related diseases [55]. Despite this, we observed that CR had very minor effects in liver and adipose tissue redox status. We even observed that CR increased sulfhydryl levels and reduced CAT activity in adipose tissue of estropausal females, indicating a negative effect on the redox balance. This is surprising, as studies indicate that redox status in adipose tissue is related to the presence of excess adipose

tissue, which is a source of pro-inflammatory cytokines and chronic inflammation [63,64]. No effects of CR on liver redox status were observed. However, estropause overall reduced ROS levels and increase nitrite in adipose tissue. In the liver, estropause slightly increased ROS levels. Ovariectomized rats have lower CAT activity than their intact counterparts in adipose tissue, suggesting reduced antioxidant defense [65]. This is in contrast with our findings, since we observed a reduction in ROS levels in adipose tissue of estropause females. However, we did observe increased nitrite levels and a tendency for increased sulfidryl levels in estropause mice, suggesting impaired redox state in this tissue. However, in our study females retained ovarian tissue, which closely associated to what is observed in women than ovariectomy. The presence of the ovarian tissue, even depleted of follicles, may have beneficial effects on redox status [66]. In the liver, we observed only a modest increase in ROS levels in estropause females. Increased ROS production is associated with aging and the estrogen reduction resulting from menopause can further reduce antioxidant defenses [9]. Others also indicate a reduction in liver antioxidant defenses after estropause in mice, suggesting an effect more related to reproductive function than age itself [66]. In line with these findings, another study did not observe changes in TBARS and CAT levels in liver of young ovariectomized rats [67]. Reduction in TBARS content was observed in the liver of ovariectomized mice under 40% CR, suggesting a reduction in oxidative stress [49]. It is noteworthy that we observed opposite behavior regarding ROS levels between adipose and hepatic tissue in response to estropause, suggesting tissue specific adaptations.

Although some studies suggest that menopause creates a pro-oxidant systemic state due to decreased estrogen production, we did not observe that chemically induced estropause potentiated oxidative damage in liver and adipose tissue significantly. We did not observe that CR had different effects on cyclic or estropausal females, except for greater weight loss and reduction in body fat. Glucose tolerance was impaired in estropausal females but was not differentially affected by CR. There is a clear need for further investigation into the effects of CR and other longevity-promoting interventions in estropause-induced female mice retaining the ovarian tissue.

Funding

Research reported in this publication was supported by CAPES, CNPq and FAPERGS.

Data availability

The data presented in the work are available from the corresponding author upon request.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

1. Te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BC. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;145(1-2):67-73. doi:10.1016/s0303-7207(98)00171-3
2. Neves MM, Marques APJr. Senescência reprodutiva feminina em mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim.* 2008; v.32, n.2, p.133-140.
3. Cavalcante MB, Sampaio OGM, Câmara FEA, Schneider A, de Ávila BM, Proszek J, Masternak MM, Campos AR. Ovarian aging in humans: potential strategies for extending reproductive lifespan. *Geroscience.* 2023. doi: 10.1007/s11357-023-00768-8.
4. Ferreira VN, Chinelato RS de C, Castro MR, Ferreira MEC. Menopausa: marco biopsicossocial do envelhecimento feminino. *Psicol Soc.* 2013;25(2):410–9.
5. Finch CE. The menopause and aging, a comparative perspective. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;142:132-141. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.03.010
6. Medeiros SF de, Maitelli A, Nince APB. Efeitos da terapia hormonal na menopausa sobre o sistema imune. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007;29(11):593–601.
7. Bitto A, Altavilla D, Bonaiuto A, Polito F, Minutoli L, Di Stefano V, Giuliani D, Guarini S, Arcoraci V, Squadrito F. Effects of aglycone genistein in a rat experimental model of postmenopausal metabolic syndrome. *J Endocrinol.* 2009;200(3):367-76. doi:10.1677/JOE-08-0206.
8. Bourgonje AR, Abdulle AE, Al-Rawas AM, Al-Maqbali M, Al-Saleh M, Enriquez MB, Al-Siyabi S, Al-Hashmi K, Al-Lawati I, Bulthuis MLC, Mulder DJ, Gordijn SJ, van Goor H, Saleh J. Systemic Oxidative Stress Is Increased in Postmenopausal Women and Independently

- Associates with Homocysteine Levels. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1):314. doi: 10.3390/ijms21010314.
9. Doshi SB, Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause. *J Midlife Health.* 2013;4(3):140-6. doi:10.4103/0976-7800.118990.
 10. Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S, Pino LD, Costa MP, Marchese G, Celotta G, Cassibba N, Pennisi G, Caschetto S. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas.* 2006;53(1):77-82. doi:10.1016/j.maturitas.2005.03.001.
 11. McLean RR. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2009;7(4):134-139. doi:10.1007/s11914-009-0023-2
 12. Chen H, Perez JN, Constantopoulos E, McKee L, Regan J, Hoyer PB, Brooks HL, Konhilas J. A method to study the impact of chemically-induced ovarian failure on exercise capacity and cardiac adaptation in mice. *J Vis Exp.* 2014;(86):51083. doi: 10.3791/51083.
 13. Das M, Ellies LG, Kumar D, Saucedo C, Oberg A, Gross E, Mandt T, Newton IG, Kaur M, Sears DD, Webster NJG. Time-restricted feeding normalizes hyperinsulinemia to inhibit breast cancer in obese postmenopausal mouse models. *Nat Commun.* 2021;12(1):565. doi:10.1038/s41467-020-20743-7.
 14. Romero-Aleshire MJ, Diamond-Stanic MK, Hasty AH, Hoyer PB, Brooks HL. Loss of ovarian function in the VCD mouse-model of menopause leads to insulin resistance and a rapid progression into the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297(3):R587-92. doi:10.1152/ajpregu.90762.2008.
 15. Brooks HL, Pollow DP, Hoyer PB. The VCD Mouse Model of Menopause and Perimenopause for the Study of Sex Differences in Cardiovascular Disease and the Metabolic Syndrome. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(4):250-257. doi:10.1152/physiol.00057.2014
 16. Van Kempen TA, Milner TA, Waters EM. Accelerated ovarian failure: a novel, chemically induced animal model of menopause. *Brain Res.* 2011;1379:176-187. doi:10.1016/j.brainres.2010.12.064
 17. Rivera Z, Christian PJ, Marion SL, Brooks HL, Hoyer PB. Steroidogenic capacity of residual ovarian tissue in 4-vinylcyclohexene diepoxide-treated mice. *Biol Reprod.* 2009;80(2):328-336. doi:10.1095/biolreprod.108.070359

18. Acosta JJ, Mayer L, Talboom JS, Tsang CW, Smith CJ, Enders CK, Bimonte-Nelson HA. Transitional versus surgical menopause in a rodent model: etiology of ovarian hormone loss impacts memory and the acetylcholine system. *Endocrinology*. 2009;150(9):4248-59. doi: 10.1210/en.2008-1802.
19. Rodrigues CM, Domingues TE, de Sousa Santos C, Costa-Pereira LV, Mendes BF, Dos Santos JM, Costa KB, Silva G, Cantuária VL, Rocha-Vieira E, Dias-Peixoto MF, Honorato-Sampaio K. Cardioprotective effects of severe calorie restriction from birth in adult ovariectomized rats. *Life Sci*. 2021;275:119411. doi:10.1016/j.lfs.2021.119411.
20. Normandin E, Sénéchal M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R, Brochu M. Effects of Caloric Restriction with or without Resistance Training in Dynapenic-Overweight and Obese Menopausal Women: A MONET Study. *J Frailty Aging*. 2015;4(3):155-162. doi:10.14283/jfa.2015.54
21. Salminen A, Kaarniranta K. SIRT1: regulation of longevity via autophagy. *Cell Signal*. 2009;21(9):1356-1360. doi:10.1016/j.cellsig.2009.02.014
22. Silva WJM da, Ferrari CKB. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Rev bras geriatr gerontol*. 2011;14(3):441–51. doi:10.1590/S1809-98232011000300005
23. Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(9):913-922. doi:10.1016/j.mad.2005.03.012
24. Genaro P de S, Sarkis KS, Martini LA. O efeito da restrição calórica na longevidade. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53(5):667–72. doi:10.1590/S0004-27302009000500019
25. de Magalhães JP. Open-minded scepticism: inferring the causal mechanisms of human ageing from genetic perturbations. *Ageing Res Rev*. 2005;4(1):1-22. doi:10.1016/j.arr.2004.05.003
26. Lohff JC, Christian PJ, Marion SL, Arrandale A, Hoyer PB. Characterization of cyclicity and hormonal profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause. *Comp Med*. 2005;55(6):523-7.
27. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*. 2012; (67):e4389. doi: 10.3791/4389.

28. Koebele SV, Bimonte-Nelson HA. The endocrine-brain-aging triad where many paths meet: female reproductive hormone changes at midlife and their influence on circuits important for learning and memory. *Exp Gerontol.* 2017; 94:14-23. doi:10.1016/j.exger.2016.12.011
29. Fang Y, Westbrook R, Hill C, Boparai RK, Arum O, Spong A, Wang F, Javors MA, Chen J, Sun LY, Bartke A. Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. *Cell Metab.* 2013;17(3):456-62. doi: 10.1016/j.cmet.2013.02.008.
30. Bennis MT, Schneider A, Victoria B, Do A, Wiesenborn DS, Spinel L, Gesing A, Kopchick JJ, Siddiqi SA, Masternak MM. The role of transplanted visceral fat from the long-lived growth hormone receptor knockout mice on insulin signaling. *Geroscience.* 2017;39(1):51-59. doi: 10.1007/s11357-017-9957-y.
31. Myers M, Britt KL, Wreford NG, Ebling FJ, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction.* 2004;127(5):569-580. doi:10.1530/rep.1.00095
32. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 1992;13(3):637-648.
33. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001;302(2-3):141-145. doi:10.1016/s0304-3940(01)01636-6
34. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-421. doi:10.1016/0076-6879(90)86134-h
35. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med.* 1989;169(5):1543-1555. doi:10.1084/jem.169.5.1543
36. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126. doi:10.1016/s0076-6879(84)05016-3
37. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-3175.

38. Lowry OH, rosebrough NJ, farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.
39. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
40. Kao SW, Sipes IG, Hoyer PB. Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. *Reprod Toxicol.* 1999;13(1):67-75. doi:10.1016/s0890-6238(98)00061-6
41. Mayer LP, Pearsall NA, Christian PJ, Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Marion SL, Sipes IG, Hoyer PB. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol.* 2002;16(6):775-81. doi:10.1016/s0890-6238(02)00048-5.
42. Borman SM, VanDePol BJ, Kao S, Thompson KE, Sipes IG, Hoyer PB. A single dose of the ovotoxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide is protective in rat primary ovarian follicles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;158(3):244-252. doi:10.1006/taap.1999.8702
43. Rogers NH, Perfield JW 2nd, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology.* 2009;150(5):2161-2168. doi:10.1210/en.2008-1405
44. Vasconcellos L de S, Sabino KR, Petroianu A. Relação entre ooforectomia e peso em modelo experimental. *Rev Col Bras Cir.* 2005;32(3):132-5. doi:10.1590/S0100-69912005000300006
45. Redman LM, Ravussin E. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(2):275-87. doi: 10.1089/ars.2010.3253.
46. Garcia DN, Saccon TD, Pradiee J, Rincón JAA, Andrade KRS, Rovani MT, Mondadori RG, Cruz LAX, Barros CC, Masternak MM, Bartke A, Mason JB, Schneider A. Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice. *Geroscience.* 2019;41(4):395-408. doi: 10.1007/s11357-019-00087-x.

47. Pósa A, Szabó R, Kupai K, Csonka A, Szalai Z, Veszelka M, Török S, Daruka L, Varga C. Exercise training and calorie restriction influence the metabolic parameters in ovariectomized female rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:787063. doi: 10.1155/2015/787063.
48. Mason JB, Cargill SL, Anderson GB, Carey JR. Ovarian status influenced the rate of body-weight change but not the total amount of body-weight gained or lost in female CBA/J mice. *Exp Gerontol*. 2010;45(6):435-41. doi:10.1016/j.exger.2010.03.010.
49. Boldarine VT, Pedroso AP, Brandão-Teles C, LoTurco EG, Nascimento CMO, Oyama LM, Bueno AA, Martins-de-Souza D, Ribeiro EB. Ovariectomy modifies lipid metabolism of retroperitoneal white fat in rats: a proteomic approach. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020;319(2):E427-E437. doi:10.1152/ajpendo.00094.2020.
50. Nishio E, Hayashi T, Nakatani M, Aida N, Suda R, Fujii T, Wakatsuki T, Honda S, Harada N, Shimono Y. Lack of association of ovariectomy-induced obesity with overeating and the reduction of physical activities. *Biochem Biophys Rep*. 2019;20:100671. doi:10.1016/j.bbrep.2019.100671.
51. Habermehl TL, Mason JB. Decreased Sarcopenia in Aged Females with Young Ovary Transplants was Preserved in Mice that Received Germ Cell-Depleted Young Ovaries. *J Clin Med*. 2019;8(1):40. doi:10.3390/jcm8010040
52. Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Phillips LS, Allen C, Bassford T, Burke G, Torrens J, Howard BV; Women's Health Initiative Investigators. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. *Diabetologia*. 2004;47(7):1175-1187. doi:10.1007/s00125-004-1448-x.
53. Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, Lin F, Grady D, Bittner V, Cauley JA, Barrett-Connor E; Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*. 2003;138(1):1-9. doi:10.7326/0003-4819-138-1-200301070-00005.
54. Salpeter SR, Walsh JM, Ormiston TM, Greyber E, Buckley NS, Salpeter EE. Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes Obes Metab*. 2006;8(5):538-554. doi:10.1111/j.1463-1326.2005.00545.x

55. Sapatini LRL, Calsa B, Marim LJ, Helaehil JV, Chiarotto GB, Corezola do Amaral ME. Caloric restriction prevents inflammation and insulin dysfunction in middle-aged ovariectomized mice. *Mol Biol Rep.* 2023;50(7):5675-5685. doi:10.1007/s11033-023-08508-z
56. Tyler KA, Habermehl TL, Mason JB. Manipulation of ovarian function influenced glucose metabolism in CBA/J mice. *Exp Gerontol.* 2019;126:110686. doi:10.1016/j.exger.2019.110686
57. Longo VD, Anderson RM. Nutrition, longevity and disease: From molecular mechanisms to interventions. *Cell.* 2022;185(9):1455-1470. doi:10.1016/j.cell.2022.04.002
58. Palmer AK, Jensen MD. Metabolic changes in aging humans: current evidence and therapeutic strategies. *J Clin Invest.* 2022;132(16):e158451. doi:10.1172/JCI158451
59. de Souza Nunes Faria MS, Pimentel VE, Helaehil JV, Bertolo MC, Santos NTH, da Silva-Neto PV, Thomazini BF, de Oliveira CA, do Amaral MEC. Caloric restriction overcomes pre-diabetes and hypertension induced by a high fat diet and renal artery stenosis. *Mol Biol Rep.* 2022;49(7):5883-5895. doi:10.1007/s11033-022-07370-9.
60. Wu QJ, Zhang TN, Chen HH, Yu XF, Lv JL, Liu YY, Liu YS, Zheng G, Zhao JQ, Wei YF, Guo JY, Liu FH, Chang Q, Zhang YX, Liu CG, Zhao YH. The sirtuin family in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):402. doi: 10.1038/s41392-022-01257-8.
61. Kim JY, Mondaca-Ruff D, Singh S, Wang Y. SIRT1 and Autophagy: Implications in Endocrine Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:930919. doi:10.3389/fendo.2022.930919
62. Tozzi R, Cipriani F, Masi D, Basciani S, Watanabe M, Lubrano C, Gnessi L, Mariani S. Ketone Bodies and SIRT1, Synergic Epigenetic Regulators for Metabolic Health: A Narrative Review. *Nutrients.* 2022;14(15):3145. doi: 10.3390/nu14153145.
63. Walsh ME, Shi Y, Van Remmen H. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. *Free Radic Biol Med.* 2014;66:88-99. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.037.
64. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12(5):3117-32. doi:10.3390/ijms12053117.

65. Lissarassa YPS, Vincensi CF, Costa-Beber LC, Dos Santos AB, Goettems-Fiorin PB, Dos Santos JB, Donato YH, Wildner G, Homem de Bittencourt Júnior PI, Frizzo MN, Heck TG, Ludwig MS. Chronic heat treatment positively impacts metabolic profile of ovariectomized rats: association with heat shock response pathways. *Cell Stress Chaperones*. 2020;25(3):467-479. doi:10.1007/s12192-020-01087-z.
66. King TL, Underwood KB, Hansen KK, Kinter MT, Schneider A, Masternak MM, Mason JB. Chronological and reproductive aging-associated changes in resistance to oxidative stress in post-reproductive female mice. *Geroscience*. 2023; doi: 10.1007/s11357-023-00865-8.
67. Vuković R, Blažetić S, Oršolić I, Heffer M, Vari SG, Gajdoš M, Krivošíková Z, Kramárová P, Kebis A, Has-Schön E. Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. *Croat Med J*. 2014;55(3):218-27. doi:10.3325/cmj.2014.55.218.

5 Artigo – Effect of senolytic drugs on chemically induced estropause in young female mice

Artigo submetido a revista Archives of Endocrinology and Metabolism.

Effect of senolytic drugs on chemically induced estropause in young female mice

Abstract

The loss of ovarian function due to depletion of the follicular reserve results in menopause in women or estropause in mice. Menopause leads to metabolic changes and development of chronic diseases associated with the process of aging and cellular senescence. Based on this, our aim was to evaluate metabolic responses in young female mice chemically induced to estropause to senolytic drugs. For this, the mice were divided into three estropause groups and three cyclic groups, which received: placebo, fisetin and a combination of dasatinib and quercetin (D+Q). Estropause was induced with 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) for 20 consecutive days in two-month-old females. The treatment protocol with senolytics began at five months of age and treatments lasted six months. Females in estropause gained more body mass than cyclic females. Estropause did not affect insulin sensitivity, lipid profile, liver enzymes, albumin, globulins or total proteins, regardless of senolytic treatment. The effect of senolytic treatments on redox status in adipose and hepatic tissue was similar in cyclic and estropause females. However, estropause decreased catalase (CAT) activity in adipose tissue in all groups. Fisetin reduced ROS levels in the hepatic tissue of estropause females compared to placebo cyclic and estropause females. Estropause and treatment with senolytics did not influence senescence-associated beta-galactosidase activity in adipose and hepatic tissues. However, estropause females had the increased senescent cells markers compared to cyclic females, reinforcing the ovotoxic and local effect of VCD in the ovary. However, senolytic treatment did not decrease ovarian senescence induced by estropause. Overall our current data suggest that estropause was associated to little metabolic changes in young females and that senolytics had no protective effects. Changes in senescence markers were restricted to the ovarian tissue of females induced to estropause and not reversed by senolytic therapy.

Keywords: menopause, senescence, VCD, oxidative stress.

1. INTRODUCTION

Reproductive aging is characterized by the continuous and progressive decline of the ovarian reserve until its complete depletion and the onset of menopause [Broekmans, et al. 2009; Finch, 2014; Cavalcante et al., 2023]. Menopause results in decreased estrogen levels, leading to metabolic changes such as body weight gain, increased adiposity, dyslipidemia, increasing the risk for osteoporosis and cardiovascular diseases [Selbac et al., 2018; Bitto et al., 2009; Lizcano, Guzmán, 2014]. Some studies suggest that menopause generates a pro-oxidant state in the body, due to a reduction in antioxidant capacity [Doshi, Agarwal, 2013; Bourgonje et al., 2020; Secomandi et al., 2022], which may also contribute to metabolic changes. In mice, cessation of cyclicity, or estropause, can be chemically induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD), an ovotoxic drug that causes ovarian failure, similar to the gradual process of follicle loss observed in peri-menopausal women [Chen et al., 2014; Romero-Aleshire et al., 2009].

Cellular senescence is a response to endogenous and exogenous stressors during aging, aiming to inhibit proliferation of aged or damaged cells, resulting in a state of permanent cell cycle arrest [Calcinotto et al., 2019; Secomandi et al., 2022]. Senescence plays important physiological roles for tissue homeostasis and tumor suppression [Hanahan et al, 2011; McHugh, Gil, 2018; Secomandi, 2022; Kudlova et al., 2022]. However, the accumulation of senescent cells during aging can generate chronic a low-grade inflammation [Song et al., 2020], as senescent cells secrete a variety of pro-inflammatory chemokines, cytokines, and interleukins, known as the senescence-associated secretory phenotype (SASP). This accumulation of senescent cells and the associated pro-inflammatory profile can trigger tissue dysfunction and age-related chronic diseases [Secomandi et al., 2022; Kudlova et al., 2022]. However, little is known about the role of senescence in the pathogenesis of diseases in females after estropause.

In this context, drugs with senolytic potential have been used to promote selective clearance of senescent cells [Kudlova et al., 2022; Yousefzadeh et al., 2018; Xu et al., 2018]. Among these, fisetin and a combination of dasatinib and quercetin (D+Q) were shown to delay age-associated disorders and increase lifespan of rodents [Baker et al., 2011; Yousefzadeh et al., 2018; Xu et al., 2018]. Our studies also indicate

that D+Q treatment can reduce senescent cell markers in mice ovaries [Hense et al., 2022]. However, it is necessary to understand whether the effects of estropause can be prevented by senolytic drugs. Therefore, we aimed to evaluate the response of young females induced to estropause to senolytic drugs.

2 METHODS

2.1 Animals and treatments

This study was approved by the Universidade Federal de Pelotas Animal Experimentation Ethics Committee (018232/2021-13). Female C57BL/6 mice were kept under controlled conditions of temperature (22 ± 2 °C), light (12-hour light/12-hour dark cycles) and humidity (40%-60%). The chemical estropause induction protocol was initiated in 60 days old females (n=33) receiving i.p. injections of VCD (160 mg/kg) diluted in sesame oil for 20 consecutive days [Brooks et al., 2016; Lohff et al., 2005; Romero-Aleshire et al., 2009; Ávila et al., 2023]. Control females (n=27) received i.p. injections of vehicle during the same period.

Estropause was confirmed by vaginal cytology at 5 months of age and the treatment with senolytics was started two weeks later. Estropause and cyclic female mice were divided into three groups each: placebo, fisetin and D+Q. The treatment was performed via gavage once a month for 3 consecutive days, during 6 months. The doses were 100mg/kg of body weight for fisetin [Yousefzadeh et al., 2018] and 5mg/kg of dasatinib and 50 mg/kg of quercetin [Xu et al., 2018]. Both treatments were diluted in the vehicle composed of ethanol, PEG 400 and Phosal. Mice in the placebo groups received 100 µL of vehicle via gavage.

In the week before euthanasia mice were subjected to an insulin tolerance test (ITT). At the end of the experiment mice were fasted for 4 hours, subjected to anesthesia with isoflurane and euthanized by exsanguination. Mice were dissected to remove ovarian, fat and liver tissues, which were flash frozen in nitrogen and stored in at -80° C. Ovarian tissue was also preserved in formaldehyde for histological analysis. Abdominal body fat was dissected and weighed on a precision scale immediately after euthanasia.

2.2 Vaginal cytology

Vaginal cytology was performed daily during one week to observe if females were already in estropause, according to the previous protocol [McLean et al., 2012]. For the vaginal cell sample collection, a micropipette was positioned at the opening of the vaginal canal to perform a lavage. The vaginal lavage was placed on a slide and stained using rapid panoptic. The slides were observed under an optical microscope to verify estrous cycle stage of each mice [McLean et al., 2012].

2.3 Insulin Tolerance Test (ITT)

The ITT was performed by injecting insulin (1 IU/kg of body weight) i.p. after two hours fasting. Blood was collected through a small incision at the tip of the tail to check blood glucose levels with a glucometer (AccuChek Activ, Roche Diagnostics®, USA) at the following times: 0, 15, 30 and 60 minutes after insulin injection [Fang et al., 2013].

2.4 Follicle count

The ovaries were removed from 10% buffered formalin, dehydrated in alcohol, cleared in xylene and embedded in paraffin and were sequentially cut at a thickness of 5µm on a semi-automatic microtome (RM2245 38, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK) . One in every six sections were selected and placed on slides. After drying in an oven at 56°C for 24 hours, the slides were stained with hematoxylin-eosin and mounted with coverslips and synthetic resin (Sigma®, St. Louis, MO, USA). The images of the ovarian sections were captured by a digital camera (Moticam 5.0, Motic®, Hong Kong, China) coupled to a microscope (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan), using 4, 10 and 40X objectives. Follicles with clearly visible oocyte nuclei were quantified. The final number of follicles was divided by the total number of sections from each ovary [Myers et al., 2004].

2.5 Biochemical Analysis

Blood samples were collected at euthanasia and centrifuged at 1500 xg to separate serum. Serum samples were evaluated for concentrations of total cholesterol (TC), total globulins, high-density cholesterol (HDL), triglycerides (TRI), albumin (ALB), total proteins (PT), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) using commercial kits (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais and Labtest Virtue Diagnostic, Lagoa Santa, Minas Gerais) in an automated biochemical analysis

equipment (Cobas Mira S, Roche®, Basel, Switzerland) [Ilanisk et al, 2023]. The concentration of very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL) were calculated using the Friedewald equation [Motta, 2009].

2.6 Oxidative stress and senescence parameters

Liver tissue was homogenized (1/10 w/v) using 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 140 mM KCl. Adipose tissue was homogenized (1/10 w/v) using RIPPA buffer (pH 7.5) containing 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl and 150 mM EDTA. The homogenates were centrifuged at 3500 g at 4°C for 10 minutes and the supernatants used in oxidative stress analysis.

2.6.1 Reactive oxygen species (ROS)

ROS levels were determined by oxidation of DCFH-DA to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). DCF fluorescence intensity was recorded at 525 and 488 nm excitation 30 min after addition of DCFH-DA to the medium. ROS formation was expressed as $\mu\text{mol DCF/mg protein}$ [Ali et al., 1992].

2.6.2 Total sulfhydryl content

The total thiol content was determined by the reduction of DTNB by thiols, forming a derivative compound (TNB), which absorption is measured in the spectrophotometer at 412 nm. The results were expressed as $\text{nmol TNB/mg protein}$ [Aksenov, Markesbery, 2001].

2.6.3 Substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS)

Lipid peroxidation was determined by estimating MDA formation. TBA and trichloroacetic acid were added to the supernatant for the reaction. TBARS levels were quantified with absorbance at 535 nm and reported as $\text{nmol TBARS/mg protein}$ [Esterbauer, Cheeseman 1990].

2.6.4 Nitrites

The nitrite reaction was performed with sulfanilamide and N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED), using the Griess reaction. Absorbance was measured at 540 nm. The results were expressed as $\mu\text{M nitrite/mg protein}$ [Stuehr, Nathan 1989].

2.6.5 Catalase activity (CAT)

CAT activity was measured based on the decomposition of H₂O₂ at 240 nm. CAT activity was reported as units/mg protein [Aebi,1984].

2.6.6 Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was measured based on the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation by SOD in the sample at 480 nm. SOD activity is expressed in units/mg of protein [Misra, Fridovich 1972].

2.6.7 Analysis of senescence-associated beta-galactosidase (SA-βGAL) activity

The analysis of SA-βGAL activity was performed in hepatic and adipose tissue through spectrophotometry using the mammalian beta-galactosidase assay kit (Mammalian beta Galactosidase Assay Kit, ThermoScientific™) following the manufacturer's recommendations.

2.6.8 Protein Determination

Protein was measured using the BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific™), according to the manufacturer's instructions. The, SA-βGAL activity was quantified

2.7 Lipofuscin Analysis

Lipofuscin analysis was performed with the Sudan Black (SB) dye according to the protocol adapted from Evangelou and Gorgoulis (2017). After preparing the SB solution, the slides were prepared by immersion in decreasing concentrations of xylene and ethyl alcohol and, subsequently, stained with the SB dye. After drying, the slides were mounted with a coverslip in 40% TBS glycerol. Images of the ovarian sections were captured by a digital camera (Moticam 5.0, Motic®, Hong Kong, China) coupled to a microscope (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan), using 4 and 10X objectives and quantified with the Image J Software.

2.8 Collagen analysis

Collagen analysis was performed using the Picrosirius Red (PSR) dye, which is specific for collagen fibers type I and III [Briley et al. 2016]. After preparing the PSR solution, slides were deparaffinized by immersion in decreasing concentrations of xylene and ethyl alcohol and stained with the PSR dye. For PSR staining, slides were

immersed in a PSR staining solution prepared by dissolving Sirius Red F3BA (Direct Red 80, CI 357.82, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in a saturated aqueous solution of picric acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 0.1% w/v. All slides were processed simultaneously to minimize variation in staining intensity by the automated sample preparation system (ST5020, Leica Biosystems). After drying, the slides were mounted with a coverslip in 40% TBS glycerol. Images of the ovarian sections were captured by a digital camera (Moticam 5.0 Motic®, Hong Kong, China) coupled to a microscope (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan), using a 10X objective and quantified with the Image J Software.

2.9 Immunofluorescence

Ovarian sections were deparaffinized with xylene and rehydrated with graded alcohols. The anti-CD68 monoclonal antibody (ab955, Abcam, Cambridge, United Kingdom) was diluted in 1.5% BSA solution [Skaznik-Wikiel et al., 2016] at 1:400 dilution. Anti-Lamin B1 (ab133741, Abcam) was also diluted in 1.5% BSA solution and used at 1:1000 dilution (Guo et al., 2014). Antigen retrieval was performed for 3 min at boiling point in citrate solution (pH 6.0). Nonspecific background staining was reduced by covering tissue sections with 10% BSA and 7% goat serum. The slides were incubated overnight with the primary antibody in a humid chamber at 4°C, for 1 h with secondary antibody Alexa Fluor® 488 (ab150077, Abcam) and for 3 min with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, USA). Slides were mounted with a drop of mounting medium (Fluoroshield, Sigma-Aldrich, St Lois, USA) under coverslips. For analysis of CD68 and LB1, an area of each section (1 section/mouse) was acquired at 100x magnification using a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP8). Sequential scanning was employed using the 488 nm laser to visualize Alexa 488 and the 405 nm UV lasers to visualize DAPI staining. Fluorescence intensity was calculated using Image J® software to calculate the proportion of positive staining in each ovarian section.

2.10 Statistical Analysis

Statistical analyzes were performed using Graphpad Prism 8 software. Repeated measures ANOVA was used for body weight and ITT analysis. Two Way ANOVA was used for analysis of continuous variables (follicle count,

biochemical/immunofluorescence and oxidative stress). Values of $P < 0.05$ were considered as statistically significant.

3 RESULTS

Weight and metabolic parameters

Females in estropause had greater body mass (Figure 1a) and greater body mass gain after estropause (Figure 1b) compared to cyclic females. Despite the increase in body weight gain, there was no difference in fat content between mice in estropause and cyclic controls (Figures 1c). Senolytic treatment did not affect the body mass gain of mice in estropause.

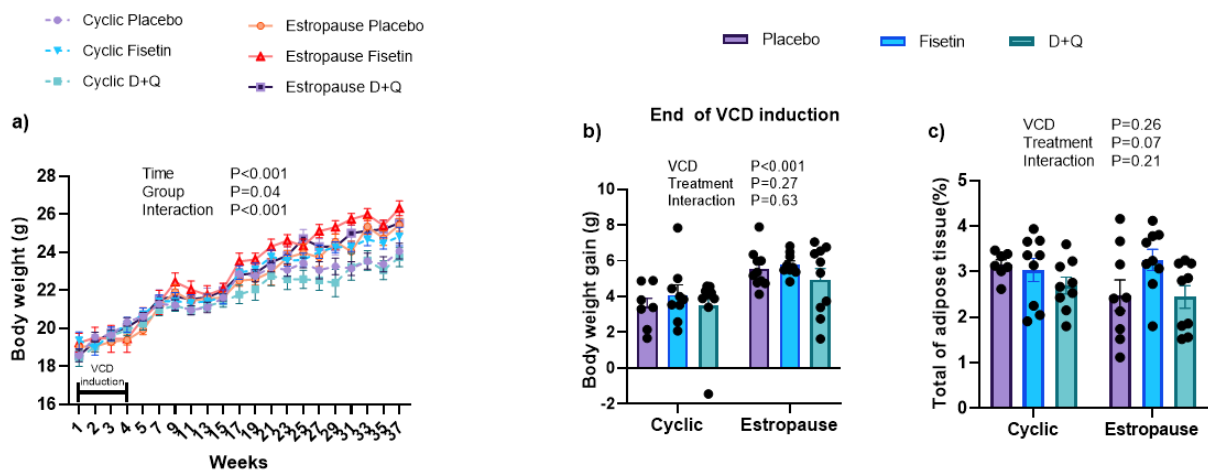


Fig. 1 – a) Body mass of females from the start of VCD injection to the end of the experimental period; b) body weight gain during the period of senolytic treatment from 5 to 11 months of age; c) Abdominal adipose tissue relative to body mass content.

There was no difference in insulin tolerance (Figure 2a), basal glucose levels (Figure 2b), and the rate of glucose decay in response to insulin (Figure 2c) between cyclic and estropause females or in response to senolytic drugs.

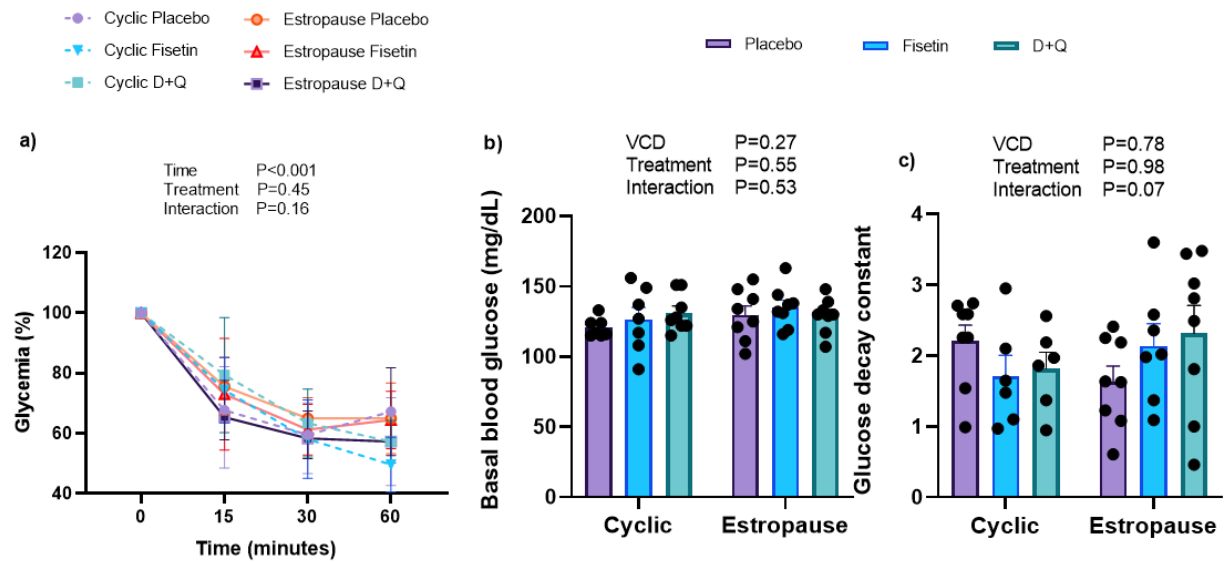


Fig. 2 – a) Glucose levels during the insulin tolerance test (ITT); b) basal blood glucose levels; c) glucose decay constant during the first 15 min of the ITT.

No significant differences were found in serum levels of liver enzymes, albumin, globulins or total proteins between estropause and cyclic females, regardless of treatment. Serum HDL levels were higher in cyclic females receiving fisetin compared to cyclic placebo females ($p < 0.001$). Albumin was lower in estropause compared to cyclic females ($p = 0.02$).

Tab. 1 – Serum biochemical parameters of cyclic and estropause females treated with senolytics dasatinib and quercetin (D+Q) or fisetin (FIS).

Parameter	Cyclic						Estropause						P value		
	PLA		FIS		D+Q		PLA		FIS		D+Q		Treatment	VCD	Interaction
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM			
TC	113.2	10.4	127.7	14.7	127.8	5.8	124.8	9.7	106.1	12.4	128.8	8.5	0.52	0.73	0.30
HDL	36.8 ^a	3.8	53.1b ⁻	4.3	42.5ab ⁻	1.7	46.4 ^{ab}	4.2	40.0 ^{ab}	3.9	41.7 ^{ab}	3.0	0.34	0.64	0.01
LDL	62.9	11.1	59.5	14.0	67.5	6.1	62.4	9.9	50.0	12.5	69.8	6.3	0.40	0.76	0.83
VLDL	13.5	2.8	15.1	1.8	17.8	2.1	16.0	1.4	16.1	1.9	17.3	0.9	0.30	0.51	0.70
TG	67.4	14.2	75.6	9.2	89	10.4	80.2	7.2	80.3	9.6	86.3	4.6	0.30	0.51	0.70
Albumin	2.5	0.07	2.4	0.1	2.5	0.1	2.2	0.1	2.1	0.2	2.3	0.07	0.52	0.02	0.73
Total globulins	3.3	0.2	3.1	0.2	3.3	0.2	3.4	0.3	3.2	0.3	3.3	0.2	0.64	0.66	0.97

Total proteins	5.8	0.2	5.5	0.2	5.8	0.2	5.6	0.3	5.3	0.2	5.7	0.2	0.25	0.34	0.98
ALT	43.0	4.1	38.2	2.2	37.4	1.9	39.1	2.4	39.8	2.9	40.9	2.6	0.71	0.86	0.38
AST	254.3	24.5	211.4	13.4	183.9	22.6	211.1	18.3	217.7	21.9	227.3	14.6	0.37	0.89	0.09

PLA (placebo); FIS (fisetin); D+Q (dasatinib +quercetin); VCD (4-vinylcyclohexene diepoxide); TC (total cholesterol); HDL (HDL cholesterol); LDL (LDL cholesterol); VLDL (VLDL cholesterol); TG (triglycerides); ALT (alanine aminotransferase); AST (aspartate transferase).

Redox status and cellular senescence in adipose and hepatic tissue

Estropause females had reduced CAT activity in abdominal adipose tissue compared to cyclic controls (Figure 3d). There was no difference in adipose tissue ROS (Figure 3a), SH (Figure 3b), nitrites (Figure 3c) and SOD activity (Figure 3e). In the hepatic tissue, ROS levels were reduced in senolytic treated females (Figure 4a). No differences were found for hepatic tissue nitrite (Figure 4b), SH (Figure 4c), SOD (Figure 4d) or CAT activity (Figure 4e). There was no difference in SA- β -gal activity in adipose (Figure 5a) and hepatic tissue (Figure 5b) between cyclicity status or in response to senolytic treatment.

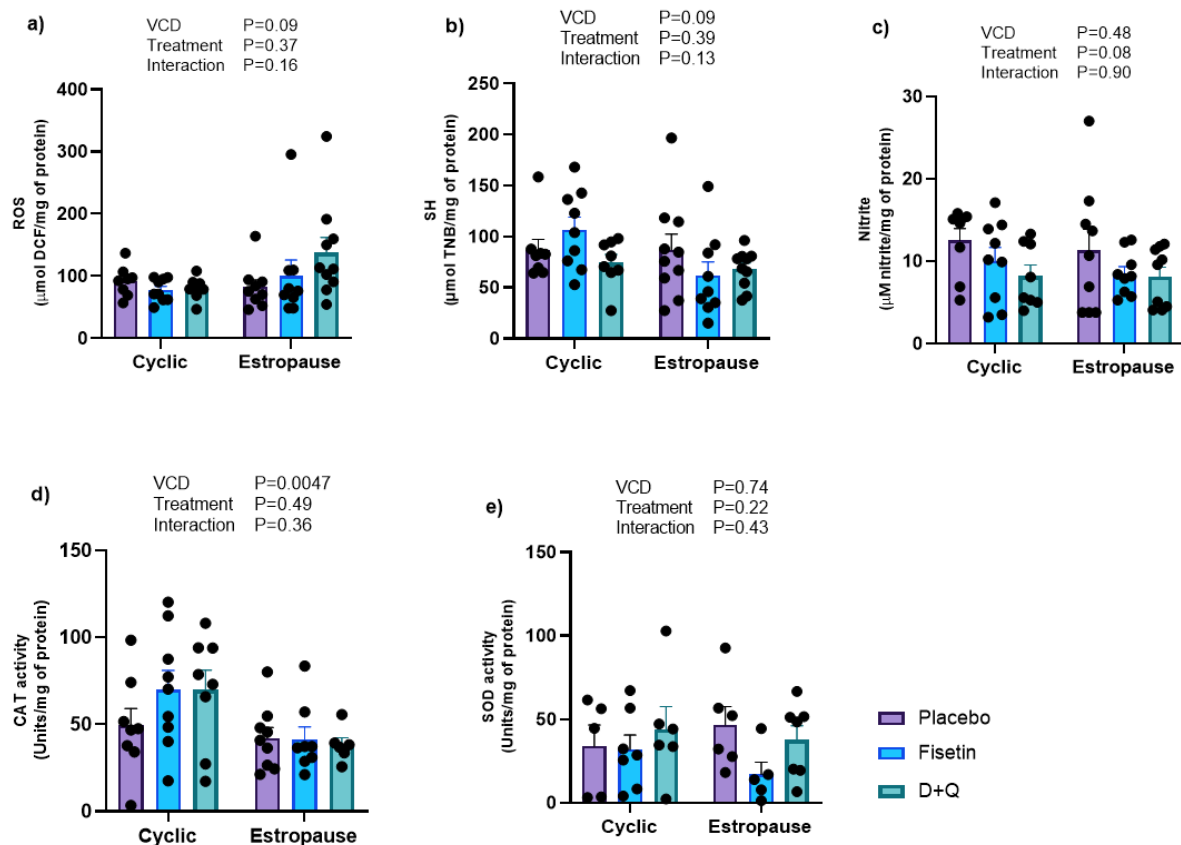


Fig. 3 – Redox status in adipose tissue. a) Reactive oxygen species (ROS); b) sulfhydryl (SH); c) nitrites; d) catalase (CAT) activity; e) superoxide dismutase (SOD) activity.

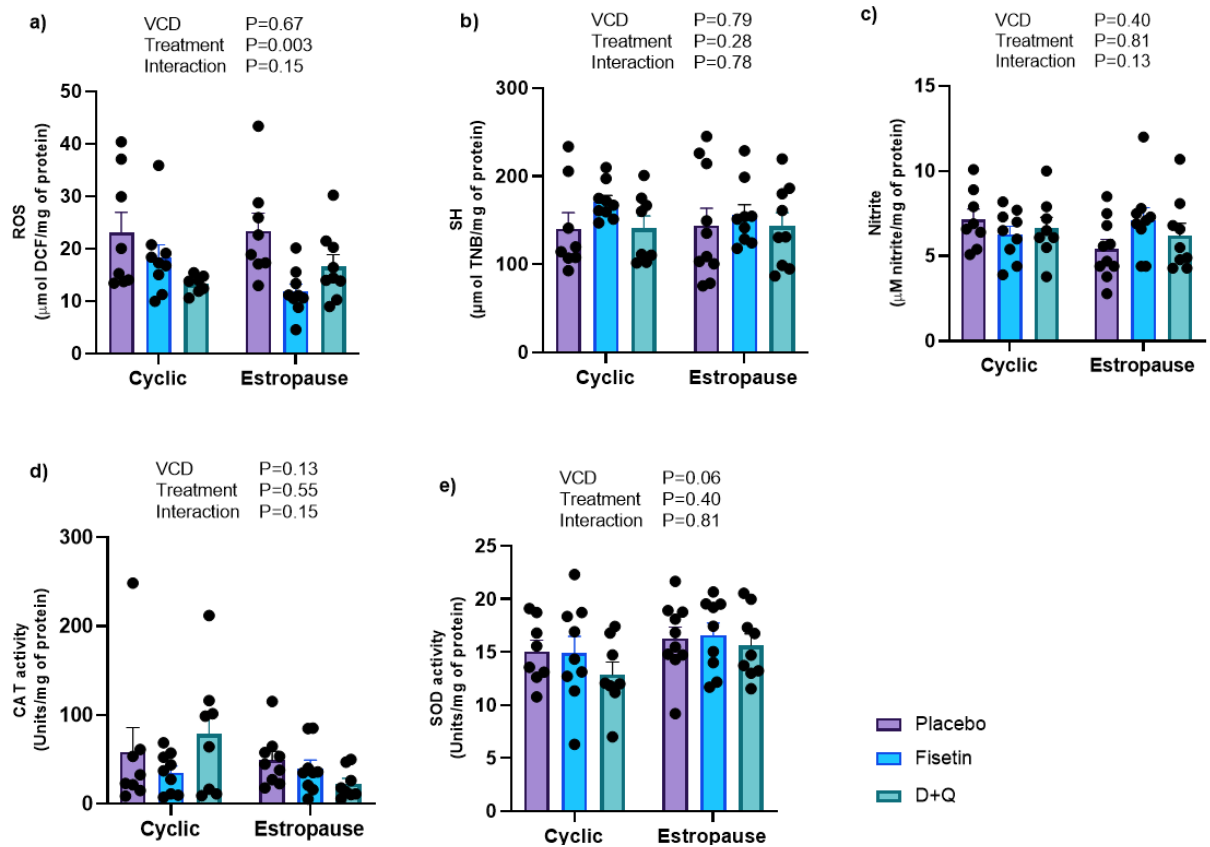


Fig. 4 – Redox status in hepatic tissue. a) Reactive oxygen species (ROS); b) sulfhydryl (SH); c) nitrites; d) catalase (CAT) activity; e) superoxide dismutase (SOD) activity.

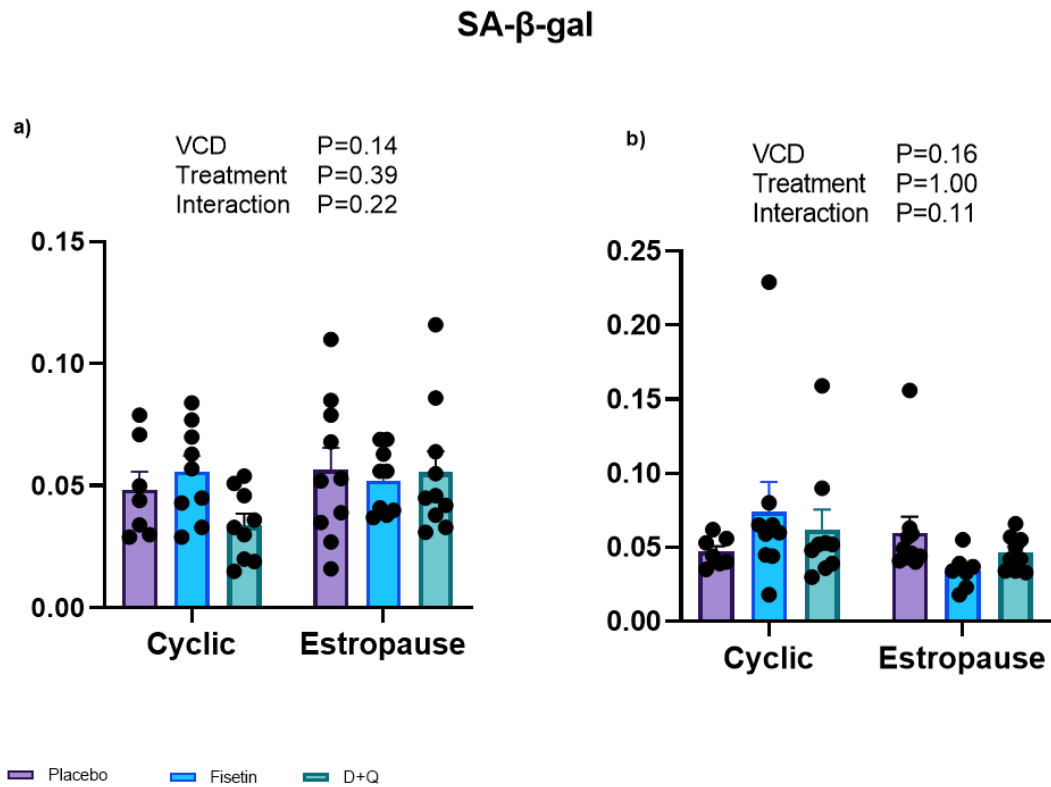


Fig. 5 – Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity in a) abdominal adipose and b) hepatic tissue.

Ovarian activity and senescence

The number of ovarian follicles reduced at all stages of development in estropause compared to cyclic females (Figure 6 a-f). This confirms the effectiveness of the estropause induction protocol with VCD in these groups. All females injected with VCD were acyclic before starting treatment with senolytics, as confirmed by vaginal cytology. Cyclic females, regardless of treatment, had similar number of follicles in all stages of development (Figure 6 a-f).

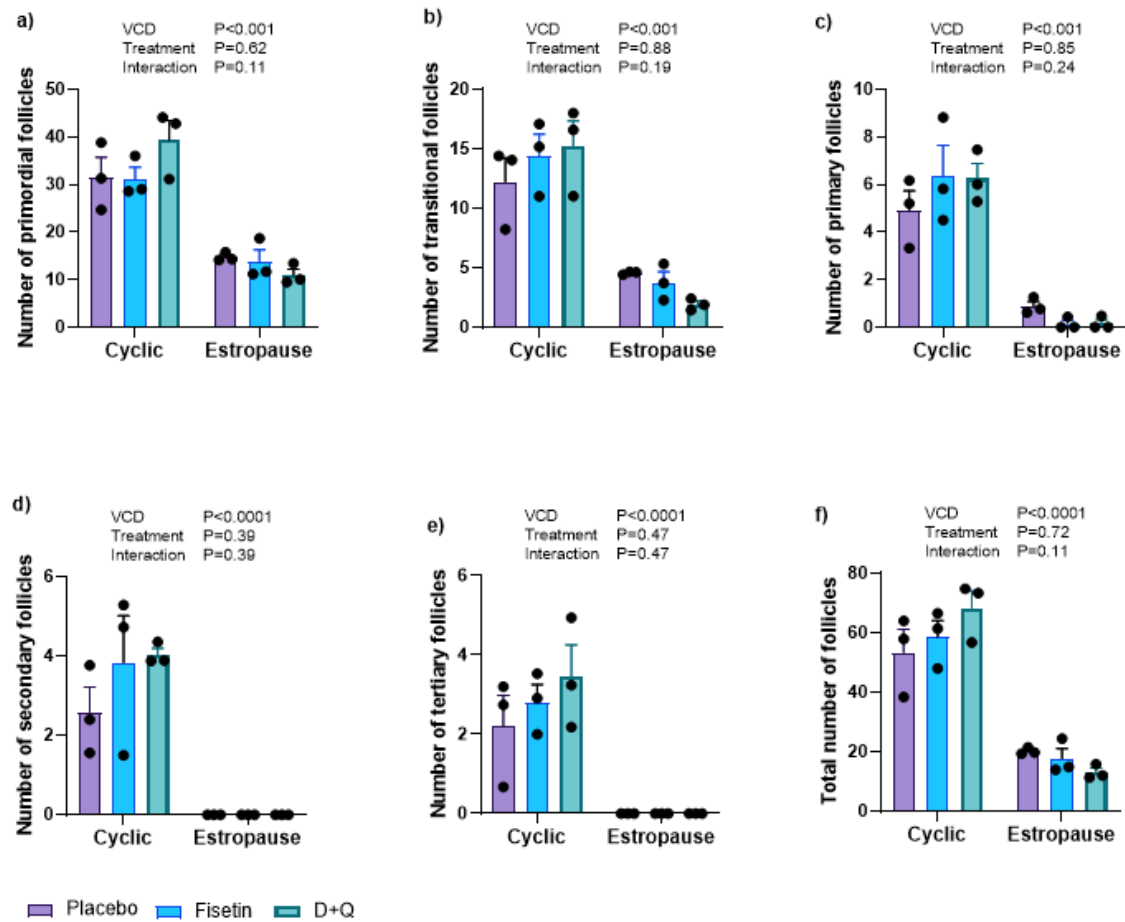


Fig. 6 – Number of a) primordial, b) transition, c) primary, d) secondary, e) tertiary, and f) total follicles per ovarian section.

The percentage of cells positive for lipofuscin in the ovary was higher in estropause compared to cyclic females, with no effect of the senolytic drugs (Figure 7a). The percentage of lamin-B1 positive cells was reduced in the ovaries of estropause compared to cyclic females ($p < 0.001$, Figure 7b), also with no treatment effect. No difference was observed for macrophage infiltration (Figure 7c) and fibrosis (Figure 7d) between cyclicity status and senolytic drug treatment.

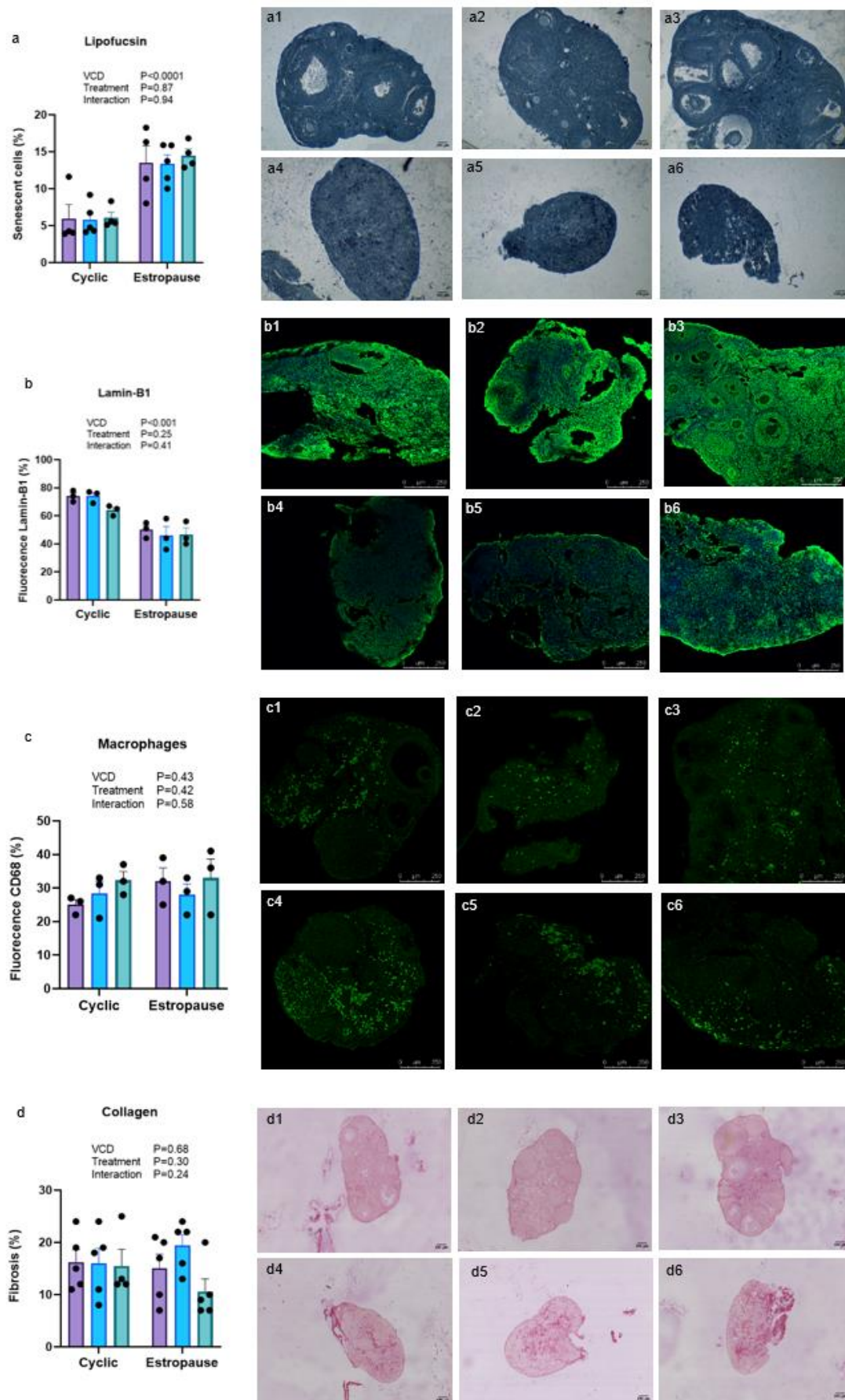


Fig. 7 – Markers of cellular senescence in the ovary a) percentage of lipofuscin positive cells; b) percentage of lamin B1 positive cells; c) percentage of CD68 positive cells; d) percentage of PSR staining. Ovarian images representative of each group as follows: 1) cyclic placebo, 2) cyclic fisetin, 3) cyclic D+Q, 4) estropause placebo, 5) estropause fisetin, 6) estropause D+Q.

4 DISCUSSION

Treatment with senolytic drugs have been investigated for its therapeutic potential to selectively clear senescent cells in different tissues, reducing inflammation and improving health and lifespan [Musi et al., 2018, Kathoon et al., 2021; Bussian et al., 2018; Fang et al., 2023]. However, the effectiveness of these drugs when used at young ages is controversial and seem to be sex specific [Fang et al., 2023; Gao et al., 2023]. In our study, treatment with fisetin or D+Q did not affect most metabolic responses in females induced to estropause compared to cyclic controls, despite increased markers of senescence being observed in the ovarian tissue of estropause females. Estropause females had increased body mass over time when compared to cyclic controls, corroborating with our previous study, when body mass was increased in estropause females even with lower food intake [Ávila et al., 2023]. However, others only observed significant body mass gain in estropause females fed a high-fat diet [Romero -Aleshire et al., 2009], which suggests that estropause alone does not induce many metabolic changes. Senolytic treatment also did not affect body mass gain of estropause females. A previous study that evaluated the senolytic potential of D+Q and fisetin in cyclic young females and males only observed beneficial effects in males [Fang et al., 2023]. In females, treatment with D+Q induced increased body mass gain and greater fat deposition, however, no differences were observed for fisetin treated females [Fang et al., 2023]. This suggests us that the use of senolytic drugs in young females needs to be better understood, as in addition to age, factors such as cyclicity, seems to affect the response to these drugs.

Regarding metabolic parameters, no significant differences were observed between estropause and cyclic females for body fat, insulin sensitivity, glycemia, lipid profile, liver enzymes, albumin, globulins or total proteins. An increase in HDL levels was observed in cyclic females treated with fisetin when compared to cyclic controls,

but no effects of senolytics were observed for other parameters. We previously observed no difference in body fat content between estropause and cyclic females [Ávila et al., 2023]. Similarly, a previous study only observed increased body fat and lower insulin sensitivity in estropause females on high-fat diet [Romero-Aleshire, 2009, Avila 2023]. This further suggests external influences, such as the type of diet, have a main role on metabolic changes induced by estropause. Previous studies show an increased cholesterol level in estropause females, even when fed standard chow [Romero-Aleshire, 2009], which was not observed in this study. Further studies on metabolic and biochemical changes in estropause females are needed to understand how cyclicity status can influence serum lipid levels and insulin sensitivity under different diets.

Estropause decreased CAT activity in adipose tissue in our study. CAT activity is pivotal in the antioxidant defense system [Barbosa et al., 2010], and its reduction can disrupt adipose tissue redox state. Similarly, a study with ovariectomized rats found reduction in CAT activity in adipose tissue compared to intact controls [Lissarassa et al., 2020]. Despite this, other oxidative stress parameters in adipose tissue do not indicate a difference between cyclic and estropause females. In the hepatic tissue, we also observed that most parameters were not different between cyclic and estropause females nor affected by senolytics. Fisetin decreased hepatic ROS levels in estropause females compared to the estropause placebo and even to cyclic females, indicating a slight benefit from this senolytic therapy. Previous observations indicate that D+Q had some detrimental effects and fisetin had little beneficial effects in young female mice [Fang et al., 2023]. Markers of senescence were not affected by fisetin and some were even increased by D+Q treatment in young females [Fang et al., 2023]. We also observed no difference in SA- β -gal activity in adipose and hepatic tissue comparing cyclic and estropause females. Senolytic drugs also did not decrease in SA- β -gal activity. SA- β -gal activity is one of the most widely used markers to assess senescent cells both in vitro and in vivo [Dimri et al., 1995; Debacq-Chainiaux et al., 2009; Wang et al., 2018]. The lack of effect of senolytic drugs further indicate that young females have no benefits from this therapy. Additionally, our data confirms that cyclicity status do not contribute to increased senescence and damage in these tissues. However, further studies evaluating cyclicity status in older females is warranted.

Next we wanted to better understand the changes caused by estropause in ovaries, as this tissue had a significant reduction in the number of follicles due to chemical estropause induction. Therefore, we also investigated markers of ovarian senescence, inflammation and fibrosis. Increased lipofuscin [Urzua et al., 2018; Hense et al., 2022] and decreased LB1 [GUO et al., 2014] staining was observed in the ovaries of estropause females. This suggests that estropause induction and the associated follicular depletion, can increase senescence markers in the ovarian tissue. However, senolytic drugs were not able to reduce these senescence markers independent of cyclicity status. Loss of lamin B1 occurs due to chronological aging and accumulation of senescent cells [Wang et al., 2018] or when cells undergo induced senescence in different tissues [Wang et al., 2017; Shimi et al., 2011; Dreesen et al., 2013]. Other have shown that young female mice treated with doxorubicin have a severely decreased ovarian reserve and increased markers of cellular senescence [Gao et al., 2023]. Senolytics were able to rescue these negative effects of doxorubicin in the ovarian reserve and senescent markers when administered concomitant to doxorubicin [Gao et al., 2023]. In our study senolytics were only started after estropause was confirmed and, therefore, no beneficial effects were observed. This indicate that other strategies may focus on the senolytic therapy to be started before the transition to the estropause state. No difference was observed between cyclic and estropause females regardless of treatment for macrophage infiltration. Others also did not observe a significant increase in ovarian macrophage in females up to 9 months of age [Isola et al., 2023]. We also did not observe a difference in ovarian fibrosis between treatment and cyclic status. This suggests us that ovarian fibrosis may be more associated with aging itself, as a previous study observed significant more ovarian fibrosis in aged mice at 20 months of age compared to young 3 month-old mice [Landry et al., 2022; Briley et al., 2016].

Although some studies suggest that estropause would be more associated with metabolic changes due to the decrease in estrogen production by creating a systemic pro-oxidative state, we only observed an increase in body mass gain, which was not followed by changes in fat mass and did not induce other metabolic or oxidative changes in the liver and adipose tissue. We did not observe any major beneficial effect of the senolytics D+Q or fisetin in cyclic or estropause females. There is a clear need for additional investigation into the effects of senolytics in estropause females. Overall

our current data suggest that estropause was associated to little metabolic changes in young females and that senolytics had no protective effects. Changes in senescence markers were restricted to the ovarian tissue of females induced to estropause and not reversed by senolytic therapy.

REFERENCES

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-126. doi:10.1016/s0076-6879(84)05016-3
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302(2-3):141-145. doi:10.1016/s0304-3940(01)01636-6
- Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 1992; 13(3):637-648.
- Ávila BM, Zanini BM, Luduvico KP, et al. Effect of calorie restriction on redox status during chemically induced estropause in female mice. *Geroscience.* 2023; 10.1007/s11357-023-00979-z. doi:10.1007/s11357-023-00979-z
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays aging-associated disorders. *Nature.* 2011;479(7372):232-236. doi:10.1038/nature10600
- Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas R de CG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Oxidative stress: concept, implications and modulatory factors. *Rev Nutr.* 2010;23(4):629-643. doi:10.1590/S1415-52732010000400013
- Bitto A, Altavilla D, Bonaiuto A, et al. Effects of aglycone genistein in a rat experimental model of postmenopausal metabolic syndrome. *J Endocrinol.* 2009;200(3):367-376. doi:10.1677/JOE-08-0206
- Bourgonje AR, Abdulle AE, Al-Rawas AM, Al-Maqbali M, Al-Saleh M, Enriquez MB, Al-Siyabi S, Al-Hashmi K, Al-Lawati I, Bulthuis MLC, Mulder DJ, Gordijn SJ, van Goor H, Saleh J. Systemic Oxidative Stress Is Increased in Postmenopausal Women and

Independently Associates with Homocysteine Levels. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1):314. doi: 10.3390/ijms21010314.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999

Briley SM, Jasti S, McCracken JM, et al. Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary. *Reproduction.* 2016; 152(3):245-260. doi:10.1530/REP-16-0129

Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev.* 2009; 30(5):465-493. doi:10.1210/er.2009-0006

Brooks HL, Pollow DP, Hoyer PB. The VCD Mouse Model of Menopause and Perimenopause for the Study of Sex Differences in Cardiovascular Disease and the Metabolic Syndrome. *Physiology (Bethesda).* 2016; 31(4):250-257. doi:10.1152/physiol.00057.2014

Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature.* 2018;562(7728):578-582. doi:10.1038/s41586-018-0543-y

Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev.* 2019; 99(2):1047-1078. doi:10.1152/physrev.00020.2018

Cavalcante MB, Sampaio OGM, Câmara FEA, et al. Ovarian aging in humans: potential strategies for extending reproductive lifespan [published online ahead of print, 2023 Mar 13]. *Geroscience.* 2023;10.1007/s11357-023-00768-8. doi:10.1007/s11357-023-00768-8

Chen H, Perez JN, Constantopoulos E, et al. A method to study the impact of chemically-induced ovarian failure on exercise capacity and cardiac adaptation in mice. *J Vis Exp* 2014;(86):51083. Published 2014 Apr 7. doi:10.3791/51083

Chen QM, Tu VC, Catania J, Burton M, Toussaint O, Dilley T. Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis

induced by hydrogen peroxide. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt22):4087-4097. doi:10.1242/jcs.113.22.4087

Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky Jd, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 2009; 4(12):1798-806. doi:10.1038/nprot.2009.191

Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci US A*. 1995;92(20):9363-9367. doi:10.1073/pnas.92.20.9363

Dreesen O, Chojnowski A, Ong PF, et al. Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. *J Cell Biol*. 2013;200(5):605-617. doi:10.1083/jcb.201206121

Doshi SB, Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause. *J Midlife Health*. 2013;4(3):140-6. doi:10.4103/0976-7800.118990.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186:407-421. doi:10.1016/0076-6879(90)86134-h

Evangelou K, Gorgoulis VG. Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells. *Methods Mol Biol*. 2017;1534:111-119. doi:10.1007/978-1-4939-6670-7_10

Fang Y, Medina D, Stockwell R, et al. Sexual dimorphic metabolism and cognitive responses of C57BL/6 mice to Fisetin or Dasatinib and quercetin cocktail oral treatment [published online ahead of print, 2023 Jun 9]. *Geroscience*. 2023;10.1007/s11357-023-00843-0. doi:10.1007/s11357-023-00843-0

Fang Y, Westbrook R, Hill C, et al. Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. *Cell Metab*. 2013;17(3):456-462. doi:10.1016/j.cmet.2013.02.008

Finch CE. The menopause and aging, a comparative perspective. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;142:132-141. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.03.010

Gao Y, Wu T, Tang X, et al. Increased cellular senescence in doxorubicin-induced murine ovarian injury: effect of senolytics. *Geroscience*. 2023;45(3):1775-1790. doi:10.1007/s11357-023-00728-2

Guo Y, Kim Y, Shimi T, Goldman RD, Zheng Y. Concentration-dependent lamin assembly and its roles in the localization of other nuclear proteins. *Mol Biol Cell*. 2014;25(8):1287-1297. doi:10.1091/mbc.E13-11-0644

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hense JD, Garcia DN, Isola JV, et al. Senolytic treatment reverses obesity-mediated senescent cell accumulation in the ovary. *Geroscience*. 2022;44(3):1747-1759. doi:10.1007/s11357-022-00573-9

Horn MA, Trafford AW. Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2016; 93:175-185. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.11.005

Ianiski, Francine R, Amanda L. De Oliveira et al. Wannmacherand Virginia C. Rech (2023), “ β -Cyclodextrins alter the energy metabolism-related enzyme activities in rats”, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 95 (2), e20201783.

Isola JVV, Ocañas SR, Hubbart CR, et al. A single-cell atlas of the aging murine ovary. Preprint. bioRxiv. 2023; 2023.04.29.538828. doi:10.1101/2023.04.29.538828

Kapetanaki MG, Mora AL, Rojas M. Influence of age on wound healing and fibrosis. *J Pathol*. 2013; 229(2):310-322. doi:10.1002/path.4122

Khatoon S, Agarwal NB, Samim M, Alam O. Neuroprotective Effect of Fisetin Through Suppression of IL-1R/TLR Axis and Apoptosis in Pentylene-tetrazole-Induced Kindling in Mice. *Front Neurol*. 2021; 12:689069. doi:10.3389/fneur.2021.689069

Kudlova N, De Sanctis Jb, Hajduch M. Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. *Int J Mol Sci* 2022; 23(8):4168. doi:10.3390/ijms23084168

Ko SH, Kim HS. Menopause-Associated Lipid Metabolic Disorders and Foods Beneficial for Postmenopausal Women. *Nutrients*. 2020;12(1):202. doi:10.3390/nu12010202

Lissarassa YPS, Vincensi CF, Costa-Beber LC, Dos Santos AB, Goettems-Fiorin PB, Dos Santos JB, Donato YH, Wildner G, Homem de Bittencourt Júnior PI, Frizzo MN, Heck TG, Ludwig MS. Chronic heat treatment positively impacts metabolic profile of ovariectomized rats: association with heat shock response pathways. *Cell Stress Chaperones*. 2020; 25(3):467-479. doi:10.1007/s12192-020-01087-z.

Lizcano F, Guzmán G. Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:757461. doi:10.1155/2014/757461

Lohff JC, Christian PJ, Marion SL, Arrandale A, Hoyer PB. Characterization of cyclicity and hormonal profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause. *Comp Med*. 2005; 55(6):523-7.

Lowry OH, rosebrough NJ, farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275.

Mayer LP, Pearsall NA, Christian PJ, Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Marion SL, Sipes IG, Hoyer PB. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol*. 2002;16(6):775-81. doi:10.1016/s0890-6238(02)00048-5.

McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*. 2018; 217(1):65-77. doi:10.1083/jcb.201708092

McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*. 2012; (67):e4389. doi: 10.3791/4389.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972; 247(10):3170-3175.

Motta, 2009. V.T. Motta. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. Rio de Janeiro (5), Medbook (2009).

Musi N, Valentine JM, Sickora KR, et al. Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell*. 2018; 17(6):e12840. doi:10.1111/ace1.12840

Myers M, Britt KL, Wreford NG, Ebling FJ, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*. 2004;127(5):569-580. doi:10.1530/rep.1.00095

Rogers NH, Perfield JW 2nd, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology*. 2009;150(5):2161-2168. doi:10.1210/en.2008-1405

Romero-Aleshire MJ, Diamond-Stanic MK, Hasty AH, Hoyer PB, Brooks HL. Loss of ovarian function in the VCD mouse-model of menopause leads to insulin resistance and a rapid progression into the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 297(3):R587-R592. doi:10.1152/ajpregu.90762.2008

Saccon TD, Moreira F, Cruz LA, 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. *Mol Cell Endocrinol*. 2017; 455:23-32. doi:10.1016/j.mce.2016.10.015

Secomandi L, Borghesan M, Velarde M, Demaria M. The role of cellular senescence in female reproductive aging and the potential for senotherapeutic interventions. *Hum Reprod Update*. 2022; 28(2):172-189. doi:10.1093/humupd/dmab038

Schneider A, Zhi X, Moreira F, Lucia T Jr, Mondadori RG, Masternak MM. Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. *J Ovarian Res* 2014; 7:120. doi:10.1186/s13048-014-0120-4

Selbac MT, Fernandes CGC, Marrone LCP, Vieira AG, Silveira EF, Morgan-Martins MI. Behavioral and physiological changes determined by the female biological cycle: climacteric to menopause. *Aletheia*, 20018; 51(1-2), 177-190.

Shimi T, Butin-Israeli V, Adam SA, et al. The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev*. 2011; 25(24):2579-2593. doi:10.1101/gad.179515.111

- Skaznik-Wikiel ME, Swindle DC, Allshouse AA, Polotsky AJ, McManaman JL. High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice. *Biol Reprod.* 2016; 94(5):108. doi:10.1095/biolreprod.115.137414
- Song P, An J, Zou MH. Immune Clearance of Senescent Cells to Combat Ageing and Chronic Diseases. *Cells.* 2020; 9(3):671. doi:10.3390/cells9030671
- Stokar J, Gurt I, Cohen-Kfir E, et al. Hepatic adropin is regulated by estrogen and contributes to adverse metabolic phenotypes in ovariectomized mice. *Mol Metab.* 2022; 60:101482. doi:10.1016/j.molmet.2022.101482
- Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989;169(5):1543-1555. doi:10.1084/jem.169.5.1543
- Tatone C, Heizenrieder T, Di Emidio G, et al. Evidence that carbonyl stress by methylglyoxal exposure induces DNA damage and spindle aberrations, affects mitochondrial integrity in mammalian oocytes and contributes to oocyte aging. *Hum Reprod.* 2011;26(7):1843-1859. doi:10.1093/humrep/der140
- Urzua U, Chacon C, Espinoza R, Martínez S, Hernandez N. Parity-Dependent Hemosiderin and Lipofuscin Accumulation in the Reproductively Aged Mouse Ovary. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2018; 2018:1289103. doi:10.1155/2018/1289103
- Vasconcellos L de S, Sabino KR, Petroianu A. Relationship between oophorectomy and weight in an experimental model. *Rev Col Bras Cir.* 2005;32(3):132–5. doi:10.1590/S0100-69912005000300006
- Wang AS, Dreesen O. Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Front Genet.* 2018; 9:247. doi:10.3389/fgene.2018.00247
- Wang AS, Ong PF, Chojnowski A, Clavel C, Dreesen O. Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Sci Rep.* 2017;7(1):15678. doi:10.1038/s41598-017-15901-9
- Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med.* 2018; 24(8):1246-1256. doi:10.1038/s41591-018-0092-9

Yeh JH, Tung YT, Yeh YS, Chien YW. Effects of Dietary Fatty Acid Composition on Lipid Metabolism and Body Fat Accumulation in Ovariectomized Rats. *Nutrients*. 2021;13(6):2022. doi:10.3390/nu13062022

Yousefzadeh MJ, Zhu Y, McGowan SJ, et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine*. 2018; 36:18-28. doi:10.1016/j.ebiom.2018.09.015

6 Discussão

Em ambos os experimentos realizados o VCD foi capaz de gerar o estado de estropausa nos camundongos fêmeas por depleção folicular, como visto pela severa redução de folículos primários e ausência de folículos no estágio secundário e terciário. Estudos anteriores realizados em roedores usando o composto químico VCD para indução da estropausa, também demonstraram depleção de pequenos folículos pré-antrais (KAO, SIPES, HOYER, 1999; MAYER et al., 2002; CHEN et al., 2014), e caracterizaram a perda folicular por atresia folicular, indicando que o VCD tem potencial de causar a perda seletiva de folículos primordiais e primários por sua capacidade de acelerar o processo de atresia (BORMAN et al., 1999; MAYER et al., 2002; CHEN et al., 2014). Neste estudo, a menopausa foi validada através da citologia vaginal das fêmeas tratadas com VCD, conforme previamente realizado por outros estudos (MAYER et al., 2002; CHEN et al., 2014, BROOKS, POLLOW, HOYER, 2016). Os resultados mostraram que a estropausa se estabeleceu num período de 60 e 90 dias após o término do tratamento com VCD, quando as fêmeas passaram a apresentar um padrão de aciclicidade e se mantiveram em anestro, semelhante ao citado em estudos prévios que sugerem a ocorrência da menopausa entre 60 e 90 dias após a finalização do tratamento com VCD (CHEN et al., 2014, BROOKS, POLLOW, HOYER, 2016).

No que se refere ao consumo alimentar, este foi um parâmetro avaliado apenas no experimento que envolvia RC, por ser indispensável para a adequação da quantidade de alimento ofertado as fêmeas submetidas a RC de 30%. Em nossos achados as fêmeas em estropausa *ad libitum* apresentaram um menor consumo de ração comparado as fêmeas cíclicas. Entretanto, vale destacar que o grupo estropausa *ad libitum* foi o que demonstrou o maior aumento de peso corporal ao longo do tempo comparado a todos os grupos, mesmo com um consumo médio de ração inferior as fêmeas cíclicas *ad libitum*. Isto corrobora com o resultado de outros estudos, indicando um aumento da eficiência de conversão alimentar, no período pós menopausa de camundongos com uma ingesta alimentar *ad libitum*, consumindo ração padrão para roedores, como neste estudo (VASCONCELLOS, SABINO, PETROIANU, 2005; ROMERO-ALESHIRE et al., 2009; REDMAN et al., 2007).

Em relação as modificações de peso corporal, os estudos demonstraram desfechos semelhantes no que diz respeito ao grupo estropausa *ad libitum*, em ambos os estudos se observou uma média de peso superior nas fêmeas estropausa quando comparadas aos seus controles cíclicos, corroborando com achados de estudos anteriores (VASCONCELLOS, SABINO, PETROIANU, 2005; ROGERS et al., 2009; ROMERO-ALESHIRE et al., 2009). No entanto, os estudos anteriores indicam que esses efeito são mais pronunciados nos animais recebendo uma dieta alta em gordura (ROMERO-ALESHIRE et al., 2009). Não houve diferença em relação ao percentual de gordura entre fêmeas estropausa *ad libitum* e seus controles cíclicos.

No estudo da RC as fêmeas submetidas a 30% RC, como esperado, apresentaram menor peso em relação as alimentadas *ad libitum*, porém curiosamente o grupo estropausa RC 30% foi o grupo que teve o menor peso corporal em relação a todos os outros grupos e apresentou o menor percentual médio de gordura corporal quando comparado aos grupos ciclico RC 30% e estropausa *ad libitum*. Estudos apontam que a intervenção de RC de 25 a 40% é capaz de aumentar a longevidade em diferentes espécies (MASORO, 2005; GENARO, SARKIS, MARTINI, 2009). Porém, parece haver uma escassez de dados que abordem os efeitos e ou benefícios da restrição calórica de fêmeas em estropausa. Alguns estudos que avaliaram uma RC mais intensa (50%) em ratas wistar demonstram que a RC promove a diminuição do ganho de peso de forma semelhante em animais em estropausa por ovariectomia, independente se a RC é iniciada antes ou depois da ovariectomia (RODRIGUES et al., 2021; PÓSA et al., 2015). Não foram encontrados outros estudos que tenham avaliado os efeitos da RC na estropausa quimicamente induzida com VCD até o presente momento, indicando que a ausência de ciclicidade mesmo na presença do tecido ovariano, não altera a resposta a RC.

No estudo dos senolíticos, o tratamento senolítico não mostrou diferença em relação ao aumento de peso das fêmeas em estropausa, exceto nas fêmeas estropausa Fisetina que demonstraram um peso final maior que as fêmeas cíclicas placebo. Um estudo anterior que avaliou o potencial senolítico de D+Q e Fisetina em fêmeas adultas cíclicas, observou efeitos prejudiciais em relação ao aumento de peso e maior deposição de gordura corporal nas fêmeas tratadas com D+Q, porém diferente do nosso estudo, não foram observadas diferenças em relação ao tratamento com a fisetina nas fêmeas (FANG et al., 2023). Assim, é questionado o pontecial senolítico

desses compostos em fêmeas jovens, uma vez que, além da idade, fatores como a menopausa ou o dimorfismo sexual parecem alterar seu mecanismo de ação em relação as descobertas de risco e benefício em diferentes contextos.

Em relação as respostas metabólicas, não foram observadas diferenças significativas entre as fêmeas estropausa e cíclicas no que diz respeito a glicemia e sensibilidade à insulina em ambos os experimentos. Como também não houve diferença em relação aos parâmetros bioquímicos sobre alterações do perfil lipídico, enzimas hepáticas, albumina, globulinas ou proteínas totais avaliadas no estudo dos senolíticos, no qual apenas se observou um aumento dos níveis de HDL nas fêmeas cíclicas tratadas com fisetina quando comparadas as cíclicas placebo, porém não houveram resultados significativos sobre a eficácia do tratamento com senolíticos entre fêmeas cíclicas e estropausa. Não foram encontrados outros estudos com senolíticos que tenham avaliado estes parâmetros bioquímicos. Entretanto, estudos prévios apontam que existe uma tendência em relação à alterações metabólicas importantes que frequentemente são identificadas em fêmeas em estropausa como: ganho de peso, maior quantidade de gordura hepática e visceral (STOKAR et al, 2022), menor sensibilidade a insulina associada a redução dos níveis de estrogênio (ROMERO-ALESHIRE et al., 2009) e desregulação do metabolismo lipídico (KO, KIM, 2020; YEH et al., 2021). E, no estudo de Sapatini et al. (2023) que avaliou uma RC de 40% em fêmeas de 8 a 12 meses de idade, diz que há maior tolerância à glicose e maior sensibilidade à insulina em fêmeas ovariectomizadas que foram submetidas a RC por 30 dias em comparação a fêmeas ovariectomizadas alimentadas à vontade. Vale destacar que a sensibilidade a insulina parece diminuir com a idade em vários estudos em camundongos. No entanto, como nosso estudo utilizou animais jovens com objetivo de minimizar os efeitos da idade, isto pode diferenciar de outros estudos com RC que demonstram a sensibilidade aumentada em animais mais velhos. Sugerindo, que o fator idade pode ter um efeito mais importante do que a ciclicidade em fêmeas. Além disso, também utilizamos um método diferente de indução da menopausa, que mimetiza melhor o que ocorre em humanos, com a retenção do tecido ovariano.

No que se refere aos parâmetros de estresse oxidativos alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo está associado ao processo de envelhecimento e doenças relacionadas à idade, como câncer (LONGO, ANDERSON, 2022; PALMER,

JENSEN, 2022), neurodegeneração (DE SOUZA NUNES FARIA et al., 2022), doenças cardiovasculares (LIGUORI et al., 2018) e diabetes (KIM et al., 2022) e a RC é apontada como um fator protetor contra essas doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Apesar disso, observamos que a RC teve pouco efeito sobre os parâmetros de estresse oxidativo no tecido hepático e adiposo. Curiosamente a RC aumentou os níveis de sulfidril e reduziu a atividade da CAT no tecido adiposo das fêmeas em estropausa, indicando um efeito negativo no equilíbrio redox, o que vai na contra mão de estudos que indicam que o estresse oxidativo no tecido adiposo se relaciona com o próprio excesso de tecido adiposo, que tem sido identificado como fonte de citocinas pró-inflamatórias que geram um estado de inflamação crônica no organismo (WALSH, SHI, VAN REMMEN, 2014; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011). No fígado não foram observados efeitos da RC no estado redox. No entanto, a estropausa reduziu em geral os níveis de ERO e aumentou o nitrito no tecido adiposo.

No estudo com senolíticos o estresse oxidativo no tecido adiposo e hepático, demonstrou efeito semelhante entre fêmeas estropausa e cíclicas, independente do tratamento. Entretanto, a estropausa diminuiu a atividade da catalase (CAT) no tecido adiposo em todos os grupos. A atividade da CAT é considerada um componente importante na defesa antioxidante do organismo (BARBOSA et al., 2010) o que poderia indicar uma redução dessas defesas no tecido adiposo. De forma semelhante, um estudo com ratas ovariectomizadas encontrou uma redução parcial da defesa antioxidante pela atividade de CAT no tecido adiposo em comparação aos controles intactos (LISSARASSA et al., 2020). Vale destacar que as demais análises no tecido adiposo não indicam diferença entre fêmeas cíclicas e estropausa. No fígado apenas o grupo estropausa Fisetina demonstrou uma redução nos níveis de ROS quando comparada aos grupos placebo cíclicos e estropausa, indicando um leve benefício da terapia senolítica com fisetina neste tecido.

A investigação da senescência celular e das modificações ovarianas na estropausa quimicamente induzida com VCD deste estudo foram realizadas exclusivamente no experimento utilizando senolíticos. A senescência celular foi avaliada no tecido adiposo e hepático pela atividade de SA- β -gal, que é um dos marcadores mais utilizados para avaliar a senescência, e continua sendo o padrão ouro para identificar células senescentes tanto em cultivo in vitro quanto em tecidos (DIMRI et al., 1995; DEBACQ-CHAINIAUX et al., 2009; WANG, DREESEN, 2018).

Não foram encontradas diferença da atividade de SA- β -gal nos tecidos adiposo visceral e hepático ao comparar as fêmeas em estropausa e cíclicas, bem como, não foram encontrados outros estudos que avaliaram a atividade de SA- β -gal no tecido adiposo e hepático de roedores na menopausa para estabelecer comparação. Entretanto, um estudo que avaliou marcadores de SASP no tecido adiposo de fêmeas jovens, tratadas com os mesmos senolíticos utilizados neste estudo, também não observou quaisquer impactos benéficos do tratamento com fisetina ou D+Q sobre a senescência celular. Reforçando a ideia de que o tratamento com senolíticos demonstra efeitos insignificantes ou não apresentam benefícios no tratamento de fêmeas jovens.

Com o objetivo de melhor compreender as alterações induzidas quimicamente da estropausa com VCD no ovário, visto a importante redução do número de folículos, analisamos marcadores de senescência celular, inflamação e fibrose no órgão. A senescência nos ovários foi avaliada pela marcação de lipofuscina (URZUA et al., 2018; HENSE et al., 2022) e imunofluorescência de LB1 (GUO et al., 2014) conforme já realizado em estudos prévios. O percentual de células positivas para lipofuscina no ovário das fêmeas estropausa foi maior do que nos controles cíclicos, sugerindo maior acúmulo de células senescentes no tecido associado ao estado de estropausa. Na imunofluorescência também observamos uma marcação positiva de maior senescência celular pela redução de LB1 no ovário das fêmeas em estropausa. Isso reforça a ideia de que a ocorrência de mais senescência na estropausa esteja ligada a redução folicular, uma vez que a menor quantidade de folículos resulta em mais marcação de lipofuscina e menos marcação de LB1. Estudos demonstram que a perda da lamina B1 ocorre pelo envelhecimento cronológico e acúmulo de células senescentes (WANG, DREESEN, 2018) ou quando as células sofrem senescência induzida em diferentes tecidos (WANG et al., 2017; SHIMI et al., 2011; DREESEN et al., 2013), corroborando com nossos achados no ovário nas fêmeas submetidas a indução química da estropausa. No entanto os senolíticos não foram capazes de reduzir esta senescência ovariana, visto que foram iniciados somente bem após o estabelecimento da estropausa induzida.

Com relação ao percentual de inflamação nos ovários não foram observadas diferenças entre fêmeas em estropausa e cíclicas e do tratamento senolítico. De forma semelhante, um estudo que avaliou o envelhecimento celular ovariano em murinos,

também não observou aumento significativo de macrófagos em fêmeas de até 9 meses de idade (ISOLA et al., 2023). Já com relação a fibrose, nosso estudo também não observou diferença entre fêmeas estropausa e cíclicas, sugerindo que a fibrose ovariana pode estar mais associada ao envelhecimento e ao número de ciclos ao longo da vida do que com o estado de estropausa si, uma vez que as fêmeas foram submetidas a indução aos dois meses de idade e tiveram sua acilicidade confirmada próximo aos cinco meses de vida, reduzindo consideravelmente o número de ciclos que foram expostas. Um estudo que avaliou a quantidade de fibrose ovariana em camundongos envelhecidos aos 20 meses de idade com camundongos jovens aos 3 meses de idade, encontrou uma quantidade relativa total de colágeno significativamente maior nos camundongos velhos (LANDRY et al., 2022). Outros estudos também reforçam que a idade parece estar associada a maior quantidade de fibrose em vários tecidos (HORN, TRAFFORD, 2015; KAPETANAKI, MORA, ROJAS, 2013; BRILEY et al., 2016). O tratamento com senolíticos não teve efeito sobre a infiltração de macrófagos ou mesmo fibrose ovariana.

Embora alguns estudos sugiram que a menopausa ou estropausa estaria mais associada a senescência celular e alterações metabólicas devido à diminuição da produção de estrogênio por criar um estado pró-oxidativo sistêmico, não observamos que a estropausa induzida quimicamente potencializou significativamente alterações metabólicas ou dano oxidativo no fígado e no tecido adiposo das fêmeas em nenhum dos experimentos que compõem este estudo. Não observamos que a RC teve efeitos diferentes nas fêmeas cíclicas ou estropausa, exceto em relação a maior perda de peso e redução de gordura corporal. O tratamento com os senolíticos D+Q ou fisetina também não tiveram efeitos positivos relevantes em fêmeas cíclicas ou em estropausa, ao contrário ainda parecem ter potencializado o ganho de peso nas fêmeas estropausa. A tolerância à glicose foi prejudicada em fêmeas em estropausa, mas não foi afetada diferencialmente pela RC, bem como a tolerância a insulina e os marcadores bioquímicos também não foram afetados pelos tratamentos senolíticos. Há uma clara necessidade de investigação adicional sobre os efeitos da RC e dos senolíticos em outras intervenções e contextos que envolvam a menopausa, o envelhecimento e a senescência celular, bem como a avaliação de alterações metabólicas e estresse oxidativo em fêmeas submetidas a estropausa por indução química com VCD. Nossos achados parecem não corroborar com muitas alterações

associadas a menopausa pelo método cirúrgico, porém devemos considerar que no presente estudo as fêmeas, apesar do estado de aciclicidade, possuíam tecido ovariano e que nossas observações foram intencionalmente feitas em animais jovens com o intuito de melhor compreender se o fator idade pode ter um efeito mais importante do que a ciclicidade nos modelos de menopausa e as alterações a ela associadas.

Vale mencionar que, durante a execução dos experimentos houveram algumas excepcionalidades e limitações que merecem ser registradas, uma vez que atrasaram o cronograma de execução e impactaram o planejamento inicial deste estudo. Dentre as excepcionalidades destaca-se a Pandemia de COVID-19, iniciada no Brasil em março de 2020, que coincidiu com uma troca de laboratório e o primeiro contato com o orientador para planejamento das atividades de pesquisa. Nesse momento, seguindo o plano estratégico do país para contenção dos casos da doença, todas as atividades consideradas não essenciais foram paralisadas, o que incluía o funcionamento das universidades. O projeto de pesquisa foi inteiramente elaborado, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL de forma remota durante o primeiro ano de Pandemia. O retorno de atividades de pesquisa presencial na universidade era restrito, inclusive para pesquisas já em andamento e, o início de novas pesquisas ficou suspenso e limitado por meses, respeitando a limitação numérica de pessoas circulando nas áreas da universidade. Isso impactou de forma importante o cronograma de execução dos experimentos, gerando um atraso de aproximadamente 8 meses para início da parte experimental. Ajustes foram necessários e, as análises consideradas prioritárias para avaliar de forma relevante os impactos da RC nas fêmeas submetidas a indução química da estropausa foram elencadas e apresentadas no primeiro artigo já publicado, intitulado: “Effect of calorie restriction on redox status during chemically induced estropause in female mice”. Por consequência do atraso inicial, o segundo experimento com senolíticos também foi impactado em relação ao cronograma de execução e, alguns ajustes em relação as análises inicialmente planejadas precisaram ser adequados para melhor comparabilidade de efeitos observados em ambos os experimentos.

7 Conclusão

A indução química da estropausa com VCD se mostrou efetiva e foi comprovada pela citologia vaginal pela aciclicidade das fêmeas induzidas e pela redução significativa de folículos primordiais e primários, bem como pela ausência folículos em estágios de desenvolvimento maduro nas fêmeas estropausa. Isto reforça o potencial da droga de atuação seletiva sobre folículos primordiais e primários pela aceleração do processo de atresia e do modelo de estropausa como um todo.

A RC se mostrou capaz de reduzir o peso corporal e quantidade de gordura corporal tanto nas fêmeas cíclicas como submetidas a estropausa quimicamente induzida. Entretanto, a RC de 30% nas fêmeas estropausa resultou em uma perda de peso e gordura mais acentuada do que esperado e diferente do observado em estudos que induziram a menopausa pelo método de ovariectomia, deixando o questionamento se o VCD ou a preservação do tecido ovariano podem gerar implicações diferentes apesar do estado de aciclicidade. O tratamento com os senolíticos D+Q ou fisetina não afetou diferencialmente as fêmeas tratadas, nem demonstrou efeitos positivos ou benéficos na comparação entre fêmeas cíclicas e estropausa. Os senolíticos também não influenciaram a resposta em relação a senescência celular em nenhum dos tecidos avaliados. Em ambos os experimentos que compõem este estudo a menopausa quimicamente induzida com VCD em fêmeas jovens não foi capaz de gerar alterações metabólicas importantes ou potencializar o aumento de estresse oxidativo de forma diferencial entre fêmeas estropausa e cíclicas.

Em conjunto os achados deste estudo podem contribuir para elucidar a lacuna percebida em relação às alterações que parecerem se confundir quanto sua associação com a menopausa ou o envelhecimento. Há uma clara necessidade de investigação adicional sobre os efeitos da RC e dos senolíticos em outras intervenções e contextos que envolvam a menopausa, o envelhecimento e a senescência celular, bem como na avaliação de alterações metabólicas e estresse oxidativo em fêmeas submetidas a estropausa por indução química com VCD, pois nosso estudo aponta que os efeitos da menopausa quando observados em animais

jovens, parece não concordar com muitas alterações já relatadas e, demonstra um aumento de marcadores de senescência restrito aos ovários.

Referências

- AGONDI, ROSANA C; RIZZO, LUIZ VICENTE; KALIL, JORGE; BARROS, MYRTHES. **Imunossenescência**. Rev. bras. alergologia imunopatol. 2012; 35(5): 169-176
- ALI SS, AHSAN H, ZIA MK, SIDDIQUI T, KHAN FH. **Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players**. J Food Biochem. 2020; 44(3):e13145. doi:10.1111/jfbc.13145.
- ALVIGGI C, HUMAIDAN P, HOWLES CM, TREDWAY D, HILLIER SG. **Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology**. Reprod Biol Endocrinol. 2009; 7:101. doi: 10.1186/1477-7827-7-101.
- ANTUNES S, MARCELINO O, AGUIAR T. **Fisiopatologia da menopausa**. Rev Port Med Geral Fam. 2003;19(4):353-7. doi:10.32385/rpmgf.v19i4.9957
- BAKER DJ, WIJSHAKE T, TCHKONIA T, LEBRASSEUR NK, CHILDS BG, VAN DE SLUIS B, KIRKLAND JL, VAN DEURSEN JM. **Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders**. Nature. 2011; 479(7372):232-6. doi: 10.1038/nature10600
- BALASUBRAMANIAN P, HOWELL PR, ANDERSON RM. **Aging and Caloric Restriction Research: A Biological Perspective With Translational Potential**. EBioMedicine. 2017; 21:37-44. doi:10.1016/j.ebiom.2017.06.015
- BARBOSA KBF, COSTA NMB, ALFENAS R DE CG, DE PAULA SO, MINIM VPR, BRESSAN J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Rev Nutr. 2010; 23(4):629–43. doi:10.1590/S1415-52732010000400013
- BARREIROS ALBS, DAVID JM, DAVID JP. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. Quím Nova. 2006; 29(1):113–23. doi:10.1590/S0100-40422006000100021
- BARZILAI N, HUFFMAN DM, MUZUMDAR RH, BARTKE A. **The critical role of metabolic pathways in aging**. Diabetes. 2012; 61(6):1315-22. doi: 10.2337/db11-1300.
- BAZILIO, DS. **Efeitos da falha ovariana induzida quimicamente com 4-vinilciclohexano diepóxido em ratas: avaliação de reflexos cardiovasculares**. Trabalho de Conclusão de Curso, Curso de Ciências Biológicas, Laboratório de Estudos Neuroendócrinos e Cardiovasculares, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.
- BECKER BN, HIMMELFARB J, HENRICH WL, HAKIM RM. **Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors**. J Am Soc Nephrol. 1997; 8(3):475-86. doi: 10.1681/ASN.V83475.
- BITTNER A, ALCAÍÑO H, CASTRO PF, PÉREZ O, CORBALÁN R, TRONCOSO R, CHIONG M, MELLADO R, MORAGA F, ZANOLLI D, WINTER JL, ZAMORANO JJ, DÍAZ-ARAYA G, LAVANDERO S. **Matrix metalloproteinase-9 activity is**

associated to oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol.* 2010; 143(1):98-100. doi:10.1016/j.ijcard.2008.

BITTO A, ALTAVILLA D, BONAIUTO A, POLITO F, MINUTOLI L, DI STEFANO V, GIULIANI D, GUARINI S, ARCORACI V, SQUADRITO F. **Effects of aglycone genistein in a rat experimental model of postmenopausal metabolic syndrome.** *J Endocrinol.* 2009; 200(3):367-76. doi: 10.1677/JOE-08-0206

BORMAN SM, VANDEPOL BJ, KAO S, THOMPSON KE, SIPES IG, HOYER PB. **A single dose of the ovotoxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide is protective in rat primary ovarian follicles.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999; 158(3):244-52. doi: 10.1006/taap.1999.8702

BOURGONJE AR, ABDULLE AE, AL-RAWAS AM, AL-MAQBALI M, AL-SALEH M, ENRIQUEZ MB, AL-SIYABI S, AL-HASHMI K, AL-LAWATI I, BULTHUIS MLC, MULDER DJ, GORDIJN SJ, VAN GOOR H, SALEH J. **Systemic Oxidative Stress Is Increased in Postmenopausal Women and Independently Associates with Homocysteine Levels.** *Int J Mol Sci* 2020; 21(1):314. doi: 10.3390/ijms21010314

BRILEY SM, JASTI S, MCCracken JM, HORNICK JE, FEGLEY B, PRITCHARD MT, DUNCAN FE. **Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary.** *Reproduction.* 2016; 152(3):245-260. doi:10.1530/REP-16-0129

BRINTON RD. **Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities.** *Endocrinology.* 2012; 153(8):3571-8. doi: 10.1210/en.2012-1340.

BROEKMANS FJ, SOULES MR, FAUSER BC. **Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences.** *Endocr Rev.* 2009; 30(5):465-93. doi: 10.1210/er.2009-0006

BROER SL, BROEKMANS FJ, LAVEN JS, FAUSER BC. **Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications.** *Hum Reprod Update.* 2014; 20(5):688-701. doi:10.1093/humupd/dmu020.

BROOKS HL, POLLOW DP, HOYER PB. **The VCD Mouse Model of Menopause and Perimenopause for the Study of Sex Differences in Cardiovascular Disease and the Metabolic Syndrome.** *Physiology (Bethesda).* 2016; 31(4):250-7. doi:10.1152/physiol.00057.2014.

BUSSIAN TJ, AZIZ A, MEYER CF, SWENSON BL, VAN DEURSEN JM, BAKER DJ. **Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline.** *Nature.* 2018; 562(7728):578-582. doi:10.1038/s41586-018-0543-y

CALCINOTTO A, KOHLI J, ZAGATO E, PELLEGRINI L, DEMARIA M, ALIMONTI A. **Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury.** *Physiol Rev.* 2019; 99(2):1047-1078. doi:10.1152/physrev.00020.2018

CAMERON JD, RIOU MÈ, TESSON F, GOLDFIELD GS, RABASA-LHORET R, BROCHU M, DOUCET É. **The TaqIA RFLP is associated with attenuated intervention-induced body weight loss and increased carbohydrate intake in post-menopausal obese women.** *Appetite.* 2013;60(1):111-116. doi:10.1016/j.appet.2012.09.010

CEPELLOS VM. **Feminização do envelhecimento: um fenômeno multifacetado muito além dos números.** Rev adm empres. 2021; 61(2):e20190861. doi:10.1590/S0034-759020210208

CERVELLATI, CARLO AND BERGAMINI, CARLO M. **Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases.** Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2016; 54(5):739-753. doi:10.1515/cclm-2015-0807

CHANG Q, JORGENSEN C, PAWSON T, HEDLEY DW. **Effects of dasatinib on EphA2 receptor tyrosine kinase activity and downstream signalling in pancreatic cancer.** Br J Cancer. 2008; 99(7):1074-82. doi: 10.1038/sj.bjc.6604676

CHEN, H.; PEREZ, JN.; CONSTANTOPOULOS, E.; MCKEE, L.; REGAN, J.; HOYER, P. B.; BROOKS, HL.; KONHILAS, J. **A Method to Study the Impact of Chemically-induced Ovarian Failure on Exercise Capacity and Cardiac Adaptation in Mice.** J. Vis. Exp. 2014; (86), e51083. doi: 10.3791/51083

COELHO TIS. **Influência da Nutrição na Resposta Inflamatória e no Envelhecimento.** Dissertação de Mestrado – Mestrado Integrado em Medicina. Faculdade De Medicina Da Universidade De Coimbra, 2017. 67p.

COLLERTON J, MARTIN-RUIZ C, DAVIES K, HILKENS CM, ISAACS J, KOLENDA C, PARKER C, DUNN M, CATT M, JAGGER C, VON ZGLINICKI T, KIRKWOOD TB. **Frailty and the role of inflammation, immunosenescence and cellular ageing in the very old: cross-sectional findings from the Newcastle 85+ Study.** Mech Ageing Dev. 2012;133(6):456-66. doi:10.1016/j.mad.2012.05.005

DA COSTA JP, VITORINO R, SILVA GM, VOGEL C, DUARTE AC, ROCHA-SANTOS T. **A synopsis on aging-Theories, mechanisms and future prospects.** Aging Res Rev. 2016; 29:90-112. doi:10.1016/j.arr.2016.06.005

DAS M, ELLIES LG, KUMAR D, SAUCEDA C, OBERG A, GROSS E, MANDT T, NEWTON IG, KAUR M, SEARS DD, WEBSTER NJG. **Time-restricted feeding normalizes hyperinsulinemia to inhibit breast cancer in obese postmenopausal mouse models.** Nat Commun. 2021; 12(1):565. doi: 10.1038/s41467-020-20743-7.

DE LA FUENTE M. **Effects of antioxidants on immune system ageing.** Eur J Clin Nutr. 2002; 56 Suppl 3:S5-8. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601476

DE SOUZA NUNES FARIA MS, PIMENTEL VE, HELAEHIL JV, BERTOLO MC, SANTOS NTH, DA SILVA-NETO PV, THOMAZINI BF, DE OLIVEIRA CA, DO AMARAL MEC. **Caloric restriction overcomes pre-diabetes and hypertension induced by a high fat diet and renal artery stenosis.** Mol Biol Rep. 2022; 49(7):5883-5895. doi: 10.1007/s11033-022-07370-9

DEBACQ-CHAINIAUX F, ERUSALIMSKY JD, CAMPISI J, TOUSSAINT O. **Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betaagal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo.** Nat Protoc. 2009; 4(12):1798-806. doi:10.1038/nprot.2009.191

DI MICCO R, KRIZHANOVSKY V, BAKER D, D'ADDA DI FAGAGNA F. **Cellular senescence in aging: from mechanisms to therapeutic opportunities.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2021; 22(2):75-95. doi:10.1038/s41580-020-00314-w

- DIMRI GP, LEE X, BASILE G, ACOSTA M, SCOTT G, ROSKELLEY C, MEDRANO EE, LINSKENS M, RUBELJ I, PEREIRA-SMITH O, et al. **A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(20):9363-7. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363
- DOSHI SB, AGARWAL A. **The role of oxidative stress in menopause.** J Midlife Health. 2013; 4(3):140-6. doi:10.4103/0976-7800.118990
- DREESEN O, CHOJNOWSKI A, ONG PF, ZHAO TY, COMMON JE, LUNNY D, LANE EB, LEE SJ, VARDY LA, STEWART CL, COLMAN A. **Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence.** J Cell Biol. 2013; 200(5):605-17. doi:10.1083/jcb.201206121
- ESENCAN E, BEROUKHIM G, SEIFER DB. **Age-related changes in Folliculogenesis and potential modifiers to improve fertility outcomes - A narrative review.** Reprod Biol Endocrinol. 2022; 20(1):156. doi: 10.1186/s12958-022-01033-x.
- FANG Y, MEDINA D, STOCKWELL R, MCFADDEN S, QUINN K, PECK MR, BARTKE A, HASCUP KN, HASCUP ER. **Sexual dimorphic metabolic and cognitive responses of C57BL/6 mice to Fisetin or Dasatinib and quercetin cocktail oral treatment.** Geroscience. 2023; 45(5):2835-2850. doi: 10.1007/s11357-023-00843-0
- FARIA MA, SIMÕES RS, SANTOS MA, SOARES JUNIOR JM, CARBONEL AAF. **Pós-menopausa e sistema imune.** Reprod. Clim. 2013; 28(1): 30-35. doi:10.1016/j.recli.2013.03.005
- FARINATTI P DE TV. **Teorias biológicas do envelhecimento: do genético ao estocástico.** Rev Bras Med Esporte. 2002; 8(4):129–38. doi:10.1590/S1517-86922002000400001
- FARR JN, ROWSEY JL, ECKHARDT BA, THICKE BS, FRASER DG, TCHKONIA T, KIRKLAND JL, MONROE DG, KHOSLA S. **Independent Roles of Estrogen Deficiency and Cellular Senescence in the Pathogenesis of Osteoporosis: Evidence in Young Adult Mice and Older Humans.** J Bone Miner Res. 2019; 34(8):1407-1418. doi: 10.1002/jbmr.3729
- FAUBION L, WHITE TA, PETERSON BJ, GESKE JR, LEBRASSEUR NK, SCHAFER MJ, MIELKE MM, MILLER VM. **Effect of menopausal hormone therapy on proteins associated with senescence and inflammation.** Physiol Rep. 2020; 8(16):e14535. doi: 10.14814/phy2.14535
- FENECH M, BONASSI S. **The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes.** Mutagenesis. 2011; 26(1):43-9. doi:10.1093/mutage/geq050
- FERNANDEZ ML, MURILLO AG. **Postmenopausal Women Have Higher HDL and Decreased Incidence of Low HDL than Premenopausal Women with Metabolic Syndrome.** Healthcare (Basel). 2016; 4(1):20. doi: 10.3390/healthcare4010020.
- FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ A, MADRIGAL-SANTILLÁN E, BAUTISTA M, ESQUIVEL-SOTO J, MORALES-GONZÁLEZ A, ESQUIVEL-CHIRINO C, DURANTE-MONTIEL I, SÁNCHEZ-RIVERA G, VALADEZ-VEGA C, MORALES-GONZÁLEZ JA.

Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(5):3117-32. doi:10.3390/ijms12053117.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Rev Assoc Med Bras.* 1997; 43(1):61–8. doi:10.1590/S0104-42301997000100014

FERREIRA VN, CHINELATO RS DE C, CASTRO MR, FERREIRA MEC. **Menopausa: marco biopsicossocial do envelhecimento feminino.** *Psicol Soc.* 2013; 25(2):410-9.

FINCH CE. **The menopause and aging, a comparative perspective.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; 142:132-141. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.03.010

FINKEL T, HOLBROOK NJ. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** *Nature.* 2000; 408(6809):239-47. doi:10.1038/35041687

FONTANA L, KLEIN S. **Aging, adiposity, and calorie restriction.** *JAMA.* 2007; 297(9):986-94. doi:10.1001/jama.297.9.986

GARCIA DN, SACCON TD, PRADIEE J, RINCÓN JAA, ANDRADE KRS, ROVANI MT, MONDADORI RG, CRUZ LAX, BARROS CC, MASTERNAK MM, BARTKE A, MASON JB, SCHNEIDER A. **Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice.** *Geroscience.* 2019; 41(4):395-408. doi: 10.1007/s11357-019-00087-x

GARCIA, DN. **Efeito da restrição calórica e da rapamicina sobre o envelhecimento ovariano em camundongos.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

GAVA AA, ZANONI JN. **Envelhecimento celular.** *Arq. Ciênc. Saúde Unipar.* 2008; 9(1).

GENARO P DE S, SARKIS KS, MARTINI LA. **O efeito da restrição calórica na longevidade.** *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009; 53(5):667–72. doi:10.1590/S0004-27302009000500019

GRYNKIEWICZ G, DEMCHUK OM. **New Perspectives for Fisetin.** *Front Chem.* 2019 Oct 30;7:697. doi: 10.3389/fchem.2019.00697

GUO Y, KIM Y, SHIMI T, GOLDMAN RD, ZHENG Y. **Concentration-dependent lamin assembly and its roles in the localization of other nuclear proteins.** *Mol Biol Cell.* 2014; 25(8):1287-1297. doi:10.1091/mbc.E13-11-0644

HALLIWELL B. **Biochemistry of oxidative stress.** *Biochem Soc Trans.* 2007;35 (Pt 5):1147-50. doi:10.1042/BST0351147

HANAHAN D, WEINBERG RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell.* 2011; 144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

HANSEN KR, KNOWLTON NS, THYER AC, CHARLESTON JS, SOULES MR, KLEIN NA. **A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause.** *Hum Reprod.* 2008; 23(3):699-708. doi: 10.1093/humrep/dem408.

HE L, HE T, FARRAR S, JI L, LIU T, MA X. **Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species.** Cell Physiol Biochem. 2017; 44(2):532-553. doi:10.1159/000485089.

HENSE JD, GARCIA DN, ISOLA JV, ALVARADO-RINCÓN JA, ZANINI BM, PROSCZEK JB, STOUT MB, MASON JB, WALSH PT, BRIEÑO-ENRÍQUEZ MA, SCHADOCK I, BARROS CC, MASTERNAK MM, SCHNEIDER A. **Senolytic treatment reverses obesity-mediated senescent cell accumulation in the ovary.** Geroscience. 2022; 44(3):1747-1759. doi: 10.1007/s11357-022-00573-9

HICKSON LJ, LANGHI PRATA LGP, BOBART SA, EVANS TK, GIORGADZE N, HASHMI SK, HERRMANN SM, JENSEN MD, JIA Q, JORDAN KL, KELLOGG TA, KHOSLA S, KOERBER DM, LAGNADO AB, LAWSON DK, LEBRASSEUR NK, LERMAN LO, MCDONALD KM, MCKENZIE TJ, PASSOS JF, PIGNOLO RJ, PIRTSKHALAVA T, SAADIQ IM, SCHAEFER KK, TEXTOR SC, VICTORELLI SG, VOLKMAN TL, XUE A, WENTWORTH MA, WISSLER GERDES EO, ZHU Y, TCHKONIA T, KIRKLAND JL. **Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease.** EBioMedicine. 2019;47:446-456. doi:10.1016/j.ebiom.2019.08.069

HIRSHFIELD AN. **Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats.** Biol Reprod. 1994; 50(2):421-8. doi: 10.1095/biolreprod50.2.421.

HOLLOSZY JO, FONTANA L. **Caloric restriction in humans.** Exp Gerontol. 2007; 42(8):709-12. doi:10.1016/j.exger.2007.03.009

HORN MA, TRAFFORD AW. **Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling.** J Mol Cell Cardiol. 2016; 93:175-185. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.11.005

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Projeção da População 2018: número de habitantes do país deve parar de crescer em 2047.** Agência IBGE Notícia, 2018. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/21837-projecao-da-populacao-2018-numero-de-habitantes-do-pais-deve-parar-de-crescer-em-2047>

ISOLA JVV, OCAÑAS SR, HUBBART CR, KO S, MONDAL SA, HENSE JD, CARTER HNC, SCHNEIDER A, KOVATS S, ALBEROLA-ILA J, FREEMAN WM, STOUT MB. **A single-cell atlas of the aging murine ovary.** bioRxiv [Preprint]. 2023; 2023.04.29.538828. doi: 10.1101/2023.04.29.538828

JIN K. **Modern Biological Theories of Aging.** Aging Dis. 2010;1(2):72-74.

KAO SW, SIPES IG, HOYER PB. **Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice.** Reprod Toxicol. 1999; 13(1):67-75. doi: 10.1016/s0890-6238(98)00061-6

KAPETANAKI MG, MORA AL, ROJAS M. **Influence of age on wound healing and fibrosis.** J Pathol. 2013; 229(2):310-322. doi:10.1002/path.4122

KAPPELER CJ, HOYER PB. **4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity.** Syst Biol Reprod Med. 2012; 58(1):57-62. doi:10.3109/19396368.2011.648820.

KHATOON S, AGARWAL NB, SAMIM M, ALAM O. **Neuroprotective Effect of Fisetin Through Suppression of IL-1R/TLR Axis and Apoptosis in Pentylene-tetrazole-Induced Kindling in Mice.** Front Neurol. 2021; 12:689069. doi:10.3389/fneur.2021.689069

KIM JY, MONDACA-RUFF D, SINGH S, WANG Y. **SIRT1 and Autophagy: Implications in Endocrine Disorders.** Front Endocrinol (Lausanne). 2022; 13:930919. doi:10.3389/fendo.2022.930919

KIRKLAND JL, TCHKONIA T. **Senolytic drugs: from discovery to translation.** J Intern Med. 2020; 288(5):518-536. doi: 10.1111/joim.13141

KO SH, KIM HS. **Menopause-Associated Lipid Metabolic Disorders and Foods Beneficial for Postmenopausal Women.** Nutrients. 2020;12(1):202. doi:10.3390/nu12010202

KOEBELE SV, BIMONTE-NELSON HA. **The endocrine-brain-aging triad where many paths meet: female reproductive hormone changes at midlife and their influence on circuits important for learning and memory.** Exp Gerontol. 2017; 94:14-23. doi: 10.1016/j.exger.2016.12.011.

KOUBOVA, J; GUARENTE, L. **How does calorie restriction work?** Gen Dev. 2003;17(3):313-21. doi:10.1101/gad.1052903

KRONENBERG F. **Hot flashes: epidemiology and physiology.** Ann N Y Acad Sci. 1990; 592:52-86. doi:10.1111/j.1749-6632.1990.tb30316.x

KUDLOVA N, DE SANCTIS JB, HAJDUCH M. **Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs.** Int J Mol Sci 2022; 23(8):4168. doi:10.3390/ijms23084168

KUMARI R, JAT P. **Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype.** Front Cell Dev Biol. 2021; 9:645593. doi:10.3389/fcell.2021.645593.

LANDRY DA, YAKUBOVICH E, COOK DP, FASIH S, UPHAM J, VANDERHYDEN BC. **Metformin prevents age-associated ovarian fibrosis by modulating the immune landscape in female mice.** Sci Adv. 2022; 8(35):eabq1475. doi:10.1126/sciadv.abq1475

LEBRASSEUR NK, TCHKONIA T, KIRKLAND JL. **Cellular Senescence and the Biology of Aging, Disease, and Frailty.** Nestle Nutr Inst Workshop Ser. 2015; 83:11-18. doi:10.1159/000382054

LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, BULLI G, ARAN L, DELLA-MORTE D, GARGIULO G, TESTA G, CACCIATORE F, BONADUCE D, ABETE P. **Oxidative stress, aging, and diseases.** Clin Interv Aging. 2018; 13:757-772. doi:10.2147/CIA.S158513

LIMA-COSTA MF, VERAS R. **Saúde pública e envelhecimento.** Cad Saúde Pública. 2003; 19(3):700–1. doi:10.1590/S0102-311X2003000300001

LINO ADS, VIANNA D, OISHI JC, SOUZA MVC, RUFFONI LD, MARIN CT, DE AVÓ LRDS, PEREZ SEA, RODRIGUES GJ, TIRAPEGUI J, SHIGUEMOTO GE.

Resistance training and caloric restriction prevent systolic blood pressure rise by improving the nitric oxide effect on smooth muscle and morphological changes in the aorta of ovariectomized rats. PLoS One. 2018 Aug 22;13(8):e0201843. doi: 10.1371/journal.pone.0201843.

LISSARASSA YPS, VINCENSI CF, COSTA-BEBER LC, DOS SANTOS AB, GOETTEMMS-FIORIN PB, DOS SANTOS JB, DONATO YH, WILDNER G, HOMEM DE BITTENCOURT JÚNIOR PI, FRIZZO MN, HECK TG, LUDWIG MS. **Chronic heat treatment positively impacts metabolic profile of ovariectomized rats: association with heat shock response pathways.** Cell Stress Chaperones. 2020; 25(3):467-479. doi:10.1007/s12192-020-01087-z

LIU Z, WANG L, YANG J, BANDYOPADHYAY A, KAKLAMANI V, WANG S, SUN LZ. **Estrogen receptor alpha inhibits senescence-like phenotype and facilitates transformation induced by oncogenic ras in human mammary epithelial cells.** Oncotarget. 2016;7(26):39097-39107. doi: 10.18632/oncotarget.9772

LIZCANO F, GUZMÁN G. **Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause.** Biomed Res Int. 2014; 2014:757461. doi:10.1155/2014/757461

LONGO VD, ANDERSON RM. **Nutrition, longevity and disease: From molecular mechanisms to interventions.** Cell. 2022;185(9):1455-1470. doi:10.1016/j.cell.2022.04.002

LÓPEZ-LLUCH G, NAVAS P. **Calorie restriction as an intervention in ageing.** J Physiol. 2016; 594(8):2043-60. doi:10.1113/JP270543.

LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO MA, PARTRIDGE L, SERRANO M, KROEMER G. **The hallmarks of aging.** Cell. 2013; 153(6):1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039

MARTINS DA SILVA W. J, BUCALÉN FERRARI CK. **Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento.** Rev. bras. geriatr. gerontol. 2011; 14(3):441-451.

MASORO EJ. **Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms.** Biochim Biophys Acta. 2009; 1790(10):1040-8. doi:10.1016/j.bbagen.2009.02.011.

MASORO EJ. **Overview of caloric restriction and ageing.** Mech Ageing Dev. 2005; 126(9):913-22. doi:10.1016/j.mad.2005.03.012

MAYER LP, PEARSALL NA, CHRISTIAN PJ, DEVINE PJ, PAYNE CM, MCCUSKEY MK, MARION SL, SIPES IG, HOYER PB. **Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide.** Reprod Toxicol. 2002;16(6):775-81. doi: 10.1016/s0890-6238(02)00048-5

MCELHANEY JE, EFFROS RB. **Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults?** Curr Opin Immunol. 2009; 21(4):418-24. doi:10.1016/j.coi.2009.05.023.

MCHUGH D, GIL J. **Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues.** J Cell Biol . 2018; 217(1):65-77. doi:10.1083/jcb.201708092

MEDEIROS SF DE, MAITELLI A, NINCE APB. **Efeitos da terapia hormonal na menopausa sobre o sistema imune.** Rev Bras Ginecol Obstet. 2007; 29(11):593–601. doi:10.1590/S0100-72032007001100008

MOBBS CV, GEE DM, FINCH CE. **Reproductive senescence in female C57BL/6J mice: ovarian impairments and neuroendocrine impairments that are partially reversible and delayable by ovariectomy.** Endocrinology. 1984; 115(5):1653-62. doi: 10.1210/endo-115-5-1653.

MOREIRA M DE M. **O envelhecimento da população brasileira: intensidade, feminização e dependência.** Rev. bras. estud. popul. 1998; 15(1):79-94.

MUSI N, VALENTINE JM, SICKORA KR, BAEUERLE E, THOMPSON CS, SHEN Q, ORR ME. **Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain.** Aging Cell. 2018; 17(6):e12840. doi: 10.1111/ace

MYRIANTHOPOULOS V. **The emerging field of senotherapeutic drugs.** Future Med Chem. 2018; 10(20):2369-2372. doi:10.4155/fmc-2018-0234

NAPOLEÃO A, FERNANDES L, MIRANDA C, MARUM AP. **Effects of Calorie Restriction on Health Span and Insulin Resistance: Classic Calorie Restriction Diet vs. Ketosis-Inducing Diet.** Nutrients. 2021;13(4):1302. doi:10.3390/nu13041302.

NEVES MM, MARQUES APJr. **Senescência reprodutiva feminina em mamíferos.** Rev Bras Reprod Anim. 2008; v.32, n.2, p.133-140.

NORMANDIN E, SÉNÉCHAL M, PRUD'HOMME D, RABASA-LHORET R, BROCHU M. **Effects of Caloric Restriction with or without Resistance Training in Dynapenic-Overweight and Obese Menopausal Women: A MONET Study.** J Frailty Aging. 2015; 4(3):155-162. doi:10.14283/jfa.2015.54

OLIVEIRA AS. **Transição demográfica, transição epidemiológica e envelhecimento populacional no Brasil.** Hygeia. 2019; 15(32):69-7.

OLSEN NJ, KOVACS WJ. **Gonadal steroids and immunity.** Endocr Rev. 1996; 17(4):369-84. doi: 10.1210/edrv-17-4-369.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **COVID-19 e as Pessoas Idosas.** OPAS, 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/envelhecimento-saudavel/covid-19-e-pessoas-idosas>

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Década do Envelhecimento Saudável nas Américas (2021-2030).** OPAS, 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/decada-do-envelhecimento-saudavel-nas-americas-2021-2030>

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Envelhecimento ativo: uma política de saúde.** OPAS, 2005. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/7685/envelhecimento_ativo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Guia Clínica para Atención Primaria a las Personas Mayores**. 3ª ed. Washington: OPAS, 2003.

PALMER AK, JENSEN MD. **Metabolic changes in aging humans: current evidence and therapeutic strategies**. J Clin Invest. 2022;132(16):e158451. doi:10.1172/JCI158451

PALMER AK, XU M, ZHU Y, PIRTSKHALAVA T, WEIVODA MM, HACHFELD CM, PRATA LG, VAN DIJK TH, VERKADE E, CASACLANG-VERZOSA G, JOHNSON KO, CUBRO H, DOORNEBAL EJ, OGRODNIK M, JURK D, JENSEN MD, CHINI EN, MILLER JD, MATVEYENKO A, STOUT MB, SCHAFER MJ, WHITE TA, HICKSON LJ, DEMARIA M, GAROVIC V, GRANDE J, ARRIAGA EA, KUIPERS F, VON ZGLINICKI T, LEBRASSEUR NK, CAMPISI J, TCHKONIA T, KIRKLAND JL. **Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction**. Aging Cell. 2019; 18(3):e12950. doi:10.1111/accel.12950.

PARISI, MM. **Impacto da obesidade sobre células do sistema imune: instabilidade genômica, disfunção mitocondrial, imunossenescência e ativação inflamatória**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. 2018. 145 f.

PATEL NV, GORDON MN, CONNOR KE, GOOD RA, ENGELMAN RW, MASON J, MORGAN DG, MORGAN TE, FINCH CE. **Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models**. Neurobiol Aging. 2005;26(7):995-1000. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.09.014.

PEDROSO, JAB. **Efeito da restrição calórica sobre marcadores de inflamação, homeostase glicêmica e proteínas envolvidas na sinalização da insulina de ratos destreinados**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo. 2013. 80p.

PIPER MD, BARTKE A. **Diet and aging**. Cell Metab. 2008; 8(2):99-104. doi:10.1016/j.cmet.2008.06.012.

PONNAPPAN S, PONNAPPAN U. **Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions**. Antioxid Redox Signal. 2011; 14(8):1551-85. doi:10.1089/ars.2010.3228.

PÓSA A, SZABÓ R, KUPAI K, CSONKA A, SZALAI Z, VESZELKA M, TÖRÖK S, DARUKA L, VARGA C. **Exercise training and calorie restriction influence the metabolic parameters in ovariectomized female rats**. Oxid Med Cell Longev. 2015; 2015:787063. doi:10.1155/2015/787063

PUTTABYATAPPA M, PADMANABHAN V. **Developmental Programming of Ovarian Functions and Dysfunctions**. Vitam Horm. 2018; 107:377-422. doi:10.1016/bs.vh.2018.01.017.

RAINE-FENNING NJ, BRINCAT MP, MUSCAT-BARON Y. **Skin aging and menopause : implications for treatment**. Am J Clin Dermatol. 2003; 4(6):371-8. doi:10.2165/00128071-200304060-00001

REDMAN LM, HEILBRONN LK, MARTIN CK, ALFONSO A, SMITH SR, RAVUSSIN E; PENNINGTON CALERIE TEAM. **Effect of calorie restriction with or without**

exercise on body composition and fat distribution. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92(3):865-72. doi: 10.1210/jc.2006-2184

REDMAN LM, RAVUSSIN E. **Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes.** Antioxid Redox Signal. 2011; 14(2):275-87. doi:10.1089/ars.2010.3253

REISZ JA, BARRETT AS, NEMKOV T, HANSEN KC, D'ALESSANDRO A. **When nature's robots go rogue: exploring protein homeostasis dysfunction and the implications for understanding human aging disease pathologies.** Expert Rev Proteomics. 2018; 15(4):293-309. doi:10.1080/14789450.2018.1453362

RHOADS TW, BURHANS MS, CHEN VB, HUTCHINS PD, RUSH MJP, CLARK JP, STARK JL, MCILWAIN SJ, EGHBALNIA HR, PAVELEC DM, ONG IM, DENU JM, MARKLEY JL, COON JJ, COLMAN RJ, ANDERSON RM. **Caloric Restriction Engages Hepatic RNA Processing Mechanisms in Rhesus Monkeys.** Cell Metabolism. 2018; 27(3):677-688.e5. doi:10.1016/j.cmet.2018.01.014.

RODRIGUES CM, DOMINGUES TE, DE SOUSA SC, COSTA-PEREIRA LV, MENDES BF, DOS SANTOS JM, COSTA KB, SILVA G, CANTUÁRIA VL, ROCHA-VIEIRA E, DIAS-PEIXOTO MF, HONORATO-SAMPAIO K. **Efeitos cardioprotetores de graves restrição calórica desde o nascimento em ratas adultas ovariectomizadas.** Ciência da Vida. 2021; 275:119411. doi:10.1016/j.lfs.2021.119411

ROGERS NH, PERFIELD JW 2ND, STRISSEL KJ, OBIN MS, GREENBERG AS. **Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity.** Endocrinology. 2009; 150(5):2161-2168. doi:10.1210/en.2008-1405

ROMERO, DÁLIA. **A epidemiologia do envelhecimento: novos paradigmas?** Fundação Oswaldo Cruz, 2022. Disponível em: https://saudeamanha.fiocruz.br/wp-content/uploads/2022/06/Romero_D_-Maia-L_A-epidemiologia-do-envelhecimento_novos-paradigmas_TD_90_versao_final.pdf

ROMERO-ALESHIRE MJ, DIAMOND-STANIC MK, HASTY AH, HOYER PB, BROOKS HL. **Loss of ovarian function in the VCD mouse-model of menopause leads to insulin resistance and a rapid progression into the metabolic syndrome.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009; 297(3):R587-R592. doi:10.1152/ajpregu.90762.2008

SACCON TD, NAGPAL R, YADAV H, CAVALCANTE MB, NUNES ADC, SCHNEIDER A, GESING A, HUGHES B, YOUSEFZADEH M, TCHKONIA T, KIRKLAND JL, NIEDERNHOFER LJ, ROBBINS PD, MASTERNAK MM. **Senolytic Combination of Dasatinib and Quercetin Alleviates Intestinal Senescence and Inflammation and Modulates the Gut Microbiome in Aged Mice.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2021; 76(11):1895-1905. doi:10.1093/gerona/glab002

SALMINEN A, KAARNIRANTA K. **SIRT1: regulation of longevity via autophagy.** Cell Signal. 2009; 21(9):1356-1360. doi:10.1016/j.cellsig.2009.02.014

SAPATINI LRL, CALSA B, MARIM LJ, HELAEHIL JV, CHIAROTTO GB, COREZOLA DO AMARAL ME. **Caloric restriction prevents inflammation and insulin**

dysfunction in middle-aged ovariectomized mice. Mol Biol Rep. 2023; 50(7):5675-5685. doi:10.1007/s11033-023-08508-z

SCHNEIDER A, DHAHBI JM, ATAMNA H, CLARK JP, COLMAN RJ, ANDERSON RM. **Caloric restriction impacts plasma microRNAs in rhesus monkeys.** Aging Cell. 2017; 16(5):1200-1203. doi:10.1111/accel.12636

SECOMANDI L, BORGHESAN M, VELARDE M, DEMARIA M. **The role of cellular senescence in female reproductive aging and the potential for senotherapeutic interventions.** Hum Reprod Update. 2022; 28(2):172-189. doi:10.1093/humupd/dmab038

SELBAC MT, FERNANDES CGC, MARRONE LCP, VIEIRA AG, SILVEIRA EF, MORGAN-MARTINS MI. **Mudanças comportamentais e fisiológicas determinadas pelo ciclo biológico feminino: climatério à menopausa.** Aletheia. 2018; 51(1-2): 177-190.

SELESNIEMI K, LEE HJ, TILLY JL. **Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age.** Aging Cell. 2008;7(5):622-9. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00409.x

SEPE A, TCHKONIA T, THOMOU T, ZAMBONI M, KIRKLAND JL. **Aging and regional differences in fat cell progenitors - a mini-review.** Gerontology. 2011; 57(1):66-75. doi: 10.1159/000279755

SHI LY, LUO AY, TIAN Y, LAI ZW, ZHANG JJ, WANG SX. **Protective effects of caloric restriction on ovarian function.** Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2013 Oct;48(10):745-9.

SHIMI T, BUTIN-ISRAELI V, ADAM SA, HAMANAKA RB, GOLDMAN AE, LUCAS CA, SHUMAKER DK, KOSAK ST, CHANDEL NS, GOLDMAN RD. **The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence.** Genes Dev. 2011; 25(24):2579-93. doi:10.1101/gad.179515.111

SIES H. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants.** Exp Physiol. 1997; 82(2):291-5. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024.

SONG P, AN J, ZOU MH. **Immune Clearance of Senescent Cells to Combat Aging and Chronic Diseases.** Cells. 2020; 9(3):671. doi:10.3390/cells9030671

SOUSA NF DA S, LIMA MG, CESAR CLG, BARROS MB DE A. **Envelhecimento ativo: prevalência e diferenças de gênero e idade em estudo de base populacional.** Cad Saúde Pública. 2018; 34(11):e00173317. doi:10.1590/0102-311x00173317

SPEAKMAN JR, MITCHELL SE. **Caloric restriction.** Molecular Aspects of Medicine. 2011; 32(3):159-221. doi:10.1016/j.mam.2011.07.001.

STOKAR J, GURT I, COHEN-KFIR E, YAKUBOVSKY O, HALLAK N, BENYAMINI H, LISHINSKY N, OFFIR N, TAM J, DRESNER-POLLAK R. **Hepatic adiponin is regulated by estrogen and contributes to adverse metabolic phenotypes in ovariectomized mice.** Mol Metab. 2022;60:101482. doi:10.1016/j.molmet.2022.101482

TCHKONIA T, ZHU Y, VAN DEURSEN J, CAMPISI J, KIRKLAND JL. **Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities.** J Clin Invest. 2013;123(3):966-72. doi:10.1172/JCI64098.

TE VELDE ER, SCHEFFER GJ, DORLAND M, BROEKMANS FJ, FAUSER BC. **Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging.** Mol Cell Endocrinol. 1998; 145(1-2):67-73. doi:10.1016/s0303-7207(98)00171-3

TEIXEIRA INDO, GUARIENTO ME. **Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas.** Ciênc saúde coletiva. 2010; 15(6):2845-57. doi:10.1590/S1413-81232010000600022

TITUS S, LI F, STOBESKI R, AKULA K, UNSAL E, JEONG K, DICKLER M, ROBSON M, MOY F, GOSWAMI S, OKTAY K. **Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans.** Sci Transl Med. 2013; 5(172):172ra21. doi: 10.1126/scitranslmed.3004925.

TONET AC, NÓBREGA OT. **Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas.** Rev. Bras. Geriatr. Gerontol. 2008; 11(2):259-273.

UGOCHUKWU NH, FIGGERS CL. **Caloric restriction inhibits up-regulation of inflammatory cytokines and TNF-alpha, and activates IL-10 and haptoglobin in the plasma of streptozotocin-induced diabetic rats.** J Nutr Biochem. 2007; 18(2):120-6. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.03.008

UNITED NATIONS. **World Population Ageing 2019.** Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2020. Disponível em: <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WorldPopulationAgeing2019-Report.pdf>

URYGA AK, BENNETT MR. **Ageing induced vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis.** J Physiol. 2016; 594(8):2115-24. doi:10.1113/JP270923

URZUA U, CHACON C, ESPINOZA R, MARTÍNEZ S, HERNANDEZ N. **Parity-Dependent Hemosiderin and Lipofuscin Accumulation in the Reproductively Aged Mouse Ovary.** Anal Cell Pathol (Amst). 2018; 2018:1289103. doi:10.1155/2018/1289103

VALKO M, LEIBFRTZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39:44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001

VAN HOUCKE J, BOLLAERTS I, GEERAERTS E, DAVIS B, BECKERS A, VAN HOVE I, LEMMENS K, DE GROEF L, MOONS L. **Successful optic nerve regeneration in the senescent zebrafish despite age-related decline of cell intrinsic and extrinsic response processes.** Neurobiol Aging. 2017; 60:1-10. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.013

VASCONCELLOS L DE S, SABINO KR, PETROIANU A. **Relação entre ooforectomia e peso em modelo experimental.** Rev Col Bras Cir. 2005; 32(3):132-5. doi:10.1590/S0100-69912005000300006

- VELARDE MC, MENON R. **Positive and negative effects of cellular senescence during female reproductive aging and pregnancy.** J Endocrinol. 2016; 230(2):R59-76. doi:10.1530/JOE-16-0018
- VERTHELYI D, KLINMAN DM. **Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo.** Immunology. 2000; 100(3):384-90. doi:10.1046/j.1365-2567.2000.00047.x.
- WALSH ME, SHI Y, VAN REMMEN H. **The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents.** Free Radic Biol Med. 2014; 66:88-99. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.037
- WANG AS, DREESEN O. **Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging.** Front Genet. 2018; 9:247. doi: 10.3389/fgene.2018.00247
- WANG AS, ONG PF, CHOJNOWSKI A, CLAVEL C, DREESEN O. **Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin.** Sci Rep. 2017;7(1):15678. doi:10.1038/s41598-017-15901-9
- WANG Z, MASTERNAK MM, AL-REGAIEY KA, BARTKE A. **Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice.** Endocrinology. 2007;148(6):2845-53. doi:10.1210/en.2006-1313
- WEISMILLER DG. **Menopause.** Primary Care: Clinics in Office Practice. 2009; 36(1):199-226. doi:10.1016/j.pop.2008.10.007.
- WILKOSZ P, GREGGAINS GD, TANBO TG, FEDORCSAK P. **Female reproductive decline is determined by remaining ovarian reserve and age.** PLoS One. 2014 Oct 13;9(10):e108343. doi: 10.1371/journal.pone.0108343.
- XI HQ, WU XS, WEI B, CHEN L. **Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy.** J Cell Mol Med. 2012;16(12):2894-909. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01612.x
- 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. 2012; 493(1):77-82. doi: 10.1016/j.gene.2011.11.019
- XU M, PIRTSKHALAVA T, FARR JN, WEIGAND BM, PALMER AK, WEIVODA MM, INMAN CL, OGRODNIK MB, HACHFELD CM, FRASER DG, ONKEN JL, JOHNSON KO, VERZOSA GC, LANGHI LGP, WEIGL M, GIORGADZE N, LEBRASSEUR NK, MILLER JD, JURK D, SINGH RJ, ALLISON DB, EJIMA K, HUBBARD GB, IKENO Y, CUBRO H, GAROVIC VD, HOU X, WEROHA SJ, ROBBINS PD, NIEDERNHOFER LJ, KHOSLA S, TCHKONIA T, KIRKLAND JL. **Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age.** Nat Med. 2018; 24(8):1246-1256. doi: 10.1038/s41591-018-0092-9.
- YEH JH, TUNG YT, YEH YS, CHIEN YW. **Effects of Dietary Fatty Acid Composition on Lipid Metabolism and Body Fat Accumulation in Ovariectomized Rats.** Nutrients. 2021; 13(6):2022. doi:10.3390/nu13062022
- YOUSSEFZADEH MJ, ZHU Y, MCGOWAN SJ, ANGELINI L, FUHRMANN-STROISSNIGG H, XU M, LING YY, MELOS KI, PIRTSKHALAVA T, INMAN CL, MCGUCKIAN C, WADE EA, KATO JI, GRASSI D, WENTWORTH M, BURD CE, ARRIAGA EA, LADIGES WL, TCHKONIA T, KIRKLAND JL, ROBBINS PD,

NIEDERNHOFER LJ. **Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan.** EBioMedicine. 2018; 36:18-28. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.09.015.

YU D, TOMASIEWICZ JL, YANG SE, MILLER BR, WAKAI MH, SHERMAN DS, CUMMINGS NE, BAAR EL, BRINKMAN JA, SYED FA, LAMMING DW. **Calorie-Restriction-Induced Insulin Sensitivity Is Mediated by Adipose mTORC2 and Not Required for Lifespan Extension.** Cell Rep. 2019; 29(1):236-248.e3. doi:10.1016/j.celrep.2019.08.084

ZHU Q, LI Y, MA J, MA H, LIANG X. **Potential factors result in diminished ovarian reserve: a comprehensive review.** J Ovarian Res. 2023;16(1):208. doi:10.1186/s13048-023-01296-x.

ZHU Y, TCHKONIA T, PIRTSKHALAVA T, GOWER AC, DING H, GIORGADZE N, PALMER AK, IKENO Y, HUBBARD GB, LENBURG M, O'HARA SP, LARUSSO NF, MILLER JD, ROOS CM, VERZOSA GC, LEBRASSEUR NK, WREN JD, FARR JN, KHOSLA S, STOUT MB, MCGOWAN SJ, FUHRMANN-STROISSNIGG H, GURKAR AU, ZHAO J, COLANGELO D, DORRONSORO A, LING YY, BARGHOUTHY AS, NAVARRO DC, SANO T, ROBBINS PD, NIEDERNHOFER LJ, KIRKLAND JL. **The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs.** Aging Cell. 2015; 14(4):644-58. doi: 10.1111/accel.12344

ZIMIN AV, CORNISH AS, MAUDHOO MD, GIBBS RM, ZHANG X, PANDEY S, MEEHAN DT, WIPFLER K, BOSINGER SE, JOHNSON ZP, THARP GK, MARÇAIS G, ROBERTS M, FERGUSON B, FOX HS, TREANGEN T, SALZBERG SL, YORKE JA, NORNGREN RB JR. **A new rhesus macaque assembly and annotation for next-generation sequencing analyses.** Biol Direct. 2014; 9(1):20. doi:10.1186/1745-6150-9-20.

ZUO L, PRATHER ER, STETSKIV M, GARRISON DE, MEADE JR, PEACE TI, ZHOU T. **Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases: From Molecular Mechanisms to Novel Treatments.** Int J Mol Sci. 2019; 20(18):4472. doi:10.3390/ijms20184472.

Anexos

Anexo A – Aprovação do experimento I pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEa)



PARECER Nº
PROCESSO Nº

114/2020/CEEa/REITORIA
23110.020410/2020-87

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Efeito da restrição calórica sobre a senescência celular durante a menopausa em camundongos”**, registrada com o nº 23110.020410/2020-87, 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 **11 de setembro de 2020**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	01/10/2020 a 30/06/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /C57BL6
Nº de animais	48
Idade	21 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEEA 20410-2020

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**, **Médico Veterinário**, em 17/09/2020, às 09:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1053971** e o código CRC **9FC8F107**.

Referência: Processo nº 23110.020410/2020-87

SEI nº 1053971

Anexo B – Aprovação do experimento II pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEAA)

SEI/UFPeI - 1415097 - Parecer

8/31/21, 14:26



PARECER Nº **85/2021/CEUA/REITORIA**
PROCESSO Nº **23110.018232/2021-13**

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do efeito de senolíticos sobre a senescência celular em camundongos durante a menopausa**”, registrada com o nº 23110.018232/2021-13, sob a responsabilidade de **Augusto Schneider** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião de 26 de agosto de 2021.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início = 01/10/2021 Término = 31/12/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / C57BL/6
Nº de animais	78
Idade	60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEUA 018232/2021-13

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON, Professor do Magistério Superior/Adjunto**, em 30/08/2021, às 19:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1415097** e o código CRC **89247823**.

Referência: Processo nº 23110.018232/2021-13

SEI nº 1415097

Anexo C – Comprovante de submissão do manuscrito “Effect of senolytic drugs on chemically induced estropause in young female mice”.

ScholarOne Manuscripts

29/11/23, 09:45

ScholarOne Manuscripts™
Augusto Schneider
Switch to a different account
Instructions & Forms
Help


Archives of Endocrinology and Metabolism

Home
Author
Review

Author Dashboard / Submission Confirmation

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to Archives of Endocrinology and Metabolism

Manuscript ID AEM-2023-0478

Title Effect of senolytic drugs on chemically induced estropause in young female mice

Authors Ávila, Bianca
Schneider, Augusto

Date Submitted 29-Nov-2023

Author D.



© Clarivate | © ScholarOne, Inc., 2023. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

🐦 @Clarivate for Academia & Government | ⚙️ System Requirements | 🔍 Privacy Statement | 📄 Terms of Use | ⚙️ Manage cookie preferences