

---

JULIANA SILVA ROCHA

EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA BRANDA  
SOBRE A REPRODUÇÃO EM CAMUNDONGOS COM  
ALTERAÇÕES NO EIXO SOMATOTRÓFICO

Belo Horizonte  
Minas Gerais  
2006

---

JULIANA SILVA ROCHA

EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA BRANDA  
SOBRE A REPRODUÇÃO EM CAMUNDONGOS COM  
ALTERAÇÕES NO EIXO SOMATOTRÓFICO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências (Biologia Celular)

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG  
Setembro de 2006

---

**“Efeitos da restrição calórica branda sobre a reprodução em camundongos com alterações no eixo somatotrófico”**

**Tese defendida em:** 28 de Setembro de 2006

**Resultado:**

**Banca Examinadora:**

---

Esta tese foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, sob a orientação do **Prof. Dr. Luiz Renato de França**; e no Geriatrics Lab, Department of Internal Medicine, Southern Illinois University, School of Medicine, Springfield, IL, USA, sob a co-orientação do **Prof. Dr. Andrzej Bartke**; tendo o auxílio das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de bolsas PROF e PDEE

National Institute on Aging (AG 19899)

Southern Illinois University Geriatrics Medicine and Research Initiative

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

---

À minha mãe Marinete Vilela Silva Rocha...  
... agradeço por tudo.

À minha avó Maria Firmo Vilela...  
e às minhas tias Maria Aparecida Silva Pereira e Ana Maria Vilela Silva ...  
... por serem o melhor presente que Deus me deu.

À minha grande “amiga-irmã” Renata Rodrigues Santos Fontes...  
e suas filhas Clara e Júlia (minha afilhada)...  
... por me amarem assim, e por entenderem a minha ausência,  
dedico esta tese a vocês.

Ao meu querido avô Admides Anastácio Silva...  
e ao meu querido amigo Jomar Alessandro Almeida Tosatti...  
... a lembrança de vocês nunca se apagará,  
nos veremos qualquer dia!

---

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, “pelo cuidado e amor ao dirigir meu ser”. E a toda a minha família... tinha que ser vocês mesmo!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luiz Renato de França**, pela excelente orientação, com muita competência, profissionalismo e amizade, mas principalmente pela confiança depositada em mim, ao oferecer a imensa oportunidade de crescimento profissional e pessoal de desenvolver experimentos fora do país.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Andrzej Bartke**, pela excelente co-orientação, plena de competência, profissionalismo e amizade, e pela grande honra de desenvolver experimentos em seu laboratório e ter a oportunidade de conviver com um exemplo de cientista e ser humano, de uma humildade inacreditável.

Ao colega de laboratório e “irmão” **Michael Bonkowski**, doutorando em Farmacologia, por me “carregar no colo” no meu início nos EUA, por me ensinar quase tudo sobre como cuidar de camundongos e pelas frutíferas colaborações.

Ao futuro **Dr. Kevin Lin** (Farmacologia-SIU), pela imensurável ajuda ao longo tempo em que estive nos EUA, principalmente com o RT-PCR, e por apoiar e acreditar em mim quando nem eu mesma acreditei.

Aos colegas de laboratório **José Rafael Miranda** e **Marcelo de Castro Leal**, agradeço à **Gleide Fernandes de Avelar** pelo apoio e amizade de tantos anos, e até ir pagar minha matrícula quando eu estava fora, o que fez também **Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda**. A **Edson Rabelo Cardoso**, meu sincero agradecimento. E à toda a “nova geração” do Laboratório de Biologia Celular: **Sérgio Ricardo Batlouni**, **Dirceu Antônio Cordeiro Junior**, **Jaqueline Melo Soares**, **Robson Campos Silva**, **Ana Luiza Alvarenga Drumond**, **Érika Ramos de Alvarenga**, **Leonardo Santos Bordoni**, **Sarah Alves Auharek**, **Amanda Ferreira Gonçalves Alves**, **Caroline Silva Passos Homem**, **Daniel Alves Freitas**, **Fernando de Moura Resende**, **Guilherme Mattos Jardim Costa**, **Luiz Henrique de Castro Assis**, **Rafael Pezzuti Dias**, **Stella Maris Campos Silva**, **Adriano Moreira Ferreira** e **Mara Livia dos Santos**. Parabéns pela competência e obrigada pela amizade!

---

Aos colegas de laboratório nos EUA: **Jacob Panici**, pela manutenção da colônia; **Drs. Michal Masternak** e **Khalid Al-Regaiey** por tirar algumas dúvidas de técnicas laboratoriais; e **Marty Wilson**, pela assistência logística.

Às coordenadoras do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular ao longo do meu curso de doutorado: **Walderez Ornelas Dutra** e **Annamaria Ravara Vago**, pela competência e pela compreensão neste trajeto; e à secretária do curso **Iraídes Silva de Jesus** pelo trabalho competente e pela amizade.

Às minhas queridas amigas **Ann-Marie Bays** e **Maria Christofilakos**, que tanto acrescentaram à minha vida, e a todos os amigos de Springfield.

Aos grandes professores **Dr. Supriya Ganguli** e **Dr. Varadaraj Chandrashekar** (ambos *in memoriam*), com quem tive a honra de conviver um pouquinho, meu respeito e admiração.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, dedico meus sinceros agradecimentos.

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AL-** latim - *ad libitum*

**AR-** receptor de andrógeno

**AROM-** aromatase ou Cyp19a1, pertencente à família do citocromo P450

**bGH-** "*bovine growth hormone*"- hormônio de crescimento bovino

**CR-** "*calorie restriction*"

**CYP17-** uma única enzima com dupla função: 17 $\alpha$ -hidroxilase e C<sub>17,20</sub>liase, também chamada de P450c17, pertencente à família do citocromo P450

**Df-** "*dwarf*"- anões homocigotos da linhagem Ames

**ELISA-** "*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*"

**ESR-** receptor de estrógeno

**FSH-** hormônio folículo-estimulante

**FSHR-** receptor de FSH

**GHBP-** proteínas de ligação ao GH

**GH-** "*growth hormone*"- hormônio de crescimento

**GHR-** receptor de GH

**GHRH-** hormônio de liberação do hormônio de crescimento

**GHR-KO-** camundongos "*knockout*" (com deleção) para o gene do receptor de GH e de GHBP's



---

**GnRH-** hormônio de liberação de gonadotrofina

**HPG-** eixo hipotálamo-hipófise-gônada

**HSD3-** “*3-β-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase*”

**ICR-** “*International Cancer Research*” - linhagem de camundongos desenvolvida neste instituto, famosa pela eficiência reprodutiva

**IGF-I = IGF1-** “*insulin-like growth factor*”- fator de crescimento semelhante à insulina-I

**IGS-** índice gonadossomático (peso da gônada / peso corporal x 100)

**KO-** camundongos homocigotos mutantes da linhagem GHR-KO utilizados neste estudo

**LH-** hormônio luteinizante

**mSTa1-** sulfotransferase de camundongo

**MT-bGH-** camundongos que superexpressam bGH sob o promotor metalotioneína 1 de camundongo (mMT)

**PEPCK-bGH-** camundongos que superexpressam bGH sob o promotor fosfoenol piruvato carboxinase de rato (rPEPCK)

**PGC-1α-** “*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha*”-

**Real time RT-PCR-** “*real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction*”

**RIA-** Radioimunoanálise

**Tg-** camundongos transgênicos, no caso deste estudo pertencentes às linhagens MT-bGH e PEPCK-bGH

**SIRT1-** da família das “*sirtuins*”, trata-se do homólogo presente em mamíferos do Sir2 (“*silencing information regulator 2*”) descrito em animais inferiores

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Características das linhagens de camundongos utilizadas .....	42
<b>Tabela 2-</b> Iniciadores utilizados no RT-PCR .....	43
<b>Tabela 3-</b> Efeitos da CR de 10 e 20% sobre a fertilidade .....	44
<b>Tabela 4-</b> Efeitos da CR de 10 e 20% sobre o peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos em machos normais .....	45
<b>Tabela 5-</b> Efeitos da CR de 20% sobre o peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos na linhagem Ames .....	46
<b>Tabela 6-</b> Efeitos da CR de 20% sobre o peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos na linhagem GHR-KO, Experimento 2 .....	47
<b>Tabela 7-</b> Efeitos da CR de 20% sobre o peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos na linhagem MT-bGH .....	48
<b>Tabela 8-</b> Efeitos da CR de 20% sobre o peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos na linhagem GHR-KO, Experimento 3 .....	49
<b>Tabela 9-</b> Efeitos da CR de 20% sobre o peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos na linhagem PEPCK-bGH .....	50

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Curvas de crescimento .....	51
<b>Figura 2-</b> Efeitos da CR de 10 e 20% sobre os níveis plasmáticos de glicose com e sem jejum em camundongos normais .....	54
<b>Figura 3-</b> Efeitos da CR sobre o peso das gônadas e IGS .....	56
<b>Figura 4-</b> Efeitos da CR sobre o peso das glândulas sexuais acessórias .....	59
<b>Figura 5-</b> Efeitos da CR de 20% sobre o peso do útero .....	61
<b>Figura 6-</b> Efeitos da CR sobre os níveis de testosterona em homogeneizado testicular .	63
<b>Figura 7-</b> Efeitos da CR sobre a expressão hepática dos genes <i>IGF1</i> , <i>PGC-1<math>\alpha</math></i> e <i>SIRT1</i> .	65
<b>Figura 8-</b> Efeitos da CR sobre a expressão de mRNA para <i>mSt<math>\alpha</math>1</i> no fígado .....	68
<b>Figura 9-</b> Efeitos da CR sobre a expressão dos genes <i>IGF1</i> e <i>AROM</i> nos testículos ....	71
<b>Figura 10-</b> Efeitos da CR sobre a expressão dos genes <i>HSD3</i> e <i>CYP17</i> nos testículos .	73
<b>Figura 11-</b> Efeitos da CR sobre a expressão dos genes <i>AR</i> , <i>LHR</i> e <i>FSHR</i> nos testículos .....	75
<b>Figura 12-</b> Efeitos da CR e 20% sobre a expressão dos genes <i>LHR</i> , <i>FSHR</i> e <i>IGF1</i> nos ovários .....	77
<b>Figura 13-</b> Efeitos da CR sobre a expressão de mRNA para <i>AR</i> nas vesículas seminais .....	79
<b>Figura 14-</b> Efeitos da CR de 20% sobre a expressão de mRNA para <i>ESR</i> no útero .....	81
<b>Figura 15-</b> Esteroidogênese nas células de Leydig .....	83

---

## SUMÁRIO

<b>1- Resumo</b> .....	01
<b>2- Abstract</b> .....	02
<b>3- Introdução</b> .....	03
<b>3.1- O eixo somatotrófico</b> .....	03
<b>3.2- Modelos de camundongos com alterações no eixo somatotrófico</b> .....	03
<b>3.3- Eixo hipotálamo-hipófise-gônada vs. eixo somatotrófico</b> .....	05
<b>3.4- A restrição calórica</b> .....	06
<b>4- Objetivos</b> .....	09
<b>4.1- Objetivo geral</b> .....	09
<b>4.2- Objetivos específicos</b> .....	09
<b>5- Material e Métodos</b> .....	10
<b>5.1- Animais</b> .....	10
<b>5.2- Grupos experimentais</b> .....	11
<b>5.2.1- Experimento 1- CR de 10 e 20% em idade avançada</b> .....	11
<b>5.2.2- Experimento 2- CR de 20% em idade avançada</b> .....	11
<b>5.2.3- Experimento 3- CR de 20% em idade jovem</b> .....	12
<b>5.3- Glicemia com e sem jejum</b> .....	13
<b>5.4- Teste de fertilidade</b> .....	13
<b>5.5- Coleta de tecidos</b> .....	13
<b>5.6- Parâmetros plasmáticos</b> .....	14
<b>5.7- Homogeneização do testículo</b> .....	14
<b>5.8- Radioimunoanálise do homogeneizado testicular</b> .....	15
<b>5.9- Extração de RNA</b> .....	15
<b>5.10- Produção de cDNA</b> .....	15
<b>5.11- RT-PCR</b> .....	16
<b>5.12- Análise estatística</b> .....	16

---

<b>6- Resultados</b> .....	17
<b>6.1-</b> Efeitos da CR sobre a fertilidade .....	17
<b>6.2-</b> Efeitos da CR sobre a glicemia com e sem jejum .....	18
<b>6.3-</b> Efeitos da CR sobre o peso corporal .....	19
<b>6.4-</b> Efeitos da CR sobre o peso dos órgãos reprodutivos .....	19
<b>6.5-</b> Efeitos da CR sobre os parâmetros plasmáticos .....	21
<b>6.6-</b> Efeitos da CR sobre os níveis de testosterona nos testículos .....	23
<b>6.7-</b> Efeitos da CR sobre a expressão gênica no fígado .....	23
<b>6.8-</b> Efeitos da CR sobre a expressão gênica nos órgãos reprodutivos .....	25
<b>7- Discussão</b> .....	28
<b>7.1-</b> Efeitos da CR sobre a fertilidade .....	28
<b>7.2-</b> Efeitos da CR sobre a glicemia com e sem jejum .....	29
<b>7.3-</b> Efeitos da CR sobre o peso corporal .....	29
<b>7.4-</b> Efeitos da CR sobre o peso dos órgãos reprodutivos .....	30
<b>7.5-</b> Efeitos da CR sobre os parâmetros plasmáticos .....	30
<b>7.6-</b> Efeitos da CR sobre os níveis de testosterona nos testículos .....	33
<b>7.7-</b> Efeitos da CR sobre a expressão gênica no fígado .....	33
<b>7.8-</b> Efeitos da CR sobre a expressão gênica nos órgãos reprodutivos .....	36
<b>8- Conclusões</b> .....	40
<b>9- Tabelas</b> .....	42
<b>10- Figuras</b> .....	51
<b>11- Referências Bibliográficas</b> .....	85

---

## 1- RESUMO

O eixo somatotrófico, o eixo hipotálamo-hipófise-gônada e o estado nutricional estão fortemente interrelacionados em mamíferos. A restrição calórica (CR) prolonga a vida, mas geralmente com um custo para a reprodução. É interessante notar que muitas das características fisiológicas de animais com interrupção no eixo somatotrófico são comuns a animais submetidos à CR. O nível de CR aplicado na maioria dos estudos é de 30 a 60%. O presente estudo testou se uma CR branda, de 20%, ou até mesmo de 10% (esta última aplicada em um grupo de camundongos normais), conseguiria trazer benefícios para a saúde sem inibir a reprodução em 4 linhagens de camundongos que apresentam alterações no eixo somatotrófico: os anões Ames (deficientes em GH), os GHR-KO (deficientes em receptor para GH), e dois transgênicos, os PEPCK-bGH e os MT-bGH (camundongos que superexpressam GH bovino), bem como os animais normais. A fertilidade não foi alterada pela CR em quaisquer dos grupos examinados. A CR branda, de modo geral: não afetou o peso corporal final ou o peso relativo dos órgãos reprodutivos; não alterou os níveis plasmáticos de glicose, insulina, IGF-I, testosterona, progesterona ou estradiol; também não alterou os níveis de testosterona em homogeneizado testicular; não influenciou a expressão hepática de genes relacionados com longevidade; e teve efeito leve sobre alguns genes dos órgãos reprodutivos. As alterações no eixo somatotrófico destes camundongos sim, tiveram profundo impacto sobre os parâmetros analisados. Este estudo preliminar encoraja a especulação de que regimes de restrição calórica branda podem trazer benefícios para a saúde e longevidade sem os “custos” para o potencial reprodutivo.

---

## 2- ABSTRACT

The somatotropic axis, the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and the nutritional status are deeply interrelated in mammals. Calorie restriction (CR) prolongs lifespan, but usually at some cost to reproduction. Interestingly, many of the physiological characteristics of animals with interruption in the somatotropic axis are shared by CR animals. The level of CR in most studies is 30 to 60%. We tested if a milder CR, of 20% (or even 10%, in this case applied to one group of normal animals) would promote health benefits without inhibiting reproduction in 4 types of mice with altered somatotropic axis: Ames dwarfs, GHR-KO, and PEPCK-bGH and MT-bGH transgenics, as well as their wild-type counterparts. Fertility was not altered by CR in any of the examined groups. Mild CR did not affect final body weight or relative reproductive organ weights; did not alter plasma levels of glucose, insulin, IGF-I, testosterone, progesterone or estradiol; did not impact testicular testosterone levels; did not influence hepatic expression of genes related to longevity; and had little effect on expression of selected genes in the reproductive organs. Altered activity of the somatotropic axis in the mice studied had a major impact on the parameters analysed. This preliminary study encourages speculation that mild regimens of CR can produce health and longevity benefits without the “costs” of impaired reproductive potential.

---

## 3- INTRODUÇÃO

### 3.1- O eixo somatotrófico

O hormônio de crescimento (“*growth hormone*” - GH) tem efeito generalizado no organismo e está relacionado com aumento do metabolismo celular. Sua secreção é controlada principalmente por dois neuropeptídeos hipotalâmicos: o fator de liberação de GH (“*GH-releasing hormone*” - GHRH) e a somatostatina, os quais estimulam ou inibem a síntese e liberação do GH pelas células somatotróficas da adenoipófise. Receptores para GH (GHR) são encontrados em vários locais do corpo, como por exemplo no hipotálamo e em outras regiões cerebrais (Nyberg e Burman, 1996) e nos testículos, incluindo as células de Sertoli e de Leydig (Lobie et al., 1990). Entretanto, sua atuação se dá na maioria das vezes de modo indireto, através do estímulo à produção de somatomedinas ou fatores de crescimento, sendo o principal representante o fator de crescimento semelhante à insulina-I (“*insulin-like growth factor*” = IGF-I). Este hormônio estimula a taxa de mitoses em várias células-alvo e é produzido em larga escala pelo fígado e lançado na circulação sanguínea, agindo assim de forma endócrina, ou pode também ser produzido nos órgãos-alvo do GH, agindo, neste caso, de forma parácrina ou autócrina (Le Roith et al., 2001). Uma gama de fatores pode influenciar a secreção de GHRH e somatostatina, estes incluem neurotransmissores, outros neuropeptídeos hipotalâmicos, e a retroalimentação pelo IGF-I e o GH. Além disso, a grelina também tem ação comprovada na indução da secreção de GH pelas células somatotróficas (Kojima et al., 2001).

### 3.2- Modelos de camundongos com alterações no eixo somatotrófico

A ausência da ação do GH, causada tanto pela deficiência na sua produção como pela ausência de receptores funcionais para GH, resulta em uma grande redução no tamanho corporal e um aumento no tempo de vida em roedores. Duas linhagens de camundongos refletem estas condições descritas: os anões Ames (Schaible e Gowen, 1961) e os animais “*knockout*” para receptor de GH (GHR-KO) (Zhou et al., 1997). Os primeiros apresentam uma mutação recessiva no gene *Prop 1*, o que leva à não diferenciação de três tipos celulares na adenohipófise: as células somatotróficas, as tireotróficas e as lactotróficas. Devido à ausência destas células nos camundongos Ames homozigotos, não há a produção de hormônio de crescimento, hormônio tireotrófico e prolactina, respectivamente (Sornson et al., 1996). Os camundongos anões Ames apresentam ao nascer tamanho corporal equivalente aos camundongos normais, já que o GH não é essencial para o



---

crescimento durante a vida intra-uterina (Le Roith et al., 2001). Entretanto, após o nascimento, os animais homozigotos para a mutação têm crescimento retardado, já que o crescimento corpóreo passa a depender de produção de GH, e, aos 14 dias, já é possível se distinguir os anões dos normais. Os camundongos anões Ames adultos pesam aproximadamente a do peso de um camundongo normal. A deficiência em GH leva estes mutantes a apresentarem níveis baixíssimos de IGF-I no plasma (Chandrashekar e Bartke, 1993) e tempo de vida prolongado (35 a 75%; Brown-Borg et al., 1996; Flurkey et al., 2001), com retardo no aparecimento de doenças neoplásicas (Ikeno et al., 2003). A deficiência em prolactina leva à falência do corpo lúteo e conseqüente esterilidade nas fêmeas (Bartke, 1965). Os machos são reprodutivamente competentes, embora sua performance seja menor do que a observada para os animais normais. Já os camundongos GHR-KO, apesar de produzirem GH, exibem resistência ao mesmo por não possuírem receptores para este hormônio. Esta ausência de receptor para GH se deve à uma deleção (“*knockout*”) do gene que codifica para o mesmo. Conseqüentemente, estes animais apresentam baixos níveis séricos de IGF-I, tamanho reduzido quando adulto e aumento significativo no tempo de vida (40 a 55%; Coschigano et al., 2000, 2003; Bartke et al., 2001a). Tanto os machos quanto as fêmeas desta linhagem possuem competência reprodutiva, porém, a puberdade é tardia (Zhou et al., 1997; Danilovich et al., 1999) e vários parâmetros indicadores da função testicular e ovariana estão reduzidos (Chandrashekar et al., 1999; Danilovich et al., 1999; Chandrashekar et al., 2001). Os resultados obtidos com a terapia de reposição de IGF-I sugerem que pelo menos parte dos deficits no desenvolvimento e funcionamento do sistema reprodutivo destes mutantes se deve à deficiência de IGF-I circulante (Danilovich et al., 1999).

Por outro lado, a superprodução de GH, observada em camundongos transgênicos (Tg), resulta em altos níveis de IGF-I, considerável aumento no tamanho corporal adulto e tempo de vida bastante reduzido (Wolf et al., 1993; Cecim et al., 1994; Bartke, 2003). Estas características são vistas nos dois modelos utilizados para este estudo: os camundongos Tg MT-bGH (Palmiter et al., 1982) e os Tg PEPCK-bGH (McGrane et al., 1988). Ambos superexpressam GH bovino (bGH) quando apresentam o gene para bGH em homozigose, sob diferentes promotores no fígado: a metalotioneína 1 de camundongo (mMT) no primeiro e a fosfoenol piruvato carboxinase de rato (rPEPCK) no segundo modelo. Apesar da maturação sexual nestes animais ser acelerada, deficits reprodutivos e vida reprodutiva mais curta são observados em ambos os sexos (Bartke et al., 1988; Naar et al., 1991; Cecim et al., 1995a; Cecim et al., 1995b; Bartke et al., 1999; Bartke, 2000). Um resumo de todos os modelos supracitados encontra-se na TAB. 1.

### **3.3- Eixo hipotálamo-hipófise-gônada vs. eixo somatotrófico**

O eixo hipotálamo-hipófise-gônada (“*hypothalamic-pituitary-gonadal*” - HPG), à semelhança do eixo somatotrófico, também tem o hipotálamo como seu centro controlador. O hormônio de liberação de gonadotrofina (GnRH), produzido naquela região cerebral, atinge o

---

sistema porta-hipofisário e então a adenohipófise, promovendo a síntese e liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo-estimulante (FSH) pelas células gonadotróficas. As gônadas são os órgãos-alvo do LH e do FSH, e os hormônios esteróides produzidos por elas em resposta a esse estímulo exercem “*feedback*” negativo a nível da hipófise e do hipotálamo. Há evidências da relação entre o eixo somatotrófico e o eixo HPG (revisões em Chandrashekar e Bartke, 2003; Chandrashekar et al., 2004; Sirotkin, 2005). O GH e o principal mediador da sua ação, o IGF-I, podem exercer efeitos diretos e indiretos sobre a atividade gonadal, sendo esta ação particularmente evidente durante a maturação sexual (Adashi et al., 1985). Foram encontradas evidências indiretas, porém bastante convincentes, de que o IGF-I representa um importante sinal para a puberdade (Hiney et al., 1996; Danilovich et al., 1999). Os resultados destes estudos sugerem que o IGF-I age transmitindo informações sobre o estado nutricional e o crescimento somático para os centros hipotalâmicos que controlam a reprodução. Estudos *in vivo*, utilizando injeções de IGF-I no terceiro ventrículo de ratos sexualmente imaturos, demonstraram que o IGF-I é capaz de promover a liberação de LH, via ativação de GnRH, adiantando a puberdade nestes animais (Hiney et al., 1996). Adicionalmente, Childs e colaboradores (2000) observaram algumas células na hipófise de ratos que expressavam concomitantemente mRNA para gonadotrofinas e GH. Estas células não só expressavam mRNA para estes hormônios, como também secretavam os mesmos, além de possuírem receptores para GnRH e GHRH (ver também Childs, 2000).

A deficiência de GH ou a resistência ao mesmo, bem como o excesso deste hormônio, interferem no desenvolvimento e funcionamento do sistema reprodutivo no homem e em animais experimentais de ambos os sexos (Strobl e Thomas, 1994; Bartke, 2000). Estudos em pacientes com deficiência congênita de GH ou resistência ao GH (Rosenfeld et al., 1994) e em camundongos mutantes com deficiência de GH (Chubb, 1987; Barlett et al., 1990), indicaram que a maioria dos machos era fértil. No entanto, estes animais apresentavam vários problemas reprodutivos, incluindo puberdade tardia, sub-desenvolvimento do sistema reprodutor (inclusive genitália externa) e libido reduzida. Segundo Bartke (2000), o GH não é um requerimento absoluto para a fertilidade dos machos, sendo no entanto importante para o controle da maturação sexual e das funções reprodutivas no adulto. O mesmo não se aplica ao IGF-I, pois sua ausência leva à falência na maturação sexual e à infertilidade em camundongos deficientes deste hormônio (Baker et al., 1996). Estas alterações ocorrem provavelmente devido à falta de produção de IGF-I dependente/independente de GH, ou devido ao papel vital que o IGF-I exerce durante o desenvolvimento inicial, ou ambos (Baker et al., 1996). Em estudos com camundongos fêmeas deficientes em receptor de GH, Danilovich e colaboradores (1999) concluíram que a resistência ao GH e a conseqüente redução nos níveis séricos de IGF-I estão associados com puberdade tardia, alterações no crescimento fetal e da placenta, atraso no parto e tamanho reduzido dos filhotes. Chandrashekar e colaboradores (2001) avaliaram a função endócrina testicular em camundongos deficientes para receptor de GH e observaram que os baixíssimos níveis plasmáticos de IGF-I nestes

---

animais estavam relacionados com uma diminuição no número de receptores para LH nas células de Leydig, e com uma baixa produção de testosterona em resposta a LH exógeno. Estes pesquisadores relataram também baixo peso testicular médio nos animais mutantes, sugerindo que o crescimento normal dos testículos requer quantidades fisiológicas de GH, receptores para GH e IGF-I. Cecim e colaboradores (1995a) investigaram os efeitos da superexpressão de GH em camundongos Tg fêmeas. Os autores observaram a ocorrência de maturação sexual acelerada, porém com baixa performance reprodutiva, evidenciada através de baixas taxas de acasalamento e prenhez. No entanto, os animais que acasalaram tiveram altas taxas de ovulação e as fêmeas que ficaram prenhes tiveram um número aumentado de implantações. Estes mesmos autores também observaram que resultados semelhantes foram obtidos em fêmeas normais que receberam injeções de bGH. A superexpressão de GH em camundongos Tg é geralmente compatível com a fertilidade nos machos mas pode levar a uma liberação anormal de gonadotrofinas, déficits no comportamento sexual, alterações patológicas nas glândulas sexuais acessórias, fertilidade reduzida e envelhecimento reprodutivo precoce (Bartke et al., 2003).

### **3.4- A restrição calórica**

Já está muito bem estabelecido que a restrição calórica (CR) retarda o envelhecimento prevenindo doenças relacionadas ao mesmo, bem como prolonga significativamente o tempo de vida em ratos e camundongos de laboratório (Weindruch e Sohal, 1997; Lane et al., 1999; Masoro, 2000, 2001). Efeitos similares também foram obtidos em cães (Kealy et al., 2002). Evidências ainda preliminares mostram que a CR pode ser benéfica até para primatas (Barger et al., 2003; Ingram et al., 2004; Roth et al., 2004), enquanto estudos envolvendo humanos apontam para uma melhora provocada pela CR em alguns marcadores do envelhecimento, como níveis periféricos de glicose e colesterol, bem como pressão sanguínea (Walford et al., 1992; Heilbronn e Havussin, 2003). Bordone e Guarente (2005) defenderam que “as mudanças fisiológicas provocadas pela CR contribuem para uma saúde mais robusta e provavelmente estas mesmas mudanças levam a uma maior longevidade”. Está também muito bem estabelecido que a CR tem um efeito deletério sobre a reprodução. A utilização da CR no momento do desmame ou logo após o mesmo não só reduz o crescimento corpóreo como retarda a maturação sexual (Holehan e Merry, 1985; Masoro, 2001), embora o período reprodutivo seja estendido (Holehan e Merry, 1985; McShane e Wise, 1996). Além disso, a frequência de partos e o tamanho da ninhada também são reduzidos pela CR (Holehan e Merry, 1985; Masoro, 2001). Essa inibição da função gonadal provocada pela CR é um importante ponto de debate quando se contempla a possibilidade do uso da CR ou de abordagens que simulam a CR para retardar o envelhecimento em humanos, além da

---

preocupação com o também relatado impacto negativo sobre os ossos, densidade mineral e outras características do esqueleto (Masoro, 2001; Roberts et al., 2001).

A interação entre CR e o eixo somatotrófico representa uma importante área de estudo visto que a supressão dos níveis periféricos de IGF-I é um achado constante nos animais submetidos a CR, podendo representar um dos mecanismos pelos quais a CR retarda o envelhecimento e prolonga a vida (Sonntag et al., 1999; Shimokawa et al., 2003). É interessante notar que muitas das características fisiológicas observadas em animais que têm interrupção no eixo somatotrófico são idênticas às observadas em animais sob CR, como a longevidade prolongada e a fertilidade reduzida. No entanto, a maioria dos estudos utiliza CR de 30 a 60% (Weindruch e Sohal, 1997). O presente estudo baseia-se na hipótese de que uma restrição branda, de apenas 20%, seria capaz de dissociar os efeitos sobre a saúde e a reprodução. Ou seja, o tratamento traria benefícios para a saúde sem comprometer a fertilidade dos animais submetidos à CR. E, para isto, foram utilizados camundongos pertencentes a diferentes linhagens, as quais apresentam alterações no eixo somatotrófico, a saber: anões Ames, GHR-KO, Tg MT-bGH e Tg PEPCK-bGH, além dos camundongos normais oriundos das mesmas ninhadas. A escolha de linhagens com alteração no eixo somatotrófico se deve justamente às semelhanças encontradas entre animais com interrupção no eixo somatotrófico e animais sob CR, na tentativa de se avaliar a possibilidade de um fator potencializar o outro, ou se agiriam de modos completamente independentes, bem como se a CR amenizaria as condições dos Tg. Portanto, foram levantadas hipóteses/perguntas alternativas, como por exemplo: 1) 20% CR seria capaz de reduzir os níveis de IGF-1?; 2) os animais normais sob 20% CR iriam se assemelhar aos animais com interrupção no eixo somatotrófico?; e 3) 20% CR seria benéfica para os animais transgênicos? Adicionalmente, foram avaliados os efeitos da CR de 10% e de 20% sobre um grupo de machos normais provenientes da nossa colônia.

Um estudo publicado recentemente veio reforçar a importância de se investigar estas linhagens supracitadas sob o efeito da CR: Bonkowski e colaboradores (2006) relataram os efeitos da CR de 30% sobre a longevidade em camundongos GHR-KO, complementando um outro estudo (Bartke et al., 2001a) acerca dos efeitos de 30% CR sobre longevidade em anões Ames. Interessantemente, 30% CR provou ser benéfica para a longevidade de Ames mas não para os mutantes GHR-KO.

---

## 5- MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1- Animais

Foram utilizadas quatro linhagens de camundongos (*Mus musculus*), reproduzidas e mantidas no biotério da Southern Illinois University: anões Ames (df/df) e normais (df/+ ou +/+) das mesmas ninhadas foram produzidos através do acasalamento de camundongos machos df/df com fêmeas df/+ ou pelo cruzamento de animais df/+; GHR-KO (-/-) e normais (+/- ou +/+) das mesmas ninhadas foram produzidos em nossa colônia a partir de animais gentilmente cedidos pelo Dr. J.J. Kopchick através do cruzamento de machos -/- com fêmeas +/- ou pelo acasalamento de animais heterozigotos; e duas linhagens de transgênicos (Tg) que superexpressam bGH e animais normais das mesmas ninhadas. Os transgênicos foram derivados de animais fundadores gentilmente cedidos por Dr. T.E. Wagner e J.S. Yun, estes animais foram produzidos por microinjeção em um zigoto do gene para bGH associado ao promotor PEPCK de rato na linhagem PEPCK-bGH e o MT de camundongo na linhagem MT-bGH, sendo as colônias mantidas acasalando-se machos Tg homozigotos com fêmeas normais híbridas C57BL/6 x C3H F1.

Todos os protocolos para a manutenção e manuseio dos animais utilizados neste estudo foram aprovados pelo “Southern Illinois University Laboratory Animal Care and Use Committee” e seguiam as instruções contidas no “NIH Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals”. Os animais foram mantidos em gaiolas contendo até 5 indivíduos de mesmo sexo/idade/fenótipo, sob temperatura ambiente de 22±2°C e 12 horas luz / 12 horas escuro. O acesso a água de torneira e ração formulada para roedores (Lab Diet 5001; não autoclavada; 23,4% proteína; 4,5% gordura; 5,8% fibras; PMI Nutrition International, Richmond IN-USA) foi ilimitado, exceto quando submetidos à CR. A restrição consistia em oferecer aos animais tratados 80% da quantidade de ração consumida pelo grupo controle (*ad libitum* = AL), observando-se equivalência de sexo, idade e fenótipo, A CR de 20% foi aplicada a quase todos os grupos experimentais, com exceção de um único grupo, constituído de machos normais, onde dois níveis de dieta foram aplicados: 20% e 10%. A quantidade de ração consumida pelos animais AL foi monitorada durante toda a duração do experimento, e os valores eram sempre atualizados. A ração era colocada nas gaiolas dos animais sob CR uma vez ao dia, entre 15:00 e 17:00h, pouco antes do período de escuro (18:00 às 06:00h), no qual os roedores são mais ativos. A restrição calórica foi aplicada durante todo o experimento, do início ao dia do sacrifício, e só foi suspensa durante o teste de fertilidade. Os animais foram observados diariamente e pesados semanalmente.

---

## **5.2- Grupos experimentais**

### **5.2.1- Experimento 1- CR de 10 e 20% em idade avançada**

Foram investigados numa primeira instância, os efeitos de dois níveis de CR branda, a saber, de 10 e 20% em camundongos machos normais provenientes da nossa colônia. O tratamento foi iniciado aos 8 meses de idade, permitindo portanto a análise dos efeitos da CR numa idade mais avançada. Após 4 meses de tratamento, os animais foram submetidos à medição dos níveis plasmáticos de glicose, sem jejum e após jejum de 12 horas (ver detalhes no tópico 5.3). Ao completar 8 meses de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de fertilidade (AL-n=5, CR 10%-n=7, CR 20%-n=5) (ver detalhes no tópico 5.4). Os animais foram sacrificados aos 20 meses de idade.

### **5.2.2- Experimento 2- CR de 20% em idade avançada**

Como ambos os níveis de CR branda produziram efeitos tênues sobre os vários parâmetros analisados, foi escolhido o nível de 20% CR para ser aplicado em camundongos também de idade avançada, pertencentes a linhagens que apresentam alteração no eixo somatotrófico.

**Grupo 1-** Anões Ames (Df) e N, machos e fêmeas foram submetidos a 20% CR iniciando-se aos 8 meses de idade. O teste de fertilidade (ver detalhes no tópico 5.4) foi realizado quando os animais tinham 11 meses (n=3 por fenótipo/dieta em machos, e n=5 por fenótipo/dieta em fêmeas). Os animais em estudo foram acasalados com animais normais AL da nossa colônia de Ames mas que não faziam parte do experimento de CR. Os animais foram sacrificados aos 14 meses de idade.

**Grupo 2-** Machos GHR-KO (KO) e N. A CR de 20% foi iniciada aos 7 meses de idade. Aos 11 meses de idade, os animais foram submetidos ao teste de fertilidade (ver detalhes no tópico 5.4), 3 machos seleccionados aleatoriamente de cada combinação fenótipo/dieta foram acasalados com fêmeas normais AL da nossa colônia de GHR-KO mas que não faziam parte do experimento de CR. Os animais foram sacrificados aos 13 meses de idade.

**Grupo 3-** Fêmeas GHR-KO (KO) e N foram submetidas a 20% CR aos 4 meses de idade. Aos 13 meses de idade as fêmeas foram submetidas ao teste de fertilidade (n=5 para N AL, N CR e KO CR; n=3 para KO AL) (ver detalhes no tópico 5.4) através do acasalamento destas com machos normais

---

AL da nossa colônia de GHR-KO mas que não faziam parte do experimento de CR. Os animais foram sacrificados aos 21 meses de idade.

**Grupo 4-** Machos e fêmeas MT-bGH Tg e N foram submetidos a 20% CR aos 8-9 meses de idade. Os animais deste grupo não foram submetidos ao teste de fertilidade. Os animais foram sacrificados aos 11-12 meses de idade.

### **5.2.3- Experimento 3- CR de 20% em idade jovem**

Com o objetivo de se avaliar se a CR de 20% teria um impacto maior ou menor quando aplicada em animais jovens, foram utilizados camundongos pertencentes a linhagens que apresentam alteração no eixo somatotrófico.

**Grupo 1-** GHR-KO (KO) e N, machos e fêmeas foram submetidos a 20% CR aos 2-3 meses de idade. Aos 6 meses de idade, machos (n=5 por subgrupo fenótipo/dieta) e fêmeas (N AL-n=5; N CR-n=5; KO AL-n=3; KO CR-n=2) foram acasalados (ver detalhes no tópico 5.4) com camundongos ICR (*“International Cancer Research”*) comprados do laboratório Harlan (Harlan Bioproducts for Science, Inc., Indianapolis IN-USA). Os animais foram sacrificados aos 8-9 meses de idade.

**Grupo 2-** Machos e fêmeas PEPCK-bGH Tg e N foram colocados sob dieta de 20% CR aos 3 meses de idade. Aos 7 meses de idade, foram submetidos ao teste de fertilidade (n=5 para machos N AL e N CR; n=4 para machos Tg AL e Tg CR, bem como fêmeas N AL e N CR; e n=3 para fêmeas Tg AL e Tg CR) (ver detalhes no tópico 5.4). Animais de ambos os sexos foram acasalados com camundongos ICR comprados do laboratório Harlan (Harlan Bioproducts for Science, Inc., Indianapolis IN-USA). Os animais foram sacrificados aos 11 meses de idade.

### **5.3- Glicemia com e sem jejum**

Os machos normais pertencentes ao experimento 1, após terem sido submetidos a CR de 10 e 20% por 4 meses, tiveram seus níveis plasmáticos de glicose (glicemia) medidos com e sem jejum. Com o auxílio de um estilete, a extremidade da cauda foi cortada, e a gota de sangue resultante foi lida com o auxílio de um glicosímetro (OneTouch Ultra Meter, LifeScan Inc., Milpitas CA-USA). As medições foram feitas em duplicatas por animal. No experimento sem jejum os animais foram testados aproximadamente às 09:00h, sem passar por qualquer alteração na sua alimentação habitual.

---

Na semana seguinte, aproximadamente no mesmo horário da manhã, os animais foram testados novamente, mas desta vez, eles haviam passado por um jejum de 12 horas. Toda a ração das gaiolas havia sido retirada na noite anterior (aproximadamente às 21:00h), tanto dos animais sob CR quanto dos AL. Cada indivíduo possuía uma marcação, tornando possível saber suas medições com e sem jejum, permitindo assim a análise estatística pelo teste *t* pareado, além da análise de variância (ANOVA).

#### **5.4- Teste de fertilidade**

Os animais foram colocados em grupos de três por gaiola, sendo um macho com duas fêmeas, sob as mesmas condições de luz e temperatura descritas anteriormente. Os animais foram mantidos assim por 14 dias. Durante este período, eles tiveram acesso livre a água e ração. As fêmeas eram checadas diariamente para a existência de tampões vaginais (indicativos do acasalamento) e ocorrência de prenhez. Após os 14 dias, os machos do experimento bem como as fêmeas vazias foram colocados de volta às condições experimentais originais. As fêmeas prenhes foram colocadas em gaiolas individuais e permaneceram alimentando-se à vontade até o nascimento da ninhada, quando então voltaram para as condições experimentais originais. O número de filhotes nascidos vivos foi anotado por fêmea. Os filhotes resultantes do teste de fertilidade, bem como os animais ICR comprados para o mesmo foram sacrificados após o teste de fertilidade.

#### **5.5- Coleta de tecidos**

Os animais foram sacrificados sempre no período da manhã e após 12 horas de jejum. Este é o procedimento padronizado no laboratório. Após anestesia com isoflurano (Aerrane, Baxter HealthCare Corporation, Deerfield IL-USA), os animais tiveram o sangue coletado por punção cardíaca e sacrificados através de deslocamento cervical. Em geral, foram coletados aproximadamente 500µl de sangue dos camungongos homozigotos recessivos das linhagens Ames e GHR-KO; e 1000µl dos animais normais e transgênicos. Os testículos e as glândulas sexuais acessórias (vesículas seminais + glândulas de coagulação) dos machos, e os ovários e o útero das fêmeas foram rapidamente removidos, pesados e congelados para posterior processamento. O fígado foi removido e congelado para posterior análise. O sangue tratado com EDTA 0.5M foi centrifugado e o plasma coletado foi mantido a -80°C para posterior análise.

#### **5.6- Parâmetros plasmáticos**



---

A concentração plasmática de glicose foi determinada utilizando-se o método colorimétrico da Sigma (Sigma Diagnostics, St. Louis MO-USA). Kits de ELISA (“*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*”) foram usados para dosagem de insulina (Crystal Chem Inc., Downers Grove IL-USA, precisão intra-análise CV < 10,0%) e IGF-I (Immunodiagnostic Systems Inc., Fountain Hills AZ-USA, precisão intra-análise CV < 6,4%) no plasma. Radioimunoanálise (RIA) foi utilizada para dosagem de testosterona no plasma e em homogeneizado testicular (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles CA-USA, precisão intra-análise CV < 12,0%) nos machos; e de progesterona (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster TX-USA, precisão intra-análise CV < 8,0%) e estradiol (MP Biomedicals, LLC, Solon OH-USA, precisão intra-análise CV < 15,7%) nas amostras de plasma das fêmeas. Todas as amostras foram analisadas sempre em duplicatas, seguindo as instruções do fabricante. Para cada sexo, todas as quatro combinações fenótipo/dieta foram analisadas de uma vez, evitando-se assim variações inter-análise.

### **5.7- Homogeneização do testículo**

Fragmentos de testículo de peso determinado foram colocados em tubos de ensaio contendo 500µl de tampão fosfato (50mM; pH 7,4; contendo sucrose 0,25M) gelado, e então homogeneizados utilizando um homogeneizador grande (Tekmar Tissumizer Typ SDT 1810S9, Tekmar Company, Cincinnati OH-USA). As amostras foram então centrifugadas a 600 x g por 10 minutos a 4°C para a precipitação dos fragmentos de estruturas nucleares e citoplasmáticas. O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente, a 10000 x g por 20 minutos a 4°C para a separação dos fragmentos mitocondriais. O sobrenadante foi então coletado e mantido a -80°C até o momento do uso para RIA.

### **5.8- Radioimunoanálise do homogeneizado testicular**

Os níveis de testosterona no homogeneizado testicular foram medidos através de RIA (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles CA-USA, precisão intra-análise CV < 12,0%). As amostras foram analisadas sempre em duplicatas, seguindo as instruções do fabricante. O volume de homogeneizado utilizado foi de 50 µl, a mesma quantidade recomendada no manual de instruções para plasma. Todas as quatro combinações fenótipo/dieta foram analisadas de uma vez, evitando-se assim variações inter-análise.

### **5.9- Extração de RNA**

---

O RNA total foi extraído de fragmentos de vesículas seminais, ovários, útero e fígado utilizando-se o método da guanidina-tiocianato (“*Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform*”) segundo Sambrook (2001) e de testículo utilizando-se o mesmo método porém segundo Chomczynski e Sacchi (1987). Todos os tecidos foram homogeneizados utilizando-se um homogeneizador pequeno (Tissue Tearor Model 985370, Biospec Products Inc., Bartlesville OK-USA). No momento de serem processadas para extração de RNA, as vesículas seminais foram dissecadas das glândulas de coagulação, e então esvaziadas e pesadas. Todas as amostras de RNA passaram por eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio.

### **5.10- Produção de cDNA**

O kit “iScript” de síntese de cDNA (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA-USA) foi utilizado para se produzir cDNA a partir de 2 µg de RNA, seguindo as orientações do fabricante. As amostras de RNA mais o coquetel iScript foram colocados em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal), e submetidas a 25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e então mantidas a 4°C.

### **5.11- RT-PCR**

O PCR de tempo real - RT-PCR foi conduzido utilizando-se o kit “iScript one-step RT-PCR” com “SYBR Green” (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA-USA) e termociclador “SmartCycler” (Cepheid, Sunnyvale CA-USA). Os iniciadores utilizados estão listados na TAB. 2. O termociclador foi ajustado para fazer 40 ciclos, cada um consistindo de 3 temperaturas: desnaturação a 95°C, anelamento a 62°C e polimerização a 72°C. Controles negativos foram incluídos em todas as análises e consistiam do mix para PCR contendo os iniciadores porém sem a amostra de cDNA. As informações obtidas da curva de fusão (“*melting*”) e da eletroforese em gel de agarose a 2% foram usadas para confirmar os produtos do PCR. Os valores obtidos para os diferentes genes no limiar de detecção (“*threshold cycle*”) ( $\Delta$ Ct) foram normalizados para o gene referência, a  $\beta$ -2-microglobulina (B2M) através da subtração do  $\Delta$ Ct obtido para B2M do  $\Delta$ Ct obtido para o gene de interesse. Os resultados são mostrados como nível de expressão relativa ao grupo N AL, ou seja, o controle. Todos os dados foram processados utilizando-se os programas SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale CA-USA) e Microsoft Excel (Redmond WA-USA).

---

## 5.12- Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando-se os programas SPSS 10.0.1 (SPSS Inc. Headquarters, Chicago IL-USA) e GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software Inc., San Diego CA-USA). Os resultados são mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média. O teste *t* pareado foi utilizado para se comparar os níveis de glicose no sangue, com e sem jejum, nos machos normais do experimento 1. A ANOVA bifatorial foi usada para se avaliar os efeitos de fenótipo, dieta e da interação fenótipo vs. dieta. Sempre que apropriado, Tukey e Games-Howell foram utilizados como testes *post-hoc*, dependendo se a igualdade das variâncias poderia ser assumida ou não, respectivamente. O teste do Qui-quadrado foi empregado para se comparar as frequências de prenhez no teste de fertilidade. O número de filhotes é mostrado como média  $\pm$  erro padrão da média por fêmea que teve filhotes e analisado por ANOVA bifatorial ou teste *t* de Student's quando se queriam comparar apenas duas médias. O nível de significância foi estabelecido a  $p < 0.05$ .

---

## 6- RESULTADOS

### 6.1- Efeitos da CR sobre a fertilidade

**Experimento 1-** A análise pelo Qui-quadrado revelou que não havia diferença significativa entre as 3 dietas aplicadas aos machos normais estudados. Foi detectada diferença significativa ( $p < 0,03$ ) no número de filhotes, quando comparando médias, notou-se que a significância foi atingida entre AL e 10% CR: as fêmeas acasaladas com machos que estavam sob 10% CR tiveram menos filhotes que as acasaladas com animais AL ( $5,67 \pm 3,5$  contra  $11,5 \pm 1,0$ ) (TAB. 3).

**Experimento 2- Grupo 1-** A dieta não afetou a performance reprodutiva dos camundongos da linhagem Ames, machos ou fêmeas. Foi observada uma diferença significativa numa análise geral pelo Qui-quadrado de  $p < 0,03$  nos machos e  $p < 0,05$  nas fêmeas. Foi detectado um efeito de fenótipo ( $p < 0,01$ ) em ambos os sexos: animais N foram férteis enquanto nenhum dos anões Ames estudados foram capazes de produzir ninhadas. Diferenças fenotípicas também foram observadas quando se analisou o número de filhotes, visto que nenhum dos anões teve prole. Não foram detectadas diferenças entre animais N AL e N CR, de ambos os sexos, em relação ao número de filhotes (TAB. 3).

**Grupo 2-** O teste do Qui-quadrado revelou que não haviam diferenças significativas quando os 4 subgrupos (fenótipo/dieta) de machos da linhagem GHR-KO eram analisados. No entanto, considerando-se somente os animais N, a CR reduziu ( $p < 0,05$ ) a capacidade reprodutiva em relação ao grupo AL. O número de filhotes não foi significativamente diferente em qualquer dos subgrupos analisados (TAB. 3).

**Grupo 3-** Os diferentes subgrupos de fêmeas pertencentes à linhagem GHR-KO não diferiram estatisticamente sob uma análise geral pelo Qui-quadrado, porém, considerando-se animais N separadamente, a CR melhorou ( $p < 0,05$ ) a fertilidade. Somente uma fêmea N AL (de 5 animais) teve filhotes enquanto todas as 5 fêmeas N CR produziram ninhadas. No entanto, nenhuma diferença foi observada no número de filhotes comparando-se esses dois subgrupos. Por outro lado, no fenótipo KO, somente uma fêmea KO AL (de 3 animais) teve filhotes, enquanto nenhuma das 5 fêmeas KO CR teve prole (TAB. 3).

**Experimento 3- Grupo 1-** Houve uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ), numa análise geral pelo Qui-quadrado, comparando-se os 4 subgrupos de machos da linhagem GHR-KO. Esta diferença se

---

devia ao efeito de fenótipo ( $p < 0,001$ ), observado quando as dietas eram agrupadas, a título de análise. Neste caso, os machos N se reproduziram melhor que os machos KO (TAB. 3). O número de filhotes não foi diferente estatisticamente. Curiosamente, nenhuma das 8 fêmeas acasaladas com os machos KO CR tiveram filhotes, enquanto 3 em 8 fêmeas acasaladas com machos KO AL tiveram ninhadas. A performance das fêmeas em estudo no teste de fertilidade não foi diferente estatisticamente numa análise geral pelo Qui-quadrado, embora as fêmeas N tenham se saído melhor ( $p < 0,05$ ) que as fêmeas KO quando as dietas eram agrupadas na análise estatística (TAB. 3). Nenhuma diferença significativa foi observada no número de filhotes embora as fêmeas KO tenham apresentado uma tendência para ninhadas menores (N AL-  $6,20 \pm 1,24$ ; N CR-  $7,00 \pm 0,71$ ; KO AL-  $3,50 \pm 0,50$ ; e KO CR-  $4,00$ ) (TAB. 3).

**Grupo 2-** Houve uma diferença significativa ( $p < 0,03$ ) em termos gerais, no teste de fertilidade, comparando-se os 4 subgrupos de machos da linhagem PEPCK-bGH. Animais N apresentaram melhor performance que os Tg ( $p < 0,01$  para dietas agrupadas, comparando-se fenótipos;  $p < 0,01$  para machos AL, comparando fenótipos); nenhum efeito de dieta foi observado. Nenhuma diferença significativa foi observada no número de filhotes entre os diferentes subgrupos de machos da linhagem PEPCK-bGH. A performance das fêmeas no teste de fertilidade não foi diferente estatisticamente, numa análise geral pelo Qui-quadrado. No entanto, as fêmeas N de ambas as dietas (CR e AL) tiveram maior ( $p < 0,01$ ) fertilidade que as fêmeas Tg, também de ambas as dietas. Fêmeas N sob CR mostraram uma tendência para ninhadas maiores ( $7,50 \pm 0,50$ ), comparadas às fêmeas N AL ( $3,50 \pm 0,96$ ), embora os números não tenham sido estatisticamente diferentes. Enquanto isso, nenhuma das fêmeas Tg gerou filhotes (TAB. 3).

## **6.2- Efeitos da CR sobre a glicemia com e sem jejum**

Resultados deste parâmetro encontram-se na FIG. 2. Através da análise de variância (ANOVA), constatou-se nos machos normais do experimento 1 uma diferença estatística ( $p < 0,001$ ) na glicemia dos animais sem jejum, quando compararam-se as dietas: a CR de 10% reduziu a glicemia em 22,8% em relação a AL, e a CR de 20% reduziu a glicemia em 17,8% em relação a AL. Não houve diferença estatística entre CR de 10 e 20% para este parâmetro. Também não foi detectado pela ANOVA qualquer efeito significativo das dietas sobre os níveis de glicose após o jejum de 12 horas. Já o teste *t* pareado demonstrou uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) na glicemia dos animais quando submetidos ou não ao jejum. A média geral ( $n=25$ ) para a glicemia após jejum foi 14,12% menor que quando os animais não passaram por jejum ( $88,92 \pm 2,69$  vs.  $103,54 \pm 3,29$ ; respectivamente). Comparando-se médias da glicemia com e sem jejum dentro de cada dieta, observou-se diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre as médias nos animais AL ( $n=8$ ) ( $96,81$

---

$\pm 5,49$  vs.  $120,0 \pm 2,49$ ; respectivamente) e 20% CR (n=9) ( $83,78 \pm 3,47$  vs.  $98,61 \pm 3,16$ ; respectivamente). Não houve diferença entre as médias nos animais sob 10% CR (n=8) com e sem jejum ( $86,81 \pm 4,26$  vs.  $92,63 \pm 6,12$ ; respectivamente).

### **6.3- Efeitos da CR sobre o peso corporal**

As curvas de crescimento dos animais em estudo encontram-se na FIG. 1. É possível notar, através das barras de erro padrão da média, que houve diferença significativa ao longo do experimento em alguns casos. No entanto, ao final do experimento, no dia do sacrifício (números mostrados nas TABS. 4 a 9), só foi observado efeito significativo da dieta sobre o peso corporal no grupo de machos da linhagem PEPCK-bGH (TAB. 9), onde os animais CR de ambos os fenótipos foram 11,7% mais leves ( $p < 0,01$ ) que os animais AL de ambos os fenótipos. Por outro lado, o fenótipo teve efeito significativo ( $p < 0,001$ ) sobre o peso corporal em todos os grupos estudados, sendo os animais N mais pesados que os KO e anões Ames, enquanto os Tg foram sempre mais pesados que os N. A análise do peso corporal dos machos da linhagem GHR-KO, Exp.2 (TAB. 6) e das fêmeas da linhagem PEPCK-bGH (TAB. 9) indicou interação significativa ( $p < 0,01$  e  $p < 0,04$ ; respectivamente) entre os dois parâmetros analisados: fenótipo e dieta.

### **6.4- Efeitos da CR sobre o peso dos órgãos reprodutivos**

**Experimento 1-** Os pesos dos testículos (FIG. 3A) e das glândulas sexuais acessórias (FIG. 4A), bem como o índice gonadossomático (IGS) (peso da gônada / peso corporal x 100) (FIG. 3A), não sofreram efeito da dieta neste experimento, embora fosse notada uma tendência para redução nestes parâmetros, proporcionalmente ao grau de restrição calórica.

**Experimento 2- Grupo 1-** Os machos da linhagem Ames apresentaram testículos 38,2% mais leves comparados aos machos N (FIG. 3B). Foi observado também um efeito da dieta: os animais anões sob CR apresentaram testículos mais leves (58,1%;  $p < 0,02$ ) que os animais anões AL. O IGS dos machos apresentou uma interação significativa de fenótipo vs. dieta (FIG. 3B). O peso das glândulas sexuais acessórias seguiu o mesmo padrão do peso testicular, ou seja, nos animais N ele foi maior (4,1 vezes) que nos animais anões (FIG. 4B). Adicionalmente, foi observado um efeito da dieta sobre este parâmetro: anões sob CR apresentaram glândulas 80,4% mais leves ( $p < 0,04$ ) comparados com anões AL. Foi observada nas fêmeas dessa linhagem uma redução (49,6%) no peso dos ovários nos animais anões comparados com os N, dietas combinadas, além disso, a CR reduziu o peso dos

---

ovários em 30,7% comparado ao regime AL, fenótipos combinados (FIG. 3C). O IGS não foi diferente significativamente entre os subgrupos de fêmeas (FIG. 3C).

**Grupo 2-** Os machos KO da linhagem GHR-KO apresentaram testículos 48,6% mais leves comparados com os machos N, mas nenhum efeito da dieta foi observado (FIG. 3D). Adicionalmente, não foram observadas diferenças entre os valores de IGS nos machos desta linhagem (FIG. 3D). Quanto às glândulas sexuais acessórias, foram detectados efeitos significativos de fenótipo e de dieta, ou seja, nos machos KO elas eram 69,2% mais leves que nos machos N, dietas combinadas, e nos animais sob CR elas eram 20,2% mais leves que nos animais AL, fenótipos combinados (FIG. 4C).

**Grupo 3-** Os ovários das fêmeas KO de ambas as dietas foram 51,1% mais leves que os ovários das fêmeas N (FIG. 3E). A dieta não teve efeito significativo sobre este parâmetro. Nenhuma diferença foi encontrada nos valores de IGS (FIG. 3E). Quanto ao peso do útero, foi observada uma interação significativa de fenótipo vs. dieta (FIG. 5A).

**Grupo 4-** O peso dos testículos nos machos Tg da linhagem MT-bGH foi 1,2 vezes maior que nos machos N, porém, talvez devido ao seu peso corporal muito maior, o IGS dos Tg foi 17,1% menor que dos machos N (FIG. 3F). Nenhum efeito da dieta foi observado sobre o peso dos testículos ou sobre o IGS nos machos (FIG. 3F). Quanto às glândulas sexuais acessórias, nos machos Tg elas foram mais pesadas (1,3 vezes) comparadas às dos machos N, dietas combinadas (FIG. 4D). Foi observado um efeito da dieta sobre este parâmetro: os machos sob CR apresentaram glândulas 28,1% mais leves que as dos machos AL, fenótipos combinados. Já nas fêmeas, os ovários foram 1,5 vezes mais pesados nas fêmeas Tg que nas fêmeas N (FIG. 3G), mas nenhuma diferença significativa foi observada para os valores calculados de IGS (FIG. 3G) ou para o peso do útero (FIG. 5B).

**Experimento 3- Grupo 1-** Os machos N da linhagem GHR-KO apresentaram testículos mais pesados (2,0 vezes) que os dos machos KO (FIG. 3H). Foi observado um efeito da dieta devido ao peso testicular reduzido (8,2%;  $p < 0,01$ ) em animais N CR comparados com N AL. O IGS foi 1,2 vezes mais alto nos machos KO que nos machos N (FIG. 3H). Houve um efeito do fenótipo sobre o peso das glândulas sexuais acessórias: animais N de ambas as dietas apresentaram glândulas mais pesadas (3,0 vezes) que os animais KO de ambas as dietas (FIG. 4E). O efeito da dieta sobre o peso das glândulas sexuais acessórias se deve a uma redução em 14,2% observada nos animais CR, comparados com os animais AL, fenótipos combinados. O peso dos ovários foi 3,2 vezes maior nas fêmeas N, comparadas às KO (FIG. 3I). A CR também teve efeito significativo sobre este

---

parâmetro: animais KO CR apresentaram ovários 37,5% mais leves ( $p<0,03$ ) que os animais KO AL. O IGS nas fêmeas N foi 1,7 vezes maior que nas fêmeas KO, dietas combinadas (FIG. 3I). A CR reduziu em 25,8% o IGS nas fêmeas, fenótipos combinados. Adicionalmente, fêmeas N apresentaram úteros 3,0 vezes mais pesados que os das fêmeas KO (FIG. 5C).

**Grupo 2-** Nenhuma diferença significativa foi observada no peso testicular dos animais pertencentes à linhagem PEPCK-bGH, embora o IGS tenha sido 1,3 vezes maior nos machos N de ambas as dietas, comparados com os machos Tg de ambas as dietas (FIG. 3J). A CR reduziu em 24,9% o peso das glândulas sexuais acessórias, fenótipos combinados (FIG. 4F). Nas fêmeas, não foram observadas diferenças no peso de ovários comparando-se fenótipos (FIG. 3L). Por outro lado, foi observado um efeito da dieta sobre este parâmetro: fêmeas N CR apresentaram ovários menores (46,1%;  $p<0,001$ ) que as fêmeas N AL. O IGS foi 48,8% menor nas fêmeas Tg que nas fêmeas N, dietas combinadas (FIG. 3L). Não foram observadas diferenças quando se comparou o peso do útero nos diferentes subgrupos (FIG. 5D).

## 6.5- Efeitos da CR sobre os parâmetros plasmáticos

**Experimento 1-** Todos os resultados acerca dos parâmetros plasmáticos medidos neste grupo após o término do experimento encontram-se na TAB. 4. Não foi observada diferença significativa entre os três subgrupos em relação aos níveis de glicose e de insulina no plasma. No entanto, foi observado um efeito da dieta sobre os níveis plasmáticos de IGF-I: a CR de 20% reduziu ( $p<0,01$ ) em 18,9% este parâmetro, em relação a AL. A CR de 10% não atingiu significância, ou seja, não foi diferente de AL ou 20% CR. Os níveis plasmáticos de testosterona não foram diferentes estatisticamente quando se compararam as diferentes dietas.

**Experimento 2- Grupo 1-** Todos os resultados deste grupo encontram-se na TAB. 5. Os machos anões Ames apresentaram redução nos níveis plasmáticos de glicose (49,0%), insulina (72,1%) e IGF-I (90,2%), comparados com os machos N. Não houve efeito significativo de dieta. Os níveis plasmáticos de testosterona não diferiram comparando-se fenótipos ou dietas. As fêmeas anãs Ames apresentaram redução nos níveis de glicose (50,3%), IGF-I (96,4%), progesterona (62,1%) e estradiol (29,5%) comparadas com as fêmeas N. Não foram detectadas diferenças nos níveis de insulina entre os 4 subgrupos (fenótipo/dieta) de fêmeas. A CR não teve efeito sobre quaisquer dos parâmetros analisados nesta linhagem.

**Grupo 2-** Todos os resultados deste grupo encontram-se na TAB. 6. Foi detectada uma interação fenótipo vs. dieta nos níveis plasmáticos de glicose e IGF-I nos machos da linhagem GHR-KO. Os níveis periféricos de insulina foram mais baixos (77,5%) nos machos KO, comparados com os machos N, dietas combinadas. É interessante notar que os valores absolutos observados para os



---

níveis plasmáticos de glicose e insulina nos machos N CR foram muito mais próximos dos observados nos animais KO que os dos animais N AL. Não foram observadas diferenças nos níveis plasmáticos de testosterona.

**Grupo 3-** Todos os resultados deste grupo encontram-se na TAB. 6. As fêmeas KO da linhagem GHR-KO apresentaram redução nos níveis plasmáticos de glicose (25,8%) e IGF-I (92,0%) comparadas com as fêmeas N. Houve uma interação fenótipo vs. dieta sobre os níveis de insulina no plasma. Note que os animais N sob CR apresentaram níveis de insulina (valores absolutos) muito semelhantes aos dos animais KO. Nenhuma diferença foi observada quando se compararam os níveis plasmáticos de progesterona ou estradiol nos diferentes subgrupos (fenótipo/dieta) das fêmeas desta linhagem.

**Grupo 4-** Todos os resultados deste grupo encontram-se na TAB. 7. Os machos Tg da linhagem MT-bGH apresentaram elevados níveis plasmáticos de insulina (3,2 vezes) e IGF-I (1,8 vezes), comparados com os machos N. Nenhuma diferença estatística foi detectada nos níveis de glicose e testosterona nos machos desta linhagem. As fêmeas Tg apresentaram elevação nos níveis de glicose (1,2 vezes), insulina (3,3 vezes), IGF-I (1,6 vezes) e estradiol (4,0 vezes), comparadas com as fêmeas N. Não houve diferença nos níveis de progesterona comparando-se os diferentes subgrupos de fêmeas.

**Experimento 3- Grupo 1-** Todos os resultados deste grupo encontram-se na TAB. 8. Foi observada uma interação fenótipo vs. dieta nos níveis plasmáticos de glicose dos machos pertencentes à linhagem GHR-KO. Os níveis de IGF-I no plasma dos machos KO foram 90,4% mais baixos comparados aos machos N. Nenhuma diferença estatística foi encontrada nos níveis plasmáticos de insulina ou testosterona dos machos. As fêmeas KO apresentaram redução nos níveis de glicose (12,8%), IGF-I (80,9%) e estradiol (61,2%) comparadas às fêmeas N. A CR teve um efeito significativo sobre os níveis de progesterona no plasma: os animais N CR apresentaram níveis deste hormônio 55,9% mais baixos ( $p < 0,01$ ) que os animais N AL, bem como as fêmeas KO CR apresentaram redução em 59,4% ( $p < 0,01$ ) nos níveis deste hormônio, comparadas às fêmeas KO AL. Nenhuma diferença foi detectada nos níveis de insulina das fêmeas desta linhagem.

**Grupo 2-** Todos os resultados deste grupo encontram-se na TAB. 9. Os machos Tg pertencentes à linhagem PEPCCK-bGH apresentaram níveis plasmáticos de glicose 36,8% mais baixos que os machos N. Os níveis de IGF-I foram 2,2 vezes mais altos nos machos Tg comparados aos N. Foi detectada uma interação significativa de fenótipo vs. dieta sobre os níveis de insulina no plasma. Não houve diferença significativa entre os valores observados para testosterona no plasma. As fêmeas Tg, à semelhança do ocorrido com os machos, apresentaram níveis plasmáticos de glicose

---

reduzidos em 22,8% comparadas com as fêmeas N, dietas combinadas. Houve uma interação fenótipo vs. dieta sobre os níveis plasmáticos de IGF-I e estradiol. Nenhuma diferença foi detectada nos níveis de insulina e progesterona nas fêmeas desta linhagem, além disso, nenhum efeito de dieta foi significativo em ambos os sexos.

#### **6.6- Efeitos da CR sobre os níveis de testosterona no testículo**

Os níveis de testosterona em homogeneizado testicular foram extremamente variáveis entre os indivíduos analisados, à semelhança do encontrado para os níveis plasmáticos deste hormônio. Em todos os experimentos, não houve diferença significativa nos níveis de testosterona nos testículos (FIG.6). Em nenhum caso houve significância para fenótipo ou para dieta, e em um caso, o da linhagem MT-bGH (FIG. 6D), houve interação fenótipo vs. dieta.

#### **6.7- Efeitos da CR sobre a expressão gênica no fígado**

**Experimento 1-** Os machos normais submetidos a CR de 10% e de 20% não apresentaram diferenças significativas entre si ou em comparação aos animais AL para quaisquer dos genes analisados no fígado: *IGF1* (FIG. 7A), *PGC-1 $\alpha$*  (“*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha*”) (FIG. 7A), *SIRT1* (“*sirtuin*”) (FIG. 7A) e *mStal* (sulfotransferase de camundongo) (FIG. 8A).

**Experimento 2- Grupo 1-** A expressão gênica de *IGF1* no fígado estava reduzida nos anões Ames comparados aos animais N, machos (89,1%) e fêmeas (92,9%) (FIGS. 7B e 7C, respectivamente). Nenhuma diferença foi detectada na expressão hepática de mRNA para *PGC-1 $\alpha$*  em ambos os sexos (FIGS. 7B e 7C). Os anões Ames machos apresentaram níveis mais elevados (1,5 vezes) de mRNA para *SIRT1* que os machos N (FIG. 7B). Nas fêmeas, a CR aumentou em 1,6 vezes a expressão de mRNA para *SIRT1* no fígado, em relação às fêmeas AL, fenótipos combinados (FIG. 7C). Nas fêmeas, analisando-se cada fenótipo separadamente e comparando-se as dietas, a expressão hepática de *SIRT1* alcançou significância nos animais N: as fêmeas N CR apresentavam uma elevação no mRNA para *SIRT1* em 1,7 vezes, em relação às fêmeas N AL (FIG. 7C). Foi observado um efeito de fenótipo sobre os níveis hepáticos de mRNA para *mStal* em direções opostas nos dois sexos: os machos anões apresentaram níveis 13,2 vezes mais altos de *mStal* que os machos N (FIG. 8B), enquanto nas fêmeas, os animais N é que apresentaram maiores níveis deste gene (2,4 vezes) comparados com animais anões Ames (FIG. 8C).

---

**Grupo 2-** A expressão gênica de *IGF1* no fígado foi 99,2% mais baixa nos machos KO da linhagem GHR-KO, em relação aos machos N (FIG. 7D). Em contraste, a expressão hepática de *PGC-1 $\alpha$*  foi mais alta (3,0 vezes) nos mutantes em relação aos N (FIG. 7D). Nenhuma diferença foi detectada na expressão gênica de *SIRT1* no fígado dos machos desta linhagem (FIG. 7D). Houve uma interação fenótipo vs. dieta na expressão de mRNA para *mStal* no fígado (FIG. 8D).

**Grupo 3-** Os níveis hepáticos de mRNA para *IGF1* estavam reduzidos em 97,1% nas fêmeas KO da linhagem GHR-KO, em relação às fêmeas N (FIG. 7E). Em contrapartida, nas mesmas fêmeas KO, houve uma elevação nos níveis hepáticos de mRNA para *PGC-1 $\alpha$*  (2,7 vezes) (FIG. 7E) e *SIRT1* (1,2 vezes) (FIG. 7E), em relação às fêmeas N. Também, para ambos os genes supracitados, foi detectado um efeito da dieta: a CR promoveu um aumento na expressão de *PGC-1 $\alpha$*  (1,4 vezes) e *SIRT1* (1,3 vezes), em relação aos animais AL, fenótipos combinados (FIG. 7E). Foi observada uma interação fenótipo vs. dieta na expressão de mRNA para *mStal* no fígado desses animais (FIG. 8E).

**Grupo 4-** Os machos Tg pertencentes à linhagem MT-bGH apresentaram níveis reduzidos (25,7%) de mRNA para *SIRT1* no fígado, em relação aos machos N (FIG. 7F). A expressão gênica de *IGF1* (FIG. 7F) e *mStal* (FIG. 8F) no fígado não foi significativamente diferente entre os diferentes subgrupos de machos estudados. Houve uma interação fenótipo vs. dieta na expressão hepática de *PGC-1 $\alpha$*  (FIG. 7F). As fêmeas Tg apresentaram uma redução nos níveis hepáticos de mRNA para *SIRT1* (29,7%) (FIG. 7G) e um aumento nos níveis de mRNA para *mStal* (1,6 vezes) (FIG. 8G), em relação às fêmeas N. As fêmeas desta linhagem não apresentaram níveis diferentes de mRNA para *IGF1* no fígado (FIG. 7G). Houve uma interação fenótipo vs. dieta na expressão gênica de *PGC-1 $\alpha$*  no fígado das fêmeas (FIG. 7G).

**Experimento 3- Grupo 1-** Os machos KO da linhagem GHR-KO apresentaram níveis de expressão de mRNA para *IGF1* no fígado 98,5% mais baixos que os dos machos N (FIG. 7H). Por outro lado, os mesmos animais KO apresentaram uma elevação nos níveis de mRNA para *PGC-1 $\alpha$*  (4,7 vezes) (FIG. 7H), *SIRT1* (1,7 vezes) (FIG. 7H) e *mStal* (6.461,0 vezes) (FIG. 8H) comparados aos machos N. Nas fêmeas KO, os níveis hepáticos de expressão de mRNA foram 96,9% mais baixos para *IGF1* (FIG. 7I); 2,7 vezes mais altos para *PGC-1 $\alpha$*  (FIG. 7I); 1,6 vezes mais altos para *SIRT1* (FIG. 7I) e 1,9 vezes mais altos para *mStal* (FIG. 8I), comparadas com as fêmeas N, dietas combinadas. Nenhum efeito da dieta foi observado sobre a expressão gênica hepática em ambos os sexos.

**Grupo 2-** Os machos Tg da linhagem PEPCK-bGH apresentaram expressão gênica de *IGF1* no fígado 1,3 vezes mais alta que os machos N (FIG. 7J). Nenhuma diferença foi observada na expressão hepática de mRNA para *PGC-1 $\alpha$*  (FIG. 7J), *SIRT1* (FIG. 7J) ou *mStal* (FIG. 8J) nos

---

machos. Os níveis hepáticos de mRNA nas fêmeas Tg eram maiores para *IGF1* (1,4 vezes) (FIG. 7L), e menores para *PGC-1 $\alpha$*  (73,1%) (FIG. 7L) e *mStA1* (73,5%) (FIG. 8L), comparadas com as fêmeas N. Nenhuma diferença foi detectada nos níveis de expressão gênica de *SIRT1* (FIG. 7L) no fígado das fêmeas desta linhagem.

### **6.8- Efeitos da CR sobre a expressão gênica nos órgãos reprodutivos**

**Experimento 1-** Os machos N submetidos a 10 e 20% CR não apresentaram diferenças significativas entre si ou quando comparados aos animais AL para quaisquer dos genes analisados nos testículos: *IGF1* (FIG. 9A), *AROM* (aromatase) (FIG. 9A), *HSD3* (3- $\beta$ -hidroxisteróide dehydrogenase/isomerase) (FIG. 10A), *CYP17* (citocromo P450c17, atua como 17 $\alpha$ -hidroxilase e como C<sub>17,20</sub>liase) (FIG. 10A), *AR* (receptor de andrógeno) (FIG. 11A), *LHR* (receptor de LH) (FIG. 11A) e *FSHR* (receptor de FSH) (FIG. 11A); ou nas vesículas seminais: *AR* (FIG. 13A).

**Experimento 2- Grupo 1-** Os níveis ovarianos de mRNA para *IGF1* nas fêmeas da linhagem Ames foram 8,3 vezes mais altos nas anãs Ames, comparadas com as fêmeas N (FIG. 12A). Nenhuma diferença foi detectada na expressão ovariana de mRNA para *LHR* ou *FSHR* (FIG. 12A).

**Grupo 2-** Houve uma interação fenótipo vs. dieta na expressão gênica de *AR* nos testículos dos machos da linhagem GHR-KO (FIG. 11B). Foi observado um efeito tanto de fenótipo quanto da dieta sobre a expressão gênica testicular de *FSHR*: os animais KO apresentaram níveis deste gene 2,1 vezes mais altos que os animais N, dietas combinadas, enquanto que a CR de 20% promoveu um aumento de 1,2 vezes nos níveis de mRNA para *FSHR*, em relação aos animais AL (FIG. 11B). Foi detectado um efeito do fenótipo sobre a expressão gênica de *CYP17* nos testículos: os animais KO apresentaram uma redução de 40,0% nos níveis deste gene, comparados com os animais N, dietas combinadas (FIG. 10B). Não houve diferença na expressão gênica de *AROM* no testículo (FIG. 9B). Nenhuma diferença foi detectada nos níveis testiculares de mRNA para *IGF1* (FIG. 9B), *HSD3* (FIG. 10B) e *LHR* (FIG. 11B).

**Grupo 3-** Não houve diferença na expressão ovariana dos genes *LHR*, *FSHR* e *IGF1* nas fêmeas da linhagem GHR-KO (FIG. 12B). Do mesmo modo, não foram detectadas diferenças na expressão de mRNA para *ESR* no útero (FIG. 14A).

**Grupo 4-** Houve uma interação fenótipo vs. dieta sobre a expressão gênica de *IGF1* nos testículos dos machos pertencentes à linhagem MT-bGH (FIG. 9C). Foi detectado um efeito da dieta sobre os níveis de mRNA para *AR*: a CR causou um aumento de 1,3 vezes em relação aos animais AL,

---

fenótipos combinados (FIG. 11C). Quando comparando médias individuais, a significância foi atingida no grupo N: os animais N CR apresentaram níveis deste gene 1,6 vezes mais altos ( $p < 0,02$ ) que os animais N AL. Houve um efeito do fenótipo sobre a expressão testicular de *HSD3*: os animais Tg apresentavam redução em 23,6% no mRNA para este gene, comparados com os animais N, dietas combinadas (FIG. 10C). Não foram detectadas diferenças nos níveis testiculares de mRNA para *AROM* (FIG. 9C), *CYP17* (FIG. 10C), *LHR* (FIG. 11C), *FSHR* (FIG. 11C). Adicionalmente, não houve diferença na expressão de mRNA para *AR* nas vesículas seminais (FIG. 13B). Não foram observadas diferenças na expressão gênica de *LHR*, *FSHR* ou *IGF1* nos ovários da fêmeas desta linhagem (FIG. 12C). Também não foram detectadas diferenças nos níveis de mRNA para *ESR* no útero (FIG. 14B).

**Experimento 3- Grupo 1-** Os machos KO da linhagem GHR-KO apresentaram níveis de expressão testicular de mRNA para *AROM* maiores (1,9 vezes) que os dos machos N (FIG. 9D). Não houve diferença significativa nos níveis de mRNA para *IGF1* (FIG. 9D), *HSD3* (FIG. 10D) e *LHR* (FIG. 11D) nos testículos. Foi detectado um efeito do fenótipo sobre a expressão gênica testicular nos animais desta linhagem: os níveis de mRNA para *CYP17* apresentavam-se reduzidos em 49,3% nos animais KO, em relação aos animais N (FIG. 10D); para *AR* estavam elevados em 1,6 vezes nos animais KO, comparados aos animais N, dietas combinadas (FIG. 11D); e para *FSHR* também estavam elevados em 2,9 vezes nos animais KO, comparados aos animais N, dietas combinadas (FIG. 11D). Nenhuma diferença foi detectada nos níveis de mRNA para *AR* nas vesículas seminais (FIG. 13C). Nas fêmeas KO, os níveis de mRNA para *FSHR* nos ovários foi maior (1,4 vezes) que nas fêmeas N, dietas combinadas (FIG. 12D). Adicionalmente, a CR causou um aumento de 1,8 vezes na expressão ovariana de mRNA para *FSHR*, fenótipos combinados (FIG. 12D). Especificamente, quando se compararam os subgrupos, a influência da dieta sobre a expressão de *FSHR* ocorreu nos animais N: as fêmeas N CR tinham este parâmetro aumentado ( $p < 0,01$ ) em 2,6 vezes, comparadas com as fêmeas N AL (FIG. 12D). Não foram detectadas diferenças na expressão ovariana de mRNA para *LHR* ou *IGF1* (FIG. 12D). A expressão gênica de *ESR* (receptor de estrógeno) em útero foi 3,6 vezes mais alta nas fêmeas KO que nas fêmeas N, dietas combinadas (FIG. 14C).

**Grupo 2-** Foi detectado um efeito do fenótipo sobre a expressão gênica testicular dos animais da linhagem PEPCK-bGH: os níveis de mRNA para *IGF1* foram 1,3 vezes mais altos nos animais Tg que nos animais N, dietas combinadas (FIG. 9E); para *HSD3* foram 27,2% mais baixos nos animais Tg, comparados com os animais N, dietas combinadas (FIG. 10E); e para *CYP17* estavam também reduzidos em 37,7% nos animais Tg, comparados com os animais N, dietas combinadas. (FIG. 10E). A expressão gênica de *AROM* (FIG. 9E), *AR* (FIG. 11E), *LHR* (FIG. 11E) e *FSHR* (FIG. 11E) nos testículos não diferiu significativamente entre os diferentes subgrupos. Não foram detectadas

---

diferenças nos níveis de mRNA para *AR* nas vesículas seminais (FIG. 13D). Nas fêmeas desta linhagem, a dieta teve um efeito sobre a expressão gênica nos ovários: a CR aumentou em 4,8 vezes os níveis de *FSHR* e em 3,7 vezes os níveis de *IGF1* em relação aos animais AL, fenótipos combinados (FIG. 12E). Nenhuma mudança significativa foi detectada nos níveis de mRNA para *LHR* nos ovários (FIG. 12E) ou *ESR* no útero (FIG. 14D).

---

## 7- DISCUSSÃO

### 7.1- Efeitos da CR sobre a fertilidade

A restrição calórica (CR) retarda o envelhecimento, previne doenças e prolonga a vida, porém com um efeito negativo sobre a fecundidade. Para analisar esta inter-relação e caracterizar os efeitos de uma restrição calórica branda, foram avaliados os efeitos da CR de 20% sobre a performance reprodutiva de camundongos machos e fêmeas pertencentes a linhagens geneticamente determinadas para maior ou menor longevidade, bem como os animais normais provenientes das mesmas ninhadas. Adicionalmente, testou-se o efeito de 10 e 20% CR sobre um grupo de camundongos machos normais.

Os animais utilizados na avaliação da fertilidade incluem os anões Ames, os camundongos “*knockout*” para receptor de GH - GHR-KO, os transgênicos que superexpressam bGH sob o promotor PEPCK de rato, os animais normais provenientes das mesmas ninhadas dos animais supracitados, todos submetidos a CR de 20%, e os machos normais submetidos a CR de 10% e 20%. Os animais transgênicos da linhagem MT-bGH não foram testados para fertilidade. Os resultados encontrados demonstram que a restrição calórica branda não afeta a performance reprodutiva em todos os grupos estudados. A única exceção foram os machos e fêmeas da linhagem GHR-KO do Exp. 2, grupos nos quais foi observado um efeito da dieta, mas somente quando se analisou estatisticamente o fenótipo N isoladamente. É interessante notar que nestes animais N, os machos e as fêmeas foram afetados pela dieta de modos opostos: os machos N CR tiveram performance pior no teste de fertilidade que os machos N AL, e as fêmeas N CR se saíram melhor que as N AL neste teste. Estas fêmeas tinham 13 meses de idade quando foram testadas para fertilidade, e esta melhor performance observada nos animais sob CR pode ser devido a uma extensão no período reprodutivo destes animais, fato relatado para animais sob CR (Merry e Holehan, 1979; McShane e Wise, 1996). Em todas as linhagens estudadas foi observado um efeito de fenótipo pois os animais mutantes e transgênicos sempre se saíram pior no teste de fertilidade, comparados com os animais normais, independentemente da dieta. Estes resultados estão de acordo com relatos anteriores acerca da reduzida fertilidade destes mutantes (Bartke, 1965; Naar et al., 1991; Bartke et al., 1992; Cecim et al., 1995a e b; Zhou et al., 1997; Chandrashekar et al., 1999; Zaczek et al., 2002). Chama a atenção o fato de nenhum dos homozigotos anões Ames testados - machos ou fêmeas - terem tido filhotes após o acasalamento. As fêmeas Tg PEPCK testadas também não produziram ninhadas. Este achado está de acordo com os relatos sobre a esterilidade precoce e de alta incidência nestas fêmeas (Cecim et al., 1995). Surpreendentemente, os machos KO CR da linhagem GHR-KO do Exp. 1 não foram

---

capazes de se reproduzir. Isto foi inesperado porque esterilidade não é uma característica destes mutantes, eles geralmente são, no máximo, subfêrteis (Chandrashekar et al., 1999; Bachelot et al., 2002; Zaczek et al., 2002). Talvez a CR, mesmo sendo branda, foi suficiente para exercer um efeito deletério numa já comprometida capacidade reprodutiva. Além disso, a CR pode ter atuado exacerbando o atraso na maturação sexual, conhecida nestes mutantes (Keene et al., 2002). A infertilidade destes animais testados pode também estar ligada ao pequeno número amostral (4 machos por subgrupo).

### **7.2- Efeitos da CR sobre a glicemia com e sem jejum**

A medição da glicemia com e sem jejum nos machos normais do experimento 1 apresentou-se como uma oportunidade de avaliar como os animais sob diferentes dietas (AL, 10% CR e 20% CR) reagiriam a um jejum de 12 horas. O teste *t* pareado comprovou que as taxas de glicose eram menores após jejum. Entretanto, mais interessante foi notar que, quando analisou-se sob a ANOVA o impacto da dieta sobre a glicemia, a significância só foi alcançada nos animais sem jejum. Quando estes mesmos animais passaram por um jejum de 12 horas, não foi possível se detectar diferença significativa entre as médias nas diferentes dietas. Resultados similares a este do jejum foram encontrados para este mesmo grupo ao final do tempo de experimento, quando todos os animais foram sacrificados, bem como em todos os outros grupos ao fim do experimento. Vale lembrar que em todos os grupos experimentais os animais passaram por um jejum de 12 horas antes de serem sacrificados.

### **7.3- Efeitos da CR sobre o peso corporal**

A redução no peso corporal é um achado constante em animais sob CR (Masoro, 2005). Portanto, o fato da 20% CR não afetar o peso corporal em praticamente todos os grupos estudados (com exceção dos machos da linhagem PEPCK-bGH), e da CR de 10% e 20% não afetarem o peso corporal dos machos normais estudados, foi de certo modo inesperado. No entanto, a redução no peso corporal é geralmente proporcional ao grau de restrição calórica. Visto que na maioria dos estudos descritos na literatura esta restrição é de 30 a 40% ou mesmo maior (Masoro, 2005), a CR branda aplicada no presente estudo talvez tenha provocado mudanças muito pequenas no peso corporal, a ponto de não serem detectadas pelos métodos estatísticos aplicados e na amostragem de animais estudados. Por outro lado, confirmaram-se as diferenças fenotípicas no peso corpóreo, já relatadas anteriormente (Cecim et al., 1993; Bartke et al., 2002; Bartke, 2005).



---

#### **7.4- Efeitos da CR sobre o peso dos órgãos reprodutivos**

A redução no peso dos órgãos reprodutivos em animais sob CR é relatada na literatura (Chen et al., 2005). Os resultados do presente estudo confirmam este achado, visto que vários dos grupos examinados apresentaram redução significativa no peso das gônadas e de outros órgãos reprodutivos. No entanto, este fato somente se confirma quando se analisam os valores absolutos. Quando se leva em consideração o peso da gônada em relação ao peso corporal ( $IGS = \text{peso da gônada} / \text{peso corporal} \times 100$ ), o efeito da CR foi confirmado apenas sobre um grupo estudado: o das fêmeas da linhagem GHR-KO Exp. 1, que apresentaram uma redução significativa do IGS pela 20% CR. Mais especificamente, as fêmeas KO CR apresentaram esta redução em relação às fêmeas KO AL. O peso do útero nas fêmeas e das glândulas sexuais acessórias nos machos, relativos ao peso corporal, foi reduzido pela 20% CR nas fêmeas da linhagem GHR-KO Exps. 2 e 3 e nos machos das linhagens Ames, MT-bGH e GHR-KO Exp. 3, mas não nos demais grupos/subgrupos.

#### **7.5- Efeitos da CR sobre os parâmetros plasmáticos**

Visto que foi testada a hipótese de que a CR branda (20% ou até 10%) seria benéfica para a saúde e não prejudicaria a reprodução, foram avaliados os níveis plasmáticos de glicose, insulina e IGF-I. Há na literatura forte evidência de que a CR melhora a sensibilidade à insulina, e os baixos níveis de glicose nos animais sob CR confirmam isto (Masoro, 2005). É interessante notar que tanto a CR quanto mutações que prolongam a vida, como nas linhagens Ames e GHR-KO, levam a uma redução nos níveis periféricos de insulina e glicose (Bartke, 2005). E mais, este é provavelmente um dos mecanismos pelos quais ambas intervenções prolongam a vida (Bartke et al., 2001b; Barger et al., 2003). Baixos níveis periféricos de IGF-I também são um achado constante nestes animais de maior longevidade (Bartke et al., 2001b; Barger et al., 2003). Ikeno e colaboradores (2003) sugeriram que a supressão dos níveis periféricos de IGF-I, observada nos camundongos da linhagem Ames, está relacionada com o atraso no aparecimento de doenças neoplásicas fatais e conseqüentemente com a maior longevidade observada nestes mutantes. A CR, do mesmo modo, leva a uma redução nos níveis periféricos de IGF-I e também a uma longevidade aumentada (Shimokawa et al., 2003).

É importante salientar que os resultados mostrados no presente estudo foram obtidos de animais que passaram por um período de jejum de 12 horas antes de serem sacrificados. A ração foi oferecida aos animais sob CR na tarde anterior à manhã do sacrifício, então, ainda naquela noite, 12 horas antes do sacrifício, toda a ração foi retirada das gaiolas, tanto de animais CR quanto AL.

---

Os níveis de glicose no plasma não foram significativamente alterados pela CR em quaisquer dos grupos estudados, já o efeito de fenótipo era frequentemente observado. Estes resultados foram de certo modo inesperados porque a redução nos níveis plasmáticos de glicose é comum em animais submetidos a CR (Masoro, 2005). Em termos numéricos (sem significância estatística), na maioria dos grupos estudados, a saber as linhagens: anões Ames, GHR-KO Exp. 1 e PEPCK bGH, machos e fêmeas, foi observada uma tendência para níveis elevados de glicose nos animais que estavam sob CR. Este resultado pode ser explicado pela possibilidade de que os animais que viveram sob CR teriam melhor capacidade de lidar com o jejum prolongado, comparados com os animais AL, visto que os primeiros já estariam acostumados a passar parte dos seus dias sem ração na gaiola. É possível que os animais sob CR sejam capazes de ativar a via da gluconeogênese mais eficientemente que os animais AL.

Os resultados para níveis plasmáticos de insulina se assemelham aos da glicose. O tratamento não afetou este parâmetro em todos os grupos estudados. E, mais uma vez, quando analisam-se valores absolutos, foi observado que alguns grupos sob CR apresentaram uma tendência para níveis mais elevados de insulina. Estes grupos foram: machos da linhagem MT-bGH, e machos e fêmeas das linhagens GHR-KO Exp. 3 e PEPCK-bGH. A explicação para isto é provavelmente a mesma levantada a pouco para os níveis de glicose, ou seja, os animais sob CR estariam melhor adaptados a longos períodos sem comida, o que provavelmente reduziria o impacto do jejum de 12 horas sobre seus níveis de insulina.

O tratamento também não afetou os níveis plasmáticos de IGF-I em praticamente todos os grupos estudados, apesar dos relatos acerca da redução nos níveis periféricos de IGF-I em animais sob CR (Shimokawa et al., 2003). A única exceção foram os machos normais submetidos a CR de 10% e 20%, nos quais foi observada uma tendência para níveis reduzidos de IGF-I em quase todos os animais submetidos a CR, comparados com os animais AL. Provavelmente a CR utilizada neste estudo foi branda o suficiente para que seus efeitos não atingissem significância estatística. O achado óbvio foi o do efeito de fenótipo, já que os animais homocigotos mutantes das linhagens GHR-KO e Ames apresentaram níveis plasmáticos de IGF-I quase indetectáveis, comparados com os N (Chandrashekar e Bartke, 1993; Coschigano et al., 2000; Bartke et al., 2001a), ao passo que os animais homocigotos transgênicos das linhagens MT-bGH e PEPCK-bGH possuíam altíssimos níveis deste hormônio no plasma, comparados com os animais N (Naar et al., 1991; Cecim et al., 1993; Cecim et al., 1994; Bartke, 2000).

Para aprofundar a investigação dos efeitos da CR branda sobre a reprodução, foram mensurados os níveis plasmáticos dos principais hormônios esteróides: testosterona, estradiol e progesterona. Os níveis periféricos de testosterona não foram afetados pelo tratamento em quaisquer dos grupos estudados. Este resultado difere de alguns estudos onde foi aplicada uma CR mais

---

severa, com conseqüente redução significativa nos níveis de testosterona (Dong et al., 1994; Young et al., 2000). O fato é que, no presente estudo, os níveis de testosterona no plasma foram extremamente variáveis dentro dos subgrupos, e esta variação era de certo modo esperada devido a relatos prévios mostrando o padrão pulsátil de liberação deste hormônio em camundongos (Bartke et al., 1973; Bartke e Dalterio, 1975). Esta alta variação poderia estar mascarando os efeitos da CR branda, aplicada no presente estudo. Os níveis periféricos de estradiol e progesterona não foram afetados de modo geral pela CR, por outro lado, era freqüente o efeito do fenótipo sobre estes parâmetros nos grupos estudados. As fêmeas anãs Ames apresentaram níveis reduzidos de estradiol e progesterona, comparadas com as fêmeas N. Embora a diferença nos níveis de progesterona entre as fêmeas Tg e N da linhagem MT-bGH não tenha atingido significância, foi observado um grande efeito de fenótipo sobre os níveis de estradiol, visto que os animais Tg apresentaram níveis mais altos deste hormônio, comparados com os animais N. As fêmeas Tg da linhagem PEPCCK-bGH seguiram a mesma tendência que as MT-bGH para níveis de estradiol no plasma, embora sem significância estatística. As fêmeas da linhagem GHR-KO Exp. 3 apresentaram redução nos níveis de progesterona pela CR, sendo portanto, o único caso de efeito de dieta sobre os níveis plasmáticos de hormônios sexuais. Enquanto isso, nesta mesma linhagem, os níveis de estradiol mostraram-se reduzidos no fenótipo KO, comparado com N.

#### **7.6- Efeitos da CR sobre os níveis de testosterona nos testículos**

Devido à liberação pulsátil de testosterona para a circulação sanguínea (como uma conseqüência direta da liberação pulsátil de LH) (Bartke et al., 1973; Bartke e Dalterio, 1975), a medição dos níveis de testosterona em homogeneizado testicular representou, a princípio, um parâmetro provavelmente mais seguro para demonstrar o estado androgênico dos animais em estudo. No entanto, a alta variabilidade característica dos níveis plasmáticos de testosterona foi também observada nos níveis testiculares deste hormônio nos grupos estudados. Não foi detectado efeito significativo de fenótipo ou de dieta sobre este parâmetro em todos os grupos. Embora a habilidade de se detectar diferenças possa estar comprometida pela alta variabilidade inerente a este parâmetro, os resultados do presente estudo podem também significar que a intensidade de CR aplicada foi realmente branda.

#### **7.7- Efeitos da CR sobre a expressão gênica no fígado**

---

Um outro método utilizado para se avaliar os efeitos da CR branda sobre parâmetros relacionados à saúde foi checar a expressão de alguns genes no fígado. Os genes selecionados aparentemente estão envolvidos com o controle do envelhecimento e do efeito da CR sobre a longevidade. O hormônio IGF-I é produzido em grande escala no fígado após a estimulação pelo GH, e age por todo o organismo promovendo proliferação celular e diferenciação. Entretanto, o IGF-I também tem sido relacionado com a ocorrência de doenças neoplásicas, e a redução nos seus níveis periféricos tem sido associada com um prolongamento na longevidade em camundongos (Ikeno et al., 2003). Como mencionado anteriormente, a redução nos níveis de IGF-I é um achado constante nos animais submetidos à CR. Portanto, foi avaliado se uma CR de 20 % (ou mesmo de 10%) teria efeito sobre a expressão de mRNA para *IGF1* no fígado. Os resultados mostraram nenhuma diferença entre os grupos tratados (CR) e controle (AL). Apenas o efeito do fenótipo foi detectado: os animais homozigotos mutantes das linhagens Ames e GHR-KO (Exp. 2 e 3) e apresentaram níveis baixíssimos ou indetectáveis de mRNA para *IGF1*, enquanto os Tg da linhagem PEPCK-bGH apresentaram altos níveis de mRNA para este gene, comparados com os animais N. Estes achados foram de certo modo antecipados, visto que os animais mutantes da linhagem Ames não produzem GH, e os da linhagem GHR-KO não possuem receptores para GH, comprovando que a produção de IGF-I no fígado destes animais é gravemente comprometida (Bartke, 2005). Por outro lado, os animais Tg da linhagem PEPCK-bGH possuem elevados níveis periféricos de GH e portanto (Cecim et al., 1994), era de se esperar que apresentassem um aumento na expressão de mRNA para *IGF1* no fígado, comparados com os animais N. É interessante notar que os animais Tg da linhagem MT-bGH não expressaram mais mRNA para *IGF1* no fígado que os animais N. Isto se deve provavelmente à sua elevação relativamente modesta nos níveis plasmáticos de GH, comparados com os da linhagem PEPCK-bGH (Naar et al., 1991).

O produto do gene *PGC-1 $\alpha$* , a proteína PGC-1 $\alpha$  é um efetor-chave no controle da produção de glicose no fígado e há relatos da elevação nos seus níveis no fígado em condições de jejum (Yoon et al., 2001; Rhee et al., 2003). No presente estudo, no entanto, a expressão hepática de mRNA para *PGC-1 $\alpha$*  não foi influenciada pela CR branda de modo geral, com exceção das fêmeas da linhagem GHR-KO Exp. 2, as quais apresentaram um aumento na expressão deste gene com a 20% CR. Por outro lado, o efeito de fenótipo foi muito freqüente. Os machos mutantes das linhagens Ames e GHR-KO Exp. 2, também os machos e fêmeas mutantes da linhagem GHR-KO Exp. 3 apresentaram níveis mais altos de mRNA para *PGC-1 $\alpha$*  no fígado, comparados com os animais N. Em contraste, as fêmeas Tg da linhagem PEPCK-bGH apresentaram níveis mais baixos de mRNA para *PGC-1 $\alpha$* , comparadas com as fêmeas N. Al-Regaiey e colaboradores (2005) submeteram machos da linhagem GHR-KO a 30% CR e não encontraram qualquer efeito da dieta sobre os níveis hepáticos de mRNA para *PGC-1 $\alpha$*  mRNA no fígado destes animais. Porém, os mesmos autores observaram um efeito de fenótipo: os homozigotos mutantes (KO) expressavam mais mRNA para este gene que os animais

---

N. Por outro lado, ainda neste estudo, os níveis da proteína PGC-1 $\alpha$  encontravam-se aumentados no fenótipo KO e com a dieta (30% CR). Estes autores mediram os níveis da proteína PGC-1 $\alpha$  em machos da linhagem PEPCK-bGH e observaram uma redução nos níveis de proteína nos animais Tg, comparados aos N.

SIRT1 é o homólogo presente em mamíferos da molécula Sir2 (“*silencing information regulator 2*”), muito descrita em animais inferiores. Ambos fazem parte da família de deacetilases dependentes de NAD chamada “*Sirtuins*” (Hekimi e Guarente, 2003). Em fungos e nematódeos, a longevidade pode ser prolongada através da indução de Sir2 (Kaeberlein et al., 1999; Tissenbaum e Guarente, 2001). É interessante notar que os resultados do presente estudo estão em conformidade com os estudos supracitados, acerca da relação do SIRT1 com a longevidade, visto que os camundongos mutantes de maior longevidade do presente estudo apresentaram níveis mais altos de mRNA para *SIRT1* no fígado, comparados com os animais N. Em contrapartida, os mutantes de menor longevidade do presente estudo demonstraram níveis de mRNA para *SIRT1* mais baixos que os dos animais N. Há evidências consideráveis ligando as “*sirtuins*” com os efeitos da CR sobre a longevidade. Foi demonstrado que a Sir2 tem um papel central no aumento da longevidade em resposta a CR em *Saccharomyces cerevisiae* (Lin et al., 2000), *Caenorhabditis elegans* (Wang e Tissenbaum, 2006) e *Drosophila melanogaster* (Rogina e Helfand, 2004). Em um elegante estudo, Rodgers e colaboradores (2005) demonstraram que a SIRT1 interage com o PGC-1 $\alpha$  durante o jejum e, através desta interação, controla os processos de gliconeogênese e glicólise no fígado. Além disso, foi sugerido em outro trabalho que a CR prolonga a vida através da indução de SIRT1, que por sua vez trabalharia em associação com o Ku70 para modular a susceptibilidade das células à apoptose induzida por estresse (Cohen et al., 2004). No presente estudo, foi detectado um efeito da dieta sobre os níveis hepáticos de mRNA para *SIRT1* somente nas fêmeas N das linhagens Ames e GHR-KO Exp. 2, nas quais a CR aumentou significativamente a expressão de *SIRT1*. Talvez, também neste caso, a CR foi branda o suficiente para produzir diferenças não muito claras na expressão de *SIRT1*. Al-Regaiey e colaboradores (2005) relataram um aumento nos níveis da proteína SIRT1 no fígado com o uso de 30% CR em machos da linhagem GHR-KO, independentemente do fenótipo, mas nenhum efeito do fenótipo sobre este parâmetro. Ao passo que nos machos da linhagem PEPCK-bGH houve um aumento dos níveis da proteína SIRT1 nos animais Tg comparados com os animais N. As diferenças entre o trabalho supracitado e o presente estudo podem ser devido às diferenças experimentais, incluindo a severidade e o tempo de CR.

As sulfotransferases citosólicas, agrupadas em uma superfamília chamada SULTs, estão envolvidas com a conjugação de grupos sulfato a vários hormônios, drogas, neurotransmissores e compostos xenobióticos (Weinshilboum et al., 1997). A sulfotransferase de deidroepiandrosterona (DHEA), chamada *SULT2A1*, é um membro da subfamília *SULT2* e age sobre DHEA, testosterona, estrógeno e ácidos biliares (Strott, 2002). Os níveis de mRNA para *SULT2A1* aumentam com a

---

idade em ratos e camundongos, mas Echchgadda e colaboradores (2004) mostraram que a CR previne o aumento de mRNA para *mStal* (*mouse* DHEA-sulfotransferase) inerente ao envelhecimento. A DHEA e seu sulfato, DHEAS, foram propostos como marcadores do envelhecimento em humanos e em primatas não-humanos, especificamente devido ao declínio crescente nos níveis destas moléculas com o avanço da idade nestes animais (Berr et al., 1996; Lane et al., 1997; Mazat et al., 2001; Goncharova et al., 2002). Nos machos do presente estudo, foram encontradas diferenças extremas nos níveis hepáticos de mRNA para *mStal* quando foram comparados os fenótipos, enquanto que nas fêmeas, as diferenças fenotípicas foram pequenas. Nenhum efeito de dieta foi detectado em quaisquer dos grupos estudados.

### **7.8- Efeitos da CR sobre a expressão gênica nos órgãos reprodutivos**

A aromatase (Cyp19a1 ou AROM) é a enzima responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos, e pertence à superfamília do citocromo P450 (Simpson et al., 1994) (FIG. 15). O único grupo no qual foram detectadas diferenças estatísticas na expressão testicular do gene *AROM* foi o de machos da linhagem GHR-KO, Exp. 3: os animais KO apresentaram níveis mais altos deste gene comparados com os animais N. Estes homozigotos mutantes têm performance reprodutiva inferior aos animais N. Talvez, além dos fatores já conhecidos que contribuem para a fertilidade reduzida dos camundongos (Chandrashekar et al., 1999; Chandrashekar et al., 2004), mais um poderia ser adicionado: maior expressão de mRNA para *AROM* nos testículos, o que poderia estar levando à uma maior taxa de conversão de testosterona em estradiol. A 20% CR não alterou os níveis de mRNA para *AROM* nos animais estudados.

Mesmo sendo já conhecido que a CR leva a uma redução dos níveis plasmáticos de IGF-I (Shimokawa et al., 2003), não foram observadas alterações significativas nos níveis de mRNA para *IGFI* nos testículos em quaisquer dos grupos examinados. Mais uma vez, é possível que 20%CR é branda e modo a não causar alterações significativas. Por outro lado, quando se comparam fenótipos, foi observada diferença significativa na expressão testicular de *IGFI* em um grupo: o de camundongos da linhagem PEPCK-bGH. O fato não foi uma surpresa, visto que a expressão gonadal de mRNA para *IGFI* pode ser bem diferente da expressão hepática deste gene, e conseqüentemente dos níveis plasmáticos de IGF-I. Animais com níveis plasmáticos de IGF-I abaixo do detectável foram descritos como possuindo níveis normais ou quase normais de expressão testicular de mRNA para *IGFI* (Chandrashekar, comunicação pessoal). Talvez o mesmo seja verdadeiro para animais com níveis plasmáticos muito elevados de IGF-I, como os transgênicos do presente estudo. Na linhagem PEPCK-bGH, o único grupo onde foi encontrada diferença na expressão testicular de mRNA para *IGFI*, estes níveis encontravam-se reduzidos em apenas 22.6%

---

nos animais N em comparação com os animais Tg, uma diferença muito inferior à diferença nos níveis plasmáticos de IGF-I entre transgênicos e normais, relatada no presente estudo.

É interessante notar que os homozigotos mutantes da linhagem GHR-KO, Exp. 3, apresentaram elevação na expressão testicular de mRNA para *AR*, comparados com os animais N. Isto talvez represente um mecanismo compensatório, visto que os mutantes têm testículos de menor tamanho e reprodução até certo ponto comprometida. A 20%CR induziu um aumento nos níveis de mRNA para *AR* nos animais de ambos os fenótipos da linhagem MT-bGH. Provavelmente, também neste caso, houve um mecanismo compensatório, tentando manter as funções testiculares normais, apesar da CR.

Nenhuma diferença estatística foi detectada nos níveis testiculares de mRNA para *LHR* nos grupos examinados. Isto pode ser um indicativo de que a CR de 20% ou mesmo de 10%, é branda o bastante para não comprometer este parâmetro testicular nos grupos estudados.

Os camundongos transgênicos que superexpressam bGH não apresentaram diferenças na expressão testicular de mRNA para *FSHR*. No entanto, os camundongos homozigotos mutantes da linhagem GHR-KO, Exps. 2 e 3, apresentaram níveis testiculares de mRNA para *FSHR* mais altos que os animais N. Além do efeito de fenótipo, observado nos animais dos Exps. 2 e 3, somente no Exp. 2 foi observado também um efeito de dieta: a 20% CR promoveu um aumento da expressão deste gene nos testículos dos animais de ambos os fenótipos. Este aumento na expressão testicular de mRNA para *FSHR* nos homozigotos mutantes em comparação com os animais N da linhagem GHR-KO provavelmente reflete uma resposta aos reduzidos níveis plasmáticos de FSH reportados para estes animais (Chandrashekar et al., 2001). O FSH regula negativamente os níveis do seu próprio receptor (Tsutsui et al., 1985). As conseqüências funcionais de uma expressão aumentada de mRNA para *FSHR* nos testículos incluem a compensação parcial pela supressão da liberação de FSH pelo fenótipo ou pelo fenótipo em combinação com a CR.

A esteroidogênese testicular ocorre principalmente nas células de Leydig e envolve uma série de eventos bioquímicos que vão culminar na produção de hormônios esteróides a partir de colesterol (FIG. 15). Uma das enzimas cruciais para este processo é a 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase/isomerase (3 $\beta$ HSD), a qual converte pregnenolona em progesterona (Payne e Youngblood, 1995). Esta enzima pode ser encontrada nas membranas mitocondriais e microsomais, dependendo do tipo celular e da espécie considerada (revisão em Payne e Hales, 2004). Os animais da linhagem GHR-KO, Exps. 2 e 3, não apresentaram diferenças na expressão de mRNA para *HSD3* nos testículos comparando-se dietas ou fenótipos. É interessante notar que em ambas as linhagens de transgênicos, MT-bGH e PEPCK-bGH, foi observado um efeito de fenótipo: os animais Tg apresentaram níveis testiculares mais baixos de mRNA para *HSD3* que os animais N.

---

Outra enzima de grande importância na esteroidogênese é a citocromo P450c17, também chamada Cyp17, uma única enzima com dupla função: 17 $\alpha$ -hidroxilase e C<sub>17,20</sub>liase (Payne e Youngblood, 1995; Bair e Mellon, 2004) (FIG. 15). Esta enzima microsomal, portanto, catalisa duas reações distintas: primeiro ela converte progesterona em 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona através de hidroxilação da primeira no carbono 17, e só então cliva a cadeia lateral de dois carbonos, resultando na formação da androstenediona (Payne e Youngblood, 1995). Em humanos, esta enzima é expressa nas adrenais e nas gônadas mas não na placenta, enquanto que em roedores ela é expressa na placenta e nas gônadas mas não nas adrenais (Bair e Mellon, 2004). No presente estudo, foram detectadas diferenças nos níveis testiculares de mRNA para *CYP17* em três grupos experimentais: linhagem GHR-KO, Exps. 2 e 3 e linhagem PEPCK-bGH. Nestes grupos, os mutantes ou transgênicos sempre apresentaram níveis mais baixos deste gene em comparação com os animais N. Estes mutantes e transgênicos são conhecidos por sua sub-fertilidade, portanto, os resultados acerca da expressão de mRNA para *CYP17* não são inesperados. No entanto, a 20% CR ou mesmo 10% CR não afetaram este parâmetro em quaisquer dos grupos examinados.

A expressão ovariana dos genes *LHR*, *FSHR* e *IGF1* foi também examinada. Os níveis de mRNA para *FSHR* estavam aumentados nas fêmeas KO da linhagem GHR-KO, Exp.3, comparadas com as fêmeas N. Observou-se neste grupo também um efeito da dieta: a 20% CR promoveu uma elevação adicional na expressão deste gene em ambos os fenótipos. Vale lembrar que os animais KO deste grupo apresentaram performance inferior no teste de fertilidade comparados aos animais N. Provavelmente, este aumento na expressão ovariana de mRNA para *FSHR* nos animais KO esteja refletindo uma compensação aos reduzidos níveis plasmáticos FSH, reportados para estes mutantes (Chandrashekar et al., 2004). É interessante notar que uma CR branda como 20% foi capaz de influenciar a expressão ovariana de *FSHR*, e, de novo, isto parece representar um mecanismo compensatório. A expressão ovariana de mRNA para *FSHR* também apresentou-se aumentada pela CR em ambos os fenótipos da linhagem PEPCK-bGH. A 20% CR também aumentou os níveis de mRNA para *IGF1* nesta mesma linhagem, em ambos os fenótipos, sugerindo um potencial benefício para a reprodução dos animais submetidos à CR. É interessante como a expressão gênica de *IGF1* nos ovários dos camundongos desta linhagem foi tão comparável entre fenótipos, mesmo sendo os níveis periféricos de GH e IGF-I tão discrepantes entre Tg e N (Steger et al., 1993; Cecim et al., 1994). Um achado inesperado foi a grande diferença notada entre fenótipos quanto à expressão ovariana de mRNA para *IGF1* na linhagem Ames: os ovários das anãs homocigotas Ames apresentavam níveis muito mais altos de mRNA para *IGF1*, comparando-se à fêmeas N. Talvez, estes mutantes tentem compensar pela falta de IGF-I circulante com produção local de IGF-I em outros tecidos que não o fígado. Infelizmente, o aumento na expressão gênica de *IGF1* nos ovários destes mutantes não foi suficiente para assegurar a fertilidade, pois as anãs Ames não produzem



---

prolactina, hormônio essencial para a manutenção da prenhez em roedores (Bartke, 1965, 1973, 1999).

Também foi investigada a expressão gênica de *AR* nas vesículas seminais. Nenhuma diferença estatística foi detectada apesar do efeito da dieta sobre o peso destas glândulas ter sido observado em praticamente todos os grupos estudados.

Os níveis de mRNA para *ESR1* no útero se apresentaram basicamente sem alterações por fenótipo ou dieta, com exceção das fêmeas KO da linhagem GHR-KO, Exp. 3, as quais demonstraram níveis mais altos deste gene comparadas com as fêmeas N. Não ficou claro se esta diferença poderia representar um mecanismo compensatório ou poderia estar relacionada com a baixa performance das fêmeas KO no teste de fertilidade.

---

## 8- CONCLUSÕES

Foi examinada a interação entre a CR branda e diferentes alterações genéticas no eixo somatotrófico de camundongos com maior ou menor longevidade, bem como camundongos normais, e o impacto destes fatores sobre a reprodução. Em suma, a CR de 20% e 10% aplicada no presente estudo:

- 1) Não teve efeito numa análise geral sobre a performance no teste de fertilidade.
- 2) Não impactou o peso corporal final.
- 3) Causou uma redução modesta nos números absolutos, mas não relativos, para o peso dos órgãos reprodutivos.
- 4) De modo geral não afetou a glicemia, a sensibilidade à insulina ou os níveis periféricos de IGF-I.
- 5) Não afetou os níveis plasmáticos de testosterona, progesterona e estradiol.
- 6) Não afetou os níveis de testosterona em homogeneizado testicular.
- 7) Não influenciou a expressão hepática de genes relacionados com o efeito da CR sobre a saúde e longevidade.
- 8) Teve pequeno efeito sobre a expressão gênica nos órgão reprodutivos.

---

A atividade alterada do eixo somatotrófico nos animais examinados neste estudo teve muito maior impacto sobre a maioria dos parâmetros analisados, o que já era esperado devido relatos na literatura de diferenças fenotípicas nestas linhagens.

Embora fosse esperado que a CR branda aplicada no presente estudo trouxesse benefícios para a saúde e quiçá para a longevidade, muitos dos parâmetros fisiológicos responsivos ao jejum ou a uma CR mais severa não se apresentaram alterados neste caso. Weindruch e Walford (1988) afirmaram que mesmo uma CR branda é benéfica para a saúde e longevidade, embora tenham chamado a atenção para o fato de que o tamanho do efeito é menor. Cabe ressaltar que nas condições do presente estudo, a CR teve um impacto pequeno sobre o sistema reprodutivo e não teve um efeito negativo sobre a fertilidade em todos os grupos examinados. Este estudo preliminar encoraja a especulação de que regimes de restrição calórica branda possam trazer benefícios para a saúde e longevidade sem os “custos” para o potencial reprodutivo.

---

## 9- TABELAS

**Tabela 1-** Origem e principais características dos camundongos pertencentes a linhagens com alteração no eixo somatotrófico

<b>Linhagem</b>	<b>Origem</b>	<b>Efeito primário</b>	<b>Peso corporal</b>	<b>Longevidade média</b>	<b>Literatura</b>
<b>Anões Ames</b>	Mutação espontânea	Deficiência GH, PRL, TSH	~ a normal	Aumentada 40-65%	Schaible e Gowen, 1961
<b>GHR-KO</b>	Deleção gene GHR	Deficiência GHR; resistência GH	~ 1/2 normal	Aumentada 40-55%	Zhou et al., 1997
<b>Tg MT-bGH</b>	Microinjeção gene bGH	Produção excessiva GH	Aumentado	Reduzida	Palmiter et al., 1982
<b>Tg PEPCK-bGH</b>	Microinjeção gene bGH	Produção excessiva GH	Aumentado	Reduzida	McGrane et al., 1988

**Tabela 2-** Iniciadores utilizados no RT-PCR

Gene	Nº de acesso no GeneBank	Para frente (5' - 3')		Para trás (5' - 3')	
		Início	Sequência	Início	Sequência
B2m	NM_009735	137	aagtatactcacgccacca	298	aagaccagtccttgctgaag
Igf1 (IGF1)	NM_010512	24	catcatgctgcttcacacc	152	ggtccacacacgaactgaag
Ppargc1a (PGC-1 $\alpha$ )	NM_008904	498	cagaagagccgtctctactt	646	ctcggcttaacaatggcag
Sirt1 (SIRT1)	NM_019812	508	gtgatgacgatgacagaacg	669	ccagctcaggtggaggaatt
mSTa1 (mSTa1)	MUSSMSTA1 X	155	ccaagtcaggaacgaactgg	308	cgtggctcctccttattgat
Igf1 (IGF1) *	NM_010512		ctgagctggtggatgctctt		cactcatccacaatgcctgt
Cyp19a1 (AROM)	NM_007810	181	ttcaataccaggctcctggct	330	agtgtctcctcctccactgat
Ar (AR)	NM_013476	961	ccaaaggattggaaggtgag	1107	tgtagtagtcgcatctgg
Lhr (LHR)	MUSLHRAA	849	cactgctgtgctttcaggaa	1000	ccactgagttcattctcctc
Fshr (FSHR)	NM_013523	1329	ccatactaagagccagtacc	1501	ccttgcatccagttgcatg
Hsd3b1 (Hsd3)	NM_008293	490	catctctgcagctcagttg	630	agtactgccttctcagccat
Cyp17a1 (Cyp17)	NM_007809	997	agcatatccttgacaggtg	1110	tcttctctcactcagga
Esr1 (ESR)	NM_007956	2004	ggttctgagaatccctgcaa	2168	cctgttcccaacagaagaca

\* extraído de Masternak et al., 2005 - iniciador utilizado somente para as amostras de testículo.

**Tabela 3-** Efeitos da CR de 10 e 20% sobre a fertilidade

	Linhagens / Sexo	Fenótipo/Dieta	Fêmeas Prenhes	Fêmeas Não prenhes	Total	Nº filhotes
<b>E X P 1</b>	<b>Machos Normais</b>	AL	4 (2,65)	6 (7,35)	10	11,50 <sup>a</sup> ± 1,00 [4]
		10% CR	3 (3,71)	11 (10,29)	14	5,67 <sup>b</sup> ± 3,51 [3]
		20% CR	2 (2,65)	8 (7,35)	10	11,0 <sup>ab</sup> ± 1,41 [2]
<b>E X P</b>	<b>Anões Ames / Machos (*#)</b>	N AL	4 <sup>a</sup> (1,75)	2 (4,25)	6	12,00 <sup>a</sup> ± 0,00 [4]
		N CR	3 <sup>a</sup> (1,75)	3 (4,25)	6	12,00 <sup>a</sup> ± 1,00 [3]
		Df AL	0 <sup>b</sup> (1,75)	6 (4,25)	6	0 <sup>b</sup> [0]
		Df CR	0 <sup>b</sup> (1,75)	6 (4,25)	6	0 <sup>b</sup> [0]
<b>E R I M</b>	<b>Anãs Ames / Fêmeas (*#)</b>	N AL	4 <sup>a</sup> (1,75)	1 (3,25)	5	6,00 ± 1,22 [4]
		N CR	3 <sup>a</sup> (1,75)	2 (3,25)	5	4,33 ± 0,33 [3]
		Df AL	0 <sup>b</sup> (1,75)	5 (3,25)	5	0 [0]
		Df CR	0 <sup>b</sup> (1,75)	5 (3,25)	5	0 [0]
<b>E N T O  2</b>	<b>GHR-KO / Machos</b>	N AL	6 <sup>a</sup> (3,50)	0 (2,50)	6	10,60 ± 0,68 [5]
		N CR	3 <sup>b</sup> (3,50)	3 (2,50)	6	10,67 ± 1,45 [3]
		KO AL	3 (3,50)	3 (2,50)	6	10,00 ± 0,58 [3]
		KO CR	2 (3,50)	4 (2,50)	6	9,00 ± 3,00 [2]
	<b>GHR-KO / Fêmeas</b>	N AL	2 <sup>a</sup> (2,50)	3 (2,50)	5	5,00 [1]
		N CR	5 <sup>b</sup> (2,50)	0 (2,50)	5	7,20 ± 0,49 [5]
		KO AL	1 (1,50)	2(1,50)	3	2,00 [1]
		KO CR	1 (2,50)	4 (2,50)	5	0 [0]
<b>E X P  R I M  E N T O  3</b>	<b>GHR-KO / Machos (*#)</b>	N AL	7 <sup>a</sup> (4,25)	1 (3,75)	8	11,43 ± 0,43 [7]
		N CR	7 <sup>a</sup> (4,25)	1 (3,75)	8	12,00 ± 0,62 [7]
		KO AL	3 <sup>b</sup> (4,25)	5 (3,75)	8	10,33 ± 0,88 [3]
		KO CR	0 <sup>b</sup> (4,25)	8 (3,75)	8	0 [0]
	<b>GHR-KO / Fêmeas (#)</b>	N AL	5 <sup>a</sup> (4,33)	0 (0,67)	5	6,20 ± 1,24 [5]
		N CR	5 <sup>a</sup> (4,33)	0 (0,67)	5	7,00 ± 0,71 [4]
		KO AL	2 <sup>b</sup> (2,60)	1 (0,40)	3	3,50 ± 0,50 [2]
		KO CR	1 <sup>b</sup> (1,73)	1 (0,27)	2	4,00 [1]
<b>E N T O  3</b>	<b>PEPCK-bGH / Machos (*#)</b>	N AL	10 <sup>a</sup> (7,78)	0 (2,22)	10	10,78 ± 1,14 [9]
		N CR	9 <sup>a</sup> (7,78)	1 (2,22)	10	10,33 ± 0,96 [9]
		Tg AL	3 <sup>b</sup> (6,22)	5 (1,78)	8	13,00 ± 1,00 [3]
		Tg CR	6 <sup>b</sup> (6,22)	2 (1,78)	8	11,67 ± 0,33 [6]
	<b>PEPCK-bGH / Fêmeas (#)</b>	N AL	4 (2,00) <sup>a</sup>	1 (3,00)	5	3,50 ± 0,96 [4]
		N CR	2 (1,60) <sup>a</sup>	2 (2,40)	4	7,50 ± 0,50 [2]
		Tg AL	0 (1,20) <sup>b</sup>	3 (1,80)	3	0 [0]
		Tg CR	0 (1,20) <sup>b</sup>	3 (1,80)	3	0 [0]

**Nota:** os números em parênteses são as frequências esperadas de fêmeas prenhes. Em colchetes está representado o número de fêmeas que tiveram filhotes. Valores na mesma coluna com diferente sobrescrito são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  ou menos. Todas as comparações foram feitas dentro de cada grupo. Sobrescrito diferente somente num fenótipo significa efeito da dieta ( $p < 0,05$ ) naquele fenótipo. Os símbolos (\*) e (#) se referem ao teste do Qui-quadrado e significam diferença estatística numa análise geral ou efeito de fenótipo, respectivamente.

**Tabela 4-** Efeitos da CR de 10 e 20% sobre peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos em machos normais

<b>Machos Normais 10 e 20% CR</b>			
	<b>AL</b>	<b>10% CR</b>	<b>20% CR</b>
<b>Peso corporal (g)</b>	30,3±4,7 (n=8)	30,2±4,0 (n=8)	27,7±2,6 (n=9) [NS]
<b>Glicose (mg/dl)</b>	89,0±10,8 (n=8)	92,1±16,5 (n=8)	84,9±16,2 (n=9) [NS]
<b>Insulina (ng/ml)</b>	1,25±1,97 (n=8)	0,72±0,50 (n=8)	1,25±1,17 (n=9) [NS]
<b>IGF-I (ng/ml)</b>	397,4±56,7 <sup>a</sup> (n=8)	322,4±72,6 <sup>ab</sup> (n=8)	290,6±70,9 <sup>b</sup> (n=9) [#0,011]
<b>Testosterona (ng/ml)</b>	170,0±441,8 (n=8)	33,2±34,5 (n=8)	24,9±21,5 (n=9) [NS]

**Nota:** todos os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo. Valores com diferente sobrescrito são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  ou menos. Em colchetes estão os valores do nível de significância (valor de  $p$ ) para dieta= [#]. [NS]= não significativo.

**Tabela 5-** Efeitos da CR de 20% sobre peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos na linhagem Ames

Linhagem Anões Ames								
	Machos				Fêmeas			
	N AL	N CR	Df AL	Df CR	N AL	N CR	Df AL	Df CR
<b>Peso corporal (g)</b>	33,3±1,3 <sup>a</sup> (n=9)	32,0±0,9 <sup>a</sup> (n=12)	15,4±1,1 <sup>b</sup> (n=5)	13,6±0,2 <sup>b</sup> (n=5)[* <b>0,001</b> ]	27,1±1,2 <sup>a</sup> (n=4)	29,1±0,9 <sup>a</sup> (n=5)	12,4±0,4 <sup>b</sup> (n=5)	11,6±0,9 <sup>b</sup> (n=5)[* <b>0,001</b> ]
<b>Glicose (mg/dl)</b>	118,4±18,7 <sup>ab</sup> (n=5)	161,4±18,3 <sup>a</sup> (n=8)	78,9±11,4 <sup>b</sup> (n=4)	69,0±18,1 <sup>b</sup> (n=4)[* <b>0,003</b> ]	121,4±37,8 <sup>ab</sup> (n=4)	167,6±27,9 <sup>a</sup> (n=5)	57,6±14,9 <sup>b</sup> (n=5)	88,5±19,2 <sup>ab</sup> (n=5)[* <b>0,012</b> ]
<b>Insulina (ng/ml)</b>	0,9±0,3 <sup>ab</sup> (n=5)	2,0±0,4 <sup>a</sup> (n=8)	0,4±0,1 <sup>b</sup> (n=4)	0,5±0,0 <sup>b</sup> (n=4)[* <b>0,009</b> ]	0,7±0,2 (n=4)	0,8±0,1 (n=5)	0,6±0,1 (n=5)	0,6±0,1 (n=5)[NS]
<b>IGF-I (ng/ml)</b>	280,9±19,8 <sup>a</sup> (n=5)	285,1±34,1 <sup>a</sup> (n=8)	19,3±4,5 <sup>b</sup> (n=4)	36,4±4,3 <sup>c</sup> (n=4)[* <b>0,001</b> ]	98,1±20,3 <sup>ac</sup> (n=4)	171,9±38,3 <sup>a</sup> (n=5)	0,0±0,0 <sup>b</sup> (n=5)	10,1±6,3 <sup>bc</sup> (n=5)[* <b>0,001</b> ]
<b>Testosterona (ng/ml)</b>	283,5±263,6 (n=9)	292,6±179,2 (n=12)	30,3±6±2 (n=5)	45,5±24,5 (n=5)[NS]	-	-	-	-
<b>Estradiol (pg/ml)</b>	-	-	-	-	6,6±0,7 (n=4)	8,1±0,8 (n=3)	5,4±1,1 (n=5)	5,0±1,1 (n=5)[* <b>0,042</b> ]
<b>Progesterona (ng/ml)</b>	-	-	-	-	6,8±1,9 (n=5)	9,4±3,6 (n=5)	4,3±1,1 (n=5)	2,0±0,7 (n=5)[* <b>0,039</b> ]

**Nota:** todos os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo. Valores com diferente sobrescrito são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  ou menos. Em colchetes estão os valores do nível de significância (valor de  $p$ ) para: [\*]= fenótipo; [#]= dieta; e [&]= interação fenótipo vs. dieta; [NS]= não significativo. Para estradiol e progesterona nas fêmeas, embora o efeito de fenótipo seja significativo, não há sobrescritos na tabela. Isto se deve ao fato de que a significância não foi atingida nos testes *post hoc*, quando as médias individuais eram comparadas entre si.



**Tabela 6-** Efeitos da CR de 20% sobre peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos na linhagem GHR-KO, Experimento 2

<i>Exp. 2 - Linhagem GHR-KO</i>								
	<b>Grupo 2- Machos</b>				<b>Grupo 3- Fêmeas</b>			
	<b>N AL</b>	<b>N CR</b>	<b>KO AL</b>	<b>KO CR</b>	<b>N AL</b>	<b>N CR</b>	<b>KO AL</b>	<b>KO CR</b>
<b>Peso corporal (g)</b>	35,4±1,7 (n=8)	28,8±1,0 (n=12)	14,4±0,7 (n=10)	13,0±0,3 (n=10)[&0,013]	30,9±2,1 <sup>a</sup> (n=6)	27,4±1,5 <sup>a</sup> (n=5)	14,3±0,7 <sup>b</sup> (n=5)	13,4±0,7 <sup>b</sup> (n=5)[*0,001]
<b>Glicose (mg/dl)</b>	189,0±27,1 (n=6)	99,4±9,0 (n=8)	69,0±10,1 (n=8)	64,6±7,8 (n=6)[&0,007]	116,3±7,8 (n=6)	115,4±4,2 (n=5)	92,2±21,3 (n=5)	79,8±6,3 (n=5)[*0,020]
<b>Insulina (ng/ml)</b>	3,7±1,7 (n=6)	1,0±0,4 (n=8)	0,6±0,1 (n=8)	0,3±0,1 (n=6)[*0,022]	2,6±0,9 (n=6)	0,4±0,1 (n=5)	0,3±0,1 (n=5)	0,3±0,1 (n=5)[*0,046]
<b>IGF-I (ng/ml)</b>	317,6±50,4 (n=6)	206,3±14,8 (n=8)	15,6±4,7 (n=8)	16,9±2,4 (n=6)[&0,024]	242,1±23,5 <sup>a</sup> (n=6)	191,6±21,5 <sup>a</sup> (n=5)	10,6±6,6 <sup>b</sup> (n=5)	4,6±4,6 <sup>b</sup> (n=5)[*0,001]
<b>Testosterona (ng/ml)</b>	30,8±4,9 (n=8)	432,7±226,6 (n=12)	151,2±126,4 (n=10)	111,6±92,1 (n=10)[NS]	-	-	-	-
<b>Estradiol (pg/ml)</b>	-	-	-	-	14,5±2,8 (n=6)	14,8±2,3 (n=5)	15,0±5,9 (n=5)	37,2±10,3 (n=5)[NS]
<b>Progesterona (ng/ml)</b>	-	-	-	-	7,1±3,2 (n=6)	5,0±0,4 (n=5)	3,9±1,2 (n=5)	2,6±0,5 (n=5)[NS]

**Nota:** todos os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo. Valores com diferente sobrescrito são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  ou menos. Em colchetes estão os valores do nível de significância (valor de  $p$ ) para: [\*]= fenótipo; [#]= dieta; e [&]= interação fenótipo vs. dieta; [NS]= não significativo. Para glicose nas fêmeas e IGF-I nos machos, embora o efeito de fenótipo seja significativo, não há sobrescritos na tabela. Isto se deve ao fato de que a significância não foi atingida nos testes *post hoc*, quando as médias individuais eram comparadas entre si.

**Tabela 7-** Efeitos da CR de 20% sobre peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos na linhagem MT-bGH

	Linhagem MT-bGH							
	Machos				Fêmeas			
	N AL	N CR	Tg AL	Tg CR	N AL	N CR	Tg AL	Tg CR
<b>Peso corporal (g)</b>	34,5±0,6 <sup>a</sup> (n=6)	31,1±0,9 <sup>a</sup> (n=6)	49,5±1,5 <sup>b</sup> (n=12)	48,9±1,1 <sup>b</sup> (n=14)[*0,001]	27,6±0,6 <sup>a</sup> (n=7)	24,6±0,5 <sup>b</sup> (n=8)	41,1±1,6 <sup>c</sup> (n=6)	39,4±1,9 <sup>c</sup> (n=6)[*0,001]
<b>Glicose (mg/dl)</b>	175,1±15,8 (n=6)	136,4±6,6 (n=6)	134,4±8,9 (n=12)	134,9±8,1 (n=14)[NS]	148,9±12,6 <sup>ab</sup> (n=7)	143,6±5,8 <sup>a</sup> (n=8)	180,3±5,3 <sup>b</sup> (n=6)	155,5±7,5 <sup>ab</sup> (n=6)[*0,018]
<b>Insulina (ng/ml)</b>	0,6±0,1 <sup>ab</sup> (n=6)	0,4±0,1 <sup>a</sup> (n=6)	1,9±0,6 <sup>ab</sup> (n=12)	1,3±0,3 <sup>b</sup> (n=14)[*0,026]	0,7±0,3 <sup>ab</sup> (n=7)	0,4±0,1 <sup>a</sup> (n=8)	1,2±0,2 <sup>b</sup> (n=6)	2,3±0,8 <sup>ab</sup> (n=6)[*0,005]
<b>IGF-I (ng/ml)</b>	514,7±22,6 <sup>a</sup> (n=6)	449,4±18,0 <sup>a</sup> (n=6)	927,1±98,0 <sup>b</sup> (n=12)	815,2±79,9 <sup>b</sup> (n=14)[*0,001]	284,5±14,4 <sup>a</sup> (n=7)	258,5±21,4 <sup>a</sup> (n=8)	410,4±34,1 <sup>b</sup> (n=6)	474,9±41,8 <sup>b</sup> (n=6)[*0,001]
<b>Testosterona (ng/ml)</b>	173,1±153,3 (n=6)	564,0±187,0 (n=6)	201,7±94,3 (n=12)	102,6±80,1 (n=14)[NS]	-	-	-	-
<b>Estradiol (pg/ml)</b>	-	-	-	-	6,3±0,6 <sup>a</sup> (n=7)	8,6±1,4 <sup>a</sup> (n=8)	27,4±3,3 <sup>b</sup> (n=6)	33,1±5,6 <sup>b</sup> (n=6)[*0,001]
<b>Progesterona (ng/ml)</b>	-	-	-	-	10,8±3,7 (n=7)	7,6±1,1 (n=8)	6,4±1,2 (n=6)	7,7±1,1 (n=6)[NS]

**Nota:** todos os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo. Valores com diferente sobrescrito são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  ou menos. Em colchetes estão os valores do nível de significância (valor de  $p$ ) para: [\*]= fenótipo; [#]= dieta; e [&]= interação fenótipo vs. dieta; [NS]= não significativo.

**Tabela 8-** Efeitos da CR de 20% sobre peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos na linhagem GHR-KO, Experimento 3

<i>Exp. 3 - Linhagem GHR-KO</i>								
	<b>Machos</b>				<b>Fêmeas</b>			
	<b>N AL</b>	<b>N CR</b>	<b>KO AL</b>	<b>KO CR</b>	<b>N AL</b>	<b>N CR</b>	<b>KO AL</b>	<b>KO CR</b>
<b>Peso corporal (g)</b>	38,9±1,7 <sup>a</sup> (n=9)	35,2±1,0 <sup>a</sup> (n=10)	15,5±0,8 <sup>b</sup> (n=9)	15,4±0,7 <sup>b</sup> (n=8)[* <b>0,001</b> ]	26,0±0,9 <sup>a</sup> (n=10)	24,4±0,8 <sup>a</sup> (n=10)	13,9±0,6 <sup>b</sup> (n=8)	12,9±,5 <sup>b</sup> (n=8)[* <b>0,001</b> ]
<b>Glicose (mg/dl)</b>	164,5±8,9 (n=9)	149,7±7,0 (n=10)	105,8±12,5 (n=9)	142,9±12,4 (n=8)[& <b>0,016</b> ]	137,8±9,2 (n=10)	130,8±4,2 (n=10)	111,0±8,9 (n=8)	123,3±7,2 (n=8)[* <b>0,031</b> ]
<b>Insulina (ng/ml)</b>	2,1±1,1 (n=9)	2,0±1,2 (n=10)	0,2±0,0 (n=9)	0,3±0,1 (n=8)[NS]	0,2±0,0 (n=10)	0,3±0,1 (n=10)	0,2±0,1 (n=8)	0,1±0,0 (n=8)[NS]
<b>IGF-I (ng/ml)</b>	412,2±22,3 <sup>a</sup> (n=9)	384,6±12,9 <sup>a</sup> (n=10)	40,0±11,8 <sup>b</sup> (n=9)	35,9±4,0 <sup>b</sup> (n=8)[* <b>0,001</b> ]	216,5±16,2 <sup>a</sup> (n=10)	215,0±11,8 <sup>a</sup> (n=10)	44,7±7,4 <sup>b</sup> (n=8)	37,8±4,7 <sup>b</sup> (n=8)[* <b>0,001</b> ]
<b>Testosterona (ng/ml)</b>	457,0±262,5 (n=9)	40,3±21,3 (n=10)	82,5±70,5 (n=9)	38,0±21,3 (n=8)[NS]	-	-	-	-
<b>Estradiol (pg/ml)</b>	-	-	-	-	8,1±1,3 <sup>a</sup> (n=10)	5,5±0,6 <sup>ab</sup> (n=10)	2,9±0,4 <sup>b</sup> (n=8)	2,5±0,5 <sup>b</sup> (n=8)[* <b>0,001</b> ]
<b>Progesterona (ng/ml)</b>	-	-	-	-	7,5±1,0 <sup>a</sup> (n=10)	3,3±0,4 <sup>bc</sup> (n=10)	5,9±0,8 <sup>ab</sup> (n=8)	2,4±0,4 <sup>c</sup> (n=8)[# <b>0,001</b> ]

**Nota:** todos os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo. Valores com diferente sobrescrito são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  ou menos. Em colchetes estão os valores do nível de significância (valor de  $p$ ) para: [\*]= fenótipo; [#]= dieta; e [&]= interação fenótipo vs. dieta; [NS]= não significativo. Para glicose nas fêmeas, embora o efeito de fenótipo seja significativo, não há sobrescritos na tabela. Isto se deve ao fato de que a significância não foi atingida nos testes *post hoc*, quando as médias individuais eram comparadas entre si.

**Tabela 9-** Efeitos da CR de 20% sobre peso corporal final e vários parâmetros plasmáticos na linhagem PEPCK-bGH

	Linhagem PEPCK-bGH							
	Machos				Fêmeas			
	N AL	N CR	Tg AL	Tg CR	N AL	N CR	Tg AL	Tg CR
<b>Peso corporal (g)</b>	39,7±1,7 <sup>a</sup> (n=13)	36,1±1,3 <sup>b</sup> (n=14)	57,4±2,9 <sup>b</sup> (n=4)[*0,001]	49,6±3,3 <sup>b</sup> (n=5)[#0,014]	30,6±1,4 (n=9)	25,5±0,7 (n=8)	49,4±0,3 (n=3)	51,4±1,9 (n=2)[&0,037]
<b>Glicose (mg/dl)</b>	176,7±7,5 <sup>a</sup> (n=13)	172,6±9,6 <sup>a</sup> (n=14)	102,7±5,5 <sup>b</sup> (n=4)	116,5±3,7 <sup>b</sup> (n=5)[*0,001]	130,3±9,5 (n=9)	147,7±6,8 (n=8)	104,5±4,0 (n=3)	110,6±2,7 (n=2)[*0,016]
<b>Insulina (ng/ml)</b>	0,8±0,3 (n=13)	0,6±0,1 (n=14)	0,5±0,2 (n=4)	2,0±1,0 (n=5)[&0,029]	0,7±0,2 (n=9)	0,8±0,4 (n=8)	0,5±0,1 (n=3)	0,6±0,2 (n=2)[NS]
<b>IGF-I (ng/ml)</b>	426,1±16 <sup>a</sup> (n=13)	434,3±18,6 <sup>a</sup> (n=14)	998,9±47,8 <sup>b</sup> (n=4)	889,9±65,1 <sup>b</sup> (n=5)[*0,001]	370,3±21,1 (n=9)	345,1±16,2 (n=8)	1043,0±136,8 (n=3)	1268,8±130,9 (n=2)[&0,031]
<b>Testosterona (ng/ml)</b>	91,8±70,9 (n=13)	423,8±169,2 (n=14)	72,7±58,3 (n=4)	13,8±1,4 (n=5)[NS]	-	-	-	-
<b>Estradiol (pg/ml)</b>	-	-	-	-	8,0±0,6 (n=9)	10,2±1,0 (n=8)	24,7±4,4 (n=3)	44,1±3,6 (n=2)[&0,001]
<b>Progesterona (ng/ml)</b>	-	-	-	-	9,3±4,2 (n=9)	6,0±2,8 (n=8)	11,1±2,0 (n=3)	7,7±1,3 (n=2)[NS]

**Nota:** todos os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo. Valores com diferente sobrescrito são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  ou menos. Em colchetes estão os valores do nível de significância (valor de  $p$ ) para: [\*]= fenótipo; [#]= dieta; e [&]= interação fenótipo vs. dieta; [NS]= não significativo. Para glicose nas fêmeas, embora o efeito de fenótipo seja significativo, não há sobrescritos na tabela. Isto se deve ao fato de que a significância não foi atingida nos testes *post hoc*, quando as médias individuais eram comparadas entre si.

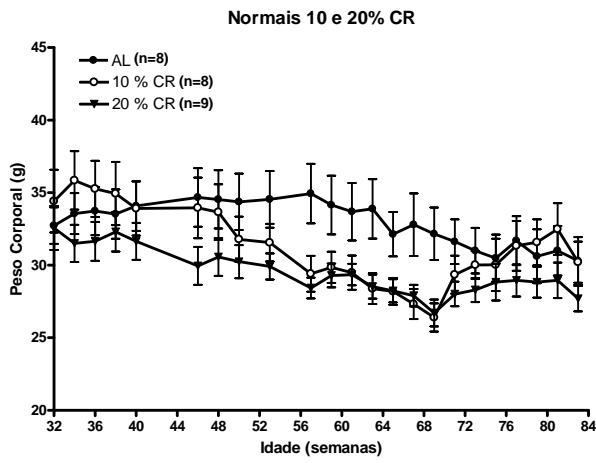
---

## 10- FIGURAS

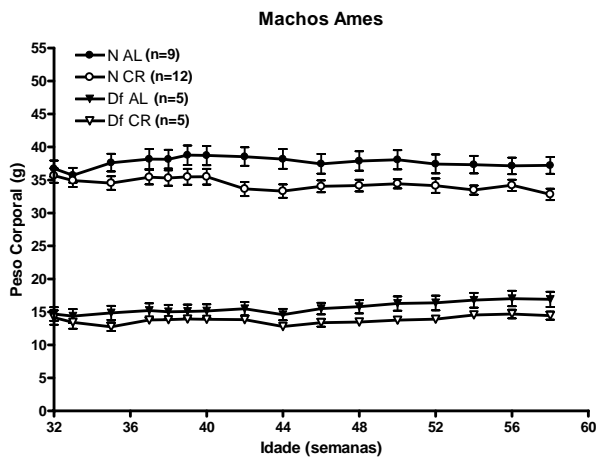
**Figura 1-** Curvas de crescimento dos camundongos: (A) machos normais submetidos a 10 e 20% CR; (B) Ames machos; (C) Ames fêmeas; (D) GHR-KO Exp.2, machos; (E) GHR-KO Exp.2, fêmeas; (F) MT-bGH machos; (G) MT-bGH fêmeas; (H) GHR-KO Exp.3, machos; (I) GHR-KO Exp.3, fêmeas; (J) PEPCK-bGH machos; e (L) PEPCK-bGH fêmeas. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). Cada ponto plotado representa uma média dos pesos corporais dos animais naquele subgrupo em um determinado dia. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo. **N:** camundongo normal; **KO:** *knockout* para receptor de GH; **Df:** anão Ames; **Tg:** transgênico que superexpressa bGH.

Figura 1- Curvas de crescimento

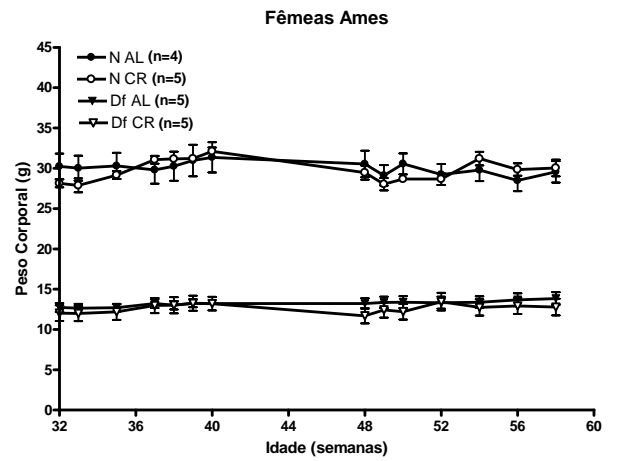
A



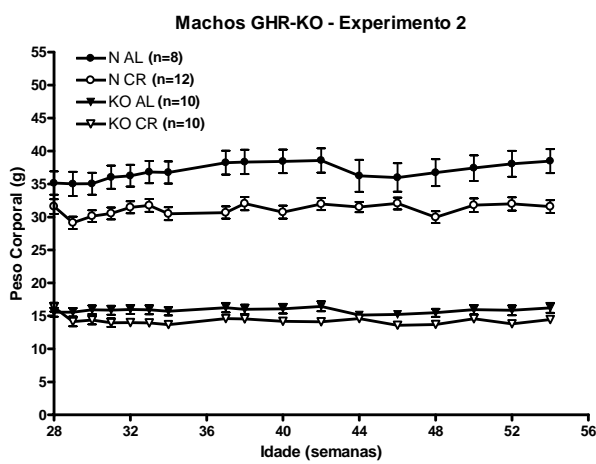
B



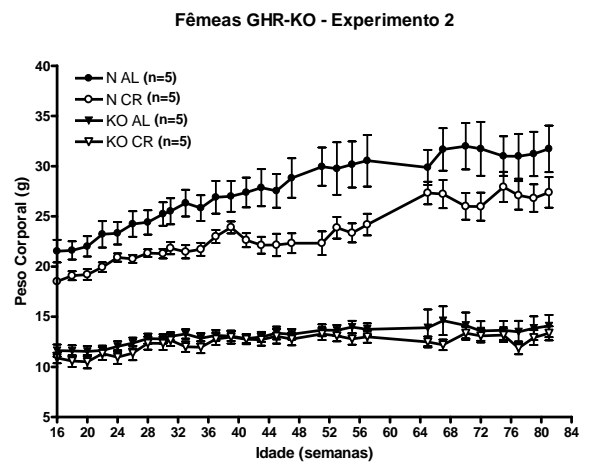
C



D

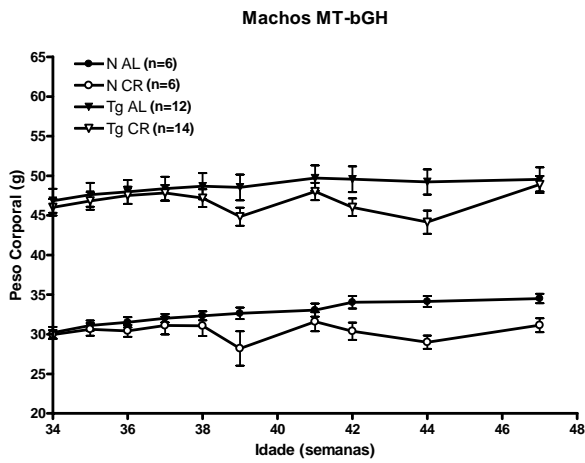


E

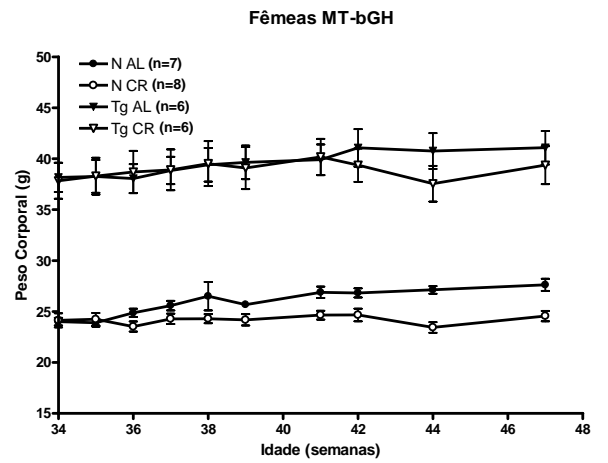


(continuação) Figura 1- Curvas de crescimento

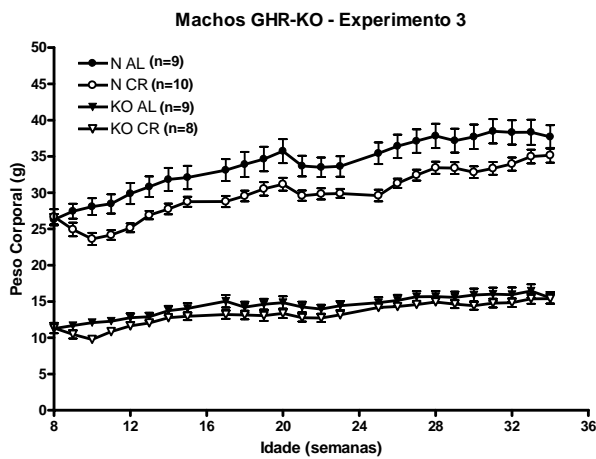
F



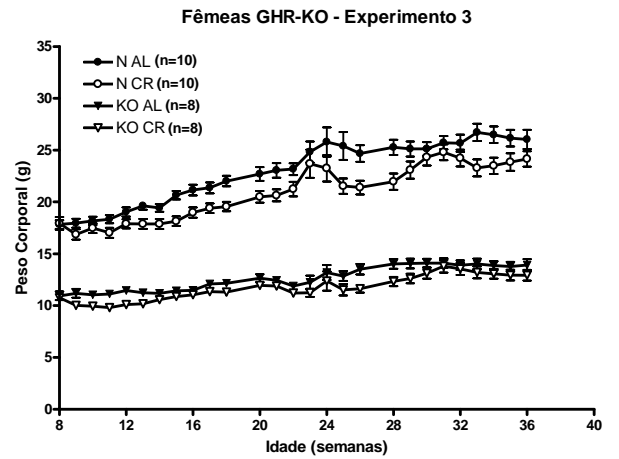
G



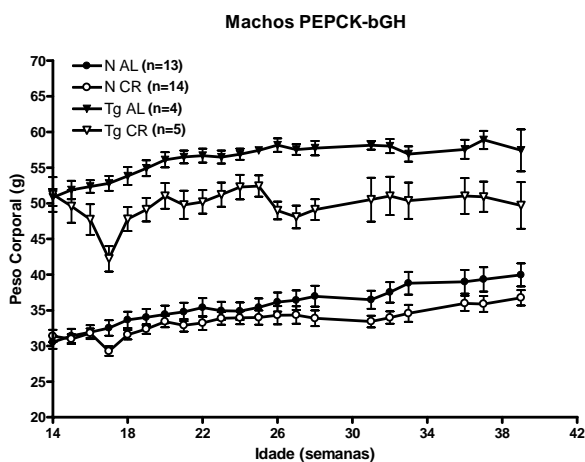
H



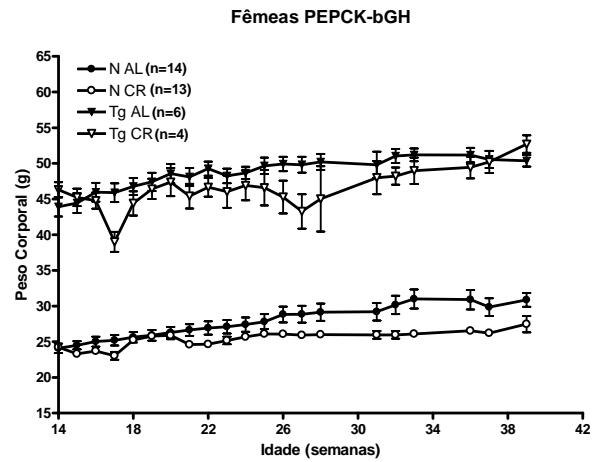
I



J



L

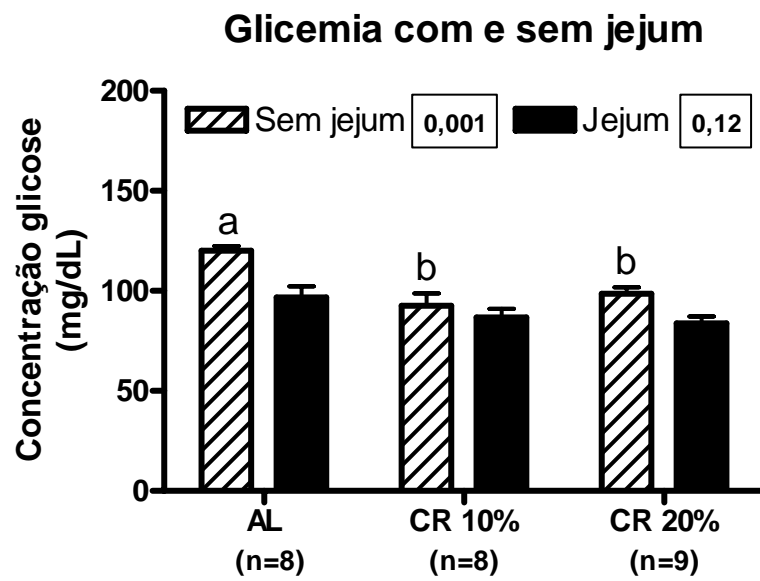


---

**Figura 2-** Efeito da CR branda sobre os níveis plasmáticos de glicose nos machos normais submetidos a 10 e 20% CR. Quando os animais tinham 12 meses (4 meses de tratamento), os níveis de glicose foram medidos com o auxílio de um glucômetro, sem jejum e com jejum de 12 horas. As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado em parênteses. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para dieta. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.



**Figura 2-** Efeitos da CR de 10 e 20% sobre os níveis plasmáticos de glicose com e sem jejum em camundongos normais

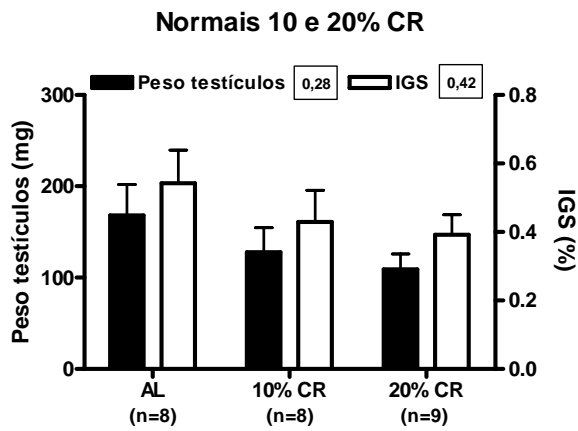


---

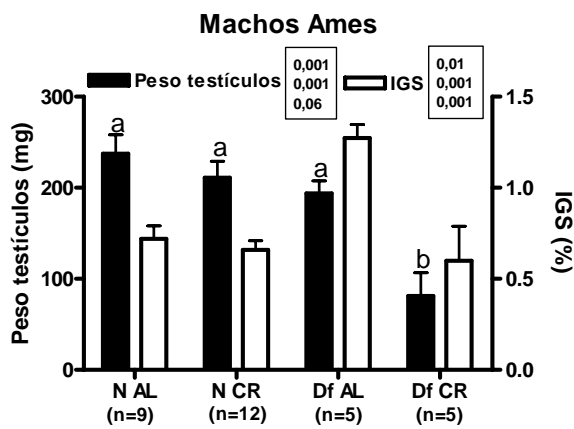
**Figura 3-** Efeito da CR branda sobre o peso de gônadas (eixo y à esquerda) e sobre o IGS (índice gonadossomático) (eixo y à direita) nos camundongos: (A) machos normais submetidos a 10 e 20% CR; (B) Ames machos; (C) Ames fêmeas; (D) GHR-KO Exp.2, machos; (E) GHR-KO Exp.2, fêmeas; (F) MT-bGH machos; (G) MT-bGH fêmeas; (H) GHR-KO Exp.3, machos; (I) GHR-KO Exp.3, fêmeas; (J) PEPCK-bGH machos; e (L) PEPCK-bGH fêmeas. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado em parênteses. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta; ou só para dieta no caso dos animais normais submetidos a 10 e 20% CR. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.

**Figura 3-** Efeitos da CR sobre o peso das gônadas e o IGS

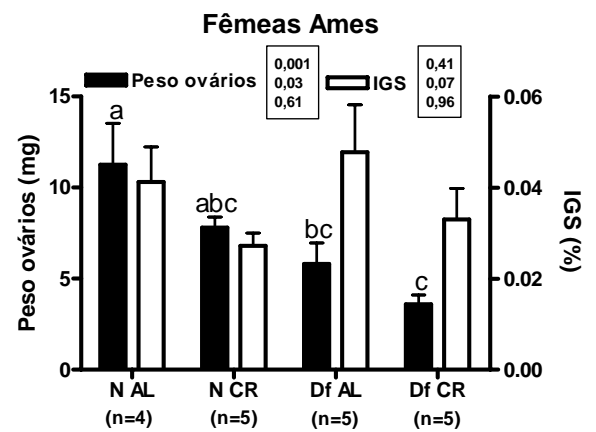
**A**



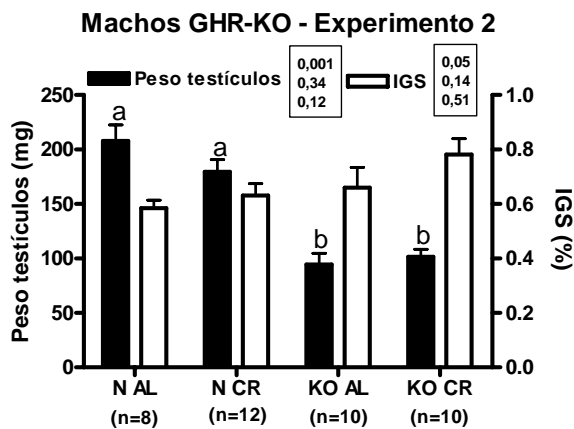
**B**



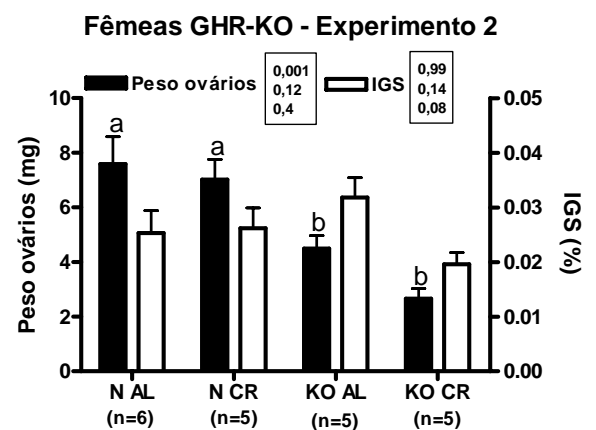
**C**



**D**

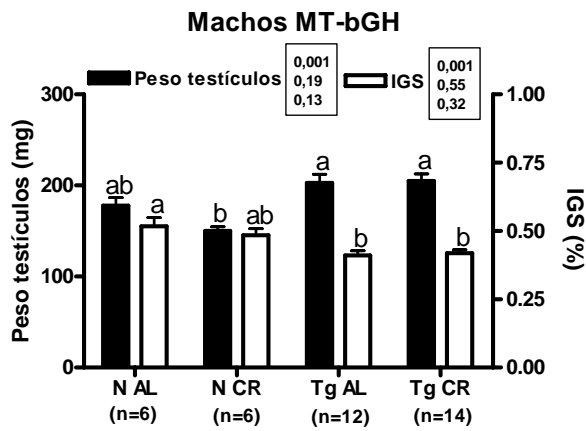


**E**

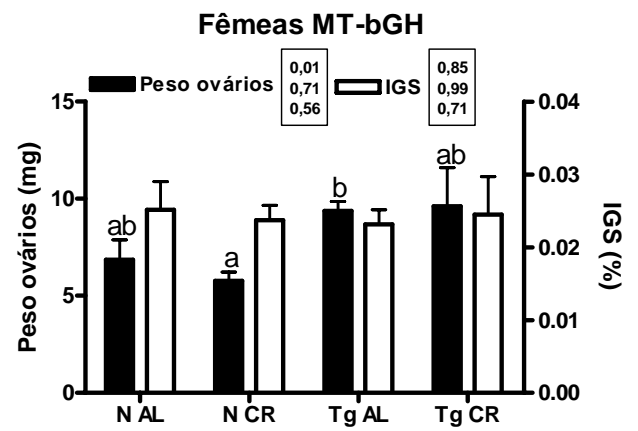


(continuação) **Figura 3**- Efeitos da CR sobre o peso das gônadas e o IGS

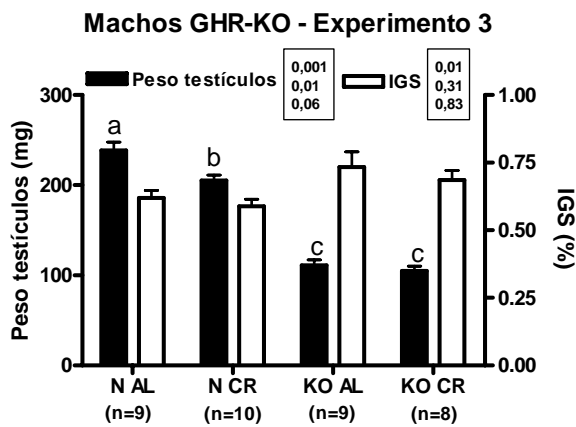
**F**



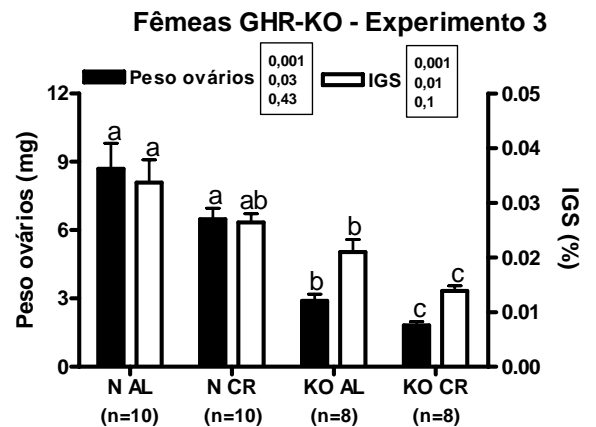
**G**



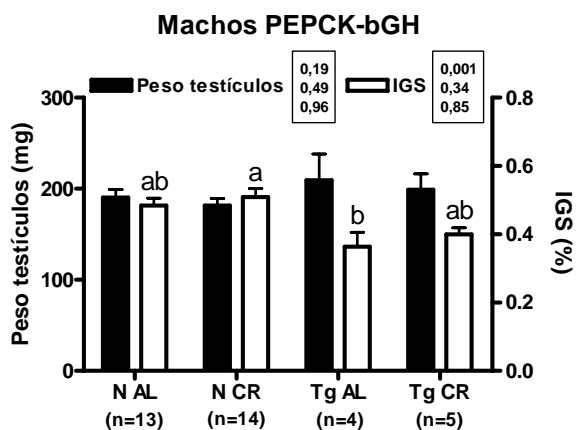
**H**



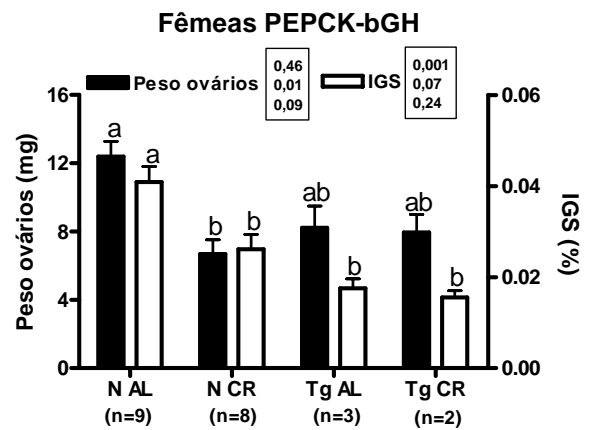
**I**



**J**



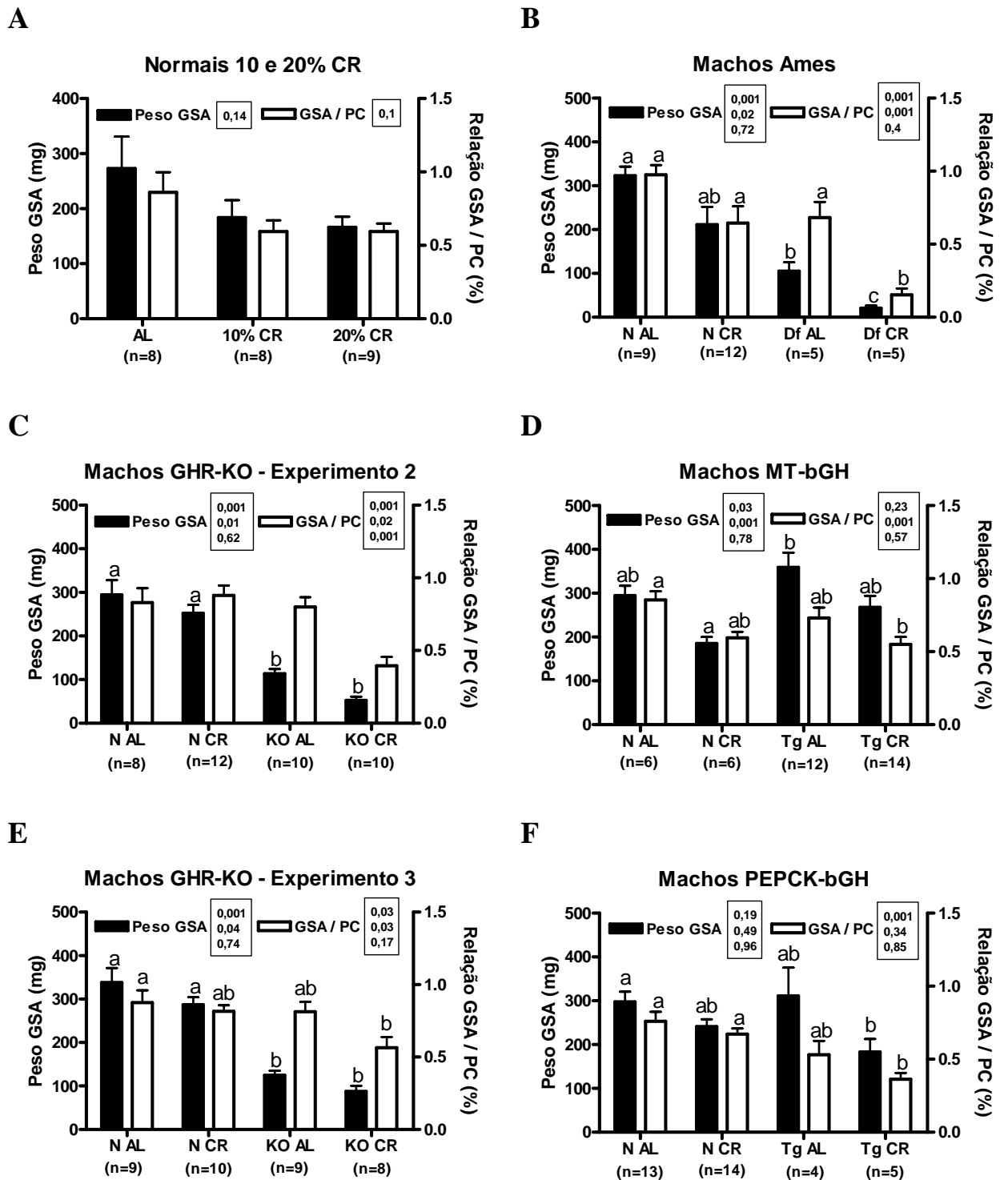
**L**



---

**Figura 4-** Efeito da CR branda sobre o peso das glândulas sexuais acessórias – GSA (vesículas seminais + glândulas de coagulação) bem como sobre a relação, expressa em porcentagem (%), do peso das mesmas e do peso corporal (PC) – GSA / PC (peso GSA / PC x 100) nos machos: (A) normais submetidos a 10 e 20% CR; (B) Ames; (C) GHR -KO Exp.2; (D) MT-bGH; (E) GHR-KO Exp.3; e (F) PEPCK-bGH. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado nas barras. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta; ou só para dieta no caso dos animais normais submetidos a 10 e 20% CR. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.

**Figura 4-** Efeitos da CR sobre o peso das glândulas sexuais acessórias

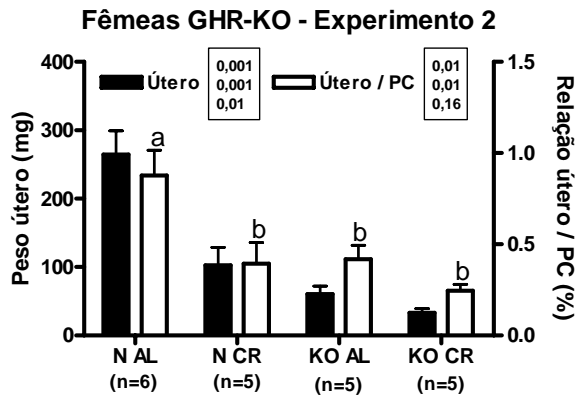


---

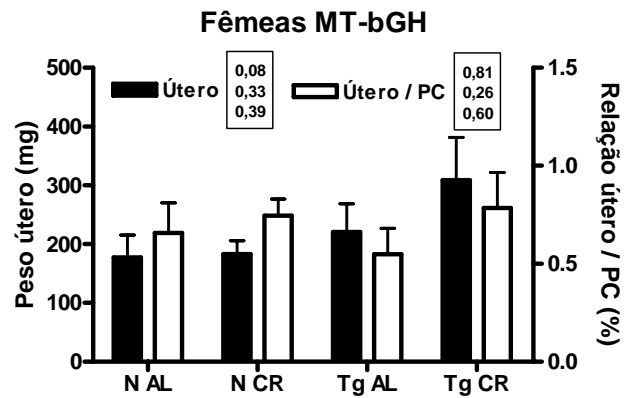
**Figura 5-** Efeito da CR branda sobre o peso do útero, bem como sobre a relação, expressa em porcentagem (%), do peso uterino e do peso corporal (PC) – Útero / PC (peso útero / PC x 100) nas fêmeas: (A) GHR -KO Exp.2; (B) MT-bGH; (C) GHR-KO Exp.3; e (D) PEPCK-bGH. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado nas barras. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.

**Figura 5-** Efeitos da CR de 20% sobre o peso do útero

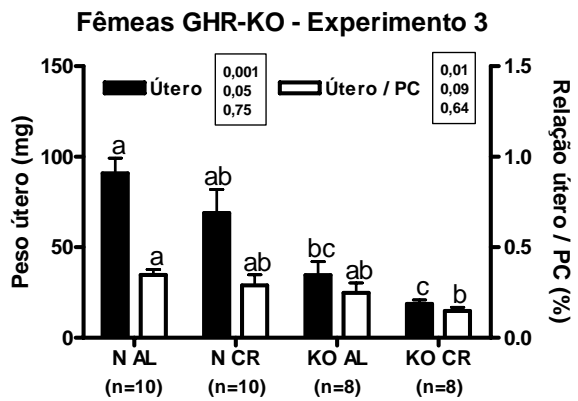
**A**



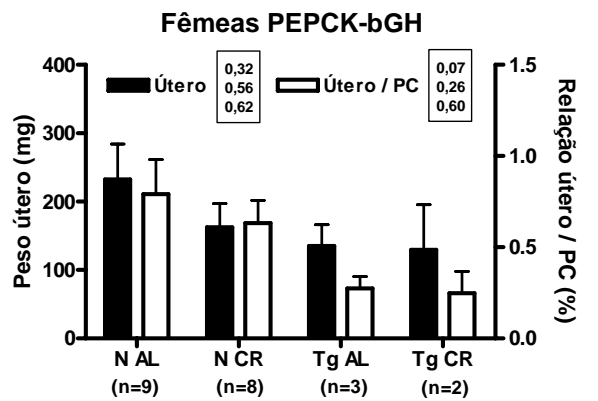
**B**



**C**



**D**

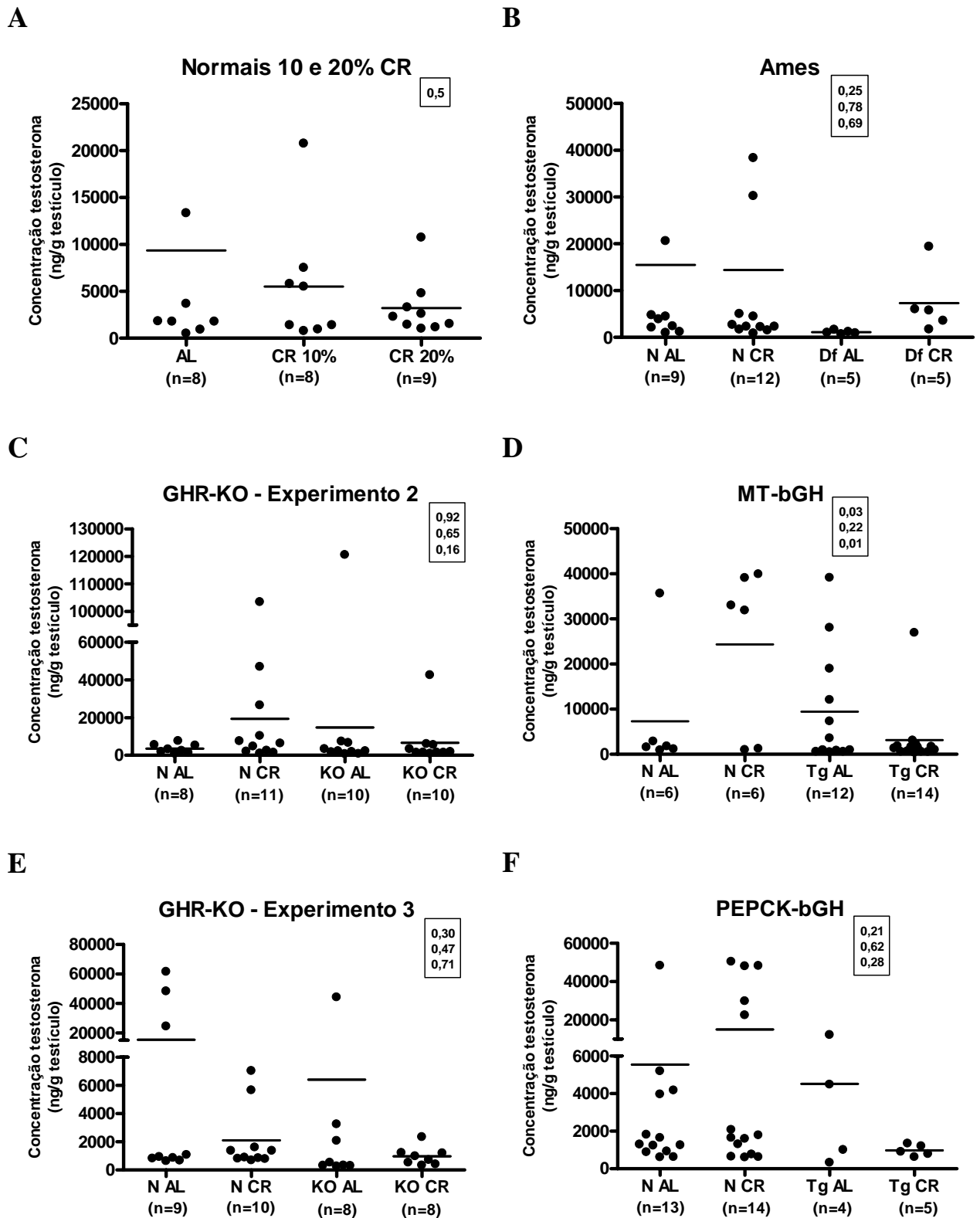




---

**Figura 6-** Efeito da CR branda sobre os níveis de testosterona em homogeneizado testicular nos machos: (A) normais submetidos a 10 e 20% CR; (B) Ames; (C) GHR -KO Exp.2; (D) MT-bGH; (E) GHR-KO Exp.3; e (F) PEPCK-bGH. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As médias por subgrupo estão representadas por barras horizontais. O número de animais por subgrupo está indicado em parênteses. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de *p* para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta; ou só para dieta no caso dos animais normais submetidos a 10 e 20% CR. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.

**Figura 6-** Efeitos da CR sobre os níveis de testosterona em homogêneo testicular

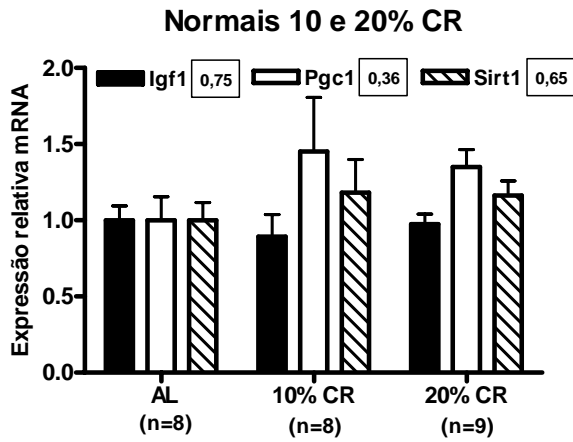


---

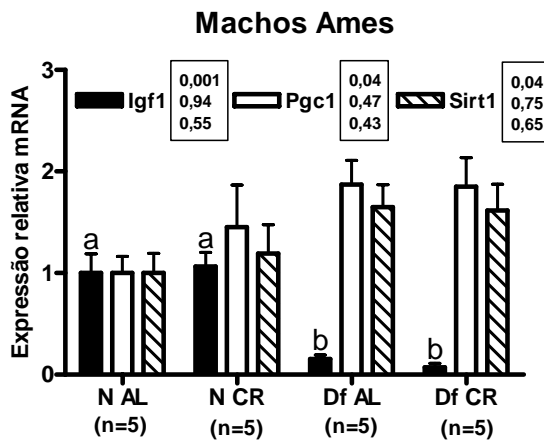
**Figura 7-** Efeito da CR branda sobre a expressão hepática dos genes *IGF1*, *PGC-1 $\alpha$* , e *SIRT1* nos camundongos: (A) machos normais submetidos a 10 e 20% CR; (B) Ames machos; (C) Ames fêmeas; (D) GHR-KO Exp.2, machos; (E) GHR-KO Exp.2, fêmeas; (F) MT-bGH machos; (G) MT-bGH fêmeas; (H) GHR-KO Exp.3, machos; (I) GHR-KO Exp.3, fêmeas; (J) PEPCK-bGH machos; e (L) PEPCK-bGH fêmeas. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado em parênteses. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta; ou só para dieta no caso dos animais normais submetidos a 10 e 20% CR. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.

**Figura 7-** Efeitos da CR sobre a expressão hepática dos genes *IGF1*, *PGC-1 $\alpha$*  e *SIRT1*

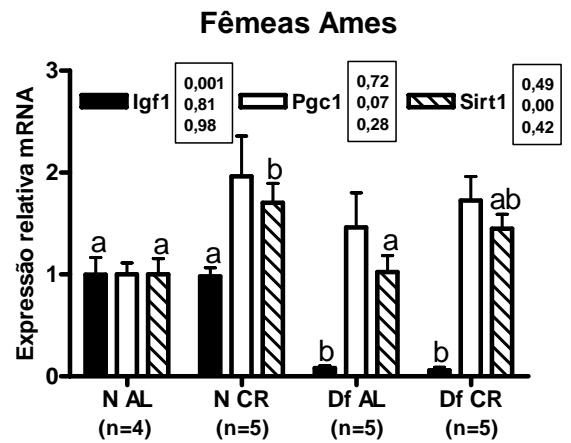
**A**



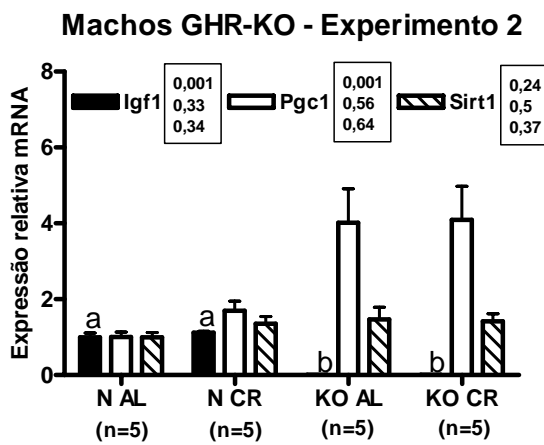
**B**



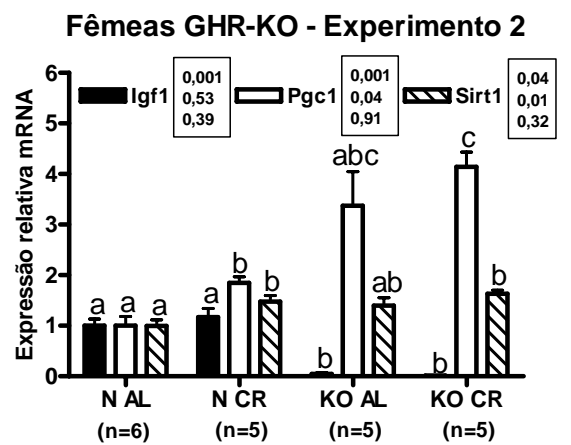
**C**



**D**

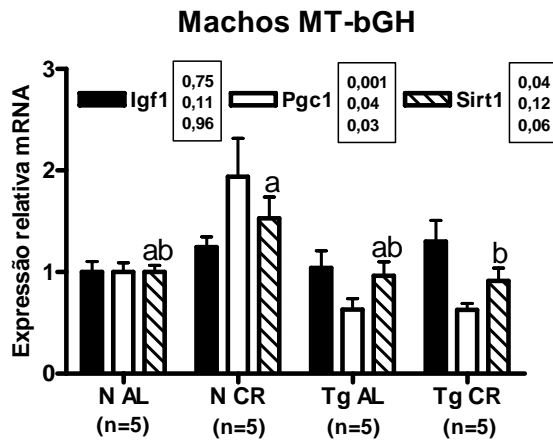


**E**

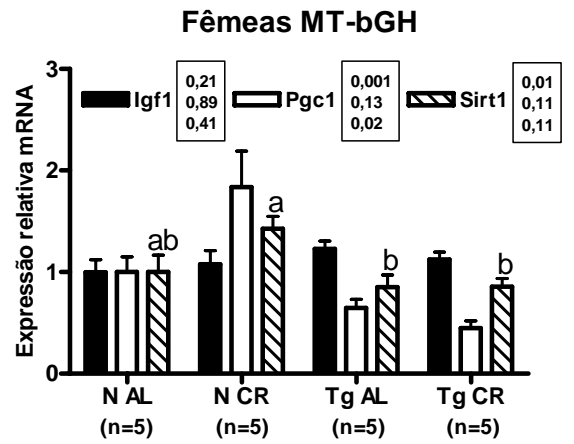


(continuação) **Figura 7-** Efeitos da CR sobre a expressão hepática dos genes *IGF1*, *PGC-1 $\alpha$*  e *SIRT1*

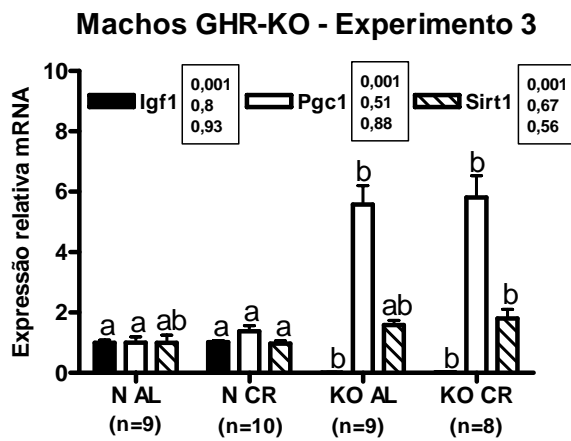
**F**



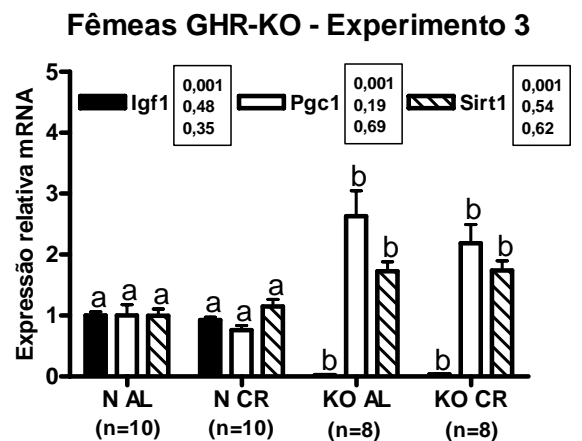
**G**



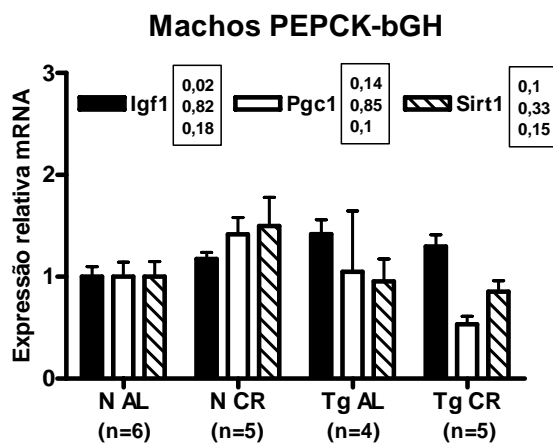
**H**



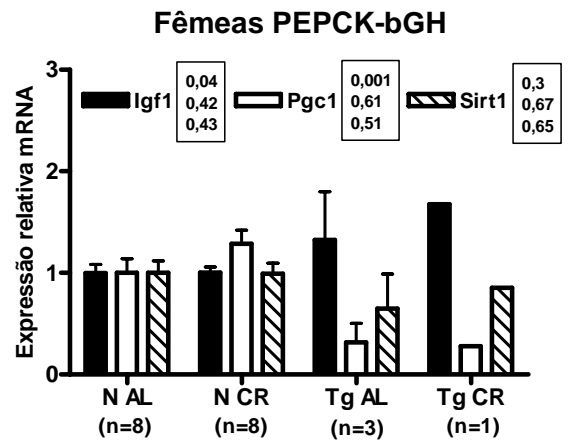
**I**



**J**



**L**

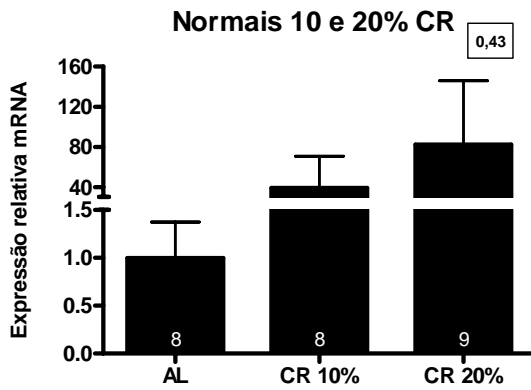


---

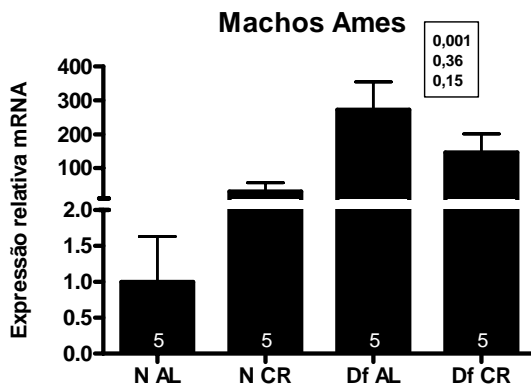
**Figura 8-** Efeito da CR branda sobre a expressão de mRNA para *mStal* no fígado dos camundongos: (A) machos normais submetidos a 10 e 20% CR; (B) Ames machos; (C) Ames fêmeas; (D) GHR-KO Exp.2, machos; (E) GHR-KO Exp.2, fêmeas; (F) MT-bGH machos; (G) MT-bGH fêmeas; (H) GHR-KO Exp.3, machos; (I) GHR-KO Exp.3, fêmeas; (J) PEPCK-bGH machos; e (L) PEPCK-bGH fêmeas. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado nas barras. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta; ou só para dieta no caso dos animais normais submetidos a 10 e 20% CR. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo. Ocasionalmente, embora o efeito de fenótipos seja significativo, não há sobrescritos no gráfico. Isto ocorre quando a significância estatística não é alcançada nos testes *post hoc*, onde médias são comparadas umas às outras aos pares.

**Figura 8-** Efeitos da CR sobre a expressão de mRNA para *mStal* no fígado

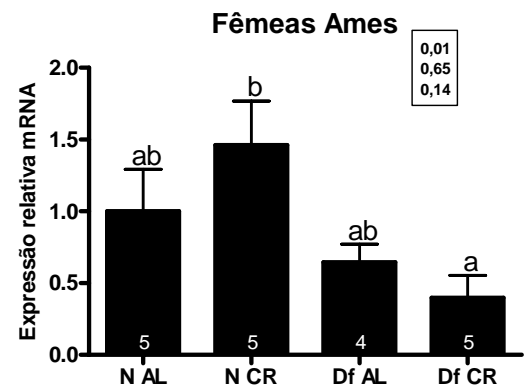
**A**



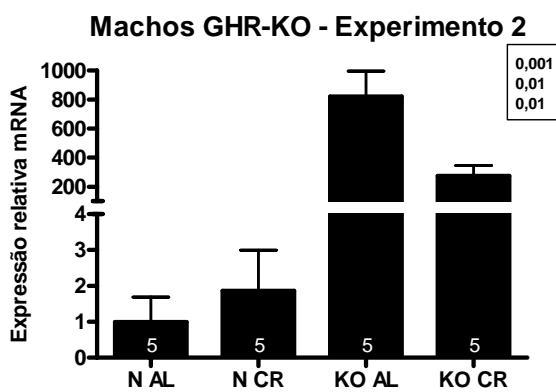
**B**



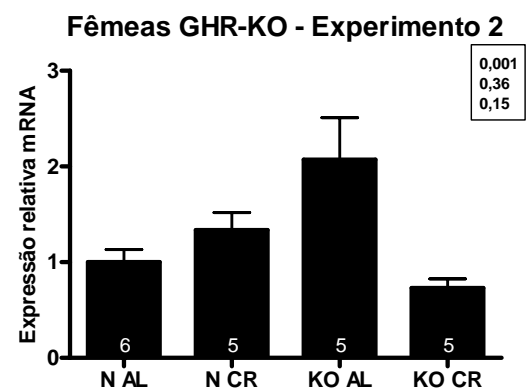
**C**



**D**

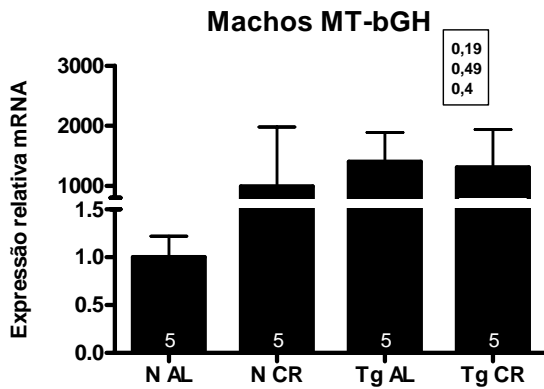


**E**

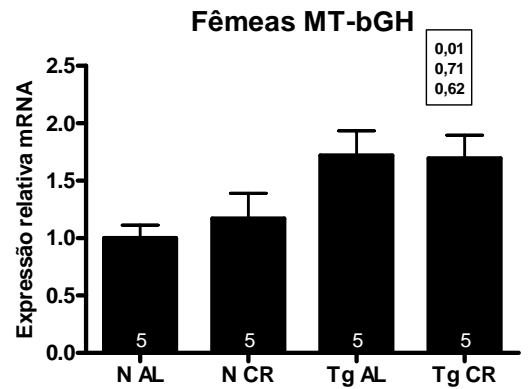


(continuação) **Figura 8-** Efeitos da CR sobre a expressão de mRNA para *mStal* no fígado

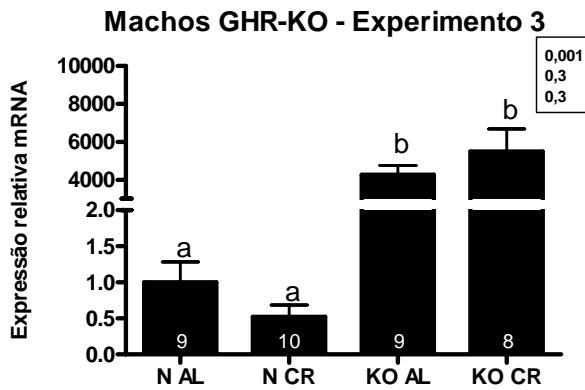
**F**



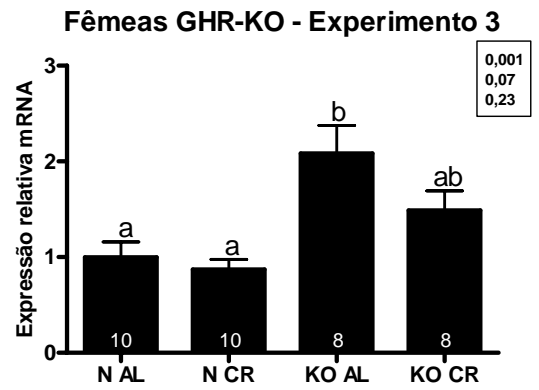
**G**



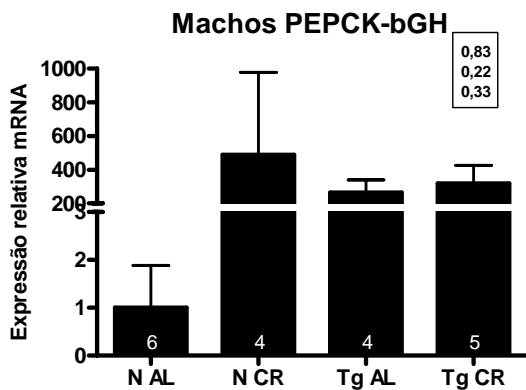
**H**



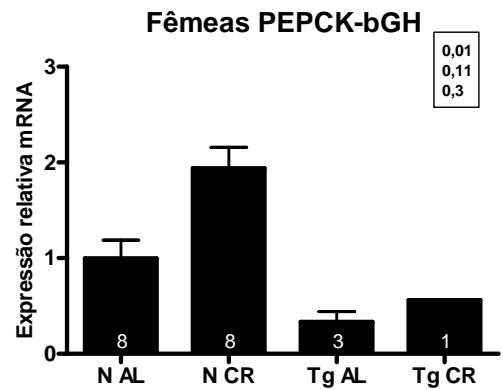
**I**



**J**



**L**

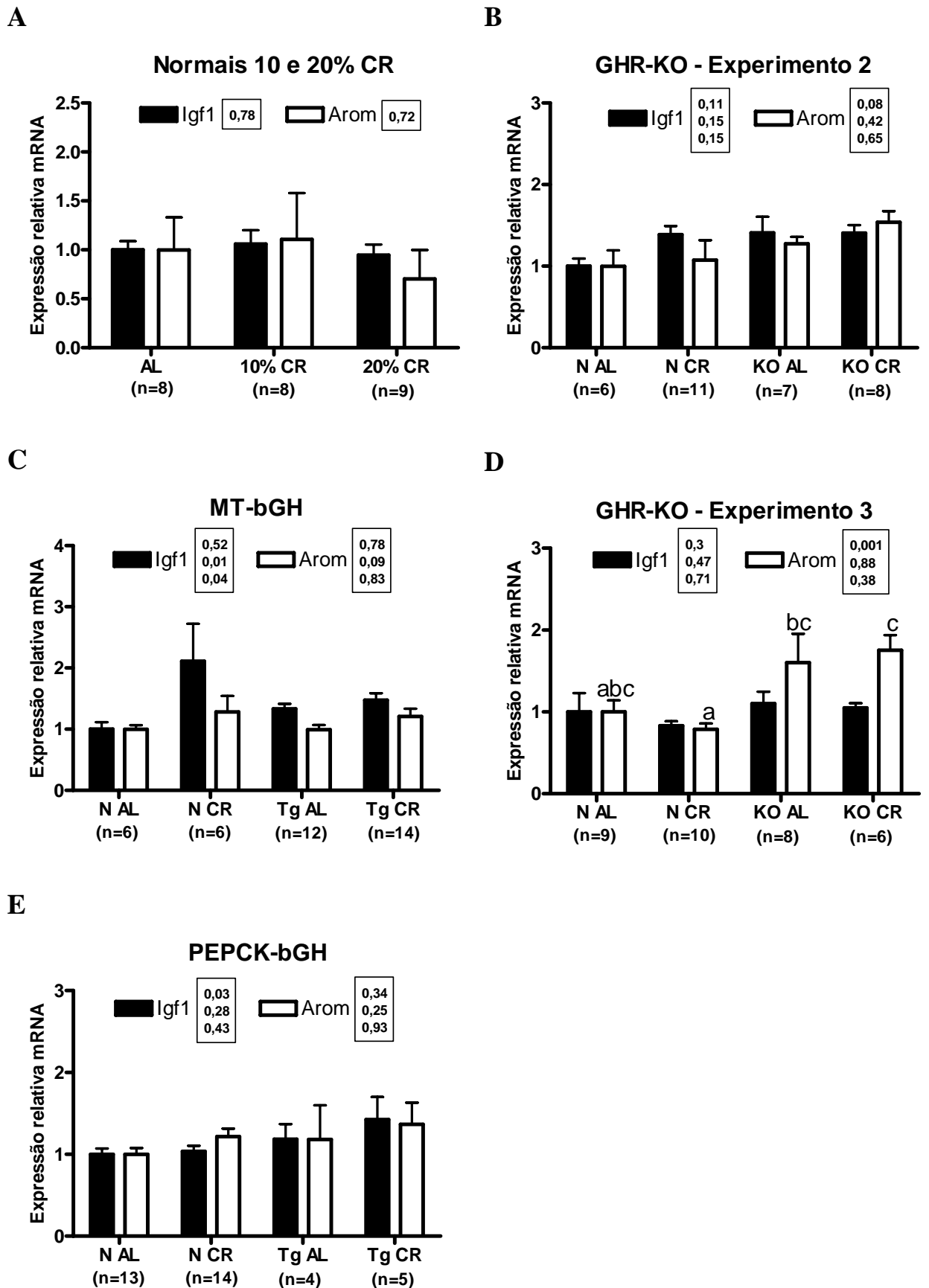




---

**Figura 9-** Efeito da CR branda sobre a expressão dos genes *IGF1* e *AROM* nos testículos dos machos: (A) normais submetidos a 10 e 20% CR; (B) GHR -KO Exp.2; (C) MT-bGH; (D) GHR-KO Exp.3; e (E) PEPCK-bGH. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado em parênteses. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta; ou só para dieta no caso dos animais normais submetidos a 10 e 20% CR. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.

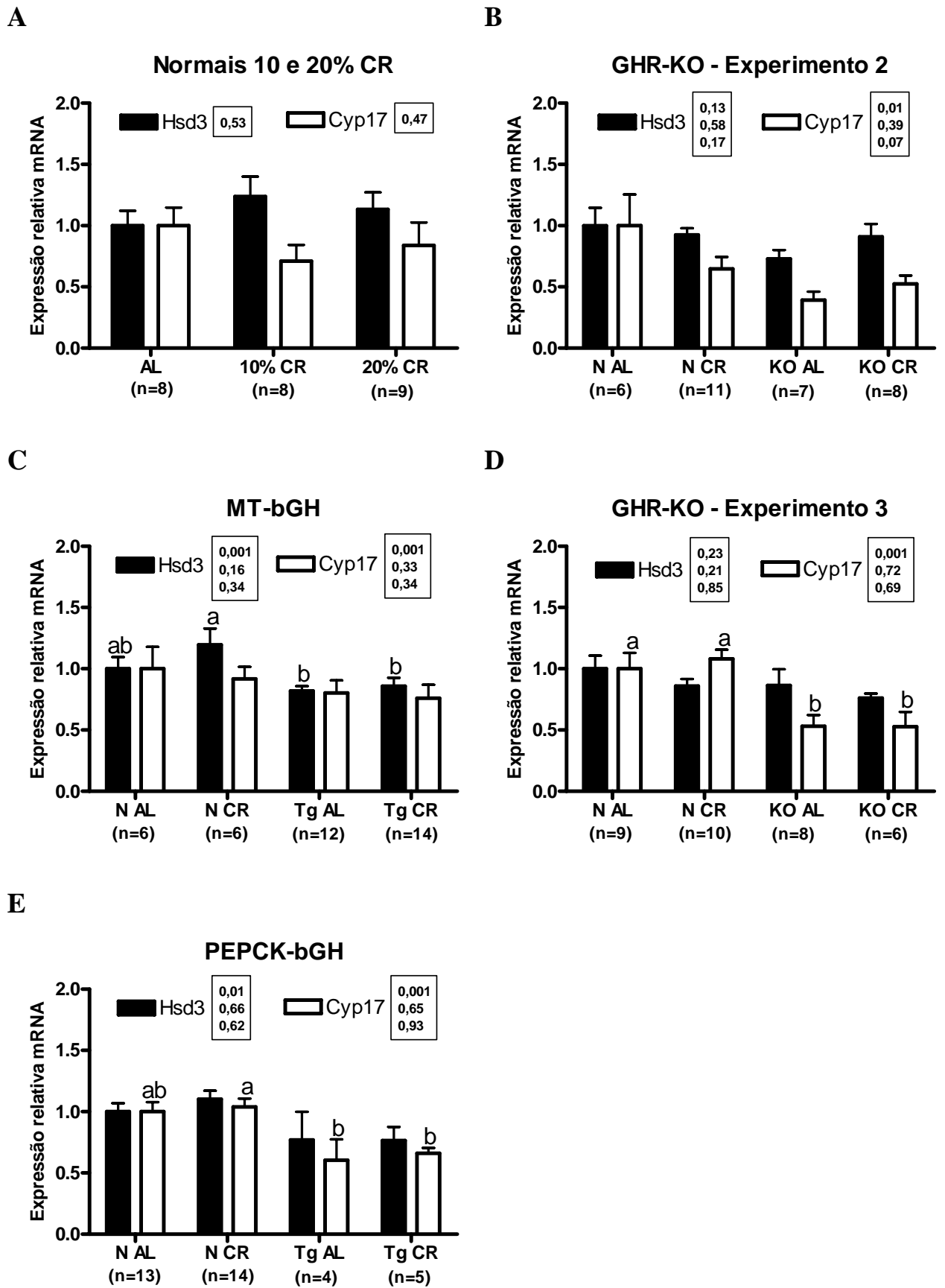
**Figura 9-** Efeitos da CR sobre a expressão dos genes *IGF1* e *AROM* nos testículos



---

**Figura 10-** Efeito da CR branda sobre a expressão dos genes *HSD3* e *CYP17* nos testículos dos machos: (A) normais submetidos a 10 e 20% CR; (B) GHR -KO Exp.2; (C) MT-bGH; (D) GHR-KO Exp.3; e (E) PEPCK-bGH. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado em parênteses. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta; ou só para dieta no caso dos animais normais submetidos a 10 e 20% CR. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.

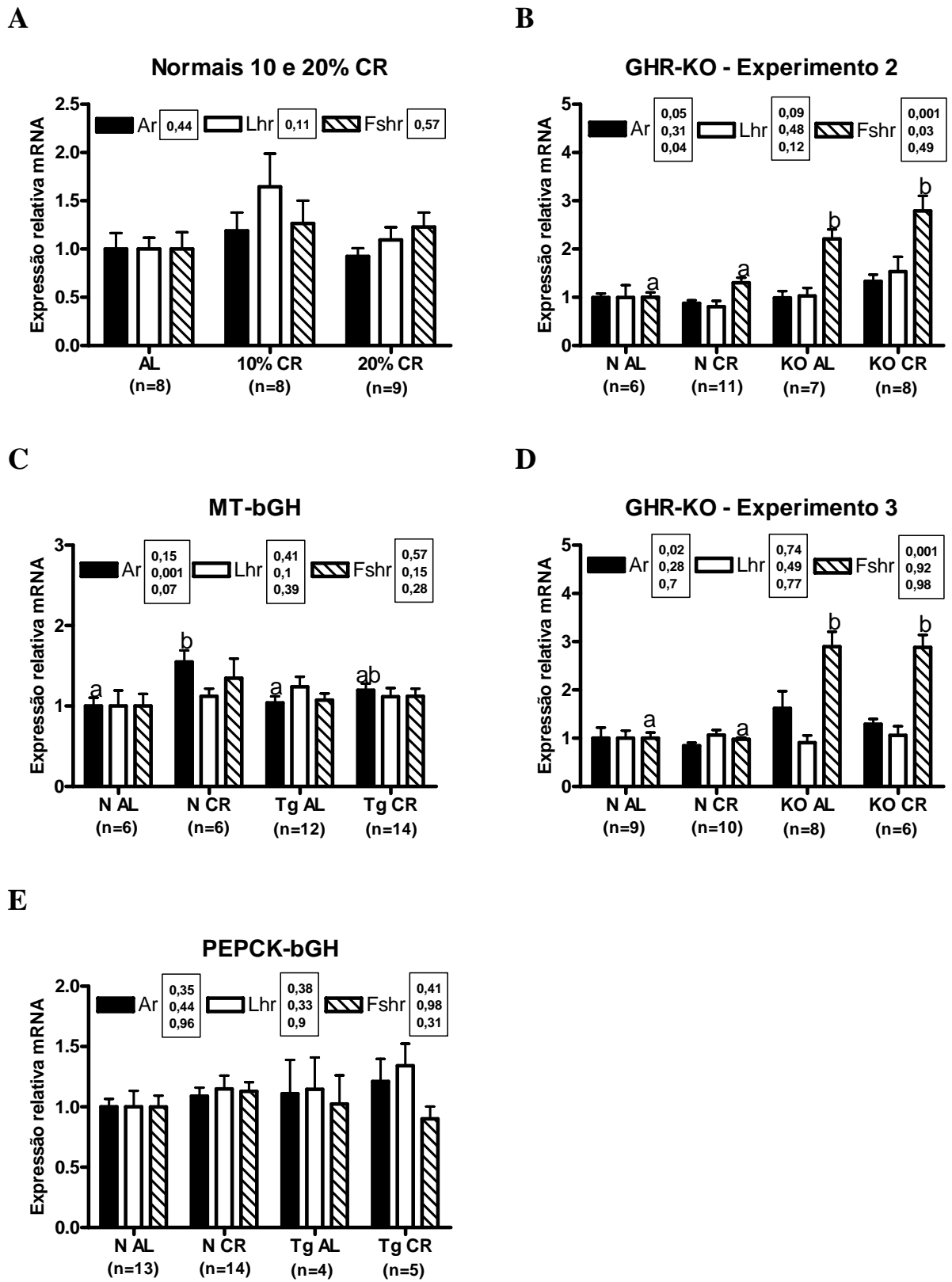
**Figura 10-** Efeitos da CR sobre a expressão dos genes *HSD3* e *CYP17* nos testículos



---

**Figura 11-** Efeito da CR branda sobre a expressão dos genes *AR*, *LHR* e *FSHR* nos testículos dos machos: (A) normais submetidos a 10 e 20% CR; (B) GHR -KO Exp.2; (C) MT-bGH; (D) GHR-KO Exp.3; e (E) PEPCK-bGH. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado em parênteses. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta; ou só para dieta no caso dos animais normais submetidos a 10 e 20% CR. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.

**Figura 11-** Efeitos da CR sobre a expressão dos genes *AR*, *LHR* e *FSHR* nos testículos

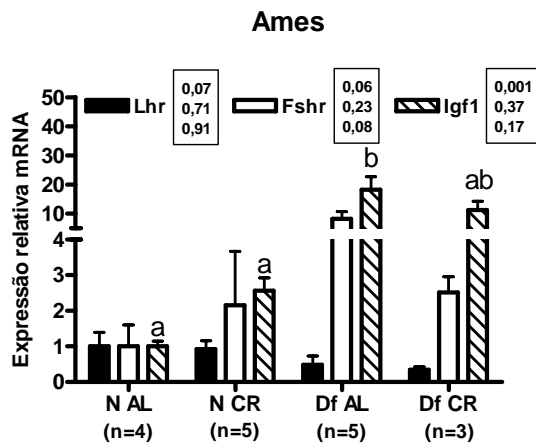


---

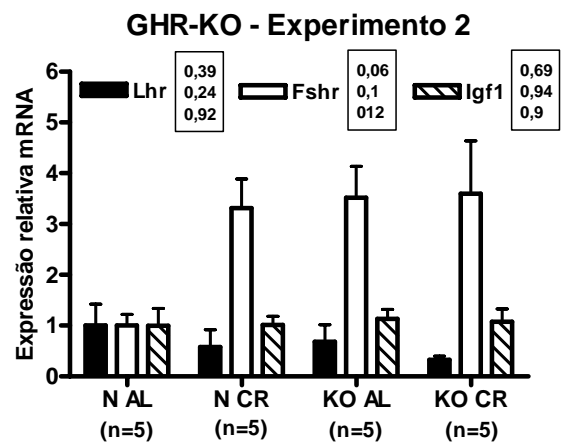
**Figura 12-** Efeito da CR branda sobre a expressão dos genes *LHR*, *FSHR* e *IGF1* nos ovários das fêmeas: (A) Ames; (B) GHR-KO Exp.2; (C) MT-bGH; (D) GHR-KO Exp.3; e (E) PEPCK-bGH. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado em parênteses. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo. Nas fêmeas PEPCK-bGH, embora o efeito de dieta tenha sido significativo, não há sobrescritos no gráfico. Isto ocorre quando a significância estatística não é alcançada nos testes *post hoc*, onde médias são comparadas umas às outras aos pares.

**Figura 12-** Efeitos da CR e 20% sobre a expressão dos genes *LHR*, *FSHR* e *IGF1* nos ovários

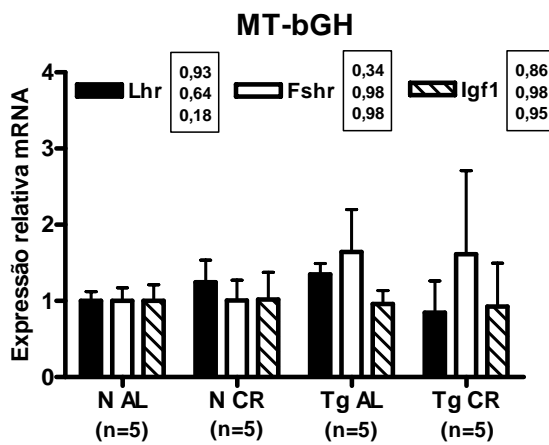
**A**



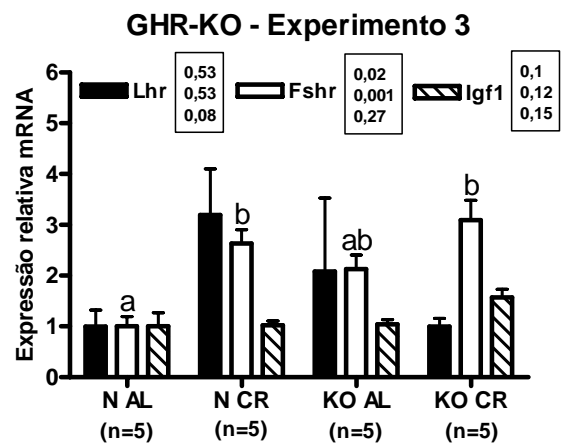
**B**



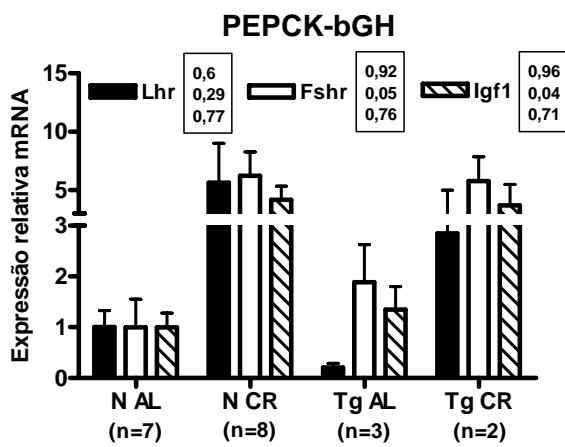
**C**



**D**



**E**

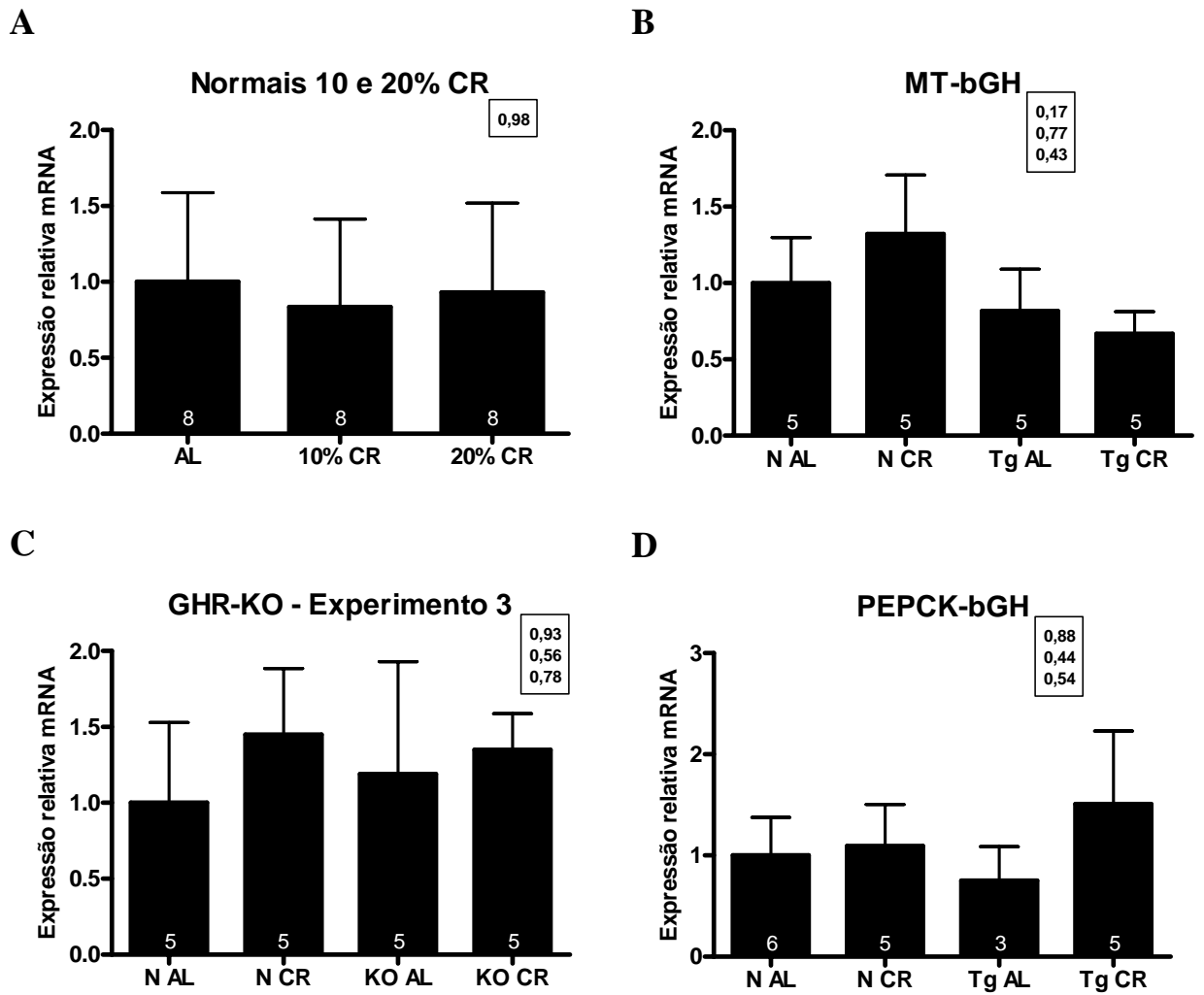




---

**Figura 13-** Efeito da CR branda sobre a expressão do gene *AR* nas vesículas seminais dos machos: (A) normais submetidos a 10 e 20% CR; (B) MT-bGH; (C) GHR-KO Exp.3; e (D) PEPCK-bGH. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado nas barras. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta; ou só para dieta no caso dos animais normais submetidos a 10 e 20% CR. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.

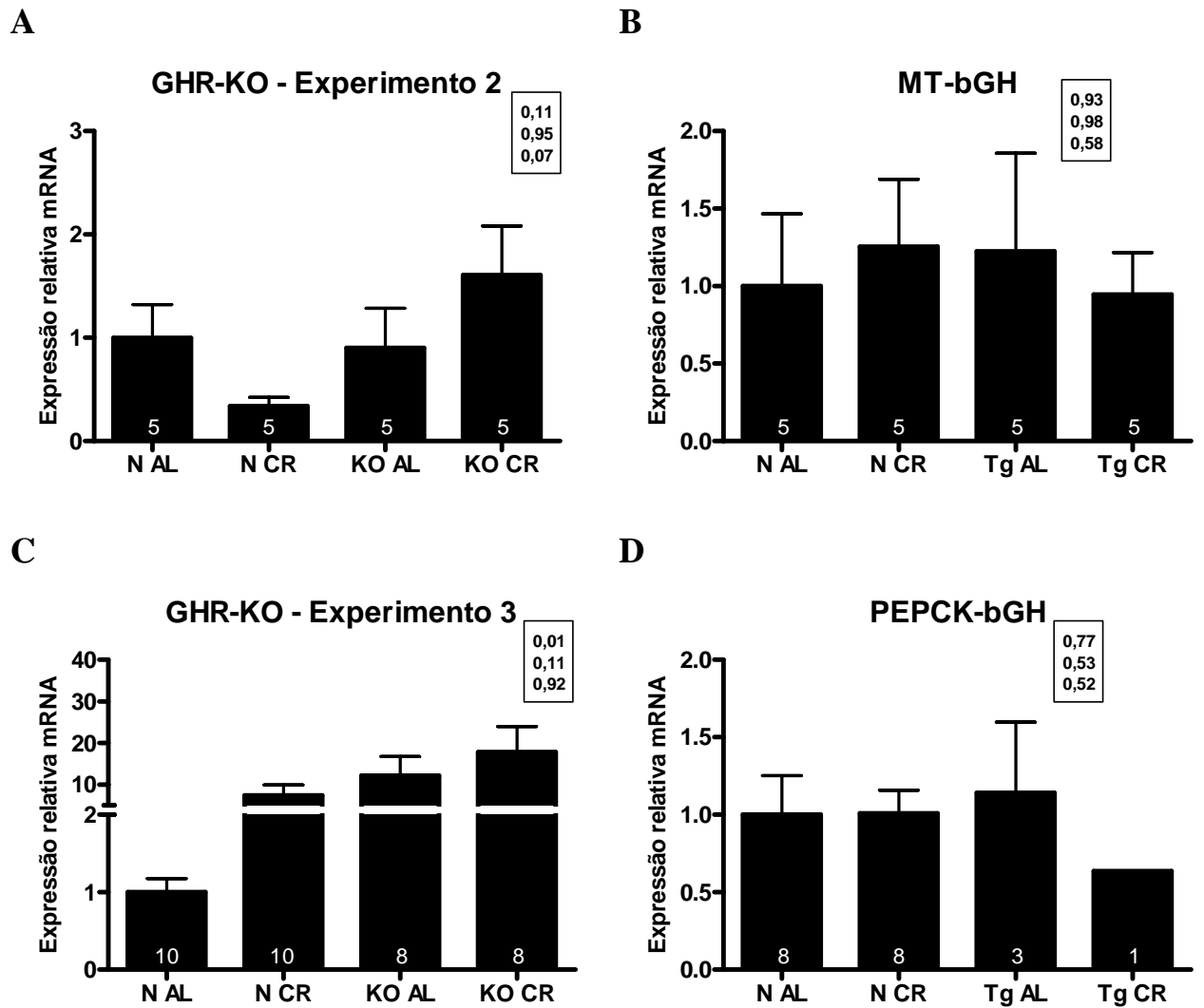
Figura 13- Efeitos da CR sobre a expressão de AR nas vesículas seminais



---

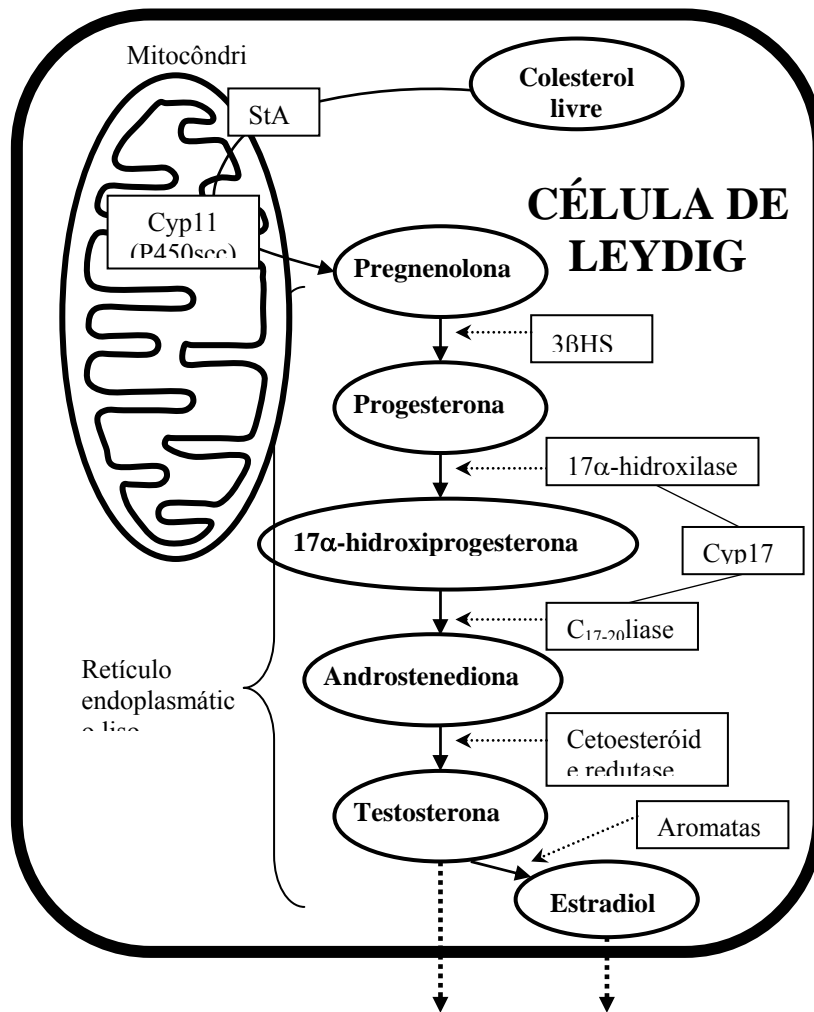
**Figura 14-** Efeito da CR branda sobre a expressão do gene *ESR* no útero das fêmeas: (A) GHR -KO Exp.2; (B) MT-bGH; (C) GHR-KO Exp.3; e (D). PEPCK-bGH. Animais eram alimentados *ad libitum* (AL) ou submetidos a restrição calórica (CR). As barras correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média. Barras que não possuem letras iguais são estatisticamente diferentes a  $p < 0.05$  ou menos. O número de animais por subgrupo está indicado nas barras. Os balões no topo do gráfico mostram os valores obtidos a partir da ANOVA para o valor de  $p$  para (de cima para baixo): fenótipo, dieta, e a interação fenótipo vs. dieta. Todas as comparações são feitas dentro de cada grupo.

Figura 14- Efeitos da CR de 20% sobre a expressão de *ESR* no útero



**Figura 15-** Desenho esquemático representando o processo de esteroidogênese nas células de Leydig. O estímulo à célula de Leydig pelo LH ou cAMP é necessário para uma expressão ideal das enzimas necessárias à síntese de testosterona a partir do colesterol. O primeiro passo da cascata de reações envolvidas neste processo ocorre na mitocôndria: a conversão do colesterol em pregnenolona catalizada pelo citocromo P450<sub>sc</sub> (“*cholesterol side chain cleavage*”). A pregnenolona então se difunde através das membranas mitocondriais para ser então metabolizada por enzimas associadas ao retículo endoplasmático liso. Nas células de Leydig de camundongos, a pregnenolona é convertida em progesterona pelo HSD3 (“*3-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase*”). A progesterona então sofre atuação do citocromo P450<sub>c17</sub>, ou Cyp17, enzima que tem duas ações distintas: atua como 17 $\alpha$ -hidroxilase, hidroxilando a progesterona em 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona; e como C<sub>17,20</sub>liase, convertendo a última em androstenediona, o precursor imediato da testosterona. A reação final se dá pela 17-cetoesteróide redutase, que transforma a androstenediona em testosterona. As células de Leydig também expressam o citocromo P450<sub>arom</sub>, ou aromatase, a qual cataliza a aromatização da testosterona em estradiol.

**Figura 15-** Esteroidogênese nas células de Leydig



---

## 11- REFERÊNCIAS

- Adashi, E.H., Resnick, C.E., D'Ercole, A.J., Svoboda, M.E., Van Wyk, J.J., 1985. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr. Rev.* 6, 400-418.
- Al-Regaiey, K.A., Masternak, M.M., Bonkowski, M., Sun, L., Bartke, A., 2005. Long-lived growth hormone receptor knockout mice: Interaction of reduced insulin-like growth factor I/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology* 146, 851-860.
- Bachelot, A., Monget, P., Imbert-Bollere, P., Coshigano, K., Kopchick, J.J., Kelly, P.A., Binart, N., 2002. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology* 143, 4104-4112.
- Bair, S.R., Mellon, S.H., 2004. Deletion of the mouse P450c17 gene causes early embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5383-5390.
- Baker, J., Hardy, M.P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellve, A.R., Efstratiads, A., 1996. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol. Endocrinol.* 10, 903-918.
- Barger, J.L., Walford, R.L., Weindruch, R., 2003. The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Exp. Gerontology* 38, 1343-1351.
- Bartke A., 1965. Influence of luteotrophin on fertility of dwarf mice. *J. Reprod. Fertil.* 10, 93-103.
- Bartke, A., 1973. Differential requirement for prolactin during pregnancy in the mouse. *Biol Reprod.* 9, 379-83.
- Bartke, A., 1999. Role of growth hormone and prolactin in the control of reproduction: what are we learning from transgenic and knock-out animals? *Steroids* 64, 598-604.
- Bartke, A., 2000. Effects of growth hormone on male reproductive functions. *J. Androl.* 21, 181-188.
- Bartke, A., 2003. Can growth hormone (GH) accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice. *Neuroendocrinology* 78, 210-6.

- 
- Bartke, A., 2005. Minireview: Role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology* 146, 3718-3723.
- Bartke, A., Steele, R.E., Musto, N., Caldwell, B.V., 1973. Fluctuations in plasma testosterone levels in adult male rats and mice. *Endocrinology* 92, 1223-1227.
- Bartke, A., Dalterio, S., 1975. Evidence for episodic secretion of testosterone in laboratory mice. *Steroids* 26, 749-756.
- Bartke, A., Steger, R.W., Hodges, S.L., Parkening, T.A., Collins, T.J., Yun, J.S., Wagner, T.E., 1988. Infertility in transgenic female mice with human growth hormone expression: evidence for luteal failure. *J. Exp. Zool.* 248, 121-4.
- Bartke, A., Naar, E.M., Johnson, L., May, M.R., Cecim, M., Yun, J.S., Wagner, T.E., 1992. Effects of expression of human or bovine growth hormone genes on sperm production and male reproductive performance in four lines of transgenic mice. *J. Reprod. Fert.* 95, 109-118.
- Bartke, A., Chandrashekar, V., Turyn, D., Steger, R.W., Debeljuk, L., Winters, T.A., Mattison, J.A., Danilovich, N.A., Croson, W., Wernsing, D.R., Kopchick, J.J., 1999. Effects of growth hormone overexpression and growth hormone resistance on neuroendocrine and reproductive functions in transgenic and knock-out mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 113-23.
- Bartke, A., Wright, J.C., Mattison, J.A., Ingram, D.K., Miller, R.A., Roth, G.S., 2001a. Extending the life span of long-lived mice. *Nature* 414, 412.
- Bartke, A., Coschigano, K., Kopchick, J., Chandrashekar, V., Mattison, J., Kinney, B., Hauck, S., 2001b. Genes that prolong life: Relationships of growth hormone and growth to aging and life span. *J. Gerontology: Biological Sciences* 56A, B340-B349.
- Bartke, A., Chandrashekar, V., Bailey, B., Zaczek, D., Turyn, D., 2002. Consequences of growth hormone (GH) overexpression and GH resistance. *Neuropeptides* 36, 201-208.
- Berr, C., Lafont, S., Debuire, B., Dartigues, J.F., Baulieu, E.E., 1996. Relationships of dehydroepiandrosterone sulfate in the elderly with functional, psychological, and mental status, and short-term mortality: A French community-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13410-13415.



- 
- Bonkowski, M.S., Rocha, J.S., Masternak, M.M., Al Regaiey, K.A., Bartke, A., 2006. Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7901-7905.
- Bordone, L., Guarente, L., 2005. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6, 298-305.
- Brown-Borg, H.M., Borg, K.E., Meliska, C.J., Bartke, A., 1996. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 384, 33.
- Cecim, M., Bartke, A., Yun, J.G., Wagner, T.E., 1993. Growth allometry of transgenic mice expressing the mouse metallothionein-I / bovine growth hormone gene. *Transgene* 1, 125-132.
- Cecim, M., Bartke, A., Yun, J.G., Wagner, T.E., 1994. Expression of human, but not bovine, growth hormone genes promotes development of mammary tumors in transgenic mice. *Transgenics* 1, 431-437.
- Cecim, M., Kerr, J., Bartke, A., 1995a. Effects of bovine growth hormone (bGH) transgene expression or bGH treatment on reproductive functions in female mice. *Biol. Reprod.* 52, 1144-1148.
- Cecim, M.C., Kerr, J., Bartke, A., 1995b. Infertility in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene: Luteal failure secondary to prolactin deficiency. *Biol. Reprod.* 52, 1162-1166.
- Chandrashekar, V., Bartke, A., 1993. Induction of endogenous insulin-like growth factor-I secretion alters the hypothalamic-pituitary-testicular function in growth hormone-deficient adult dwarf mice. *Biol. Reprod.* 48, 544-551.
- Chandrashekar, V., Bartke, A., Coschigano, K.T., Kopchick, J.J., 1999. Pituitary and testicular function in growth hormone receptor gene knockout mice. *Endocrinology* 140, 1082-1088.
- Chandrashekar, V., Bartke, A., Awoniyi, C.A., Tsai-Morris, C.H., Dufau, M.L., Russell, L.D., Kopchick, J.J., 2001. Testicular endocrine function in GH receptor gene disrupted mice. *Endocrinology* 142, 3443-3450.

- 
- Chandrashekar, V., Bartke, A., 2003. The role of insulin-like growth factor-I in neuroendocrine function and the consequent effects on sexual maturation: inferences from animal models. *Reprod. Biol.* 3, 7-28
- Chandrashekar, V., Zaczek, D., Bartke, A., 2004. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. *Biol. Reprod.* 71, 17-27.
- Chen, H., Luo, L., Liu, J., Brown, T., Zirkin, B.R., 2005. Aging and caloric restriction: Effects on Leydig cell steroidogenesis. *Exp. Gerontology* 40, 498-505.
- Childs, G.V., 2000. Growth hormone cells as co-gonadotropes: partners in the regulation of the reproductive system. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 168-175.
- Childs, G.V., Unabia, G., Wu, P., 2000. Differential expression of growth hormone messenger ribonucleic acid by somatotropes and gonadotropes in male and cycling female rats. *Endocrinology* 141: 1560-1570
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162,156-159.
- Chubb, C., 1987. Sexual behavior and fertility of little mice. *Biol. Reprod.* 37, 564-569.
- Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., de Cabo, R., Sinclair, D.A., 2004. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305, 390-392.
- Coschigano, K.T., Clemmons, D., Bellush, L.L., Kopchick, J.J., 2000. Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology* 141, 2608-2613.
- Coschigano, K.T., Holland, A.N., Riders, M.E., List, E.O., Flyvbjerg, A., Kopchick, J.J., 2003. 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* 144, 3799-3810.
- Danilovich, N., Wernsing, D., Coschigano, K.T., Kopchick, J.J., Bartke, A., 1999. Deficits in female reproductive function in GH-R-KO mice; role of IGF-I. *Endocrinology* 140, 2637-2640.

- 
- Dong, Q., Bergendahl, M., Huhtaniemi, I., Handelsman, D.J., 1994. Effect of undernutrition on pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion in castrate and intact male rats using an ultrasensitive immunofluorometric LH assay. *Endocrinology* 135, 745-750.
- Echchgadda, I., Song, C.S., Oh, T.S., Cho, S.H., Rivera, O.J., Chatterjee, B., 2004. Gene regulation for the senescence marker protein DHEA-sulfotransferase by the xenobiotic-activated nuclear pregnane X receptor (PXR). *Mech. Ageing Develop.* 125, 733-745.
- Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R.A., Harrison, D.E., 2001. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6736-6741.
- Goncharova, N.D., Lapin, B.A., 2002. Effects of aging on hypothalamic-pituitary-adrenal system function in non-human primates. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1191-1201.
- Heilbronn, L.K., Ravussin, E., 2003. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 361-369.
- Hekimi, S., Guarente, L., 2003. Genetics and the specificity of the aging process. *Science* 299, 1351-1354.
- Hiney, J.K., Srivastava, V., Nyberg, C.L., Ojeda, S.R., Dees, W.L., 1996. Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology* 137, 3717-3128.
- Holehan, A.M., Merry, B.J., 1985. The control of puberty in the dietary restricted female rat. *Mech. Ageing Dev.* 32, 179-191.
- Ikeno, Y., Bronson, R.T., Hubbard, G.B., Lee, S., Bartke, A., 2003. Delayed occurrence of fatal neoplastic diseases in Ames dwarf mice: Correlation to extended longevity. *J. Gerontology* 58, A291-296.
- Ingram, D.K., Anson, R.M., de Cabo, R., Mamczarz, J., Zhu, M., Mattison, J., Lane, M.A., Roth, G.S., 2004. Development of calorie restriction mimetics as a prolongevity strategy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 412-423.

- 
- Kaeberlein, M., McVey, M., Guarente, L., 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Dev.* 13, 2570-2580.
- Kealy, R.D, Lawer, D.F., Ballam, J.M., 2002. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220,1315-1320.
- Keene, D.E., Suescun, M.O., Bostwick, M.G., Chandrashekar, V., Bartke, A., Kopchick, J.J., 2002. Puberty is delayed in male growth hormone receptor gene-disrupted mice. *J. Androl.* 23, 661-668.
- Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H., Kangawa, K., 2001. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 118-122.
- Lane, M.A., Ingram, D.K., Ball, S.S., Roth, G.S., 1997. Dehydroepiandrosterone sulfate: A biomarker of primate aging slowed by calorie restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2093-2096.
- Lane, M.A., Ingram, D.K., Roth, G.S., 1999. Nutritional modulation of aging in nonhuman primates. *J. Nutr. Health Aging* 3, 69-76.
- Le Roith, D., Scavo, L., Butler, A., 2001. What is the role of circulating IGF-I? *Endocrinology & Metabolism* 12, 48-52.
- Lobie, P.E., Breipohl, W., Aragón, J.G., Waters, M.J., 1990. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology* 126, 2214-2221.
- Masoro, E.J., 2000. Caloric restriction and aging: an update. *Exp. Gerontol.* 35, 299-305.
- Masoro, E.J., 2001. Dietary restriction: current status. *Aging (Milano)* 13, 261-262.
- Masoro, E.J., 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Develop.* 126, 913-922.

- 
- Masternak, M.M., Al-Regaiey, K.A., Lim, M.M.D.R., Jimenez-Ortega, V., Panici, J.A., Bonkowski, M.S., Bartke, A., 2005. Effects of caloric restriction on insulin pathway gene expression in the skeletal muscle and liver of normal and long-lived GHR-KO mice. *Exp. Gerontol.* 40, 679-684.
- Mazat, L., Lafont, S., Berr, C., Debuire, B., Tessier, J.F., Dartigues, J.F., Baulieu, E.E., 2001. Prospective measurements of dehydroepiandrosterone sulfate in a cohort of elderly subjects: Relationship to gender, subjective health, smoking habits, and 10-year mortality. *P.N.A.S.* 98, 8145-8150.
- McGrane, M.M., de Vente, J., Yun, J.S., Bloom, J., Park, E.A., Wynshaw, A., Wagner, T.E., Rottman, F.M., Hanson, R.W., 1988. Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 263, 11443-11451.
- McShane, T.M., Wise, P.M., 1996. Life-long moderate caloric restriction prolongs reproductive life span in rats without interrupting estrous cyclicity: effects on the gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone axis. *Biol. Reprod.* 54, 70-75.
- Merry, B.J., Holehan, A.M., 1979. Onset of puberty and duration of fertility in rats fed a restricted diet. *J. Reprod. Fertil.* 57, 253-259.
- Naar, E.M., Bartke, A., Majumdar, S.S., Buonomo, F.C., Yun, J.S., Wagner, T.E., 1991. Fertility of transgenic female mice expressing bovine growth hormone or human growth hormone variant genes. *Biol. Reprod.* 45, 178-187.
- Nyberg, F., Burman, P., 1996. Growth hormone and its receptors in the central nervous system - location and functional significance. *Horm. Res.* 45, 18-22.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C., Evans, R.M., 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300, 611-615.
- Payne, A.H., Youngblood, G.L., 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in leydig cells. *Biol. Reprod.* 52, 217-225.
- Payne, A.H., Hales, D.B., 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews* 25, 947-970.

- 
- Rhee, J., Inoue, Y., Yoon, J.C., Puigserver, P., Fan, M., Gonzalez, F.J., Spiegelman, B.M., 2003. Regulation of hepatic fasting response by PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1): Requirement for hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4012-4017.
- Roberts, S.B., Pi-Sunyer, X., Kuller, L., Lane, M.A., Ellison, P., Prior, J.C., Shapses, S., 2001. Physiological effects of lowering caloric intake in nonhuman primates and nonobese humans. *Gerontology* 56A, 66-75.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., Puigserver, P., 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature* 434, 113-118.
- Rogina, B., Helfand, S.L., 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15998-16003.
- Rosenfeld, R.G., Rosenbloom, A.L., Guevara-Aguirre, J., 1994. Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocr. Rev.* 15, 369-390.
- Roth, G.S., Mattison, J.A., Ottinger, M.A., Chachich, M.E., Lane, M.A., Ingram, D.K., 2004. Aging in rhesus monkeys: relevance to human health interventions. *Science* 305, 1423-1426.
- Sambrook, J., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* / Joseph Sambrook, David W. Russell, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schaible, R., Gowen, J.W., 1961. A new dwarf mouse. *Genetics* 46, 896.
- Shimokawa, I., Higami, Y., Tsuchiya, T., Otani, H., Komatsu, T., Chiba, T., Yamaza, H., 2003. Life span extension by reduction of the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis: relation to caloric restriction. *FASEB J.* 17, 1108-1109.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarnah, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., Mendelson, C.R., Bulun, S.E., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews* 15, 342-355.
- Sirotkin, A.V., 2005. Control of reproductive processes by growth hormone: extra- and intracellular mechanisms. *Vet. J.* 170, 307-317.

- 
- Sonntag, W.E., Lynch, C.D., Cefalu, W.T., Ingram, R.L., Bennett, S.A., Thornton, P.L., Khan, A.S., 1999. Pleiotropic effects of growth hormone and insulin-like growth factor (IGF)-1 on biological aging: inferences from moderate caloric-restricted animals. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 54, B521-B538.
- Sornson, M.W., Wu, W., Dasen, J.S., Flynn, S.E., Norman, D.J., O'Connell, S.M., Gukovsky, I., Carriere, C., Ryan, A.K., Miller, A.P., Zuo, L., Gleiberman, A.S., Andersen, B., Beamer, W.G., Rosenfeld, M.G., 1996. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384, 327-333.
- Steger, R.W., Bartke, A., Cecim, M., 1993. Premature ageing in transgenic mice expressing different growth hormone genes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 46, 61-75.
- Strobl, J.S., Thomas, M.J., 1994. Human growth hormone. *Pharm. Rev.* 46, 1-34.
- Strott, C.A., 2002. Sulfonation and molecular action. *Endocrine Reviews* 23, 703-732.
- Tissenbaum, H.A., Guarente, L., 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227-230.
- Tsutsui, K., Shimizu, A., Kawamoto, K., Kawashima, S., 1985. Developmental changes in the binding of follicle-stimulating hormone (FSH) to testicular preparations of mice and the effects of hypophysectomy and administration of FSH on the binding. *Endocrinology* 117, 2534-2543.
- Walford, R.L., Harris, S.B., Gunion, M.W., 1992. The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11533-11537.
- Wang, Y., Tissenbaum, H.A., 2006. Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech. Ageing Develop.* 127, 48-56.
- Weinshilboum, R.M., Otterness, D.M., Aksoy, I.A., Wood, T.C., Her, C., Raftogianis, R.B., 1997. Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *FASEB J.* 11, 3-14.
- Weindruch, R., Walford, R.L., 1988. The retardation of aging and disease by dietary restriction. Charles C. Thomas, Springfield.

- 
- Weindruch, R., Sohal, R.S., 1997. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N. Engl. J. Med.* 337, 986-994.
- Wolf, E., Kahnt, E., Ehrlein, J., Hermanns, W., Brem, G., Wanke, R., 1993. Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: Lessons from transgenic animal models. *Mech. Ageing Dev.* 68, 71-87.
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., Newgard, C.B., Spiegelman, B.M., 2001. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413, 131-138.
- Young, K.A., Zirkin, B.R., Nelson, R.J., 2000. Testicular regression in response to food restriction and short photoperiod in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) is mediated by apoptosis. *Biol. Reprod.* 62, 347-354.
- Zaczek, D., Hammond, J., Suen, L., Wandji, S., Service, D., Bartke, A., Chandrashekar, V., Coschigano, K.T., Kopchick, J.J., 2002. Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. *Biol. Reprod.* 67, 1115-1124.
- Zhou, Y., Xu, B.C., Maheshwari, H.G., He, L., Reed, M., Lozykowski, M., Okada, S., Cataldo, L., Coschigano, K., Wagner, T.E., Baumann, G., Kopchick, J.J., 1997. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13215-13220.