

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS

Dissertação



**RESTRIÇÃO ALIMENTAR DURANTE A GESTAÇÃO EM
CAMUNDONGOS, EFEITOS SOBRE O METABOLISMO E
ENVELHECIMENTO OVARIANO NA PROLE**

BIANKA MACHADO ZANINI

Pelotas, 2019

BIANKA MACHADO ZANINI

**RESTRIÇÃO ALIMENTAR DURANTE A GESTAÇÃO EM
CAMUNDONGOS, EFEITOS SOBRE O METABOLISMO E
ENVELHECIMENTO OVARIANO NA PROLE**

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

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schneider

Pelotas 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

Z31r Zanini, Bianka Machado

Restrição alimentar durante a gestação em camundongos, efeitos sobre o metabolismo e envelhecimento ovariano na prole / Bianka Machado Zanini ; Augusto Schneider, orientador. — Pelotas, 2019.

57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Gestação. 2. Restrição calórica. 3. Reserva ovariana. 4. Envelhecimento. I. Schneider, Augusto, orient. II. Título.

CDD : 641.1

Bianka Machado Zanini

**RESTRIÇÃO ALIMENTAR DURANTE A GESTAÇÃO EM
CAMUNDONGOS, EFEITOS SOBRE O METABOLISMO E
ENVELHECIMENTO OVARIANO NA PROLE**

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

Data da Defesa: 09/08/2019

Banca examinadora:

.....
Prof. Augusto Schneider (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel

Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dr. Joao Rincón

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dra. Carolina Jacometo

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Lista de Figuras

Figura 1	Monitoramento do peso corporal durante a gestação, no puerpério e no dia do desmame de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle.....	31
Figura 2	Número de filhotes por ninhada em camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle.....	32
Figura 3	Massa corporal da prole feminina, aferido no dia dos desmame (21 dias) de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle.....	32
Figura 4	Acompanhamento de peso corporal durante 10 semanas da prole, de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle.....	33
Figura 5	Teste de tolerância à glicose realizado em fêmeas prole de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle.....	33
Figura 6	Peso do tecido adiposo abdominal em fêmeas prole de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle.....	34
Figura 7	Número de folículos ovarianos primordiais, em transição, primários, secundários, terciários e totais de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle. Diferentes letras indicam diferenças significativa ($p < 0.05$)	35
Figura 8	Expressão gênica de AMH, GDF9, BMP15, KIT, KITL, MTOR no tecido ovariano da prole feminina de camundongos submetidos a restrição alimentar e controle com 90 dias.....	37
Figura 9	Expressão gênica de PI3K, AKT1, FOXO3a, SOD, CAT, SIRT1 no tecido ovariano da prole feminina de camundongos submetidos a restrição alimentar e controle com 90 dias. *Indicam diferenças significativas ($p < 0.05$)	38

Figura10 Imunofluorescência de H2AX em oócitos de folículos ovarianos primordiais e primários de camundongos submetidos a restrição alimentar e controle. *Indicam diferenças significativas ($p < 0.05$).....39

Figura11 Imunofluorescência de CD68 em oócitos de folículos ovarianos primordiais e primários de camundongos submetidos a restrição alimentar e controle.....40

Lista de Tabelas

Tabela 1	Diferenças da restrição calórica durante a gestação, lactação e no indivíduo adulto.....	16
Tabela 2	Sequência de primers utilizados na RTq-PCR.....	30
Tabela 3	Diâmetros de núcleo, oócito, total e células da granulosa de folículos primordiais, em transição e primários de animais controle e submetidos a restrição alimentar	37

Lista de abreviaturas

Akt: Proteína kinase B

AMH: hormônio antimulleriano

B2m: microglobulina beta 2

BMP15: proteína morfogenética óssea

CAT: Catalase

cDNA: ácido deoxiribonucleico complementar

CD68: cluster de diferenciação 68

DNA: ácido deoxiribonucleico

df/df: ames dwarf

FIGLA: fator na linha germinal alfa

FOXO3a: forkhead Box O 3^a

f: gramas

GC: grupo controle

GDF9: fator de diferenciação de crescimento

GRA: grupo restrição alimentar

GH: hormônio do crescimento

H2A.X: anti-gamma H2A.X

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina

ITT: teste de tolerância à insulina

KIT: tirosina quinase do receptor proto-oncogenese

KITL: tirosina quinase do receptor proto-oncogenese ligante

LH:hormônio luteinizante

mTOR: proteína alvo da rapamicina

mRNA: RNA mensageiro

NOBOX: homeobox

PCR: reação em cadeia da polimerase

Pi3k: fosfoinositideo 3-quinase

Pten: homologia de fosfatase e tensina

PVC: policloreto de vinila

RA: restrição alimentar

RC: restrição calórica

RNA: ácido ribonucleico

SIRT1: sirtuína tipo 1

SOD2: superóxido dismutase

UFPEL: Universidade Federal de Pelotas

U/kg: unidade por quilo de peso

Agradecimentos

Agradeço minha família, Luis Eduardo Zanini e Fátima Machado, minha irmã Nathalia Zanini, por todo apoio e compreensão quando não pude me fazer presente, sem eles nada disso seria possível. Sempre incentivaram meus estudos, pois está é a herança mais preciosa que alguém pode deixar e jamais será perdida.

Ao meu namorado, Pedro Mesquita, que esteve comigo desde o início de tudo me dando apoio. Agradeço pela paciência e compreensão, por sempre acreditar em mim e estar na torcida para que tudo desse certo.

Ao meu orientador, Augusto Schneider, no qual tenho grande admiração. Agradeço por me ajudar em tudo e por me passar um pouco do seu conhecimento, sempre foi paciente e muito prestativo com minhas dúvidas, tornou-se um grande exemplo profissional para mim.

Às minhas amigas e colegas de mestrado, Alice Guimarães, Rebeca Belmonte, Pâmela Alves, Caroline Neves e Andressa Cardozo, que compartilharam as emoções destes dois anos e tornaram tudo mais leve e agradável.

Às amigas do grupo de estudos, Driele Neske e Jorgea Pradiee, que não mediram esforços para me ajudar em todas as etapas e me incentivaram sempre.

Ao Laboratório de Histologia do Instituto de Biologia- UFPel – por terem cedido espaço para realização do meu trabalho, principalmente aos técnicos Eliane, Luis Augusto e Luis Otávio e ao Professor Rafael Mondadori que sempre foram prestativos me dando apoio quando precisei e alegrando minhas manhãs.

Agradeço, a Renata Ramirez técnica do laboratório de nutrição experimental, por toda ajuda ao longo do meu experimento, sempre muito querida e dedicada.

Agradeço a Faculdade de Nutrição, ao Programa de Pós- Graduação em Nutrição e Alimentos e principalmente a CAPES pelo fomento e oportunidade.

Obrigada!

Resumo

ZANINI, Bianka Machado. Restrição alimentar durante a gestação em camundongos, efeitos sobre o metabolismo e envelhecimento ovariano na prole. 2019. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da restrição alimentar durante a gestação em camundongos sobre o metabolismo e preservação dos folículos primordiais e envelhecimento ovariano na prole. Foram utilizados 14 camundongos fêmeas e 7 camundongos machos da linhagem C57BL/6. Os animais acasalaram na proporção de um macho para duas fêmeas no mesmo período em gaiolas separadas. Dez dias após a confirmação da cópula as fêmeas foram divididas em grupo controle (n=7) e grupo restrição alimentar (RA) (n=7), que recebeu uma dieta composta por 50% do que foi consumido pelo grupo controle no dia anterior. As prenhas foram submetidas a esta dieta restrita durante 10 dias. Após o parto e o desmame (21 dias de idade), a prole foi separada de acordo com o grupo inicial e receberam dieta *al libitum* até os 3 meses de idade, onde foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT). O peso dos camundongos foi avaliado a cada 7 dias, desde o desmame até a eutanásia, quando os ovários e tecido adiposo foram coletados. O ganho de peso das fêmeas foi aumentado no grupo RA após o desmame ($p<0.0001$). Este resultado indica que o período em que o feto está se desenvolvendo no útero é crucial para definir a regulação das vias de sinalização que controlam o metabolismo e crescimento durante a idade adulta. Não foi verificada diferença no ITT comparado entre os grupos ($p=0.85$). Observamos menos folículos primordiais (2740 ± 231 vs 1064 ± 128), em transição (2914 ± 2010 vs 1024 ± 131) ($p<0.0001$) e totais ($p<0.0001$) em prole de camundongos submetidos a RA durante a gestação do que nos camundongos controle, respectivamente. Folículos primários, secundários e terciários não diferiram entre os grupos ($p>0.05$). Com relação ao peso do tecido adiposo também não foi observado diferença entre os grupos ($p=0.26$). O grupo RA apresentou menor dano no DNA em oócito de folículos primordiais ($p=0.0002$), células da granulosa destes ($p=0.0003$) e oócito primários ($p<0.0001$). A infiltração de macrófagos não diferiu entre grupos ($p=0.22$). Portanto, a RA durante a gestação afetou negativamente ganho de peso e o tamanho da reserva ovariana da prole em camundongos.

Palavras-Chave: gestação. restrição calórica. reserva ovariana. envelhecimento

Abstract

ZANINI, Bianka Machado. Feed restriction during gestation in mice, effects on ovarian metabolism and aging in offspring. 2019. Dissertation (Master Degree in Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The aim of this study was to evaluate the effect of dietary restriction during gestation in mice on the metabolism and preservation of primordial follicles and ovarian aging in offspring. Fourteen female and seven male C57BL / 6 mice were used. The animals mated at the ratio of one male to two females in the same period in separate cages. Ten days after mating confirmation, females were divided into control group (n = 7) and food restriction group (RA) (n = 7), which received a diet consisting of 50% of what was consumed by the control group the day before. . The pregnant women were subjected to this restricted diet for 10 days. After childbirth and weaning (21 days old), the offspring were separated according to the initial group and received ad libitum diet until 3 months of age, where the insulin tolerance test (ITT) was performed. The weight of mice was evaluated every 7 days, from weaning to euthanasia, when the ovaries and adipose tissue were collected. Female weight gain was increased in the RA group after weaning ($p < 0.0001$). This result indicates that the period in which the fetus is developing in the womb is crucial in defining the regulation of signaling pathways that control metabolism and growth during adulthood. There was no difference in ITT compared between groups ($p = 0.85$). We observed fewer primordial (2740 ± 231 vs 1064 ± 128), transitional (2914 ± 2010 vs 1024 ± 131) follicles ($p < 0.0001$) and total ($p < 0.0001$) follicles in gestational mice than in control mice. respectively. Primary, secondary and tertiary follicles did not differ between groups ($p > 0.05$). Regarding the weight of adipose tissue, no difference was observed between the groups ($p = 0.26$). The RA group showed lower DNA damage in primordial follicle oocyte ($p = 0.0002$), granulosa cells ($p = 0.0003$) and primary oocyte ($p < 0.0001$). Macrophage infiltration did not differ between groups ($p = 0.22$). Therefore, AR during pregnancy negatively affected weight gain and the size of offspring ovarian reserve in mice.

Keywords: gestation. caloric restriction. ovarian reserve. aging

Sumário

1. Revisão de Literatura	15
2.Introdução.....	22
3.Objetivos.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivo Específico.....	24
4. Hipóteses.....	24
5. Metodologia.....	25
5.1. Manejo dos Animais.....	25
5.2. Teste de Tolerância à Insulina.....	26
5.3. Contagem de Folículos.....	27
5.4. Imunofluorescência.....	27
5.5. Análise de Expressão Gênica.....	28
5.6. Análise Estatística.....	30
6. Resultados.....	31
6.1. Fenótipo Materno.....	31
6.2. Fenótipo da Prole.....	33
7. Discussão.....	42
8. Conclusão.....	48
Referências.....	49

1. Revisão de Literatura

O desenvolvimento e crescimento fetal são influenciados por fatores maternos e genética. Mesmo que a genética tenha efeito determinante no crescimento do feto, o fator ambiental materno tem grande influência, sendo um dos mais determinantes no crescimento e desenvolvimento do embrião antes e após o nascimento (BOLTON; BILBO, 2014). Desta forma, mudanças no estado nutricional resultam em processos que preparam o indivíduo para condições particulares antecipadas no ambiente pós-natal (GLUCKMAN; BEEDLE, 2007). Pesquisadores têm debatido sobre a relação entre o meio intrauterino desfavorável e o desenvolvimento de doenças na vida adulta. Este processo é denominado “programação fetal”, sendo estimulado no útero e estabelecendo uma resposta permanente no feto, conduzindo a um aumento da susceptibilidade a doenças na vida adulta (BARKER; OSMOND, 1986; SILVEIRA, 2010). Além disso, o ambiente durante os períodos iniciais de vida do recém-nascido, pode também “programar” funções e efeitos da má nutrição não apenas na saúde dessa criança e em sua vida adulta, mas também na de sua prole (KOLETZKO *et al.*, 2011).

As células durante algum dano primário, tentam se adaptar, modificar para tentar sobreviver no ambiente mais hostil. Para estudar estas condições alguns modelos foram propostos, como por exemplo a restrição de nutrientes, que engloba restrições energética, protéica, de aminoácidos e calórica, entre outras. A restrição alimentar (RA) é uma redução da ingestão alimentar abaixo do *ad libitum*, ou seja, é um regime alimentar em que o organismo é submetido à diminuição da ingestão de alimentos sem que haja desnutrição. É uma intervenção que tem sido praticada como um método para aumentar a longevidade e a qualidade de vida em diferentes espécies, que vão desde leveduras até roedores (SPEAKMAN; MITCHELL, 2011). Muitas características fenotípicas de animais sujeitos a restrição alimentar são compartilhadas por outros modelos com a repressão da atividade do eixo do hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I) (COSCHIGANO, *et al.*, 2003). Entre estas características, podemos citar: redução do peso corporal, redução do GH e IGF-I, diminuição dos níveis plasmáticos de insulina e glicose, redução da fertilidade e puberdade atrasada

(MATTISON, *et al.*, 2000). Com base nestas semelhanças, é possível que a RA e deficiências do eixo GH/IGF-I possam atuar no aumento da longevidade por meio de processos semelhantes (HOLZENBERGER, 2004). Estudos em modelos animais têm demonstrado que a RA diminui ou previne a progressão de doenças relacionadas ao envelhecimento, dentre elas: diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e alguns tipos de câncer (LEVENSON; RICH, 2007). A RA pode ser realizada de duas formas distintas, a curto ou a longo prazo (CERQUEIRA; KOWALTOWSKI, 2010; LI, L *et al.*, 2013). Mattson (2010) utilizou um termo chamado *hormese* para definir RA, podendo ser configurada por respostas bifásicas, assim, em porcentagens baixas é benéfica para células e organismos, porém, em porcentagens elevadas, é inibitória e prejudicial. A maioria dos experimentos científicos apresentam a faixa de RA correspondente a 20-40% da ingestão calórica total diária do grupo controle (dieta *ad libitum*), portanto, o consumo do grupo restrição alimentar é na faixa de 80-60% do grupo controle (CERQUEIRA; KOWALTOWSKI, 2010). Em diferentes fases da vida os efeitos acarretados no metabolismo, quando submetido à restrição calórica (RC), estão sintetizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Diferenças da restrição calórica durante a gestação, lactação e no indivíduo adulto

	RC Gestação	RC Lactação	RC Adulto
Persistência do Efeito	✓	✓	X
Peso Adulto	↑	↓	↓
Obesidade	↑	↓	↓
Res. Insulina	↑	↓	↓

RC- Restrição Calórica; Res. Insulina- Resistência insulina; ✓ - sim; X- não; ↑ - aumenta; ↓ - diminui.
Barker, 2005; [Saccon](#), et al. 2016; Schneider, et al. 2014

A desnutrição materna promove retardo no crescimento fetal e baixo peso ao nascer. Bebês de gestantes que sofreram privação calórica nos dois primeiros

trimestres gestacionais têm maior prevalência de obesidade na fase adulta, portanto, a restrição de alimentos nesse período gestacional leva a uma adaptação no organismo do feto, determinando a predisposição à obesidade futura (BARKER, 2005; SILVEIRA, 2010). Os estudos da fome holandesa são particularmente esclarecedores para avaliar o estresse no útero. Durante os quatro meses de duração da fome as calorias diárias era de 400 a 800 kcal/dia (ROSEBOON *et al.*, 2006). Fetos desnutridos durante a gestação precoce tinham um perfil lipídico aterogênico, aumento do risco de doença coronariana na idade adulta e um declínio da função cognitiva (ROOIJ *et al.*, 2010; ROSEBOON *et al.*, 2006). Finalmente, a tolerância à glicose foi alterada em todos os fetos expostos à fome, mas ficou particularmente evidente após a desnutrição no final da gestação (RAVELLI *et al.* 1999; ROSEBOON *et al.*, 2006).

Em modelos animais, diversos estudos relataram que a desnutrição proteico-calórica durante a gravidez de ratas adultas origina retardo no desenvolvimento fetal, e leva à obesidade e à hiperleptinemia em ratos adultos. Este fato pode ser representado pelo grande número de recém-nascidos de baixo peso, além do aumento nas taxas de natimortos e de mortalidade perinatal (CALDWELL; CHURCHILL, 1967; GONG, 2016; MULAY *et al.*, 1982; PAUL *et al.*, 1979). Este tipo de desnutrição na rata adulta determina, de acordo com alguns autores, redução no tamanho da ninhada, porém, segundo outros, o número de filhotes por ninhada não se altera (CHOW; RIDER, 1973). Outro ponto importante é o conceito de efeitos sexualmente dimórficos após o estresse *in útero* (SYMONDS *et al.*, 2007). Mulheres com peso abaixo da média ao nascer e maior peso em 1 ano apresentam a maior incidência de taxas de morte cardiovascular, esse padrão não estava presente nos homens (OSMOND *et al.*, 1993), apenas ratos machos adultos apresentaram alterações nos triglicerídeos e expressão de enzimas hepáticas de ácidos graxos (LANE *et al.*, 2001). Esses efeitos sexualmente dimórficos são causados por vários mecanismos que não estão claramente compreendidos. Além das diferenças nos esteroides sexuais, esses efeitos podem refletir variações na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, respostas diferentes ao estresse oxidativo e a taxa de crescimento pós-natal mais rápida de camundongos machos comparados com fêmeas (SYMONDS, 2007).

Assim, pode-se entender que a quantidade de alimentos ingeridos pela mãe é capaz de influenciar o desenvolvimento embrionário, levando a menor sobrevivência da prole, porém aqueles que sobrevivem têm maior risco de desenvolver obesidade quando adultos (BILBO, 2014; WARE *et al.*, 2015). Embora os estudos realizados com animais forneçam múltiplos mecanismos biologicamente plausíveis para a programação fetal, muitas questões permanecem sem esclarecimento.

Há indícios de que a maturação reprodutiva também é influenciada pelos eventos iniciais da vida (SLOBODA *et al.*, 2007; PARENT *et al.*, 2003). BARNES (2008) revela que a exposição precoce a restrição de nutrientes, ainda dentro do útero da mãe, modifica os níveis de mRNAs de genes circadianos nos ovários das filhas quando adultas. Outros autores também demonstraram que a desnutrição materna pode ser prejudicial ao desenvolvimento normal dos ovários, levando ao envelhecimento precoce destes com redução da reserva ovariana na prole (BERNAL 2010; CHAN *et al.*, 2018; RICHARDSON, 1987). O termo “reserva ovariana” faz referência ao potencial funcional do ovário e reflete o número e qualidade dos oócitos (RICHARDSON *et al.*, 2014). A reserva ovariana é constituída por folículos primordiais, que são folículos em estado quiescente ou dormentes, juntamente com folículos já recrutados, que estão nas fases de desenvolvimento pré-antrais (primários e secundários) e antrais pequenos (terciários) (ZOU *et al.*, 2009). Na maioria dos mamíferos a reserva de folículos primordiais é estabelecida durante o desenvolvimento fetal, no caso dos roedores é logo após o nascimento. As células germinativas não podem se proliferar, portanto a reserva de folículos primordiais é finita e constitui a totalidade de oócitos disponíveis para uma fêmea durante sua vida reprodutiva. Assim, o tempo de vida reprodutiva de uma fêmea depende do tamanho inicial da reserva de folículos ovarianos e a taxa de esgotamento presente no ovário (FORTUNE *et al.*, 2013). Um declínio progressivo e esgotamento da reserva de folículos ovarianos contendo ovócitos é o principal determinante da idade ao início da menopausa (BUCKLER, 2005). Concomitante com o número reduzido de folículos, a qualidade dos ovócitos restantes nas fêmeas geralmente diminui com o avançar da idade, levando a taxas extremamente pobres de sucesso nas tentativas de fertilidade natural e assistida (NAVOT, *et al.*, 1991). Portanto,

infere-se que alterações no ambiente materno podem afetar a fertilidade da prole quando adulta.

XIANG *et al.* (2012) compararam os efeitos da RC em animais adultos na preservação ovariana e observou que camundongos submetidos à RC tiveram aumento de 47% no número de folículos primordiais em associação aqueles resignados a uma dieta controle, salientando mais uma vez que atenuações de alterações referentes a via GH/IGF-I causadas pela RC podem estender a atividade ovariana. No entanto, quando a restrição é aplicada em fêmeas gestantes efeitos negativos são observados sobre a prole. Autores relatam que os descendentes nascidos de mães desnutridas reduziram o número de folículos ovarianos e aumentaram o estresse oxidativo do ovário quando adultos (BERNAL *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2018). Outros, ainda demonstram efeitos negativos da desnutrição materna durante a lactação sobre a foliculogênese em ratos (FARIA, 2008) e em ovinos (LEA, 2006). A gravidez é uma janela crítica do desenvolvimento da reserva ovariana, onde filhos de mães subnutridas durante a gestação, lactação ou gestação isolada, mas não durante a lactação isolada, manifestaram diminuição de fatores de crescimento foliculares ovarianos e aumento dos níveis de estresse oxidativo (SLOBODA, 2009). Assim, pouquíssimos registros de quantificação folicular ovariana em animais descendentes de mães sob restrição alimentar foram encontrados na literatura e nos indicam a necessidade de melhor entender este importante processo.

A restrição de nutrientes durante a gravidez e lactação prejudica o crescimento e desenvolvimento geral do feto. Alguns protocolos de RC foram estudados, variando de: leve redução (15%) (OZAKI *et al.*, 2001), redução moderada (50%) (OZAKI *et al.*, 2000) e redução severa (70%) (VICKERS *et al.*, 2001; WOODALL *et al.*, 1996). Um trabalho em roedores demonstrou que a restrição de nutrientes durante a gestação resulta em baixo peso ao nascer na prole, puberdade precoce e quando adultos, têm estresse oxidativo ovariano aumentado e uma perda prematura de folículos em comparação com a prole controle (BERNAL *et al.*, 2010). Filhas nascidas de mães que sofreram restrição de nutrientes durante apenas a segunda metade da gestação interromperam ciclos estrais (KHORRAM *et al.*, 2015), e comparativamente a restrição protéica durante a gravidez também mostrou reduzir o número de folículos na prole e

diminuiu a expectativa de vida reprodutiva (GUZMÁN *et al.*, 2014, 2006). Apesar desses avanços, não se sabe a que ponto a perda de folículos da vida pós-natal começa, ou quais vias contribuem para este fenótipo ovariano distinto.

No ovário em desenvolvimento, após a cessação das divisões mitóticas, as células germinativas entram em meiose no 13,5 dia em camundongos (PEPLING, 2012; TINGEN *et al.*, 2009) e em 11-12 semanas de gestação em humanos (COHEN; HOLLOWAY, 2010; GONDOS *et al.*, 1986; MOTTA *et al.*, 1997), tornando-se oócitos. Perto do nascimento em camundongos (PEPLING; SPRADLING, 2001), e em torno de 16 semanas de gestação em humanos (MOTTA *et al.*, 1997), os cistos de células germinativas sofrem “quebra”, assim a maioria dos oócitos são perdidos pela morte celular apoptótica (BERGERON *et al.*, 1998; MORITA *et al.*, 2001; PEPLING, 2012). O excesso de produção e o abatimento das células germinativas poderiam representar um meio de “seleção de células germinativas”, no qual apenas oócitos de qualidade podem se desenvolver (MORK *et al.*, 2012). A regulação da expressão gênica é um aspecto crucial para o desenvolvimento, incluindo o de folículos primordiais. Fatores de transcrição desempenham papéis cruciais, como por exemplo o fator na linha germinal alfa (*FIGLA*), ele é responsável por coordenar a expressão de genes da zona pelúcida específicos de oócitos (LIANG *et al.*, 1997), ou seja, é essencial para a formação de folículos primordiais em camundongos. *FIGLA* também foi identificado no genoma humano (HUNTRIS *et al.*, 2002) e expresso nos folículos primordiais. Além disso, maior expressão de *FIGLA* foi correlacionada com o desenvolvimento folicular primordial (BAYNE *et al.*, 2004), e a perda dele associada com insuficiência ovariana prematura em mulheres (TOSH *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2008). Outro gene que também está relacionado com o desenvolvimento de folículos primordiais é o homeobox (*NOBOX*), trabalhos descobriram que o *NOBOX* é essencial não somente para a sobrevivência do oócito, mas também para a montagem do folículo primordial em camundongos (RAUKOVIC *et al.*, 2004). Nos últimos tempos, pesquisas encontraram correlações significativas entre o *NOBOX* e a insuficiência ovariana prematura em mulheres (BOUILLY *et al.*, 2015, 2011; QIN *et al.*, 2007). Enfatizando assim o importante papel destes e de outros fatores de transcrição no crescimento ovariano.

Existe algum mecanismo que está estimulando os folículos a começaram a crescer, o que está envolvido nesse sistema ainda não é bem esclarecido na literatura. Acredita-se que vários fatores locais estejam envolvidos nesse processo de ativação dos folículos (MCGEE; HSUEH, 2000). Uma delas é a via de sinalização fator de diferenciação de crescimento (*GDF9*) e proteína morfogenética óssea (*BMP15*), são fatores parácrinos produzidos pelas células ovarianas que estimulam outra via de crescimento celular que é fosfoinositídeo 3-quinase (*Pi3k*)/proteína quinase B (*Akt1*) um importante regulador da proliferação e sobrevivência celular, que tem sido implicado na ativação de folículos primordiais (BROWN, 2010; REDDY *et al.*, 2008). Ambas, culminam para ativação da via do fator de transição Forkhead Box 03a (*FOXO3a*), para a iniciação do crescimento dos folículos primordiais da reserva ovariana, é essencial (BROWN, *et al.*, 2010). Hiperfosforilação de *FOXO3a* resulta na sua exportação nuclear, culminando com a ativação global de folículos primordiais e falência ovariana prematura (KALICH-PHILOSOPH, *et al.*, 2013). A ativação da via *FOXO* é promovida pela insulina e *IGF-I*, e a redução da sinalização desta via parece estar envolvida na longevidade prolongada observada em camundongos Ames Dwarf (*df/df*) deficientes em GH (MURAKAMI, 2006). Assim, acredita-se que o eixo GH/*IGF-I* funcional é importante para a eficiência máxima reprodutiva (CHANDRASHEKAR, *et al.*, 2004). Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram menor ativação de *FOXO3a* e maior reserva de folículos primordiais em camundongos *df/df* deficientes em GH (SACCON, *et al.*, 2017). Além disso, camundongos sobre expressando o GH apresentam maior ativação de *FOXO3a* e menor reserva de folículos primordiais (SACCON, *et al.*, 2017). Isto demonstra que alterações em níveis de fatores de crescimento podem afetar a ativação da reserva ovariana e prolongar a vida reprodutiva da fêmea. Portanto, a *FOXO3a* que está dentro do núcleo da célula é ativada na presença de energia, saindo do núcleo e estimulando uma série de respostas celulares, sendo o fator de crescimento uma delas. Resultando assim em crescimento e multiplicação celular. Porém, passando por um período de restrição, considerando um ambiente mais hostil, a célula sem energia entra em estado de hibernação e conseqüentemente para de se reproduzir, tornando a *FOXO3a* inativa.

2. Introdução

Não é completamente compreendido como a reserva ovariana folicular é depletada em mulheres inférteis. Sabe-se que um estímulo ou agressão que ocorra num período suscetível, resulta em consequências em longo prazo para as funções fisiológicas (GLUCKMAN, 2008; GODFREY *et al.*, 2010). Ou seja, quando os ambientes intrauterino e pós-natal diferem acentuadamente, essas modificações podem se mostrar inadequadas na vida adulta. Os oócitos no ovário fetal em crescimento são vulneráveis a eventos pré-natais, onde o crescimento fetal e o baixo peso ao nascer estão associados ao início puberal precoce, disfunção ovariana, resultados insatisfatórios de gravidez e menopausa precoce (GARDNER; OZANNE; SINCLAIR, 2009; SLOBODA *et al.*, 2009). Evidências de que a função e maturação reprodutiva são influenciadas por eventos iniciais da vida e os ambientes nutricionais pré e pós-natais também interagem para influenciar a função reprodutiva da prole, estão surgindo na literatura (GLUCKMAN *et al.*, 2008; SLOBODA, 2007, 2009).

A atividade ovariana é extremamente sensível ao estado nutricional (BERNAL *et al.*, 2010; SLOBODA *et al.*, 2007). Estudos experimentais demonstraram que um declínio na reserva ovariana folicular, mudanças nas taxas de ovulação e idade alterada no início da menarca são vulneráveis a influências precoces (CHAN 2017; GUZMAN *et al.* 2006). Sloboda (2009) mostrou que os déficits e excessos nutricionais durante os períodos intrauterino, lactacional e pós-desmame resultaram na aceleração do início puberal e subsequentes mudanças na função ovariana. Porém, os mecanismos subjacentes a essas mudanças, não estão claros.

Estudos mostram que a redução na disponibilidade de alimento, como a restrição alimentar (RA), tem sido praticada como um método para aumentar a longevidade e a qualidade de vida (SPEAKMAN; MITCHELL, 2011). Durante a vida adulta a RA aumenta a duração do período fértil em camundongos, visto que inibe a transição de folículos primordiais para primários, resultando assim no adiamento do esgotamento folicular. Além disso, estudos em modelos animais têm demonstrado que a RA diminui ou previne a progressão de doenças relacionadas ao envelhecimento (LEVENSON; RICH, 2007). Em contrapartida, RA durante a gestação mostrou efeitos prejudiciais, induzindo uma alteração na

sensibilidade à leptina, diminuindo a sensação de saciedade, o que contribui para o desenvolvimento da obesidade e com o envelhecimento (GRIVE; FREIMAN, 2015; KIESS *et al.*, 1998). Desta forma, não existem dados claros dessas associações durante a gestação e seus efeitos sobre a prole.

São raros os trabalhos que analisam a inter-relação entre desnutrição, gestação e seus efeitos de longo prazo na prole. Levando em conta a importância do problema, procuramos através deste estudo elucidar os efeitos destas condições sobre o binômio mãe/feto. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da restrição alimentar em camundongos na gestação sobre a regulação do metabolismo e envelhecimento ovariano da prole. Descrever a associação com: ganho de peso, perfil glicídico, tolerância insulínica, reserva ovariana, imunofluorescência e expressão gênica nos ovários.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do estudo foi investigar os efeitos da restrição alimentar durante a gestação em camundongos, sobre a regulação do metabolismo e envelhecimento ovariano da prole.

3.2 Objetivos específicos

Descrever a associação entre a restrição alimentar durante a gestação e efeitos na prole com:

- Ganho de peso nas fêmeas
- Perfil glicídico em fêmeas
- Tolerância insulínica
- Reserva ovariana
- Expressão gênica nos ovários

4. Hipóteses

A prole de camundongos submetidos a restrição alimentar durante a gestação apresentará sobrepeso/obesidade, intolerância à glicose e as fêmeas diminuição do número de folículos primordiais e, consequentemente, longevidade ovariana reduzida.

5. Metodologia

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), sendo aprovado sob o número 8367-2018. Inicialmente foram utilizados 14 camundongos fêmeas e 7 camundongos machos da linhagem C57BL/6 com aproximadamente 30 dias de vida, mantidos sob condições controladas de temperatura e luz ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclos 12 horas claro/12 horas escuro) e com dieta padrão e água *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da UFPeI e mantidos no Laboratório Experimental da Faculdade de Nutrição da UFPeI. Os camundongos foram mantidos em caixas com as seguintes características: medidas 65x25x15 cm, feitas de polipropileno com tampa em arame galvanizado, com bebedouro em polipropileno com capacidade de 700 ml, rolha cônica de borracha e bico de aço inoxidável. O assoalho foi coberto por maravalha. Os animais foram alojados em grupos de 2 fêmeas e 3 machos por gaiola com presença de tubo PVC.

5.1 Manejo dos animais

Os animais foram acasalados na proporção de um macho para duas fêmeas no mesmo intervalo de tempo em gaiolas separadas. A discriminação da gravidez foi de acordo com o ganho de peso, presença de plugues vaginais ou através de esfregaço contendo espermatozoides. Para a visualização de espermatozoides presentes no epitélio vaginal o dia do estro foi considerado dia zero. Diariamente, foi colhido material celular vaginal, com auxílio de uma micropipeta, inserindo a ponteira esterilizada com solução salina. O material colhido foi depositado em lâmina de vidro, previamente limpa e desengordurada, procedendo-se posteriormente à fixação do material e coloração celular por panótico rápido. O processo iniciou-se com a imersão das lâminas na solução nº1 (triarilmetano a 0,1%), mantendo-se um movimento contínuo para cima e para baixo por 5-10s (5-10 imersões por 1s cada). Em seguida, as extensões foram imersas na solução nº2 (xanteno a 0,1%), repetindo o mesmo procedimento. Após escorrer, as lâminas foram imersas na solução nº3 (tiazina a 0,1%), repetindo-se o mesmo procedimento. As lâminas foram enxaguadas com água destilada e deixadas ao ar livre para secagem. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico. Fêmeas sem plugues de cópula ou sem identificação de espermatozoides na lâmina, foram devolvidos à colônia de

reprodução após serem pesadas. Desta maneira, constituíram um grupo controle (n=7) e grupo restrição (n=7), para o qual foi fornecida uma dieta de 50% de restrição do consumido pelo grupo controle até o momento do parto (CHAN *et al.*, 2018). Os dados de consumo da ração dos dois grupos foram coletados todos os dias durante os 20 dias de gestação, sendo que a partir do décimo dia foi reposta a quantidade de ração calculada para um dia para o grupo da restrição. Após o parto todas as fêmeas receberam dieta *ad libitum*. Após o desmame (21 dias de vida) a prole foi separada, de acordo com o grupo inicial (controles e restrição) uma fêmea por caixa e receberam dieta normal *ad libitum* até os 3 meses de vida. Os dados de peso corporal da prole foram coletados a cada 7 dias do desmame até a eutanásia.

Os animais foram eutanasiados após jejum de 4 horas, anestesiados por via inalatória com isoflurano e após feita exsanguinação por punção cardíaca seguida de deslocamento cervical. O procedimento foi realizado em sala específica e isolada, localizada anexa ao local onde os animais foram mantidos na Faculdade de Nutrição na UFPel. Os camundongos foram dissecados e os ovários coletados e estocados, um ovário a -80°C e outro em solução de formol a 10% para análise histológica.

5.2 Teste de Tolerância à Insulina

A sensibilidade periférica à insulina e o metabolismo da glicose foram avaliados através do Teste de Tolerância à Insulina (ITT), quando os animais completaram 3 meses de vida. Para isso 6 animais de cada grupo receberam uma injeção intraperitoneal de insulina (1UI/kg de peso corporal) após 2 horas de jejum. O sangue foi coletado por uma pequena incisão na ponta da cauda nos seguintes tempos: 0, 5, 20 e 35 minutos após a injeção de insulina. Os níveis de glicose foram mensurados através do glicosímetro (AccuChek Active, Roche Diagnostics®, USA). A porcentagem de decaimento da glicose foi calculada pela fórmula $0,693/t_{1/2}$, onde $t_{1/2}$ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear do decaimento da glicose plasmática, detectada nos tempos 5 a 35 minutos após infusão de

insulina (BONORA *et al.*, 2000). Quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, maior a sensibilidade à insulina (GELONEZE; TAMBASCIA, 2006).

5.3 Contagem de folículos

Para avaliação histológica as amostras de ovários foram retirados do formol tamponado 10%, submetidas à desidratação em álcool, clareados em xilol e incluídos em Paraplast Plus® (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA). Os ovários já incluídos em Paraplast Plus® foram sequencialmente cortados em micrótomo automático Leica modelo RM2245 (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK) a uma espessura de 5 µm, sendo 1 a cada 6 cortes retirados e colocados em lâminas histológicas padrão. Cortes intermediários foram separados para análise de imunofluorescência, usando lâminas silanadas em etanol com organosilano 3% (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA). Todo o ovário foi cortado e usado. As lâminas, após, secagem na estufa a 55°C, foram coradas com hematoxilina-eosina, montadas com lamínulas e resina sintética (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, EUA). Imagens de seções ovarianas foram capturadas por uma câmera digital Moticam 5.0 (Motic®, Hong Kong, China) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation, JP), utilizando objetivas de 10 e 40X. Os folículos foram classificados como: primordiais quando cercado por uma camada de célula da granulosa planas; primários quando circundado por uma camada de células cúbicas; secundários quando rodeado por duas ou mais camadas de células granulosas cúbicas e finalmente folículos terciários quando a presença de antro e complexo cumulus oophorus foi detectada (LI *et al.*, 2015). A quantidade de folículos foi multiplicada por seis e a quantidade final de folículos multiplicada duas vezes, mimetizando a quantidade de folículos dos dois ovários.

5.4 Imunofluorescência

As amostras foram desparafinizadas com xilol e reidratadas com álcoois graduados. Os anticorpos policlonais primários foram: marcadores de dano ao DNA: anti-H2A.X (fosfo S139) e marcadores de infiltração de macrófagos: anti-

cd68, diluídos de acordo com a padronização de cada anticorpo. O procedimento de imunofluorescência foi ajustado de acordo com o descrito previamente (Schneider, Zhi *et al.* 2014, Saccon, Moreira *et al.* 2016). As imagens dos folículos primordiais, primários e secundários foram capturadas por uma câmera digital Moticam 5.0 (Motic®, Hong Kong, CHN) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation, JP), utilizando objetiva de 40X. Foram analisados 5 oócitos/animal/categoria de folículo por grupo para geração das médias. O valor mais comum (a moda) de cada área registrado pelo aplicativo histograma 32-bit do software Image J®, utilizando uma escala que varia de 0 (a maior intensidade de coloração) a 255 (sem coloração). Além disso o número de focos de H2A.X em folículos primordiais e primários foi usado para determinar o nível de dano no DNA destes oócitos.

5.5 Análise de Expressão Gênica

Um dos ovários de cada fêmea foi transferido para microtubos contendo 1mL de isotiocianato de guanidina (Trizol, Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), homogeneizado e armazenado à -70°C.

A extração de RNA foi realizada utilizando o método do Trizol (Invitrogen®) seguindo as indicações do fabricante. O RNA total foi quantificado utilizando espectrofotômetro (NanoDrop Lite, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) e todas as amostras foram ajustadas para 100 ng/μL. Adicionalmente, foi verificada a pureza das amostras através da taxa de absorbância 260/280 nm.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 μg de RNA total utilizando kit comercial (iScript cDNA Synthesis Kit, Biorad, Hercules, CA, USA), no volume total de 20 μL, seguindo as recomendações do fabricante. A PCR em tempo real (RTq-PCR) foi conduzida em duplicata, usando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) no equipamento StepOne 7500 RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para cada ensaio foram corridos 45 ciclos (95°C durante 15s e 60 °C durante 60s) e uma curva de dissociação foi incluída no final da reação para verificar a amplificação de um único produto de PCR.

Os genes *beta-2 microglobulin (B2m)* e *actin beta (Actb)* foram utilizados como controles endógenos e os genes alvo foram: *RAC-alpha serine/threonine protein kinase 1 (Akt1)*, *phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (Pik3r1)*, *mechanistic target of rapamycin kinase (mTOR)*, *forkhead box protein O3 (Foxo3a)*, *growth differentiation factor 9 (GDF9)*, *anti-Mullerian hormone (AMH)*, *bone morphogenetic protein 15 (BMP15)*, *proto-oncogene receptor tyrosine kinase (Kit)*, *Kit Ligand (Kitl)*, *superoxide dismutase 2 (Sod2)*, *sirtuin type 1 (SIRT1)*, *catalase (CAT)*, *phosphatase and tensin homolog (Pten)*. A sequência de primers dos genes analisados encontram-se na tabela 2.

A expressão relativa foi calculada a partir da equação $2^{A-B} / 2^{C-D}$ (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra analisada; C, a média geométrica dos valores de Ct para os genes *B2m* e *ACTB* na primeira amostra do controle e D, a média do Ct para os genes *B2m* e *ACTB* na amostra analisada). A primeira amostra do controle foi expressa como 1,00 por esta equação, e todas as outras amostras foram calculadas em relação a este valor. Depois disso, os resultados do grupo controle foram ponderados, e todos os outros resultados foram divididos pelo valor médio da expressão relativa no grupo controle, para se obter a mudança na expressão dos genes de interesse em comparação com o grupo controle (Fold change) (Masternak, Al-Regaiey et al. 2005).

Tabela 2. Sequência de primers utilizadas na RTq-PCR.

Gene	Código	Primers
<i>B2m</i>	NM_009735.3	F: AAGTATACTCACGCCACCCA R: CAGGCGTATGTATCAGTCTC
<i>Actb</i>	NM_007393.5	F: GAGACCTTCAACACCCCAGC R: ATGTCACGCACGATTTCCC
<i>Akt1</i>	NM_001331107.1	F: CCGGTTCTTTGCCAACATCG R: ACACACTCCATGCTGTCATCTT
<i>Pi3k</i>	XM_006507441.3	F: TAGCTGCATTGGAGCTCCTT R: TACGAACTGTGGGAGCAGAT
<i>mTOR</i>	XM_006539077.2	F: CGGCAACTTGACCATCCTCT R: TGCTGGAAGGCGTCAATCTT
<i>Foxo3a</i>	XM_006512806.1	F: CGGCTCACTTTGTCCCAGAT R: GCCGGATGGAGTTCTTCCA
<i>Gdf9</i>	XM_006532220.3	F: AATACCGTCCGGCTCTTCAG R: GGTAAACAGCAGGTCCACCAT
<i>Amh</i>	XM_006513119.3	F: TCCTACATCTGGCTGAAGTGATATG R: CAGGTGGAGGCTCTTGGAAC
<i>Bmp-15</i>	NM_009757.5	F: GAGCGAAAATGGTGAGGCTG R: GGCGAAGAACAACCTCCGTCC
<i>Kit</i>	NC_000071.6	F: CTCCCCCAACAGTGTATTAC R: TAGCCCGAAATCGCAAATCTT
<i>Kitl</i>	NM_013598.3	F: TTCGCACAGTGGCTGGTAAC R: TTCACAGCGAAGCACTCTGC
<i>Sod2</i>	NM_013671.3	F: AAGGAGCAAGGTCGCTTACA R: ACACATCAATCCCCAGCAGT
<i>Cat</i>	NM_009804.2	F: AGGAGGCAGAACTTTCCCAT R: TTTGCCAACTGGTATAAGAGGGTA
<i>Pten</i>	NM_008960.2	F: TGGATTGACTTAGACTTGACCT R: GCGGTGTCATAATGTCTCTCAG
<i>SIRT1</i>	NM_001159589.2	F: GCAACAGCATCTTGCCTGAT R: GTGCTACTGGTCTCACTT

5.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 6.0. O teste de t foi usado para analisar a contagem de folículos, metabolização da glicose e expressão gênica. Para o ganho de peso foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativamente estatísticos.

6. Resultados

6.1 Fenótipo Materno

Como esperado, foi observado uma redução na ingestão da dieta materna no grupo submetido a RA ($p < 0.0001$), visto ingeriu uma quantidade 50% menor que o controle levando em consideração a média do consumo da semana anterior do grupo controle. Todos animais do GC foram alimentados com ração padrão para roedores e com água *ad libitum*.

Foi realizado o monitoramento do peso corporal ao longo da gestação, peso pós parto (1 dia pós) e no dia do desmame (21 dias), respectivamente, conforme demonstrados na Figura 1. As gestantes do GC obtiveram ganho de peso superior em relação ao GRA. Evidenciando assim, que a diferença entre os grupos é resultado de mudanças na composição corporal dos camundongos fêmeas, pois o consumo dietético diário vai aumentando conforme a prenhez, tornando-se mais evidente a partir do décimo sexto dia.

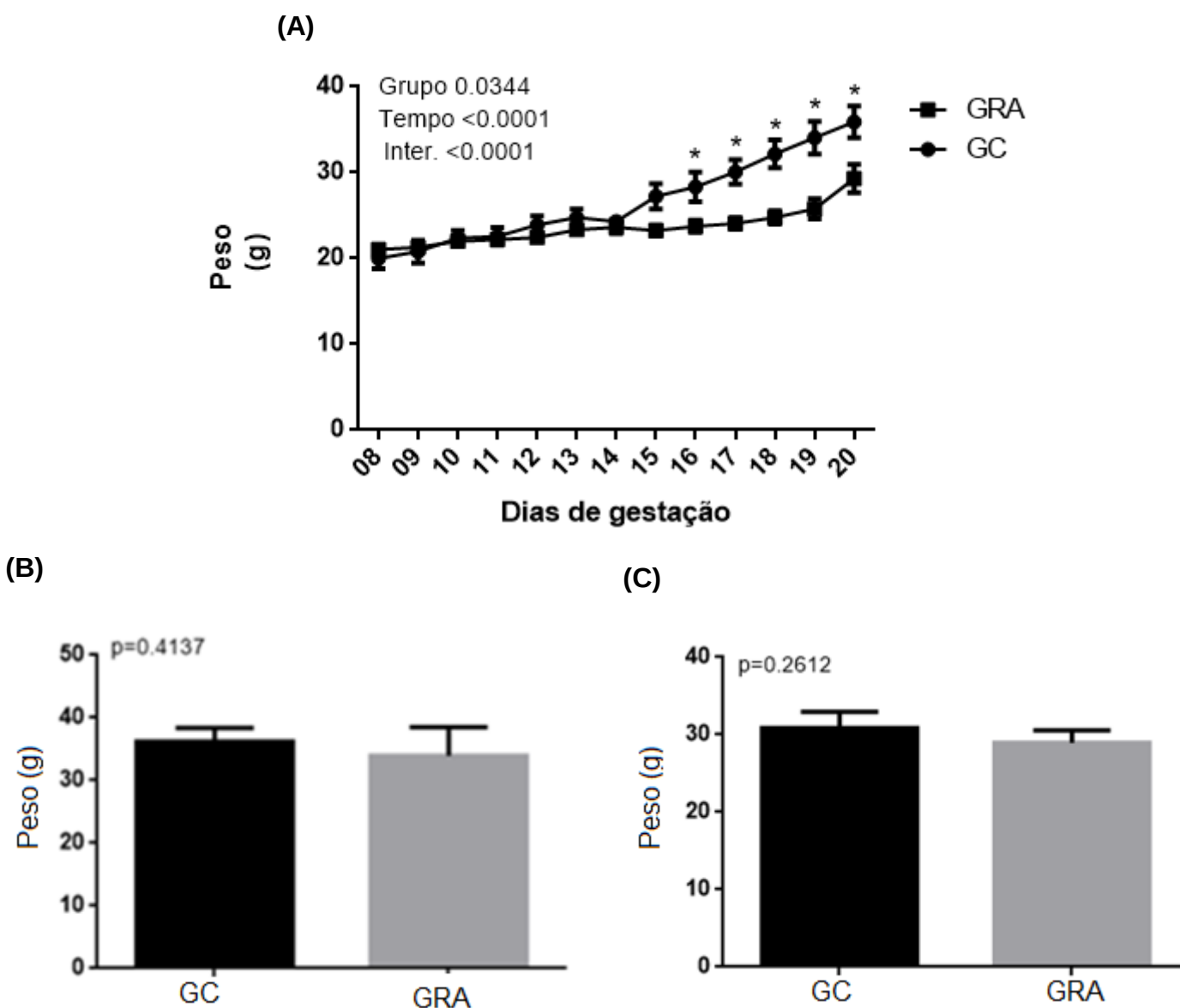


Figura 1. Peso corporal durante a gestação (A), no puerpério (B) e no dia do desmame (C) de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle.

Durante o período de lactação, não houve monitoramento da massa corporal dos animais. No desmame (21 dias) foi realizada pesagem das mães, onde foi observado que ambos os grupos possuíam pesos semelhantes, sem efeitos significativos da dieta durante a gestação ($p=0.212$).

6.2 Fenótipo da prole

A dieta ofertada para os camundongos gestantes não afetou o número de filhotes por ninhada ($p=0.1340$) (Figura 2), ou a razão sexual (masculino:feminino). Também não houve um efeito da dieta materna sobre o peso corporal aferido no dia do desmame da prole ($p=0.3451$) (Figura 3). As fêmeas cuja a mãe foi submetida a RA ganharam mais peso ($p<0.0001$) comparadas com a prole de animais controle durante os 90 dias de vida (Figura 5).

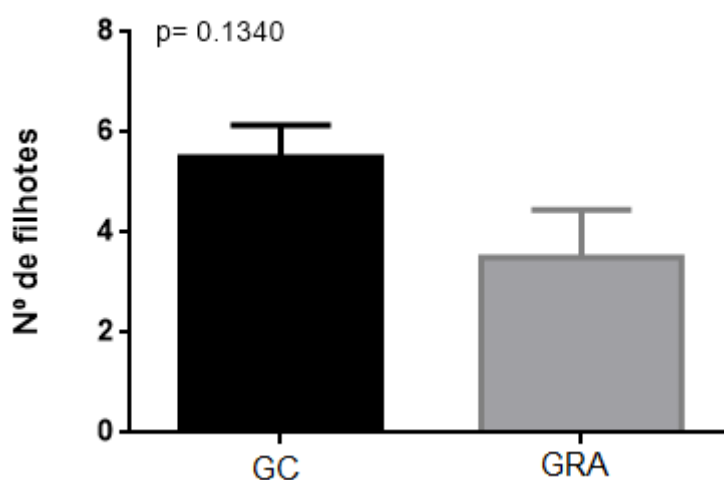


Figura 2. Número de filhotes por ninhada em camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle no dia do nascimento.

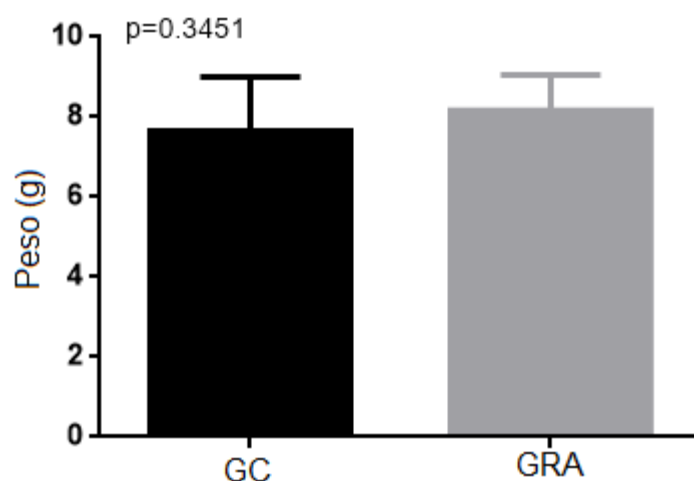


Figura 3. Peso da prole feminina, aferido no dia do desmame (21dias) de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle.

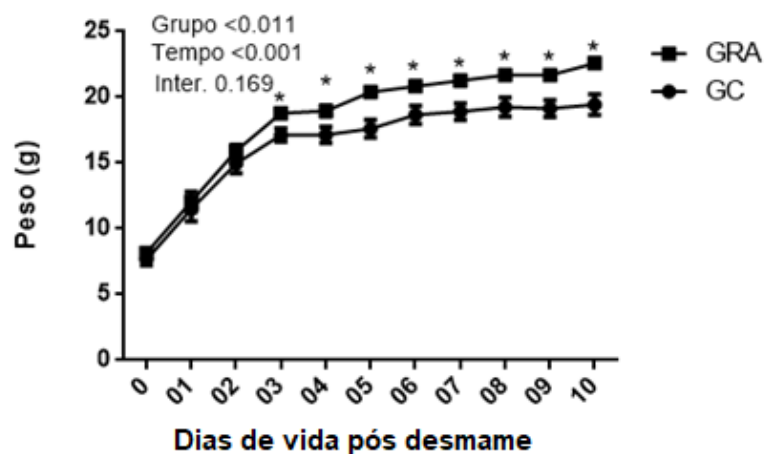


Figura 4. Acompanhamento do peso corporal durante 10 semanas, da prole de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle.

A tolerância à insulina foi semelhante entre os grupos (Figura 5). A taxa de decaimento da glicose, assim como o nível de glicose após a injeção de insulina, foram semelhantes entre os grupos. Também não houve diferença significativa na proporção de tecido adiposo visceral da prole no momento da eutanásia ($p=0.2640$) (Figura 6).

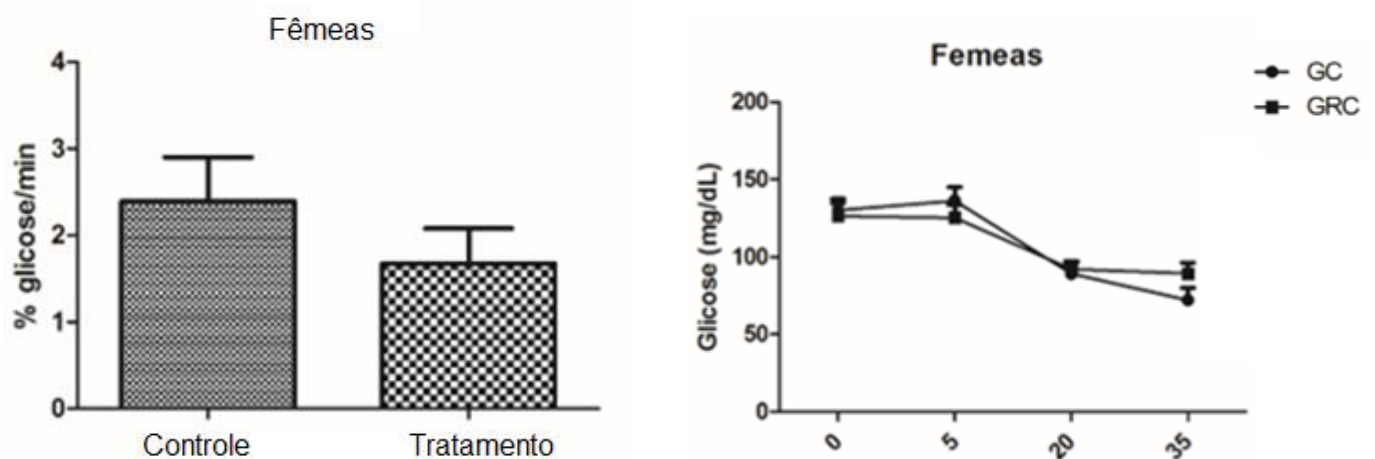


Figura 5. Teste de tolerância à glicose em fêmeas prole de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle.

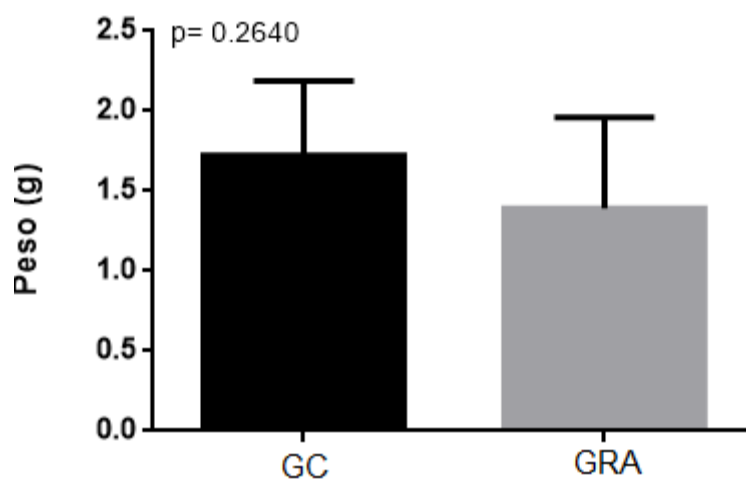


Figura 6. Peso do tecido adiposo abdominal em fêmeas prole de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle

O número de folículos primordiais, em transição e totais do grupo GRA foi menor comparado ao grupo GC ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, respectivamente). Folículos primários, secundários e terciários não apresentaram diferença entre os grupos ($p = 0.1717$, $p = 0.6297$ e $p = 0.5064$ respectivamente) (Figura 7).

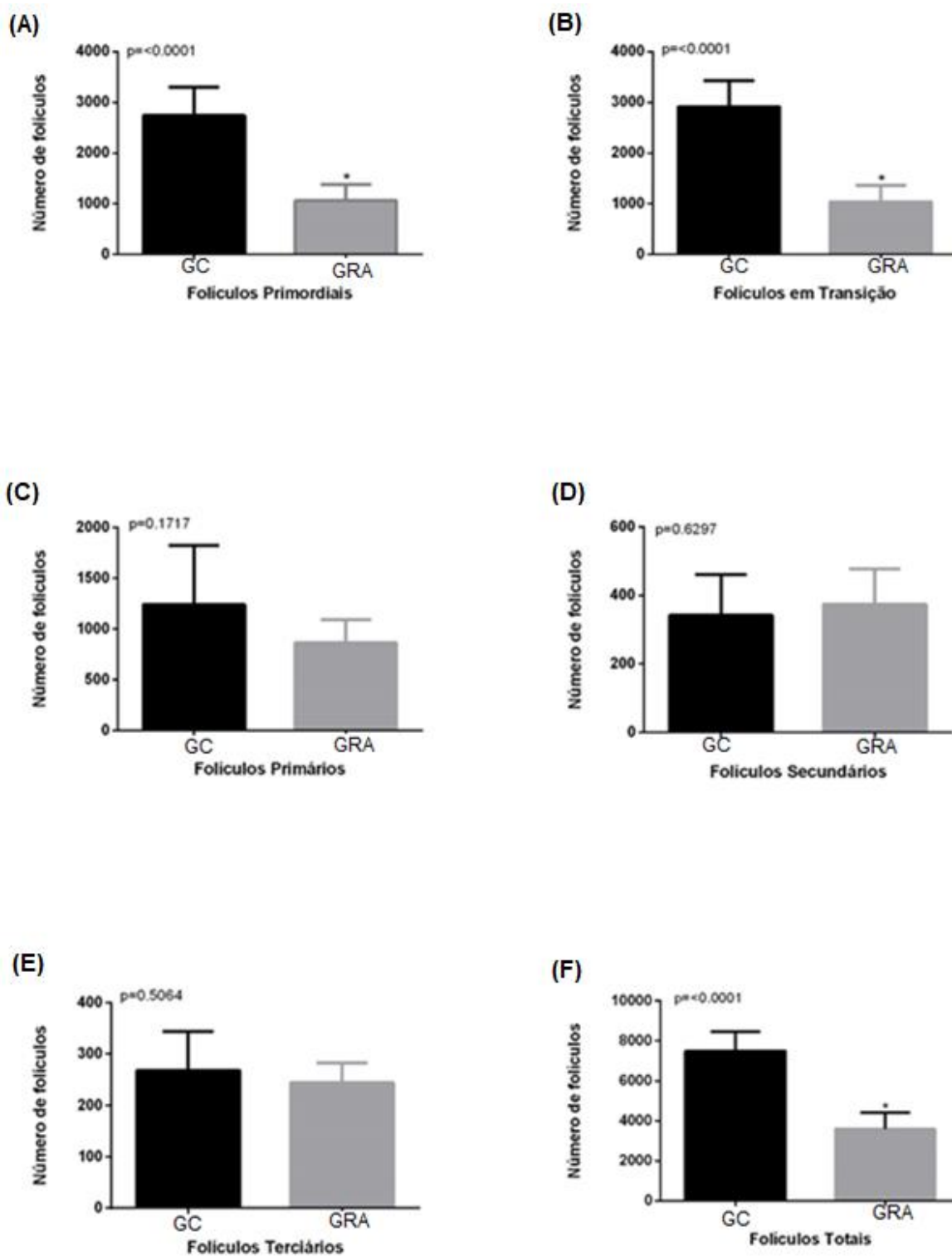


Figura 7. Número de folículos ovarianos primordiais (A), em transição (B), primários (C), secundários (D), terciários (E) e totais (F) na prole de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle. *Indicam diferenças significativas ($p < 0.05$)

Os dados de diâmetro do núcleo, do oócito, do folículo e número de células da granulosa estão representados na Tabela 3. Foi observado que diâmetros de núcleo, oócito e número de células da granulosa de folículos primordiais foram maiores no grupo com restrição alimentar ($p=0.0384$, $p=0.007$, $p=0.0138$, respectivamente). Nos demais folículos de transição e primários não foi observada nenhuma diferença estatística.

Tabela 3- Diâmetros de núcleo, oócito, total e células da granulosa de folículos primordiais, em transição e primários de animais controle e submetidos a restrição alimentar

	Grupo Controle	Grupo GRA	Valor P
Folículo Primordial	(μM)	(μM)	
Diâmetro do Núcleo	5,53 $\pm$ 0,1	6,05 $\pm$ 0,1	0,0384*
Diâmetro do Oócito	9,11 $\pm$ 0,3	10,63 $\pm$ 0,2	0,0007*
Diâmetro do Folículo	12,54 $\pm$ 0,5	13,78 $\pm$ 0,5	0,1269
Células da Granulosa	3,05 $\pm$ 0,1	3,66 $\pm$ 0,1	0,0138*
Folículo Transição			
Diâmetro do Núcleo	6,28 $\pm$ 0,1	6,05 $\pm$ 0,2	0,4331
Diâmetro do Oócito	10,34 $\pm$ 0,4	10,22 $\pm$ 0,5	0,8659
Diâmetro do Folículo	14,93 $\pm$ 0,8	14,75 $\pm$ 0,7	0,8748
Células da Granulosa	4,88 $\pm$ 0,3	5,66 $\pm$ 0,2	0,0722
Folículo Primário			
Diâmetro do Núcleo	7,62 $\pm$ 0,2	7,66 $\pm$ 0,3	0,9144
Diâmetro do Oócito	18,62 $\pm$ 1,1	21,50 $\pm$ 1,2	0,1095
Diâmetro do Folículo	27,12 $\pm$ 1,3	30,49 $\pm$ 1,4	0,1035
Células da Granulosa	13,94 $\pm$ 0,8	15,5 $\pm$ 1,0	0,2686

*diferença estatística $p<0,05$

Com relação a expressão gênica (Figura 8 e 9) não houve diferença significativa entre os genes estudados. Apenas a expressão de SOD2 foi menor no grupo GRA.

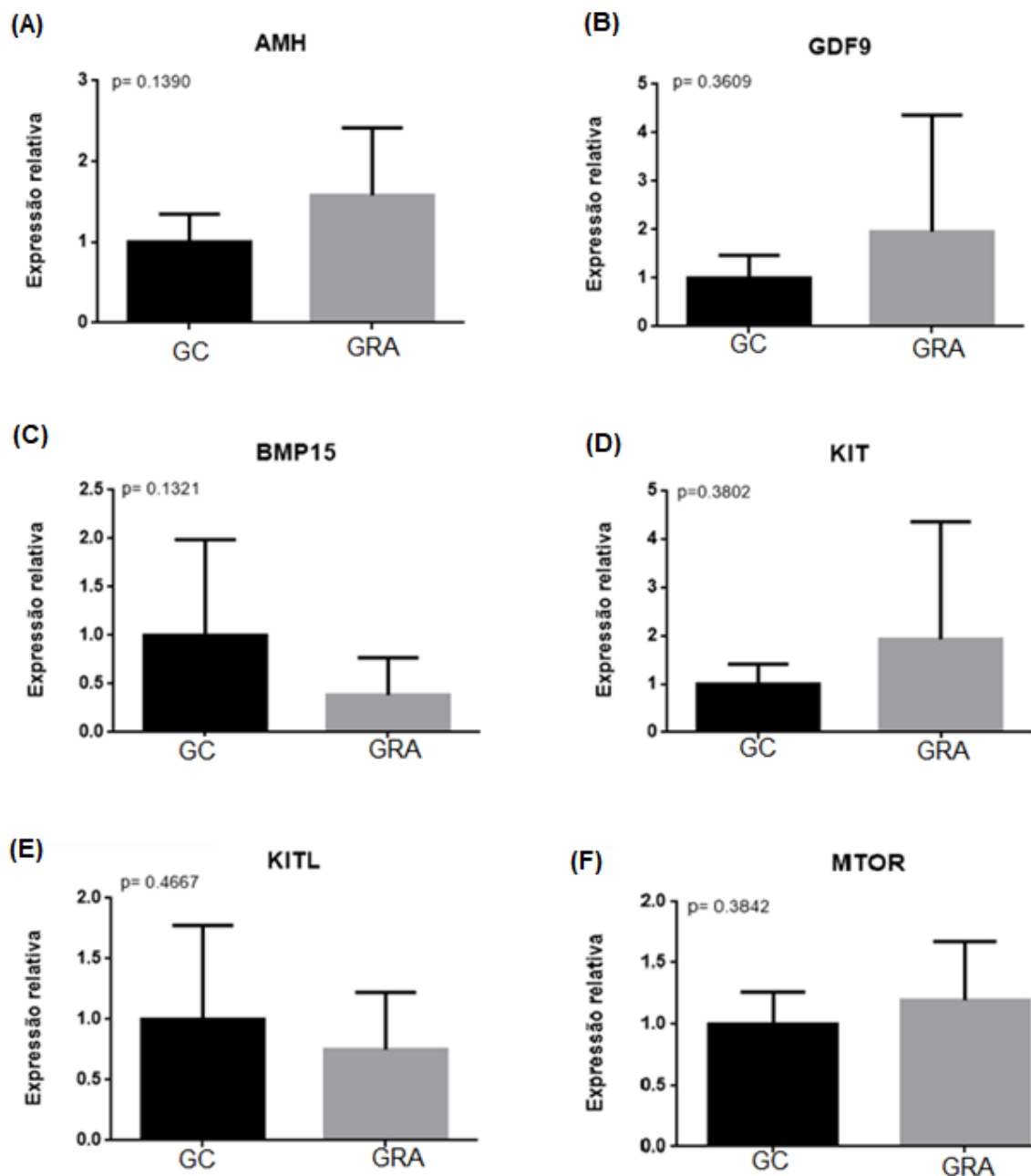


Figura 8. Expressão gênica de *AMH* (A), *GDF9* (B), *BMP15* (C), *KIT* (D), *KITL* (E), *MTOR* (F) no tecido ovariano da prole feminina de camundongos submetidos a restrição alimentar e controle com 90 dias.

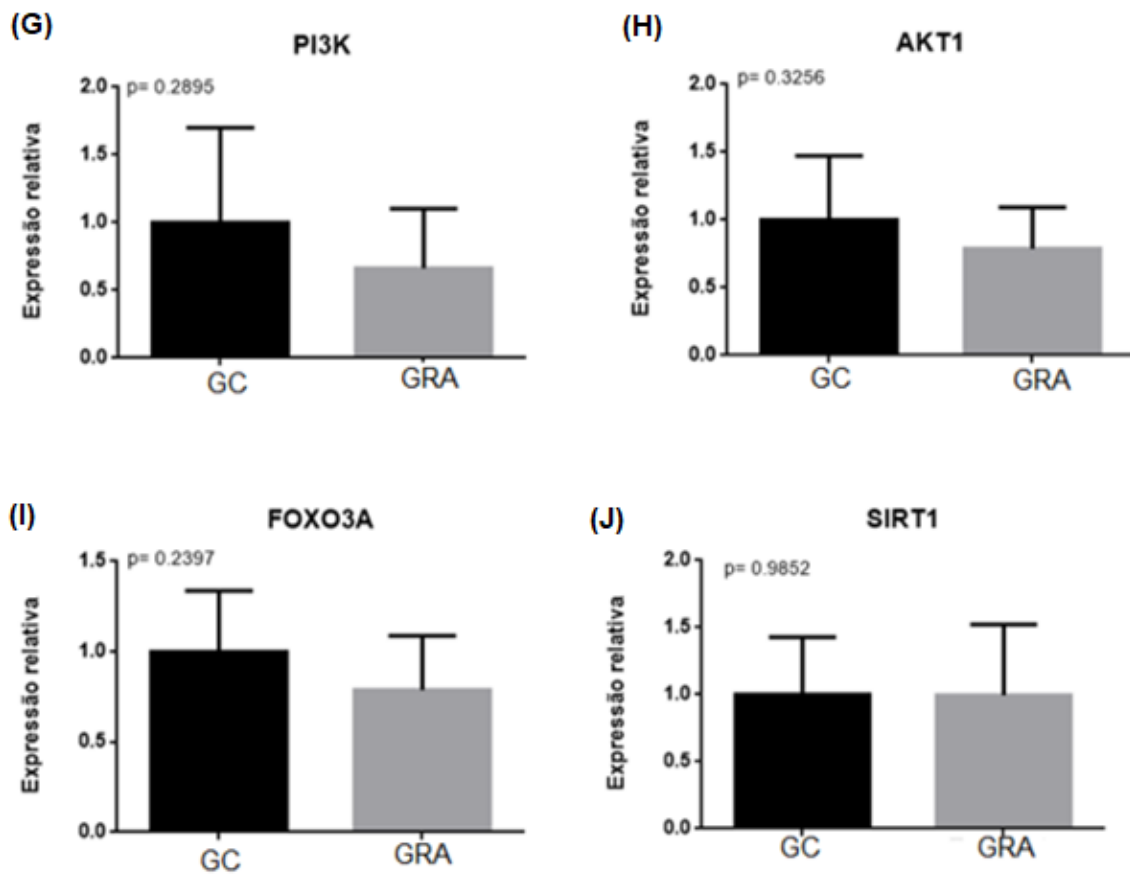


Figura 9. Expressão gênica de PI3K, AKT1, FOXO3A, SIRT1 no tecido ovariano da prole feminina de camundongos submetidos a restrição alimentar e controle com 90 dias.

Na imunofluorescência foi observado que em oócitos de folículos primordiais, células da granulosa destes e oócitos de folículos primários do grupo GRA, a intensidade de fluorescência do H2A.X foi menor ($p=0.0002$, $p=0.0003$ e $p<0.0001$, respectivamente), indicando menos dano no DNA (Figura 10). Com relação ao anticorpo CD68, indicador de infiltração de macrófagos, não houve divergências entre os grupos ($p=0.2233$) (Figura 11).

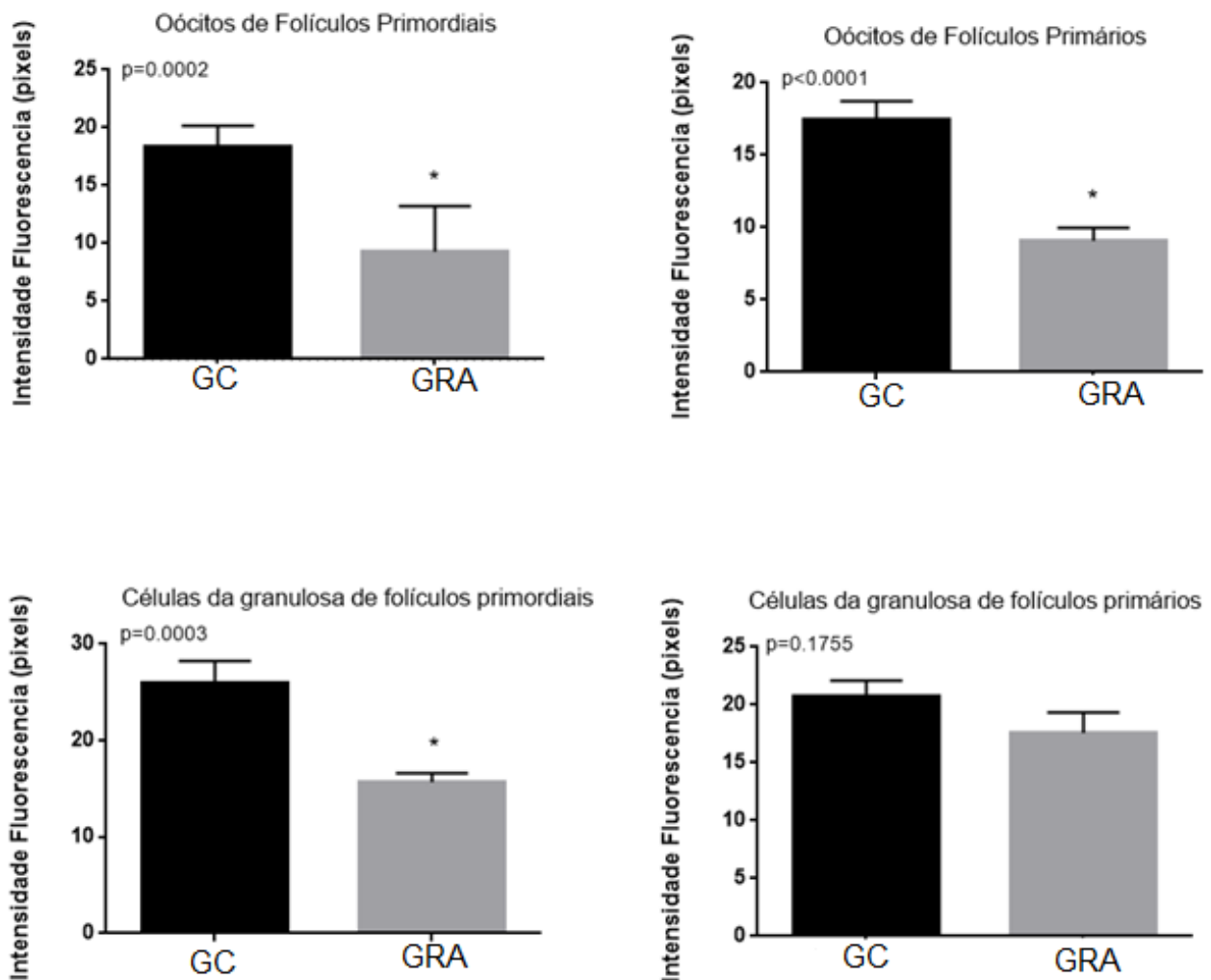


Figura 10. Imunofluorescência de H2A.X em oócitos de folículos ovarianos primordiais e primários de camundongos submetidos a restrição alimentar e controle. * Indicam diferenças significativas ($p<0.05$).

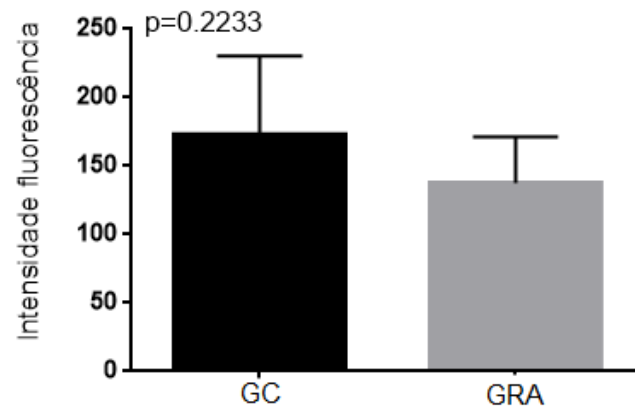


Figura 11. Imunofluorescência de CD68 em oócitos de folículos ovarianos primordiais e primários em proles de camundongos submetidos a restrição alimentar e controle.

7. Discussão

Os resultados deste estudo indicam que a restrição alimentar durante a gestação altera o tamanho do oócito, número de células da granulosa e número de folículos ovarianos na reserva da prole. Os animais submetidos a restrição alimentar apresentaram uma quantidade menor de folículos primordiais, em transição e totais do que animais do grupo controle, o que sugere uma vida reprodutiva mais curta. Em contrapartida, observamos menores danos no DNA dos animais submetidos a restrição alimentar. Devemos levar em consideração que os animais testados são bem jovens e que mais estudos de longo prazo são necessários.

A restrição alimentar nas gestantes afetou seu ganho de peso porém não afetou o número de filhotes por ninhada, nem o peso aferido no dia do desmame. Evidenciando que a ninhada se manteve em equilíbrio durante a amamentação e que os efeitos transgeracionais só vão ser percebidos na idade adulta. Tal fato foi observado por nós e por outros pesquisadores (AIKEN; OZANNE, 2013; GUZMÁN *et al.*, 2006, 2014) utilizando diferentes métodos dietéticos durante a gestação. Possivelmente esta preservação do tamanho da ninhada esteja envolvida com a degradação das reservas corporais maternas, ou seja, a fêmea perde peso mas mantém a nutrição da prole, como observado por (BERNAL *et al.*, 2010; CHAN *et al.*, 2018). Tornou-se clara a capacidade da restrição alimentar influenciar no desenvolvimento gestacional. Este resultado vem ao encontro dos obtidos por Amy *et al.* (2018), que observaram diferenças de peso significativas entre grupos de animais submetidos a restrição de 50% durante a gestação. Outros trabalhos também realizados com RA, como o de Gonzales *et al.* (2015) demonstraram menor peso no período gestacional de ratos em restrição quando comparados com grupo controle. Assim podemos observar que a RA afeta o ganho de peso das gestantes mas não afetou o número de filhotes nascidos ou mesmo o peso dos filhotes ao desmame.

Foi observado que o número de folículos primordiais na prole de mães submetidas a restrição, representa 38,83% quando relacionado com o grupo controle. Isto é, o grupo controle apresentou 2,6 vezes mais folículos do que o grupo restrição. De maneira similar, o estudo de Winship *et al.* (2018) observou 51% menos folículos primordiais em descendentes de mães submetidas a

restrição proteica em relação ao grupo controle. Estes resultados também se assemelham aos estudos feitos por Bernal *et al.*, (2010) e Chan *et al.*, (2018) onde camundongos prole de RA também tiveram uma reserva de folículos primordiais menor. As mudanças no ambiente fetal através da nutrição, têm o potencial de alterar o desenvolvimento do ovário, com grandes implicações para a fertilidade. Estudos em ovinos (ERA *et al.*, 2001; LEA *et al.* 2006), bovinos (EVAN *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2007; MOSSA *et al.*, 2009;) e ratos (MEIKLE; WESTBERG, 2001) mostraram que os descendentes de animais submetidos a alguma restrição de nutrientes durante a gestação, tiveram uma série de problemas reprodutivos pós-natais, incluindo taxas de ovulação e concepção mais baixas. No presente estudo, a prole mostrou perda folicular significativa já aos 3 meses, corroborando com outras evidências de proles nascidas de mães expostas a algum tipo de restrição (BERNAL *et al.*, 2010; CHAN *et al.*, 2018; GUZMÁN *et al.*, 2006, 2014). Portanto os resultados apresentados demonstram que esse fenótipo de envelhecimento acelerado começa muito antes do que se pensava anteriormente e com a exposição, diminuiu a reserva ovariana podendo assim ditar a capacidade reprodutiva em potencial aos 90 dias de vida.

A reserva folicular primordial ovariana é estabelecida durante o desenvolvimento fetal (MCGEE; HSUEH, 2000). Após o nascimento, há uma ativação contínua do pool de folículos primordiais o que leva ao crescimento de folículos individuais, enquanto o restante permanece quiescente por meses ou até anos, até que a reserva se esgote em um evento conhecido como menopausa. Acredita-se que vários fatores locais estejam envolvidos nesse processo de ativação (MCGEE; HSUEH, 2000). Nos animais estudados, não houve diferença entre o número de folículos primários e secundários, isto é parecem não ser menos ativados, sim menos folículos foram formados na vida fetal inicial. A insuficiência ovariana prematura pode ter como causa considerada fatores genéticos, mas a etiologia desta condição é pouco compreendida. Os fatores Nobox e Figla podem estar envolvidos, pois são eles que regulam o desenvolvimento folicular primordial (GRIVE; FREIMAN, 2015). E desempenham um importante papel regulador na expressão de múltiplos genes específicos de oócitos, incluindo aqueles que iniciam a foliculogênese e aqueles que codificam a zona pelúcida, sendo necessários para fertilização e sobrevivência

embrionária. Um estudo com ratas knockout de Figla, culminou em animais sem folículos primordiais, eles não se formaram. Além disso, houve uma depleção massiva de oócitos, resultando em ovários menores e esterilidade. Nos machos a fertilidade não foi alterada. A persistência de Figla em mulheres adultas sugere que ele pode regular vias adicionais que são essenciais para o desenvolvimento ovariano normal (TOSCH *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2008).

A transição dos folículos primordiais para primários é dependente do crescimento do oócito (LINTERN-MOORE; MOORE, 1979). Ou seja, o tamanho do oócito pode ser usado como indicador da taxa folicular de depleção. Assim observamos que os camundongos RA apresentaram oócitos inclusos em folículos primordiais maiores, com mais células da granulosa e uma perda mais precoce de folículos ovarianos. Logo há comprometimento da função ovariana associada ao aumento no tamanho de oócitos de folículos primordiais. Os folículos primordiais, cada um dos quais contém um oócito rodeado por uma única camada de células pré-granulosas somáticas, representam assim toda a reserva ovariana que a fêmea possui (COHEN *et al.*, 2010). A comunicação bidirecional e a troca de moléculas de sinalização entre oócito e as células da granulosa circundante são necessárias tanto para o crescimento do oócito quanto para o desenvolvimento do folículo após o nascimento (GRIVE; FREIMAN, 2015). Após o início da puberdade, os folículos maduros podem ser “ativados” por uma onda de hormônio luteinizante (LH), que resulta na quebra da vesícula germinativa, na maturação nuclear e na conclusão da primeira divisão meiótica (GRIVE; FREIMAN, 2015). Esses oócitos, então, tem a interrupção na metáfase II e da meiose II e são ovulados (COTICCHIO *et al.*, 2015). Portanto, a regulação fiel da montagem do folículo primordial durante o período neonatal, determina a capacidade reprodutiva a longo prazo das fêmeas dos mamíferos. Neste caso, a diminuição do número de folículos primordiais foi associada a um menor diâmetro dos oócitos inclusos nestes.

A resistência à insulina é programada durante a gestação (HOWIE, 2012; SYMONDS, 2009), e ela está associada a proles que tiveram menor peso ao nascer devido a nutrição dada durante a gestação, se manifestando durante a vida adulta (HOFMAN, 1997). A RA durante a vida adulta melhora significativamente a curva glicêmica de animais e reduz o tempo de ação de

insulina exógena, o que reflete uma maior sinalização após a ligação de insulina ao seu receptor. O impacto da RA durante a vida adulta na sensibilidade periférica à insulina está entre os efeitos mais reprodutíveis desta intervenção (BLONDEAU *et al.*, 2002). Os recém-nascidos de mães que sofreram restrição alimentar durante a gravidez apresentaram hiperinsulinemia (CHAN *et al.*, 2018) o que demonstra que a restrição alimentar intrauterina está associada à resistência à insulina no início da vida. Mas, esta diferença não foi mais significativa aos 65 dias de idade da prole adulta (HOWIE, 2012), corroborando com o observado no presente estudo. Não observamos diferença na sensibilidade à insulina da prole de camundongos submetidos a restrição alimentar. Um dos motivos pode ser devido a eutanásia ter ocorrido após apenas 3 meses de vida, sendo menor tempo comparado aos estudos que foram apresentados anteriormente. No entanto Szostaczuk *et al.*, (2016) também observaram que não há resistência à insulina na prole, mesmo tendo avaliado os animais aos 6 meses, corroborando com nossos achados. Isto evidencia, que os efeitos observados no desenvolvimento ovariano são independentes da sensibilidade à insulina, como é sugerido por vários estudos com RC durante a vida adulta.

Em nosso estudo não observamos diferença na deposição de tecido adiposo visceral entre os grupos. Segundo Malo *et al.* (2013) também não foi observado alteração na deposição de gordura aos 6 meses de vida, após uma RA a partir do 4º dia de gestação de 50%. Choi *et al.* (2007) também não observaram diferença no peso de tecido adiposo na prole de mães que sofreram 25% de RA a partir do 10º dia de gestação. Garcia *et al.* (2011) não observaram diferenças no diâmetro dos adipócitos entre o grupo de restrição comparado ao controle, quando aplicada 20% de RA até o 12º dia de gestação. Estes estudos citados apoiam nossos resultados, onde também se obteve um peso de tecido adiposo similar entre os grupos.

Os resultados do presente estudo, vão ao encontro da chamada hipótese da programação fetal, já levantada por outros trabalhos (BARKER; OSMOND, 1986; CHAN *et al.*, 2018; RINAUDO; WANG, 2012; VICKERS, 2011), segundo a qual o organismo do feto se adapta a um ambiente intrauterino adverso. Como esse metabolismo poupador se mantém após o nascimento, o indivíduo se torna

mais propenso a engordar caso o padrão de ingestão calórica melhore. Conforme executamos neste trabalho, onde a prole foi submetida a um período de restrição alimentar intrauterino e após o nascimento dieta *ad libitum*. Desta maneira obtivemos diferença no ganho de peso das proles, sendo a RA mais pesada comparada ao GC. Tal fato ocorre porque, as modificações genéticas que acontecem durante o período fetal são formas de proteção frente à restrição alimentar. Assim, eles favorecem o acúmulo contínuo de calorias no corpo, promovendo o desenvolvimento de obesidade e, mais tarde, de doenças que acompanham, como aterosclerose e hipertensão arterial como estudos em humanos sugerem (BARKER *et al.*, 1989, 2005).

Apesar do efeito marcante na reserva ovariana, não houve efeito da dieta na expressão dos genes ovarianos estudados. Porém, as diferenças na expressão dos genes no ovário podem estar relacionadas a duração da exposição à restrição alimentar. Pesquisas anteriores observaram que camundongos fêmeas alimentados com uma dieta rica em gordura diminuíram expressão ovariana de Foxo3a e aumentou expressão de Akt1 (NTEEBBA *et al.*, 2013). Os animais submetidos a RA apresentaram folículos maiores, já foi relatado envolvimento com a expressão de IGF1 (WANDJI *et al.* 1998), mas não foi associado no atual estudo. Está bem estabelecido em estudos reprodutivos que um eixo funcional GH/IGF-I é importante para a função ovariana normal (CHANDRASHEKAR, *et al.*, 2004). Embora camundongos fêmeas Ames Dwarf sejam animais que apresentam uma mutação natural na qual a hipófise é menos desenvolvida e por isso acabam não secretando GH, uma pesquisa realizada com estes animais aos 12 e 18 meses demonstrou que as fêmeas apresentaram três vezes mais folículos primordiais quando jovens. A presença do hormônio no ovário, faz com que haja uma preservação, consequentemente ligado a uma maior extensão do tempo de vida. Os animais com 18 meses, tratados com GH externo, quando recebiam as injeções os folículos voltavam a crescer, mesmo quando são deficientes (SCHNEIDER *et al.*, 2014). Corroborando com nosso estudo, a pesquisa com os camundongos Ames dwarf não evidenciou diferença na expressão gênica com a idade, não houve diferença significativa nos animais jovens, mas quando mais velhos sim. Observaram que, mRNA de Akt1, Pi3k, Mtor e Foxo3a nos ovários de camundongos mais velhos foi menor e que está associada à redução da atividade ovariana. Portanto os animais deste estudo

podem ter apresentado expressão gênica semelhante pois eram muito jovens ainda.

Estudos recentes sugerem que a montagem inicial dos folículos engloba um ponto de verificação de desenvolvimento crucial, permitindo que apenas os oócitos de maior qualidade se desenvolvam e sejam fertilizados no adulto (GRIVE; FREIMAN, 2015; SMITHFGRTU DXZ; WILHELM, 2014). Ou seja, os folículos com maior dano no DNA sofrem apoptose e são eliminados. Isto valida nossos resultados, o grupo GRA obteve menos intensidade de fluorescência com o anticorpo H2A.X nos oócitos de folículos primordiais, primários e células da granulosa dos primários. Tendo potencial de proteção dessa pequena reserva, para que não ocorram mais danos e que quando recrutados estes folículos possam ser ovulados, por isso observamos um menor dano no DNA. Quanto ao segundo anticorpo utilizado, CD68, particularmente útil como marcador de macrófagos e diagnósticos de condições relacionadas à proliferação ou anormalidade das células, não houve diferença entre os grupos estudados. Este fato pode ser devido ao peso corporal observado nos animais, a diferença encontrada não foi suficiente para gerar um depósito de gordura visceral a ponto de torna-los obesos. A gordura visceral em excesso faz com que aumente a inflamação e assim consequentemente acarrete em resistência à insulina (SKAZNIK-WIKIEL *et al.*, 2016). A dieta hiperlipídica e obesidade estão associadas a um aumento da infiltração de macrófagos no estroma ovariano (SKAZNIK-WIKIE *et al.*, 2016), porém nada disso foi observado nos camundongos deste estudo.

Portanto, os achados apontam que a exposição intrauterina dita o potencial reprodutivo da prole. É evidente que o desenvolvimento do ovário pré-natal exige a conclusão bem sucedida de uma série de eventos-chave, como o nível correto e o tempo necessário para estabelecer um ovário normal em funcionamento em animais adultos.

8. Conclusão

A restrição alimentar durante a gestação em camundongos aumenta o ganho de massa corporal e diminui em cerca de três vezes a reserva ovariana da prole. Mostrando a influência nutricional precoce sobre a função reprodutiva, ou seja, a restrição alimentar resulta em perda precoce de folículos em filhotes adultos jovens. Nossos dados fornecem um modelo de compreensão de perda de folículos e disfunção reprodutiva. Até o momento os mecanismos subjacentes a essas associações não são claros. Portanto, mais estudos sobre os efeitos nutricionais pré-natais e pós-natais são necessários.

Referências

1. AIKEN, Catherine E.; OZANNE, Susan E. Transgenerational developmental programming. **Human reproduction update**, v. 20, n. 1, p. 63-75, 2013.
2. ARTEGA, A. *et al.* Efecto de la alimentacion durante el embarazo y el estado nutricional de la gestante sobre el recién nacido. **Rev. Med. Chile**, v. 10, p. 499-506, 1978.
3. AYRES, Caroline *et al.* Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. **International journal of pediatrics**, v. 2012, 2012.
4. BARBIERI, Marco A. *et al.* Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. **Pediatric research**, v. 65, n. 2, p. 215, 2009.
5. BARKER, David JP. The developmental origins of chronic adult disease. **Acta Paediatrica**, v. 93, p. 26-33, 2004.
6. BARKER, David JP. The fetal origins of type 2 diabetes mellitus. **Annals of internal medicine**, v. 130, n. 4_Part_1, p. 322-324, 1999.
7. BARKER, David JP *et al.* Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 17, p. 1802-1809, 2005.
8. BARKER, David JP *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577-580, 1989.
9. BARKER, David JP; OSMOND, Clive. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, v. 327, n. 8489, p. 1077-1081, 1986.
10. BARNES, Maria. J.; PRIMEAUX, Stefany. D.; BRAY, George. A. Food deprivation increases the mRNA expression of micro opioid receptors in the ventral medial hypothalamus and arcuate nucleus. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol**, v. 295, n.5, p. 1385-90, Nov 2008.
11. BATISTA FILHO, Malaquias; RISSIN, Anete. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de saúde pública**, v. 19, p. S181-S191, 2003.
12. BERNAL, Angelica B. *et al.* Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15558, 2010.

13. BLONDEAU, B. et al. Endocrine pancreas development is altered in foetuses from rats previously showing intra-uterine growth retardation in response to malnutrition. **Diabetologia**, v. 45, n. 3, p. 394-401, 2002.
14. BOLTON, Jessica L.; BILBO, Staci D. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 307, 2014.
15. BRAW-TAL, Ruth. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells?. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 11-18, 2002.
16. BROWN, Caitlin et al. Subfertility caused by altered follicular development and oocyte growth in female mice lacking PKBalpha/Akt1. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 2, p. 246-256, 2010.
17. BUCKLER, Helen. The menopause transition: endocrine changes and clinical symptoms. **British Menopause Society Journal**, v. 11, n. 2, p. 61-65, 2005.
18. CASTRILLON, Diego H. et al. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. **Science**, v. 301, n. 5630, p. 215-218, 2003.
19. CERQUEIRA, Fernanda M.; KOWALTOWSKI, Alicia J. Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. **Ageing research reviews**, v. 9, n. 4, p. 424-430, 2010.
20. CETIN, Irene; MANDO, Chiara; CALABRESE, Stefania. Maternal predictors of intrauterine growth restriction. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 16, n. 3, p. 310-319, 2013.
21. CHAN, Kaitlyn A. et al. Maternal nutrient restriction impairs young adult offspring ovarian signaling resulting in reproductive dysfunction and follicle loss. **Biology of reproduction**, v.98, n.5, p. 664-682, 2018.
22. CHANDRASHEKAR, Varadaraj; ZACZEK, Denise; BARTKE, Andrzej. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 1, p. 17-27, 2004.
23. COHEN, Paula E.; HOLLOWAY, J. Kim. Predicting gene networks in human oocyte meiosis. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 3, p. 469-472, 2010.
24. CHOI, Gyu Yeon et al. Gender-specific programmed hepatic lipid dysregulation in intrauterine growth-restricted offspring. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 196, n. 5, p. 477. e1-477. e7, 2007.
25. CHOW, B.; F, RIDER, A. D. Implication of the effects of maternal diet in various species. **J. Anim. Sci.**, v.3, p. 167-73. 1973.

26. CONNOR, Kristin L. et al. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 9, p. 2167-2180, 2012.
27. COOPER, Cyrus et al. Childhood growth and age at menarche. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 103, n. 8, p. 814-817, 1996.
28. COSCHIGANO, Karen T. et al. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3799-3810, 2003.
29. DE ROOIJ, Susanne R. et al. Prenatal undernutrition and cognitive function in late adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 39, p. 16881-16886, 2010.
30. ERIKSSON, J. G. et al. Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. **Diabetologia**, v. 45, n. 3, p. 342-348, 2002.
31. DA SILVA FARIA, Tatiane et al. Maternal malnutrition during lactation alters the folliculogenesis and gonadotropins and estrogen isoforms ovarian receptors in the offspring at puberty. **Journal of Endocrinology**, v. 198, n. 3, p. 625-634, 2008.
32. FEITOSA, Alina Coutinho Rodrigues et al. Aplicação de programa educativo multidisciplinar em gestações de alto risco devido a doenças endócrinas. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 32, n. 10, p. 504-9, 2010.
33. GARCÍA, Ana Paula et al. Moderate caloric restriction during gestation in rats alters adipose tissue sympathetic innervation and later adiposity in offspring. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e17313, 2011.
34. GARDNER, D. S.; OZANNE, S. E.; SINCLAIR, K. D. Effect of the early-life nutritional environment on fecundity and fertility of mammals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3419-3427, 2009.
35. GLUCKMAN, Peter D. et al. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 1, p. 61-73, 2008.

36. GLUCKMAN, Peter D.; BEEDLE, Alan S. Migrating ovaries: early life influences on later gonadal function. **PLoS medicine**, v. 4, n. 5, p. e190, 2007.
37. GODFREY, Keith M.; BARKER, David JP. Fetal programming and adult health. **Public health nutrition**, v. 4, n. 2b, p. 611-624, 2001.
38. GODFREY, Keith M.; GLUCKMAN, Peter D.; HANSON, Mark A. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 199-205, 2010.
39. GONG, Ming et al. Bone marrow mesenchymal stem cells of the intrauterine growth-restricted rat offspring exhibit enhanced adipogenic phenotype. **International Journal of Obesity**, v. 40, n. 11, p. 1768, 2016.
40. GRIVE, Kathryn J.; FREIMAN, Richard N. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. **Development**, v. 142, n. 15, p. 2554-2563, 2015.
41. GUZMAN, C. et al. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. **The Journal of physiology**, v. 572, n. 1, p. 97-108, 2006.
42. GUZMÁN, Carolina et al. Maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation negatively affects follicular ovarian development and steroidogenesis in the prepubertal rat offspring. **Archives of medical research**, v. 45, n. 4, p. 294-300, 2014.
43. HOFMAN, Paul L. et al. Insulin resistance in short children with intrauterine growth retardation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 2, p. 402-406, 1997.
44. HOLZENBERGER, Martin. The GH/IGF-I axis and longevity. **European Journal of Endocrinology**, v. 151, n. Suppl_1, p. S23-S27, 2004.
45. HOWIE, G. J.; SLOBODA, D. M.; VICKERS, M. H. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 2, p. 298-307, 2012.
46. IBANEZ, L.; DE ZEGHER, Francis. Puberty after prenatal growth restraint. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 65, n. Suppl. 3, p. 112-115, 2006.
47. KALICH-PHILOSOPH, Lital et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. **Science translational medicine**, v. 5, n. 185, p. 185ra62-185ra62, 2013.

48. KASEVA, Nina et al. Diet and nutrient intake in young adults born preterm at very low birth weight. **The Journal of pediatrics**, v. 163, n. 1, p. 43-48, 2013.
49. KIESS, Wieland; BLUM, Werner F.; AUBERT, Michel. Leptin, puberty and reproductive function: lessons from animal studies and observations in humans. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 26-9, 1998.
50. LANE, Robert H. et al. Uteroplacental insufficiency alters hepatic fatty acid-metabolizing enzymes in juvenile and adult rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 1, p. R183-R190, 2001.
51. LAW, C. M. et al. Fetal, infant, and childhood growth and adult blood pressure: a longitudinal study from birth to 22 years of age. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1088-1092, 2002.
52. LEA, Richard G. et al. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. **Reproduction**, v. 131, n. 1, p. 113-124, 2006.
53. LEVENSON, Cathy W.; RICH, Nicholas J. Eat less, live longer? New insights into the role of caloric restriction in the brain. **Nutrition reviews**, v. 65, n. 9, p. 412-415, 2007.
54. LI, Li et al. Caloric restriction promotes the reproductive capacity of female rats via modulating the level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1). **General and comparative endocrinology**, v. 174, n. 2, p. 232-237, 2011.
55. LI, Liaoliao; WANG, Zhi; ZUO, Zhiyi. Chronic intermittent fasting improves cognitive functions and brain structures in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66069, 2013.
56. LUSSANA, Federico et al. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 6, p. 1648-1652, 2008.
57. MALO, Elina et al. Plasma lipid levels and body weight altered by intrauterine growth restriction and postnatal fructose diet in adult rats. **Pediatric research**, v. 73, n. 2, p. 155, 2013.
58. MASORO, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. **Mech Ageing Dev**, v.126, n.9, p.913-22, Sep., 2005.

59. MATTISON, J. A. et al. Studies of aging in Ames dwarf mice: effects of caloric restriction. **Journal of the American Aging Association**, v. 23, n. 1, p. 9-16, 2000.
60. MATTSON, Mark P. The impact of dietary energy intake on cognitive aging. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 2, p. 5, 2010.
61. MCGEE, Elizabeth A.; HSUEH, Aaron JW. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 2, p. 200-214, 2000.
62. CURY, L. et al. Influence of protein-calorie malnutrition on reproductive performance of young and mature rats. **Growth, development, and aging: GDA**, v. 53, n. 4, p. 141-144, 1989.
63. MOREIRA, F. et al. Leptin and mitogen-activated protein kinase (MAPK) in oocytes of sows and gilts. **Animal reproduction science**, v. 139, n. 1-4, p. 89-94, 2013.
64. MULAY, S.; VARMA, D. R.; SOLOMON, S. Influence of protein deficiency in rats on hormonal status and cytoplasmic glucocorticoid receptors in maternal and fetal tissues. **Journal of Endocrinology**, v. 95, n. 1, p. 49-58, 1982.
65. MURAKAMI, Shin. Stress resistance in long-lived mouse models. **Experimental gerontology**, v. 41, n. 10, p. 1014-1019, 2006.
66. NAVOT, Daniel et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. **The Lancet**, v. 337, n. 8754, p. 1375-1377, 1991.
67. NAYER, R. L. Teenaged and preteenaged pregnancies. Consequences of fetal maternal competition for nutrient. **Pediatrics**, v.67, p.146–50, 1981.
68. NTEEBA, J. et al. High fat diet induced obesity alters ovarian phosphatidylinositol-3 kinase signaling gene expression. **Reproductive toxicology**, v. 42, p. 68-77, 2013.
69. OSMOND, C. et al. Early growth and death from cardiovascular disease in women. **Bmj**, v. 307, n. 6918, p. 1519-1524, 1993.
70. PARENT, Anne-Simone et al. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. **Endocrine reviews**, v. 24, n. 5, p. 668-693, 2003.
71. PAUL, Alison A.; MULLER, E. M.; WHITEHEAD, Roger G. The quantitative effects of maternal dietary energy intake on pregnancy and lactation in rural

- Gambian women. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 6, p. 686-692, 1979.
72. PERÄLÄ, Mia-Maria et al. Body size at birth is associated with food and nutrient intake in adulthood. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46139, 2012.
 73. PILGAARD, Kasper et al. Differential nongenetic impact of birth weight versus third-trimester growth velocity on glucose metabolism and magnetic resonance imaging abdominal obesity in young healthy twins. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 9, p. 2835-2843, 2011.
 74. QASEM, Rani J. et al. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation alters central leptin signalling, increases food intake, and decreases bone mass in 1 year old rat offspring. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 4, p. 494-502, 2016.
 75. RAVELLI, Anita CJ et al. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 5, p. 811-816, 1999.
 76. RAVELLI, Anita CJ et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **The Lancet**, v. 351, n. 9097, p. 173-177, 1998.
 77. REDDY, Pradeep et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, n. 5863, p. 611-613, 2008.
 78. RICHARDSON, SANDRA J.; SENIKAS, VYTA; NELSON, James F. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 65, n. 6, p. 1231-1237, 1987.
 79. RINAUDO, Paolo; WANG, Erica. Fetal programming and metabolic syndrome. **Annual review of physiology**, v. 74, p. 107-130, 2012.
 80. ROSEBOOM, Tessa J. et al. Adult survival after prenatal exposure to the Dutch famine 1944–45. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 15, n. 3, p. 220-225, 2001.
 81. ROSEBOOM, Tessa; DE ROOIJ, Susanne; PAINTER, Rebecca. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. **Early human development**, v. 82, n. 8, p. 485-491, 2006.

82. SACCON, Tatiana D. et al. Ovarian aging and the activation of the primordial follicle reserve in the long-lived Ames dwarf and the short-lived bGH transgenic mice. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 455, p. 23-32, 2017.
83. MARTINS, MarDGI; SOUSA, MDS. Gravidez na adolescência e fatores associados com baixo peso ao nascer. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 5, p. 224-31, 2008.
84. SCHNEIDER, Augusto et al. Ovarian transcriptome associated with reproductive senescence in the long-living Ames dwarf mice. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 439, p. 328-336, 2017.
85. SCHNEIDER, Augusto et al. Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. **Journal of ovarian research**, v. 7, n. 1, p. 120, 2014.
86. SILVEIRA, Patrícia P. et al. Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype. **Pediatric research**, v. 71, n. 3, p. 293, 2012.
87. SILVEIRA, Simone da Luz. Programação metabólica: estudo de parâmetros indicadores de resistência à insulina e espécies reativas de oxigênio em ratos. 2010.
88. SKAZNIK-WIKIEL, Malgorzata E. et al. High-fat diet causes subfertility and compromised ovarian function independent of obesity in mice. **Biology of reproduction**, v. 94, n. 5, p. 108, 1-10, 2016.
89. Smith, P., Wilhelm, D. & Rodgers, R. J. Development of mammalian ovary. **J Endocrinol** 221, R145–161, 2014.
90. SLOBODA, Deborah M. et al. Age at menarche: influences of prenatal and postnatal growth. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 1, p. 46-50, 2007.
91. SLOBODA, Deborah M. et al. Pre-and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. e6744, 2009.
92. Speakman, J.R.; Mitchell, S.E. Caloric restriction. **Mol Aspects Med**, v.32, n.3, p.159-221, Jun, 2011.
93. STONE, Vinícius et al. Food restriction during pregnancy alters brain's antioxidant network in dams and their offspring. **Free radical research**, v. 50, n. 5, p. 530-541, 2016.

94. SUN, Liou et al. Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 64, n. 7, p. 711-722, 2009.
95. SYMONDS, Michael E. Integration of physiological and molecular mechanisms of the developmental origins of adult disease: new concepts and insights. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, n. 3, p. 442-450, 2007.
96. SYMONDS, Michael E. et al. Nutritional programming of the metabolic syndrome. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 11, p. 604, 2009.
97. SZOSTACZUK, N. et al. Oral leptin supplementation throughout lactation in rats prevents later metabolic alterations caused by gestational calorie restriction. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 3, p. 360, 2017.
98. TE VELDE, E. R. et al. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 145, n. 1-2, p. 67-73, 1998.
TREFF, Nathan R. et al. Next generation sequencing-based comprehensive chromosome screening in mouse polar bodies, oocytes, and embryos. **Biology of reproduction**, v. 94, n. 4, p. 76, 1-11, 2016.
99. TONKISS, John et al. Prenatal protein malnutrition alters response to reward in adult rats. **Physiology & behavior**, v. 48, n. 5, p. 675-680, 1990.
100. TOSH, Durgadatta et al. Mutational analysis of the FIGLA gene in women with idiopathic premature ovarian failure. **Menopause**, v. 22, n. 5, p. 520-526, 2015.
101. VICKERS, Mark H. Developmental programming of the metabolic syndrome-critical windows for intervention. **World journal of diabetes**, v. 2, n. 9, p. 137, 2011.
102. VUCETIC, Zivjena et al. Early life protein restriction alters dopamine circuitry. **Neuroscience**, v. 168, n. 2, p. 359-370, 2010.
103. XIANG, Yanfang et al. Calorie restriction increases primordial follicle reserve in mature female chemotherapy-treated rats. **Gene**, v. 493, n. 1, p. 77-82, 2012.
104. ZHAO, Han et al. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. **The American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 6, p. 1342-1348, 2008.
105. ZUCKERMAN, Barry et al. Neonatal outcome: Is adolescent pregnancy a risk factor?. **Pediatrics**, v. 71, n. 4, p. 489-493, 1983.

106. WANDJI, Serge-Alain et al. Expression of mouse ovarian insulin growth factor system components during follicular development and atresia. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 5205-5214, 1998.