

Larissa Bernardes de Rezende

**Efeito do tratamento com óleo de coco na perda óssea  
de camundongos alimentados com dieta rica em gordura**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, MG

2020

Larissa Bernardes de Rezende

**Efeito do tratamento com óleo de coco na perda óssea de camundongos alimentados com dieta rica em gordura**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde

Linha de pesquisa: Nutrição Clínica e Experimental

Orientadora: Prof. Dra. Marina Chaves de Oliveira

Coorientadora: Prof. Dra. Adaliene Versiani Matos  
Ferreira

Escola de Enfermagem da UFMG

2020

Rezende, Larissa Bernardes de.  
R467e Efeito do tratamento com óleo de coco na perda óssea de camundongos alimentados com dieta rica em gordura [manuscrito]. / Larissa Bernardes de Rezende. - - Belo Horizonte: 2020.  
59f.: il.  
Orientador (a): Marina Chaves de Oliveira.  
Coorientador (a): Adaliene Versiani Matos Ferreira.  
Área de concentração: Nutrição e Saúde.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. óleo de Coco. 2. Obesidade. 3. Gorduras na Dieta. 4. Metabolismo. 5. Dissertação Acadêmica. I. Oliveira, Marina Chaves de. II. Ferreira, Adaliene Versiani Matos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: WB 425

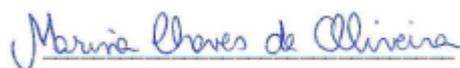
**ATA DE NÚMERO 61 (SESSENTA E UM) DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA LARISSA BERNARDES DE REZENDE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.**

Aos 28 (vinte e oito) dias do mês de outubro de dois mil e vinte, às 14:00 horas, realizou-se por meio de videoconferência, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação **"EFEITO DO TRATAMENTO COM ÓLEO DE COCO NA PERDA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM GORDURA"**, da aluna **Larissa Bernardes de Rezende**, candidata ao título de "Mestre em Nutrição e Saúde", linha de pesquisa "Nutrição Clínica e Experimental". A Comissão Examinadora foi constituída pelas professoras doutoras Marina Chaves de Oliveira, Adaliene Versiani Matos Ferreira, Soraia Macari, e Ana Leticia Malheiros Silveira, sob a presidência da primeira. Abrindo a sessão, a Senhora Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

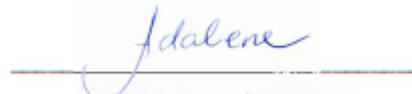
- ( x ) APROVADO;
- ( ) APROVADO COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;
- ( ) REPROVADO.

O resultado final foi comunicado à candidata pela Senhora Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Marina Chaves de Oliveira, Presidente da Comissão Examinadora, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de outubro de 2020.

Prof.ª. Dr.ª. Marina Chaves de Oliveira  
Presidente (UFMG)



Prof.ª. Dr.ª. Adaliene Versiani Matos Ferreira  
Coorientadora (UFMG)



Prof.ª. Dr.ª. Soraia Macari  
(UFMG)



Dr.ª. Ana Leticia Malheiros Silveira  
(UFMG)



## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por sempre caminhar ao meu lado me protegendo e me guiando.

Aos meus pais Míriam e Carlos, que não mediram esforços para me proporcionarem a melhor educação que eu poderia ter, dedico essa dissertação a vocês. Muito obrigada por sempre me apoiarem em todas as etapas de minha vida, amo vocês. Às minhas irmãs Carol e Carla, pelo companheirismo, apoio e amizade. E às minhas avós Didi e Rosa pelas orações e o carinho de sempre.

À minha orientadora Marina e à minha coorientadora Adaliene (Dadá) por terem me acolhido como sua aluna no mestrado e por todos os ensinamentos ao longo desses dois anos. Muito obrigada por terem feito parte da minha formação como pesquisadora.

Às minhas colegas Amanda, Francine, Mariele e Polianna, muito obrigada por toda a ajuda e ensinamentos, pela paciência e companheirismos ao longo do curso, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Às alunas de iniciação científica, Adma, Bruna e Joyce, muito obrigada por toda ajuda.

Ao grupo de Imunometabolismo, pelas trocas de conhecimento ao longo desses anos, aprendi muito com todos vocês.

Ao laboratório de imunofarmacologia, ao biotério da farmácia e aos técnicos, sem vocês nenhum experimento seria possível.

Ao Colegiado de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde e a todos os professores. Ao secretário Mateus Gomes por toda ajuda desde a minha entrada no mestrado.

Às minhas amigas Bela, Letícia e Laura, que mesmo de longe, sempre me apoiaram e me motivaram. E a Ana Laura, amiga que BH me deu, obrigada por me aguentar e por todo o apoio nesse período.

Aos membros da banca que aceitaram participar.

À FAPEMIG pela minha bolsa.

## RESUMO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal associada a uma inflamação crônica de baixo grau, sendo relacionada ao aumento do risco para o desenvolvimento de perda óssea, e consequentemente osteoporose. A perda óssea acontece devido a diversos fatores, dentre eles a presença de resposta inflamatória. As doenças crônicas como a obesidade apresentam aumento na síntese e secreção de mediadores inflamatórios que poderiam favorecer a perda óssea. Apesar de abordagens dietéticas serem propostas para tratar a perda óssea, elas ainda são pouco exploradas. O óleo de coco virgem (OCV) é um alimento funcional devido à sua quantidade significativa de ácidos graxos de cadeia média. Nos últimos anos, o OCV tem sido amplamente utilizado como possível tratamento de diversas doenças incluindo Alzheimer, doenças cardíacas, obesidade, entre outras. Contudo, conhecimentos a respeito da suplementação com OCV no tratamento da perda óssea ainda é incipiente. Esse estudo objetivou avaliar o efeito da suplementação dietética com OCV no tratamento na perda óssea de camundongos alimentados com dieta rica em gordura 45% (HF). Camundongos machos C57BL/6 foram inicialmente divididos em dois grupos e alimentados com dieta controle AIN-93M (C) ou dieta HF por oito semanas. Na 9ª semana, os camundongos alimentados com dieta HF foram reagrupados em quatro grupos até a 12ª semana: (i) dieta HF; ou dieta HF suplementada com diferentes doses de OCV, (iii) 1000 mg/kg, (iv) 3000 mg/kg ou (v) 9000 mg/kg. Apesar do ganho de peso não apresentar diferença estatística entre os grupos, o peso corporal final foi maior no grupo HF em relação ao grupo controle, mas sem alteração naqueles tratados com OCV em relação ao controle. Não houve diferença significativa na ingestão alimentar entre os grupos avaliados. Ao serem avaliados parâmetros ósseos, as concentrações séricas de RANKL, um marcador de perda óssea, e OPG, opositora a essa sinalização, não se alteraram entre os grupos. Contudo, somente os animais que receberam a dose média de OCV apresentaram tendência para menor relação RANKL/OPG, sendo essa a dose escolhida para a avaliação da microarquitetura óssea. No geral, o grupo HF apresentou menor densidade mineral óssea e volume ósseo, trabéculas de menor espessura com maior espaço entre elas, caracterizando aumento da reabsorção óssea na estrutura óssea do fêmur e maxila. Quando tratados com a dose média de OCV ocorreu uma piora da densidade mineral óssea e da separação trabéculas na maxila, sem alteração nos outros parâmetros quando comparados com o grupo HF. Contudo, a perda óssea presente no fêmur não foi alterada. Como esperado, a adiposidade, área de adipócitos e concentrações séricas de leptina foram maiores no grupo alimentado com dieta HF em relação ao controle. No grupo tratado com a dose alta de OCV foi observado um aumento da área dos adipócitos, mas nos demais parâmetros não foram observadas alterações após os diferentes tratamentos com o OCV. A intolerância à glicose observada no grupo HF não foi alterada com a adição do OCV à dieta HF, e ainda se mostraram hiperglicêmicos. Apesar de alteradas no grupo HF, as concentrações séricas de colesterol total e triglicérides não se modificaram com os tratamentos. Portanto, o uso da suplementação com OCV em camundongos alimentados com a dieta HF parece não ser benéfico para tratar perda óssea, a obesidade e ainda as disfunções metabólicas associadas.

**Palavras-Chave:** óleo de coco virgem, obesidade, perda óssea, dieta rica em gordura, metabolismo

## ABSTRACT

Obesity is characterized by the accumulation of body fat associated with low-grade chronic inflammation, which is related to an increased risk of developing bone loss, and consequently, osteoporosis. Bone loss occurs due to several factors, including the presence of an inflammatory response. Chronic diseases such as obesity show an increase in the synthesis and secretion of inflammatory mediators that could favor bone loss. Although dietary approaches are proposed to treat bone loss, they are still poorly explored. Virgin coconut oil (VCO) is a functional food due to its significant amount of medium-chain fatty acids. In recent years, VCO has been widely used to treat several diseases, including Alzheimer's, heart disease, obesity, among others. However, knowledge about VCO supplementation in the treatment of bone loss is still incipient. This study aimed to evaluate the effect of dietary supplementation with VCO in the treatment of bone loss in mice fed a 45% high-fat (HF) diet. Male C57BL / 6 mice were initially divided into two groups and fed either the AIN-93M (C) control diet or the HF diet for eight weeks. At the 9th week, the mice fed the HF diet were regrouped in four groups until the 12th week: (i) HF diet; or HF diet supplemented with different doses of VCO, (iii) 1000 mg / kg, (iv) 3000 mg / kg or (v) 9000 mg / kg. Although the weight gain does not present a statistical difference between the groups, the final body weight was higher in the HF group than the control group, but without changes in those treated with VCO in relation to the control. There was no significant difference in food intake between the groups evaluated. When bone parameters were evaluated, the serum concentrations of RANKL, a bone loss marker, and OPG, opposed to this signaling, did not change between the groups. However, only animals that received the medium dose of VCO showed a tendency towards a lower RANKL / OPG ratio, which was the dose chosen for bone microarchitecture evaluation. In general, the HF group showed lower bone mineral density and bone volume, thinner trabeculae with greater space between them, characterizing increased bone resorption in the femur and maxilla's bone structure. When treated with the medium dose of VCO, there was a worsening of bone mineral density and trabecular separation in the maxilla, with no change in other parameters when compared with the HF group. However, the bone loss present in the femur was not altered. As expected, adiposity, area of adipocytes and serum leptin concentrations were higher in the group fed with HF compared to the control group. In the group treated with the high dose of VCO an increase in the area of adipocytes was observed, but in the other parameters, no changes were observed after the different treatments with the VCO. The glucose intolerance observed in the HF group was not altered with the addition of VCO to the HF diet, and they were also shown to be hyperglycemic. Despite being changed in the HF group, serum concentrations of total cholesterol and triglycerides did not change with treatments. Therefore, the use of VCO supplementation in mice fed the HF diet does not seem to be beneficial for treating bone loss, obesity, and even the associated metabolic disorders.

**Keywords:** virgin coconut oil, obesity, bone loss, high fat diet, metabolism

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCM- Ácido graxo de cadeia média

BMD- Bone mineral density - Densidade mineral óssea

BV/TV- Bone volume fraction - Percentual volume ósseo / volume de tecido

Ct.Th – Cortical thickness – Espessura transversal

DAOC – Dose alta de óleo de coco

DBOC – Dose baixa de óleo de coco

DMOC – Dose média de óleo de coco

ERO- Espécies reativas de oxigênio

HC- Dieta rica em carboidrato refinado

HF- Dieta rica em gordura

IL-1- Interleucina – 1

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 beta

IL-6 – Interleucina – 6

IMC- Índice de massa corporal

IRS – Substrato do receptor de insulina

Micro- Ct- Microtomografia Computadorizada

M-CSF – Fator estimulador de colônia

NFATc1- Fator nuclear de células T

OC – Óleo de Copra

OCV- Óleo de coco virgem

OMS- Organização Mundial de Saúde

OPG- Osteoprotegerina

PPAR – Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama

PTH- Paratormônio

RANK- Receptor ativador Kappa B

RANKL - Ligante do receptor ativador Kappa B

SMI – Structure model index – Índice de modelo de estrutura

TAE – Tecido adiposo epididimal

TAI – Tecido adiposo inguinal

TAM – Tecido adiposo mesentérico

TAR – Tecido adiposo retroperitoneal

Tb/Th – Trabecular thickness - Espessura das trabéculas

Tb/N – Trabecular number - Número de trabéculas

Tb/Sp – Trabecular separation - Separação das trabéculas

TNF – Fator de necrose tumoral

TRAP – Fosfatase ácida resistente ao tartarato

TTOG – Teste oral de tolerância à glicose

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema RANK/RANKL/OPG.....	17
Figura 2. Hipertrofia do tecido adiposo e produção de citocinas pró-inflamatórias.....	20
Figura 3. Diferenciação celular de osteoblastos e adipócitos.....	22
Figura 4. Delineamento Experimental.....	28
Figura 5. Consumo Alimentar e evolução do ganho de peso.....	31
Figura 6. Análises de remodelamento ósseo.....	32
Figura 7: Análise de microtomografia computadorizada da maxila.....	33
Figura 8. Análise de microtomografia computadorizada do fêmur.....	34
Figura 9. Análises da adiposidade.....	35
Figura 10. Análise da área de adipócitos do tecido adiposo epididimal.....	36
Figura 11. Concentrações séricas de leptina.....	37
Figura 12. Teste de tolerância oral de glicose e área sob a curva.....	38
Figura 13. Avaliações sorológicas de glicose, triglicérides e colesterol total.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes da dieta AIN-93M e dieta rica em gordura saturada 45%.....27

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Tecido ósseo .....	15
2.2 Obesidade .....	18
2.3 Obesidade e Perda óssea.....	22
2.4 Óleo de Coco: relação com a obesidade e perda óssea .....	23
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>26</b>
3.1 Objetivos específicos .....	26
<b>4. MATERIAIS E METODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 Delineamento experimental .....	27
4.2 Avaliações Sorológicas .....	29
4.3 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct).....	29
4.4 Teste oral de tolerância oral à glicose (TTOG).....	30
4.5 Análise Histológica.....	30
4.6 Análise Estatística.....	30
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1 Consumo alimentar e ganho de peso.....	31
5.2 Regulação do remodelamento ósseo por RANKL e OPG .....	32
5.3 Microtomografia computadorizada (Micro-Ct) .....	33
5.4 Análise da adiposidade.....	35
5.5 Área de adipócitos.....	36
5.6 Leptina.....	37
5.7 Teste oral de tolerância à glicose (TTOG) e sua área sob a curva.....	38
5.8 Avaliações sorológicas.....	39
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O nosso organismo é formado pelo esqueleto humano que contém peças ósseas constituído por um tecido dinâmico, que exerce funções básicas, como mecânica, protetora e metabólica (JUNQUEIRA et al., 2007). O osso é formado por tecidos conjuntivos e pela matriz óssea (TRZECIAKIEWICZ et al., 2009). Além de sua constituição estrutural, dentre as células que participam de seu processo de constante remodelamento tecidual, pode-se citar os osteoblastos, osteócitos e os osteoclastos. Essas células atuam na síntese e manutenção da matriz óssea e na reabsorção respectivamente, contribuindo para manter a homeostase do tecido (BAUM et al., 2014). Diversos fatores influenciam de forma positiva ou negativa na regulação, síntese e reabsorção óssea, como por exemplo, hormônios, nutrientes, alguns medicamentos, fatores de crescimento e moléculas inflamatórias. Nesse contexto, doenças inflamatórias crônicas podem contribuir com a perda óssea, assim como ocorre na obesidade.

A prevalência da obesidade aumentou nos últimos anos, e isso está associado ao atual padrão de consumo alimentar da população composto por alimentos calóricos, ricos em carboidrato refinado e gordura saturada (FEHRENDT et al., 2014). Essa doença é caracterizada pela expansão do tecido adiposo associada à inflamação crônica de baixo grau (EDWARDS et al., 1993). Nesse sentido, respostas inflamatórias podem influenciar o processo de remodelamento ósseo, contribuindo para o desenvolvimento de doenças ósseas, como a osteopenia (KANIS et al., 2012) e, conseqüentemente, a osteoporose (CLARKE e SUNDEEP, 2010), tornando o osso frágil e susceptível a fraturas. Assim, estudos em modelos animais mostraram que o consumo de dieta rica em carboidratos refinados (HC) (MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2017) ou dieta rica em gordura saturada (HF) (STRÖHER et al., 2019; HALADE et al., 2010; CAO et al., 2017; MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2018) reduz a densidade mineral óssea. A partir dessa associação, duas hipóteses são descritas por correlacionar a influência da obesidade sobre o processo de remodelamento ósseo. A primeira hipótese é que pelas células adiposas e as células osteoblásticas derivarem de uma mesma célula progenitora, resulta na propensão da formação de adipócitos na medula óssea, advindos de estímulos causados pelo desenvolvimento da obesidade e menor formação de osteoblastos. A segunda hipótese é que por ser uma doença inflamatória crônica de baixo grau, as citocinas pró-inflamatórias

aumentadas na obesidade estimulariam o processo de desmineralização óssea (CAO et al., 2011). Portanto, a expansão dos adipócitos e a inflamação presentes na obesidade contribuem para maior risco de reabsorção óssea, refletindo a necessidade da investigação de intervenções que revertam essa perda óssea.

Diversos estudos têm buscado tratamentos diversos a fim de evitar a progressão da perda óssea e melhorar a obesidade, principalmente, advindos de compostos dietéticos (NEVIN e RAJAMOHAN, 2006). À exemplo, o óleo de coco virgem (OCV) vem sendo estudado devido às suas propriedades funcionais em diversas doenças (NEVIN, K.G.; RAJAMOHAN T. 2006). O OCV é composto por ácidos graxos de cadeia média (AGCM), sendo o ácido láurico (C12:0) o mais abundante, além de alguns nutrientes e compostos bioativos, à exemplo, vitamina E, e os polifenóis, sendo considerados responsáveis por proporcionarem efeitos benéficos ao organismo (DEBMANDAL M.; MANDAL, S. 2011; WALLACE et al., 2018). Na literatura, foi demonstrado que a suplementação com OCV levou a diminuição da circunferência abdominal em mulheres obesas (ASSUNÇÃO et al., 2009), e que camundongos alimentados com dieta HC e tratados com o OCV apresentaram melhora dos parâmetros de obesidade, como análise da adiposidade, entre outros (ZICKER et al., 2018). Porém, estudos abordando o impacto da suplementação de OCV em animais alimentados com dieta HF não demonstraram alteração na adiposidade ou até mesmo pioraram esse parâmetro associada a um acúmulo de gordura hepática (STRÖHER et al., 2019; LAU et al., 2010; DIAS et al., 2010).

Apesar de nos últimos anos os estudos do efeito do consumo de óleo de coco em diferentes doenças terem aumentado, o seu impacto nos diferentes contextos de dietas obesogênicas ainda se apresentam contraditórios (STRÖHER et al., 2019). Além disso, são escassos os estudos que objetivam realizar o tratamento da perda óssea presente na obesidade por meio de alimentos ou compostos presentes em alimentos. Neste contexto, o presente trabalho propõe uma intervenção por meio da administração oral de diferentes concentrações de OCV em camundongos alimentados em uma dieta rica em gordura saturada, a fim de investigar a sua influência nos parâmetros ósseos.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Tecido Ósseo**

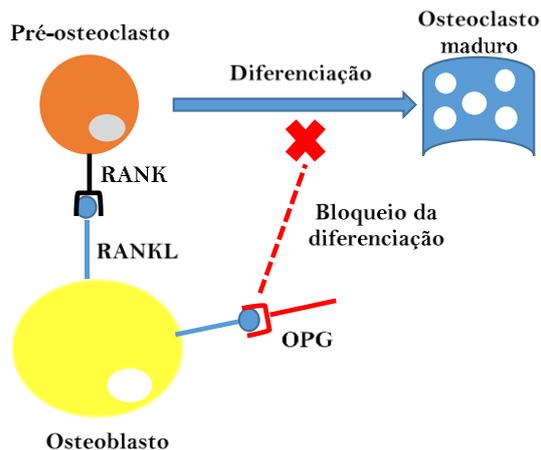
O esqueleto humano é formado pelos ossos e cartilagens unidos por ligamentos e tendões. Dentre suas funções básicas pode-se citar: mecânica, protetora e metabólica. As peças ósseas apresentam diferentes dimensões e funções dependendo da localização em que elas se encontram, e sua classificação leva em consideração a forma dos ossos (JUNQUEIRA et al., 2007). À exemplo, o fêmur é considerado um osso longo por possuir comprimento maior do que a largura e espessura, sua função consiste em fornecer suporte ao esqueleto, sendo diretamente influenciado pela carga mecânica sobre ele e mais susceptível a fraturas (LOCKE M. 2004). Outro exemplo é a maxila que é classificada como um osso plano, pois suas dimensões são similares e apresentam função protetora, possuindo participação direta no ato de se alimentar (BURGOS-FLÓREZ et al., 2016).

O osso é formado pelo endóstio e perióstio e pela matriz óssea. Essa matriz possui importante papel nesse tecido por ser o local de maior atividade ao exercer suas funções fisiológicas, sendo ela constituída pela parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas), e pela matriz inorgânica (cristais de hidroxiapatita) composta de fosfato de cálcio e íons associados (TRZECIAKIEWICZ et al., 2009). A partir de sua funcionalidade e características estruturais, o osso pode ser dividido em dois tipos, compacto ou cortical, e esponjoso ou trabecular. O cortical representa cerca de 80% da massa óssea total, sendo responsável por fornecer suporte e proteção. Por outro lado, o trabecular compõe ao redor de 20% dela por ser mais poroso, menos denso, e possuir a capacidade de se adaptar mais facilmente quando exercidas cargas mecânicas. No osso tem-se também a medula óssea que se subdivide em medula óssea vermelha, onde ocorre a produção de células sanguíneas, e medula óssea amarela, onde há presença de adipócitos (KIERSZENBAUM et al., 2008).

Apesar de sua composição estrutural rígida, o tecido ósseo é considerado dinâmico, e esse dinamismo acontece principalmente pelo fato da matriz óssea ser composta por diferentes células que participam do processo de formação, reabsorção óssea, reparação e manutenção, denominado remodelamento ósseo (OFTADEH et al., 2015). Dentro desse processo se destacam as células especializadas, como os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos são derivados de células

tronco mesenquimais e são responsáveis pela síntese e mineralização do osso. Já os osteócitos correspondem ao estágio final de diferenciação dos osteoblastos, e se formam a partir do aprisionamento dos osteoblastos dentro da matriz óssea. Por fim, os osteoclastos participam do processo de desmineralização do tecido. Eles são derivados de monócitos ou macrófagos, os quais precisam se diferenciar em células maduras e serem ativadas para exercer sua função de reabsorção óssea (BAUM et al., 2014). Eles possuem a função de regular o processo de remodelação. Estima-se que os adultos remodelam de 10-30% do osso por ano (HALADE et al., 2011; TRZECIAKIEWICZ et al., 2009).

A manutenção da homeostase durante o processo de remodelamento ósseo é realizada principalmente pelo sistema RANK/RANKL/OPG. O ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), Proteína Transmembranosa tipo II, membro da família do fator de necrose tumoral (TNF), está presente principalmente na superfície dos osteoblastos, é considerado um marcador de desmineralização, e a osteoprotegerina (OPG) membro atípico da família TNF, uma vez que funciona como um receptor chamarriz solúvel sem um domínio transmembrana – possui alta afinidade com o RANKL – Bloqueia a diferenciação. Para iniciar esse processo é necessário a presença de uma célula pré-osteoclástica, a qual expressa em sua superfície o receptor do ativador do fator nuclear kappa B (RANK) e o receptor para o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Essa diferenciação é realizada por meio da ativação de uma cascata de sinalização que induzirá o fator nuclear de células T ativadas (NFATc1) nessas células para que ocorra a sua maturação em osteoclastos (KOBAYASHI, 2009). Por outro lado, os osteoblastos sintetizam a OPG que poderá inibir essa diferenciação por possuir alta afinidade ao RANKL, impedindo assim sua ligação ao RANK (TAKEGAMI et al., 2017) (**Figura 1**). Além desse sistema, o hormônio da paratireoide (PTH) e a vitamina D são moléculas essenciais na regulação e manutenção do remodelamento ósseo. Para contribuir com a homeostase da calcemia, o PTH estimula a atividade dos osteoclastos e a reabsorção óssea, esse se liga em seu receptor presente no osteoblasto, o que estimula a secreção do RANKL e, conseqüentemente, libera cálcio à circulação em um estado de hipocalcemia (PIRI et al., 2016). Por outro lado, a vitamina D estimula a mineralização óssea, onde disponibiliza o principal substrato para esse processo, o cálcio, por meio do aumento de sua absorção no intestino (HALL J. E. 2017).



**Figura 1: Sistema RANK/RANKL/OPG.** A osteoclastogênese é regulada pelo sistema RANK/RANKL/OPG, o ligante do receptor ativador Kappa B (RANKL) liberado pelo osteoblasto, se liga ao receptor do ativador do fator nuclear kappa B (RANK) presente na superfície da célula pré-osteoclástica, ocorrendo a diferenciação de osteoclastos. Esse sistema é bloqueado pela osteoprotegerina (OPG) que se liga ao RANKL secretado pelo osteoblasto, regulando a diferenciação dos osteoclastos.

Doenças autoimunes e inflamatórias, podem interferir no processo de remodelamento levando ao desenvolvimento de doenças ósseas. A osteopenia consiste na diminuição da massa óssea, ocorrendo uma desmineralização e, sua progressão leva a osteoporose. A característica dessa condição é a presença de deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, o que aumenta o risco de fraturas devido a fragilidade óssea, principalmente no quadril, fêmur, coluna vertebral, antebraço distal e úmero proximal (KANIS et al., 2012). Um dos fatores envolvidos para sua progressão é a menopausa, pois a falta de estrogênio é responsável pela aumento da reabsorção óssea, com elevação do fator de necrose tumoral (TNF) e da proporção do RANKL/OPG. Então, a diminuição hormonal presente nesse período da vida eleva a desmineralização e prejudica a mineralização, interferindo diretamente na homeostase do tecido (ALMEIDA et al., 2017). Essa condição também pode ser evidenciada em modelos animais, os quais animais fêmeas são ovariectomizadas, com o intuito de induzir a pós-menopausa, e apresentam uma diminuição da densidade mineral óssea, característica da osteoporose (HAYATULLINA et al., 2012). Outro fator envolvido além da menopausa, é o envelhecimento, em que há um aumento da secreção de PTH e citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), que favorecem a depleção óssea, além do aumento de gordura medular estimulando hiperplasia e diminuição da osteoblastogênese (CLARKE e SUNDEEP,

2010). Ademais, osteoblastos e adipócitos compartilham um progenitor em comum, as células tronco mesenquimais, então o estímulo para o aumento de uma linhagem pode reduzir a outra, o que infere no metabolismo ósseo (CAO J. J. 2010).

As doenças inflamatórias também ocasionam uma piora nos parâmetros ósseos, pois a inflamação gera um aumento na síntese de mediadores pró-inflamatórios, e estes por sua vez estimulam a ação de células ósseas que realizam a reabsorção óssea, os osteoclastos. O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, interleucina-1 (IL-1) e a IL-6, regulam a osteoclastogênese, gerando um aumento da expressão de RANKL. Como dito anteriormente, essa sinalização ocasiona maior produção de osteoclastos maduros, e conseqüentemente maior reabsorção óssea, levando a maior perda óssea (HALADE et al., 2011). Além das citocinas inflamatórias, durante o processo de reabsorção óssea é liberada elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo essas moléculas também responsáveis por afetar negativamente o remodelamento ósseo (WAUQUIER et al., 2009). Assim, doenças crônicas, como a obesidade, apresentam produção anormal de mediadores pró-inflamatórias, o que pode contribuir diretamente para o desequilíbrio da homeostase óssea (CAO et al., 2009), sendo importante aprofundar o conhecimento a respeito de seu impacto na saúde óssea.

### **2.3 Obesidade**

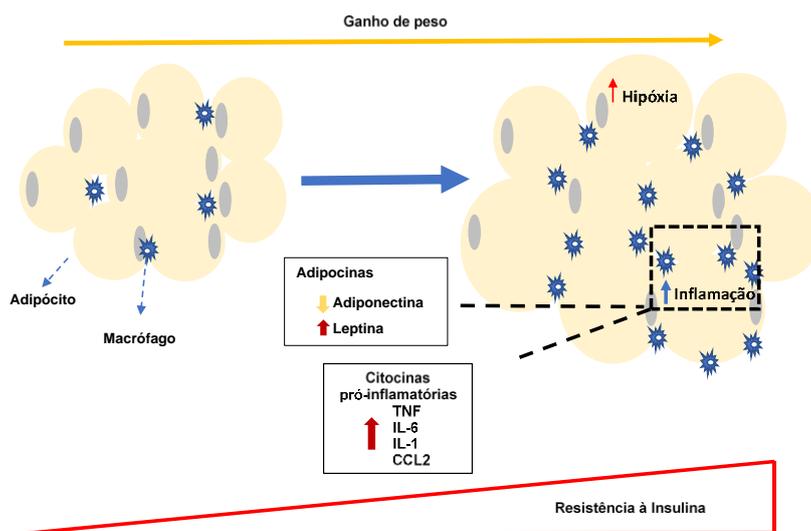
A obesidade é uma doença de alta prevalência global. Em 2016, aproximadamente 2,1 bilhões de pessoas foram classificadas como obesas ou sobrepeso, representando por volta de 30% da população mundial (COSTA et al., 2016). No mesmo ano, mais de 50% da população apresentava excesso de peso no Brasil. Em 2025, estima-se que cerca de 2,5 bilhões de adultos estejam com excesso de peso, e mais de 700 milhões com obesidade (FAO 2020). Essa doença complexa pode ser resultante de diversos fatores, como psicológicos, comportamentais, fisiológicos, genético e por alteração do padrão alimentar (COSTA et al., 2016). O atual perfil dietético é caracterizado por um aumento do consumo de produtos industrializados, processados e ultraprocessados. Nesses produtos pode-se destacar alta quantidade de carboidratos refinados, gorduras saturadas e trans, sódio, e pobre em micronutrientes, pode ocasionar também carências nutricionais. Diversos estudos têm demonstrado que o elevado consumo desses alimentos pode aumentar o risco do

desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, entre outros, além dessas doenças pode ocorrer também o desenvolvimento da síndrome metabólica, o que pode aumentar o risco de mortalidade (FEHRENDT et al., 2014). Além disso, o excesso de peso desenvolve-se quando a energia ingerida é maior que energia gasta, gerando um balanço energético positivo, com consequente aumento na adiposidade (LERNARD et al., 2008; GHABEN; SCHERER, 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), obesidade é definida como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta algum risco à saúde (WHO, 2016). Sua classificação ocorre por meio do índice de massa corporal (IMC), sendo que, quando o IMC é  $\geq 25 \text{ kg / m}^2$  é considerado sobrepeso, enquanto para a obesidade é um IMC  $\geq 30 \text{ kg / m}^2$  (OMS, 1998). O maior estoque de gordura do corpo se encontra no tecido adiposo branco, sendo definido como visceral aquele concentrado ao redor dos órgãos da cavidade abdominal, e subcutâneo aquele localizado principalmente abaixo da derme (FRIGOLET et al., 2020). As células mais abundantes no tecido adiposo são os adipócitos, porém contém também pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos e células imunológicas (FREITAS et al., 2014).

A expansão dos adipócitos na obesidade pode ocorrer por meio da hipertrofia, que consiste no aumento do volume celular, e/ou hiperplasia, por um aumento do número de células (EDWARDS et al., 1993). A expansão pela hipertrofia é mais prejudicial, pois gera uma diminuição da vascularização do tecido, podendo causar hipóxia celular, e aumento da secreção de mediadores pró-inflamatórios, o que leva a uma inflamação crônica de baixa intensidade (ENGIN, 2017). A produção anormal de citocinas, como o TNF, IL-6 e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ocorre principalmente pelos macrófagos (M2) (TILG; MOSCHEN, 2006). Embora os macrófagos do tecido adiposo serem a principal fonte de TNF, os adipócitos contribuem com quase um terço da concentração de IL-6 na circulação de pacientes obesos (SUN et al. 2011). Além disso, a quimiocina CCL2, produzida por adipócitos, contribui para a infiltração de macrófagos no tecido adiposo (ENGIN, 2017). Outras citocinas, como a leptina, é uma das mais abundantes produzidas por adipócitos, que além de pró-inflamatória, reflete diretamente o conteúdo de massa adiposa, estando aumentada na obesidade (TILG et al., 2006). De forma concomitante, há uma redução na produção de citocinas anti-

inflamatórias, como adiponectina, que também é sensibilizadora de insulina, ocasionando uma menor captação de glicose nos adipócitos, com consequente desenvolvimento da resistência à insulina (SUN et al., 2011) (**Figura 2**).



**Figura 2: Hipertrofia do tecido adiposo e produção das citocinas pró-inflamatórias.** A expansão do tecido adiposo durante o ganho de peso na obesidade leva a uma diminuição de sua vascularização, podendo ocasionar a hipóxia tecidual. Além disso, ocorre o recrutamento de macrófagos por meio da produção da quimiocina CCL2. Citocinas pró-inflamatórias aumentam, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6), IL-1 e leptina, enquanto a adipocina anti-inflamatória se reduz como, a adiponectina. A alteração no perfil de secreção de moléculas inflamatórias decorrente da obesidade pode contribuir com o desenvolvimento da resistência à

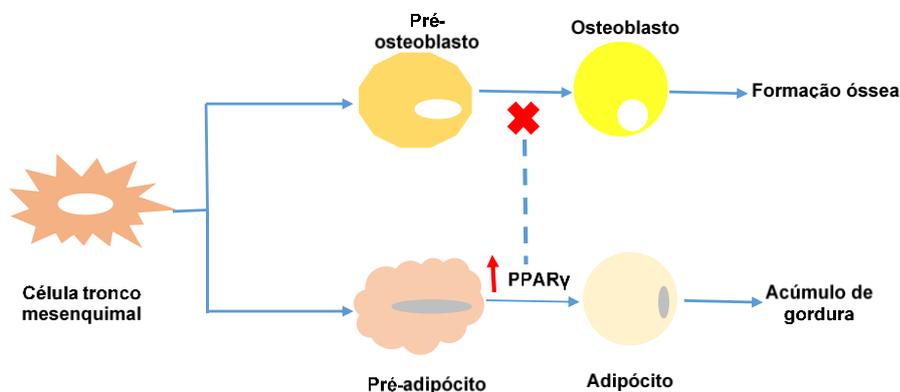
A resistência à insulina pode ser desencadeada a partir do aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e a IL-6, por estimular lipólise nos adipócitos, favorecendo a liberação de ácidos graxos livres (SUN et al., 2011). Além disso, a fosforilação errônea do substrato do receptor de insulina (IRS), em serina ao invés de tirosina, prejudica a funcionalidade do receptor de insulina e, consequentemente, a sinalização da insulina, levando a hiperglicemia e hiperinsulinemia (SANTOLERI D.; TICHENELL P.M. 2019). Outro fator contribuidor é o balanço energético positivo gerado pelo consumo excessivo de alimentos, que estimula a secreção contínua de insulina no período pós-prandial, levando a uma endocitose dos receptores proteicos tirosina quinase, resultando em hiperinsulinemia (GORDEN et al., 1989). Estudos com camundongos que receberam dieta HC (OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015) ou dieta HF (PORET et al., 2018) demonstraram que esses animais desenvolveram resistência à insulina e um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias decorrente do aumento da adiposidade visceral, com consequente

esteatose hepática. Assim, é descrito que a resistência à insulina causada pelo consumo desse tipo de dieta favorece não somente o acúmulo de gordura no tecido adiposo, mas também em órgãos periféricos, como o fígado, associado as dislipidemias (TILG; MOSCHEN, 2008). Apesar de órgãos como o tecido adiposo e outros órgãos metabólicos, como o fígado e músculo, serem bastante associados com a obesidade (PERDERSEN et al., 2012; CHEPO M.P. 2017), outros tecidos podem também ser influenciados por essa doença, à exemplo os ossos, e seu efeito está principalmente correlacionado ao desenvolvimento e/ou progressão de doenças ósseas (SHAPSES et al., 2012).

#### **2.4 Obesidade e perda óssea**

A relação entre obesidade e a perda óssea vem sendo estudada nos últimos anos, porém ela ainda não é totalmente elucidada. Antigamente a obesidade era vista como benéfica para o osso, pois o aumento da carga mecânica estimularia a formação óssea diminuindo a apoptose e aumentando a proliferação e diferenciação dos osteoblastos e dos osteócitos. Assim, impediria a perda óssea, protegendo o osso contra fraturas e conseqüentemente, reduzindo a evolução dos quadros de osteoporose (ROBLING et al., 2006). Porém, estudos recentes demonstraram que o aumento da massa gorda não é benéfico para o osso (HSU et al., 2006; LAU et al., 2010; FERESIN et al., 2014), sendo que duas hipóteses principais propõem mecanismos para explicar a complexa relação entre gordura e massa óssea. A primeira hipótese é que a obesidade diminui a osteoblastogênese enquanto aumenta a adipogênese, pois os adipócitos e os osteoblastos derivam de uma mesma célula progenitora, a célula tronco mesenquimal. Assim, com o aumento da massa gorda ocorre maior diferenciação em adipócitos, estes por sua vez estimulam a ativação positiva do receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama (PPAR $\gamma$ ), que quando em excesso diminuiu a diferenciação dos osteoblastos, gerando uma diminuição da formação óssea com conseqüente redução da densidade mineral óssea (CAO J.J. 2011) (**Figura 3**). A segunda hipótese, como já foi descrito, é pelo fato de a obesidade por ser uma doença inflamatória crônica de baixa intensidade, onde citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas. Essas citocinas são capazes de estimular a atividade dos osteoclastos através da regulação do sistema RANK / RANKL / OPG, o que induz maior desmineralização, torna os ossos mais fracos e

susceptíveis a fraturas (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2016). Esses mecanismos contribuem para reforçar o que tem sido demonstrado nos últimos anos em que obesidade também é responsável por aumentar o risco de doenças ósseas devido a maior perda óssea e isso é demonstrado em estudos observacionais, clínicos e experimentais.



**Figura 3: Diferenciação celular de osteoblastos e adipócitos.** O acúmulo de gordura está intimamente relacionado à formação óssea. Os osteoblastos e os adipócitos são derivados da célula tronco mesenquimal multipotente. Assim, com o aumento do ganho de peso na obesidade ocorre uma diferenciação maior dessas células em adipócitos, estes aumentam a expressão de PPAR $\gamma$ , que inibe a diferenciação dos osteoblastos.

Estudo de coorte avaliou fraturas ósseas em mulheres obesas na pós-menopausa. Foi observada uma correlação positiva entre o IMC e fraturas ósseas, em que a maior parte das pacientes apresentaram osteoporose ao longo do estudo (PREMAOR et al., 2010). Um estudo experimental investigou o efeito do consumo de dieta HC no osso alveolar e fêmur de camundongos. Foi encontrado aumento da adiposidade e inflamação no tecido adiposo associada a perda óssea e aumento da relação RANKL/OPG (MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2017). Estudos com dieta HF também mostram prejuízos na densidade mineral óssea (BMD) e qualidade do osso. Camundongos alimentados com dieta HF por 14 semanas apresentaram maior concentração sérica de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e leptina, mas menores de osteocalcina, indicando maior diferenciação dos osteoclastos e reabsorção óssea, com consequente impacto negativo na estrutura óssea (CAO et al., 2010). Outro estudo com camundongos em crescimento, alimentados com dieta HF durante 13 semanas, foi encontrado aumento do TRAP, com maior diferenciação de osteoclastos e aumento da reabsorção óssea relacionada a maior expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (CAO et al., 2017). Ainda, o aumento da

expressão dos genes inflamatórios foi associado a menor BMD, percentual volume ósseo / volume de tecido (BV/TV), espessura das trabéculas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e maior separação das trabéculas (Tb.Sp) na maxila, e menor BMD e maior Tb.Sp no fêmur de camundongos alimentados com dieta HF por 12 semanas (MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2018). Devido esses dados, torna-se interessante buscar tratamentos alternativos que visem tratar a perda óssea proveniente da obesidade, sendo que nos últimos anos os alimentos funcionais vêm ganhando destaque nesses tratamentos, devido as propriedades benéficas que proporcionam ao organismo.

### **2.5 Óleo de Coco: relação com a obesidade e o tecido ósseo**

O óleo de coco é um óleo comestível tradicional que é extraído do endosperma branco (carroço) de cocos maduros colhidos do coqueiro (*Cocos nucifera L*) (CHEN E.; ELEVITCH C. R. 2006). Existem dois principais tipos de óleo de coco, o óleo de copra (OC) e óleo de coco virgem (OCV). Eles possuem perfis semelhantes em relação aos ácidos graxos, o que os difere é no modo de extração. O OC é produzido pela trituração dos carroços do cocos secos para extrair o óleo, que normalmente é refinado, branqueado e desodorizado. Já o OCV é feito pressionando o caroço de coco úmido ralado para obter o óleo e o leite de coco, que formam uma emulsão que será separada, porém não é utilizado calor nem processo de refino (MARINA et al., 2009). Além disso, o OCV contém quantidades mais elevadas de alguns nutrientes, como a vitamina E, e compostos bioativos da dieta, como os polifenóis (WALLACE, 2018). Por causa de sua composição, o OCV é considerado um alimento funcional, pois é rico em ácidos graxos de cadeia média (AGCM), principalmente o ácido láurico (C12:0), o que lhe confere boa digestibilidade (MARINA et al., 2009). Os AGCM são absorvidos diretamente para a circulação portal, sendo ligados a albumina em direção ao fígado ou, em menor quantidade, transportados via quilomícrons para o sistema linfático, permitindo sua absorção por tecidos extra-hepáticos, como o tecido adiposo (ST-ONGE et al. 2002). Ademais, eles possuem uma alta taxa de oxidação, e uma rápida metabolização, contribuindo com o aumento do gasto energético, maior saciedade e menor deposição de gordura no tecido adiposo, o que facilita o controle do peso corporal (BABA et al., 1982).

A maior saciedade provinda pelo óleo de coco está correlacionada com a estimulação dos hormônios colecitocinina, peptídeo YY, peptídeo inibidor gástrico, neurotensina e polipeptídeo pancreático, porém os mecanismos exatos ainda não foram estabelecidos (ST-ONGE et al., 2002). Estudo realizado em homens com sobrepeso avaliou o impacto do consumo dos AGCM no apetite. Ao final do estudo constatou-se uma redução do apetite com aumento do peptídeo YY e de leptina, e menores concentrações de triglicerídeos e glicose no sangue (ST-ONGE et al., 2014). Outro estudo com camundongos alimentados com uma dieta HF, enriquecida com AGCM, demonstrou que a suplementação com AGCM aumentou a taxa metabólica de repouso e termogênese, resultando em menor peso corporal (BABA et al., 1982). O fato de o óleo de coco também ser composto por vitaminas e compostos bioativos o descreve por ter ação antioxidante, propriedades antimutagênicas, antiproliferativas, anticarcinogênicas, e contribuir para menor peroxidação lipídica (ZAKARIA et al., 2010). Estudo realizado com ratos machos suplementados com OCV por 45 dias mostrou aumento nas concentrações de enzimas antioxidantes, e prevenção da peroxidação de lipídios, o que comprova seus efeitos antioxidantes (NEVIN K. G.; RAJAMOCHAN T. 2006). Outro estudo realizado com ratos fêmeas ovariectomizados avaliou o efeito do OCV na peroxidação lipídica no osso, sendo ele que evitou a peroxidação lipídica e aumentou as enzimas antioxidantes nos ratos com osteoporose (ABUJAZIA et al., 2012). No geral, evidências científicas relatam os efeitos benéficos do óleo de coco na prevenção e no tratamento do Alzheimer (FERNANDO et al., 2015), na modulação do sistema imunológico (EYRES et al., 2016), na redução de fatores de risco de doenças cardiovasculares (HILMA et al., 2019), nas cáries dentárias (PEEDIKAYIL et al., 2015), no controle glicêmico e diabetes tipo 2 (DJURASEVIC et al., 2018), na saúde da pele, auxiliando na dermatite atópica (VERALLO-ROWELL et al., 2008), na obesidade (ZICKER et al., 2018) e na perda óssea (HAYATULLINA et al., 2012).

O efeito do OCV na obesidade tem sido amplamente estudado nos últimos anos. Estudo realizado em mulheres obesas consumindo óleo de soja ou OCV mostrou redução no IMC em ambos os grupos, mas apenas o grupo OCV apresentou redução na circunferência da cintura. Além disso, somente o grupo que recebeu óleo de soja apresentou dislipidemia (ASSUNÇÃO et al., 2009). Por outro lado, estudo realizado em mulheres obesas consumiram de forma aguda o OCV não mostraram

melhorias metabólicas, porém houve aumento da resposta de saciedade (VALENTE et al., 2018). Ademais, em modelo experimental, nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito do OCV na adiposidade, disfunções metabólicas e inflamatórias induzidas por uma dieta HC em camundongos. Os animais tratados com OCV apresentaram diminuição da área de adipócitos, melhoria nas alterações metabólicas, e resposta inflamatória no tecido adiposo (ZICKER et al., 2018). De forma bem contrastante, um estudo com ratos alimentados com dieta HF e tratados com OCV, durante 12 semanas demonstrou que a suplementação de OCV por mais 30 dias piorou as alterações metabólicas, com um aumento da hipertrofia dos adipócitos e um acúmulo de lipídios hepáticos quando comparados com o grupo que recebeu apenas a dieta HF (STRÖHER et al., 2019). Dessa forma, mais estudos ainda são necessários para determinar o efeito do óleo de coco em diferentes condições de desenvolvimento da obesidade, principalmente aquelas advindas de dietas, por ser uma das causas mais comuns para o seu agravamento.

A avaliação do efeito do óleo de coco nas doenças ósseas ainda é bastante escassa na literatura. Até o momento, somente um estudo avaliou os efeitos do OCV na microarquitetura óssea em modelo de ratos ovariectomizados, ou seja, com osteoporose. De forma interessante, foi observada uma melhora nos parâmetros ósseos, como fração do volume ósseo e número de trabéculas no grupo ovariectomizado tratado com o óleo de coco (HAYATULLINA et al., 2012). Apesar dessa evidência de possível benefício do tratamento do OCV no tecido ósseo, ainda são necessários mais estudos a respeito para determinar de forma mais concreta seus efeitos em diferentes contextos de perda óssea.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da suplementação dietética com óleo de coco como tratamento na perda óssea induzida por dieta rica em gordura em camundongos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito do tratamento com óleo de coco no remodelamento ósseo de camundongos obesos;
- Verificar se o tratamento com óleo de coco reverte a perda óssea dos animais obesos;
- Avaliar se a adiposidade é alterada pelo tratamento com óleo de coco;
- Determinar se as alterações metabólicas, presente em animais obesos, é alterada pelo tratamento com óleo de coco.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

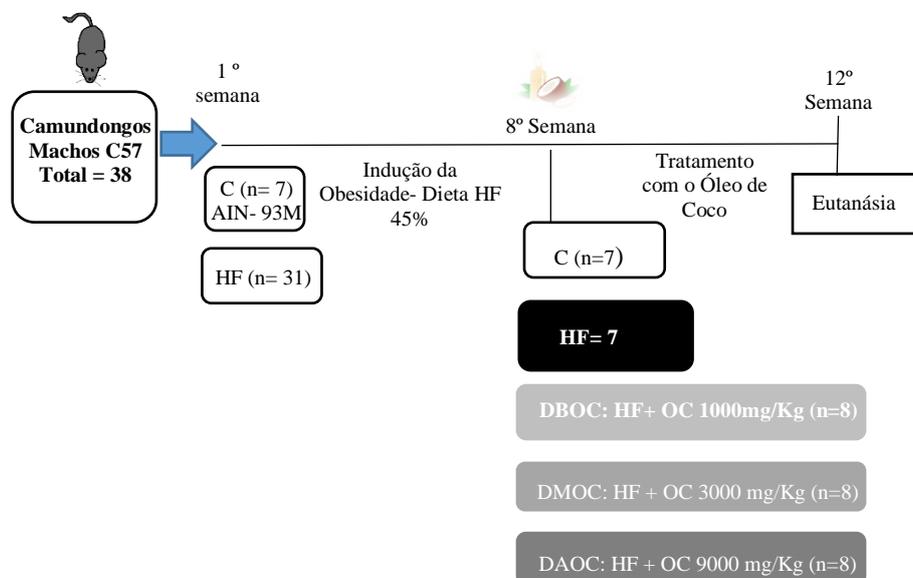
Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) com o número de protocolo 305/2017. Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com 8 semanas de idade (n=38). Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos experimentais, (i) camundongos alimentados com dieta AIN-93M (controle) e (ii) camundongos alimentados com dieta rica em gordura 45% (HF). A composição de macronutrientes da dieta controle AIN-93M (3,80 kcal/g) apresentava 76% de carboidratos, 9% de gordura e 15% de proteína; e HF (4,81 kcal/g) com 36% de carboidratos, ± 44% de gordura e 20% de proteína. Os ingredientes dessas dietas podem ser observados na **Tabela 1**. Após 8 semanas, os camundongos foram tratados com óleo de coco, durante 4 semanas. Para isso, o grupo HF foi redistribuído em quatro grupos, sendo três tratados com (iii) dose baixa (DBOC) (1000mg/kg), (iv) média (DMOC) (3000mg/kg) ou (v) alta (DAOC) (9000mg/kg) de óleo de coco, conforme delineamento experimental (**Figura 4**).

**Tabela 1:** Ingredientes da dieta AIN-93M e dieta rica em gordura saturada 45% (HF).

Composição	g/Kg	
	Dieta AIN-93M	Dieta HF 45%
<b>Amido de milho</b>	465,69	253,00
<b>Caseína</b>	140,00	241,00
<b>Maltodextrina</b>	155,00	-
<b>Sacarose</b>	100,00	-
<b>Óleo de soja</b>	40,00	60,00
<b>Fibra (celulose microfina)</b>	50,00	60,00
<b>Mistura de minerais</b>	35,00	42,00
<b>Mistura de vitaminas</b>	10,00	12,00
<b>Bitartarato de colina</b>	2,50	2,00
<b>Tetrabutyl-hidroquinona</b>	0,008	0,04
<b>Groselha</b>	-	181,00
<b>Banha</b>	-	145,00

Uma amostra de OCV orgânico do município de Conde, Bahia (Brasil), foi identificada e devidamente armazenada sob refrigeração (4-10°C) e protegida da luz. O perfil de ácidos graxos do OCV foi: 6,01% de ácido caprílico, 6,48% de ácido cáprico, 48,08% de ácido láurico, 17,72% de ácido mirístico, 7,97% de ácido palmítico, 6,94% de ácido esteárico, 0,85% de ácido oleico e 1,16% de ácido linoleico.

Os camundongos foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia (UFMG) sob o ciclo de claro e escuro 12h/12h. Todos os animais receberam a dieta respectiva e água *ad libitum*. Durante todo o período experimental os animais foram pesados uma vez por semana e o consumo da dieta mensurado duas vezes por semana. Na décima primeira semana os animais foram submetidos ao teste de tolerância oral a glicose (TTOG). Na décima segunda semana ocorreu a eutanásia por meio de sangria após anestesia geral com uma solução de quetamina (10mg/kg) e xilasina (80mg/kg), sendo que previamente os animais ficaram sobre um período de jejum de 6 horas. Foram coletados o sangue para a obtenção do soro; fêmur e maxila, e os tecidos adiposos, epididimal (TAE), mesentérico (TAM), retroperitoneal (TAR) e inguinal (TAI), que foram pesados. Amostras foram armazenadas em freezer -80°C, porções do TAE foram armazenadas em solução de formol 4% para análises histológicas, e as amostras do fêmur e maxila foram armazenadas em formol 4% para análise de microtomografia computadorizada.



**Figura 4.** Delineamento Experimental.

## **4.2 Avaliações sorológicas**

No soro foram quantificados colesterol total, triglicérides e glicose jejum por kit enzimático (Bioclin, Belo Horizonte, MG). A quantificação de adipocina sérica, por sua vez, foi determinada pelo ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked ImmuneSorbent Assay*) para a leptina, assim como as concentrações do ligante do receptor ativador kappa-B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), segundo as instruções do fabricante (R&D System, Inc., Minneapolis, USA).

## **4.3 Microtomografia computadorizada (Micro-Ct)**

As amostras de fêmur e maxila fixadas em formalina tamponada (4%) foram escaneadas utilizando um Micro-CT, alinhadas com o eixo vertical do scanner (Microtomografia Skyscan 1172 X-Ray; Skyscan, Aartselaar, Bélgica). A calibração foi realizada com phantoms de hidroxiapatita de cálcio de densidade conhecida específicas para camundongos.

Para o alinhamento do fêmur e da maxila foi utilizado o software Datawiew (Bruker, Kontich, Belgium) e para as análises morfológicas do osso trabecular e cortical o programa utilizado foi o software CTAnalyzer (Bruker, Kontich, Belgium). As maxilas foram alinhadas seguindo a linha média do palato, observando o plano oclusal, de forma que o último molar fosse visto. Para as análises foram padronizados como área de interesse a área da furca, que compreende a área entre as três raízes do último molar, a partir de 20 cortes. Para o fêmur, o alinhamento foi realizado de forma longitudinal, na região proximal do fêmur, sendo considerados 150 cortes a partir do disco epifisário. O tecido foi analisado para determinar a densidade mineral óssea (BMD), percentual volume ósseo / volume de tecido (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), separação trabecular (Tb.Sp) e índice de modelo de estrutura (SMI). Também foi analisada a região cortical, em que foi avaliado o volume ósseo / volume do tecido (BV/TV) e a espessura transversal (Ct.Th), sendo considerados 280 cortes abaixo do disco epifisário e depois mais 100 cortes.

#### **4.4 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)**

O TTOG foi realizado na décima primeira semana. Para tal, os animais foram submetidos ao jejum de 6 horas e receberam, por gavagem, D-glicose na dose de 0,2g/100g de peso corporal.

A concentração de glicose foi mensurada nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após gavagem. O sangue foi obtido por meio de um corte na cauda dos animais e avaliado pelo glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA).

#### **4.5 Análise histológica do tecido adiposo epididimal**

O tecido adiposo epididimal foi fixado em formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por um período de 24 horas. Em seguida, procederam-se etapas de desidratação em série crescente de álcoois (70°, 85°, 90°, 95°, 100°), diafanização com xilol, e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5µm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina, para serem avaliadas por microscopia de luz.

As lâminas foram fotografadas em microscópio com auxílio de câmera Zeiss® (Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemanha) e software Zeiss Zen (Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemanha). Para determinação da área de adipócitos foi utilizado o programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) no qual foram determinadas a área de todos os adipócitos presentes em 5 imagens (100x) para cada animal.

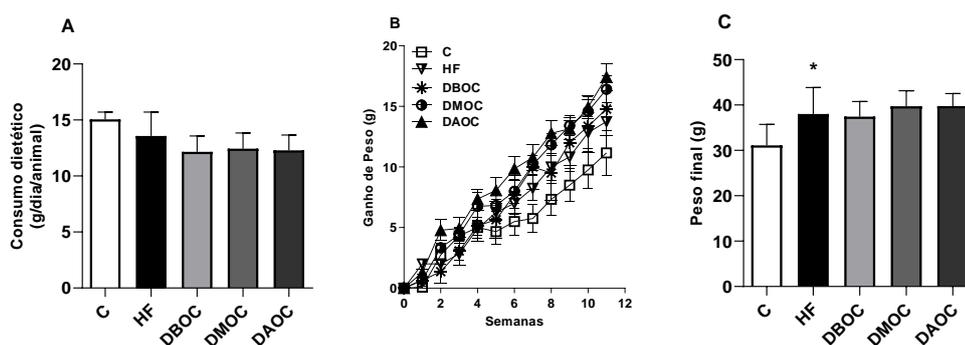
#### **4.6 Análise estatística**

Após ser realizado o teste de normalidade, Kolmogorof-Smirnoff e verificado que as amostras apresentam distribuição Gaussiana, as comparações estatísticas entre os vários grupos foram realizadas por one-way ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (5 grupos) ou Dunnett (3 grupos). Para o ganho de peso e TTOG foi utilizado two-way ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. O nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ . Para a realização de todas as análises foi utilizado o software GraphPad PRISM, (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Consumo alimentar e ganho de peso

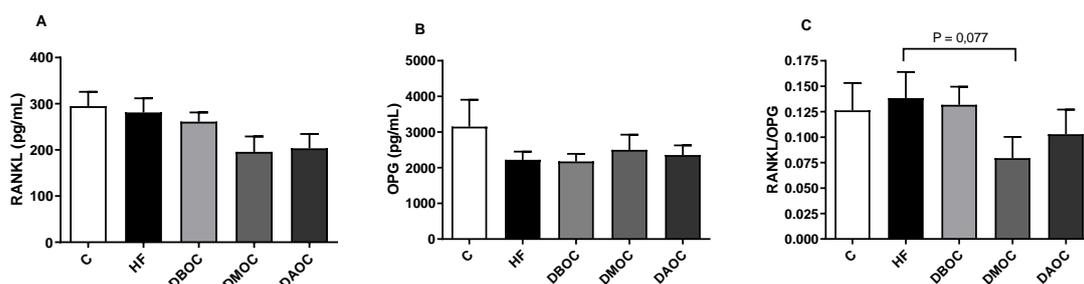
O consumo dietético durante o período avaliado não alterou entre os grupos (Figura 5A). Apesar do ganho de peso ao longo do período experimental não demonstrar diferenças significativas entre os grupos (Figura 5B), o peso final do grupo que recebeu a dieta HF foi maior quando comparado com o grupo controle, mas sem diferença para aqueles tratados com as DBOC, DMOC e DAOC em relação ao grupo HF (Figura 5C).



**Figura 5. Consumo alimentar e evolução do ganho de peso.** (A) Consumo dietético, (B) ganho de peso e (C) peso final de camundongos alimentados com dieta controle ou dieta rica em gordura (HF) por 12 semanas e tratados com doses baixa (DBOC), média (DMOC) e alta (DAOC) de óleo de coco nas últimas 4 semanas. As barras representam os valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n=7-8$ ). \*diferença estatística HF vs. Controle, one-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls,  $P<0,05$ .

## 5.2 Regulação do remodelamento ósseo por RANKL e OPG

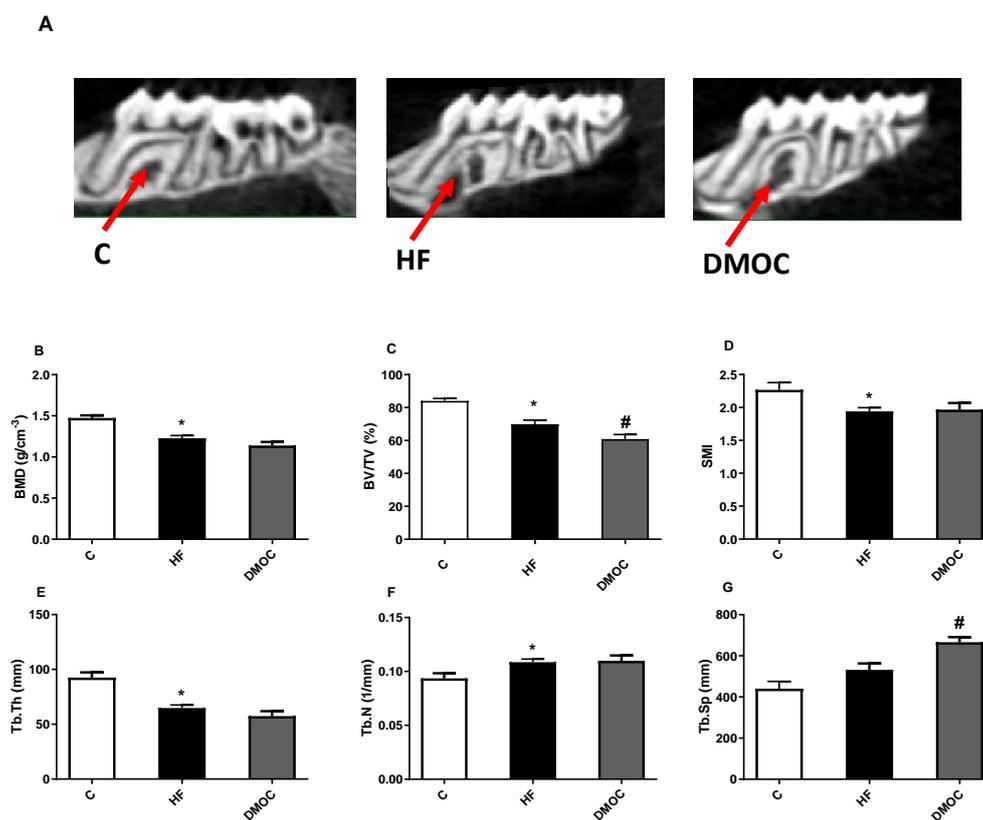
Para os marcadores de remodelamento ósseo, não houve alteração significativa nas concentrações de RANKL e OPG entre os grupos (Figura 6A e 6B). Porém, ao analisar a relação do RANKL / OPG, apesar de não ser observada diferença entre o grupo controle e o HF, pode-se observar que a DMOC apresentou maior potencial para inibir a desmineralização óssea ( $P = 0,077$ ), ao ser comparada com os animais alimentados com dieta HF não tratados (Figura 6C). Por esse motivo, o grupo que recebeu a dose média foi definido para serem feitas as avaliações ósseas por micro-Ct.



**Figura 6. Análises de remodelamento ósseo.** Avaliação sorológica de (A) RANKL, (B) OPG e (C) relação RANKL/OPG de camundongos alimentados com dieta controle ou rica em gordura (HF) por 12 semanas, e alimentados com dieta HF tratados com dose baixa (DBOC), média (DMOC) e alta (DAOC) de óleo de coco nas últimas 4 semanas. As barras representam valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n=7-8$ ). One-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls,  $P<0,05$ .

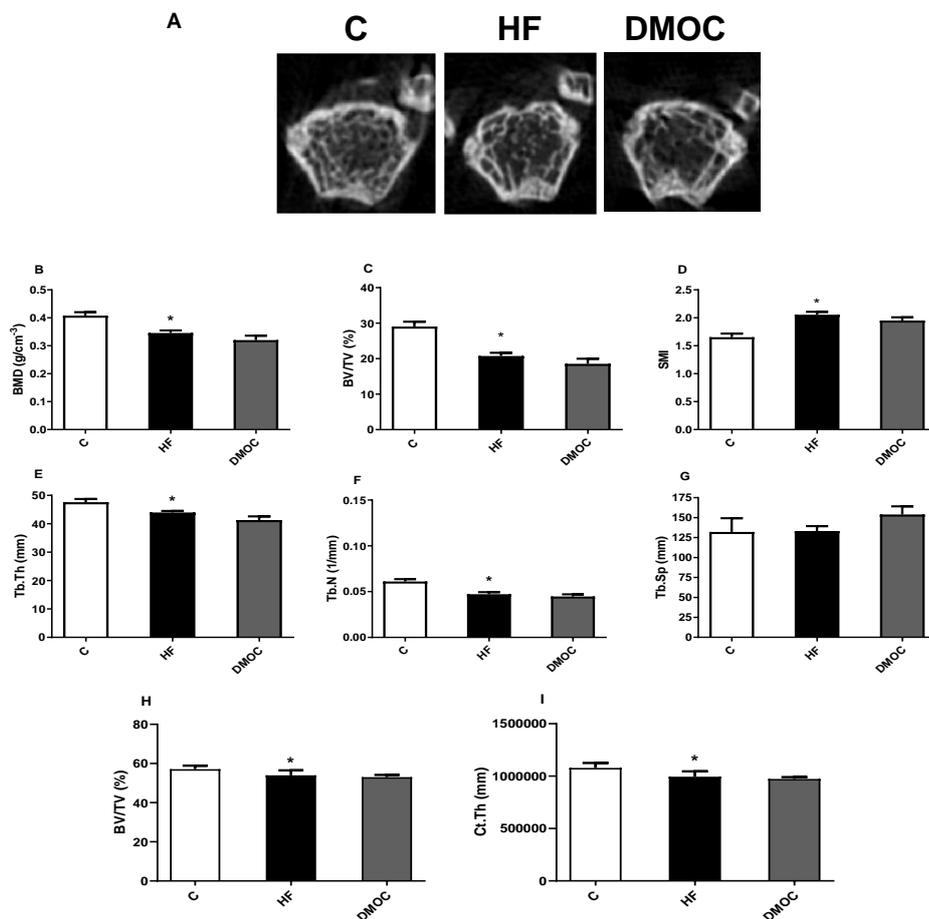
### 5.3 Microtomografia computadorizada (Micro-Ct)

Nas imagens tridimensionais da maxila é possível observar que o grupo que recebeu dieta HF apresentou maior perda óssea quando comparado com o grupo controle. O grupo tratado com a DMOC não reverteu a perda óssea induzida pela dieta HF (Figura 7A). Para os dados quantitativos, o grupo HF apresentou redução na BMD (Figura 7B), no BV/TV (Figura 7C), no SMI (FIGURA 7D e na Tb.Th (FIGURA 7E). Por outro lado, ocorreu aumento do número Tb.N (FIGURA 7F) e da Tb.Sp (FIGURA 7G). Porém, o tratamento com DMOC não modificou o perfil de alterações e ainda mostrou-se pior por ter diminuído a BV/TV (FIGURA 7C) e aumentado a Tb.Sp (FIGURA 7G).



**Figura 7. Análise de microtomografia computadorizada da maxila.** (A) Imagens representativas da maxila e análise da (B) densidade mineral óssea (BMD), (C) percentual volume ósseo/volume do tecido (BV/TV), (D) índice de modelo da estrutura (SMI), (E) espessura de trabéculas (Tb.Th), (F) número de trabéculas (Tb.N) e (G) separação entre as trabéculas (Tb.Sp) de camundongos alimentados com dieta controle ou dieta rica em gordura (HF) por 12 semanas e tratados com dose média (DMOC) de óleo de coco nas últimas 4 semanas. As barras representam valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=7-8). Diferença estatística representada por \*HF vs. Controle e #HF vs. DMOC, one-way ANOVA, pós teste Dunnett,  $P < 0,05$ .

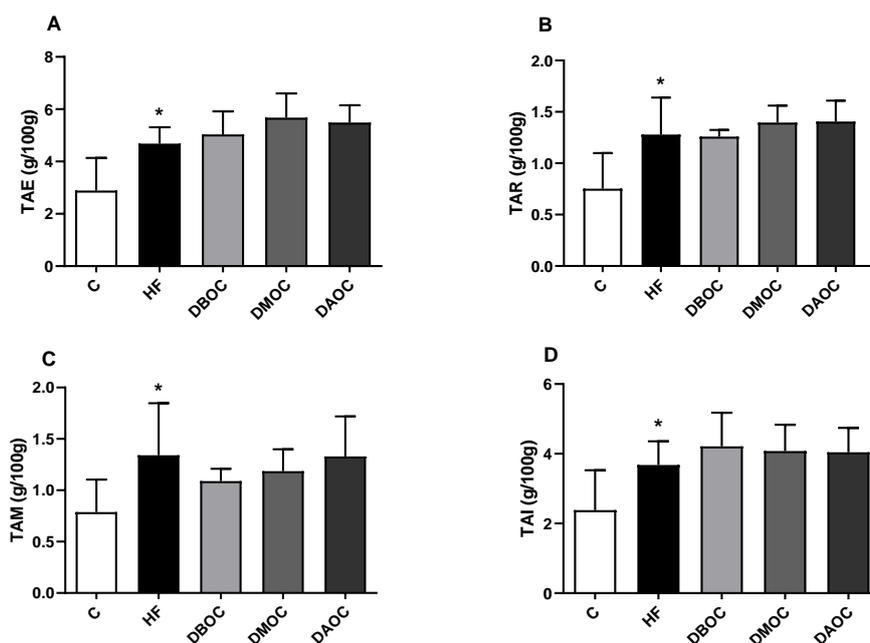
As imagens representativas do fêmur demonstra um menor número de trabéculas nos camundongos alimentados com dieta HF, não sendo alterado após o tratamento com o óleo de coco (Figura 8A). Os animais alimentados com dieta HF apresentaram menor BMD (Figura 8B), BV/TV (Figura 8C), Tb.Th (Figura 8D), e Tb.N (Figura 8E), e um aumento do SMI (Figura 8D) quando comparado com o grupo controle. Contudo, os animais tratados com a DMOC não demonstraram diferença em relação ao grupo HF em nenhuma das análises realizadas (Figura 8 A-F). Não houve diferença no parâmetro Th.Sp entre os grupos avaliados (Figura 8G). Na região cortical do fêmur foram encontrados menor BV/TV e Ct.Th e quando tratados com a DMOC, não foi observado melhora desses parâmetros (Figura 8H-I).



**Figura 8. Análise de microtomografia computadorizada do fêmur.** (A) Imagens representativas do fêmur e análise da (B) densidade mineral óssea (BMD), (C) percentual volume ósseo/volume do tecido (BV/TV), (D) índice de modelo da estrutura (SMI), (E) espessura de trabéculas (Tb.Th), (F) número de trabéculas (Tb.N), e (G) separação entre as trabéculas (Tb.Sp). Na região cortical, (H) percentual volume ósseo/volume do tecido (BV/TV) e (I) espessura transversal. Camundongos alimentados com dieta controle ou dieta rica em gordura (HF) por 12 semanas e tratados com dose média (DMOC) do óleo de coco nas últimas 4 semanas. As barras representam valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=7-8). Diferença estatística representada por \*HF vs. Controle, one-way ANOVA, pós teste Dunnett,  $P < 0,05$ .

## 5.4 Análise da adiposidade

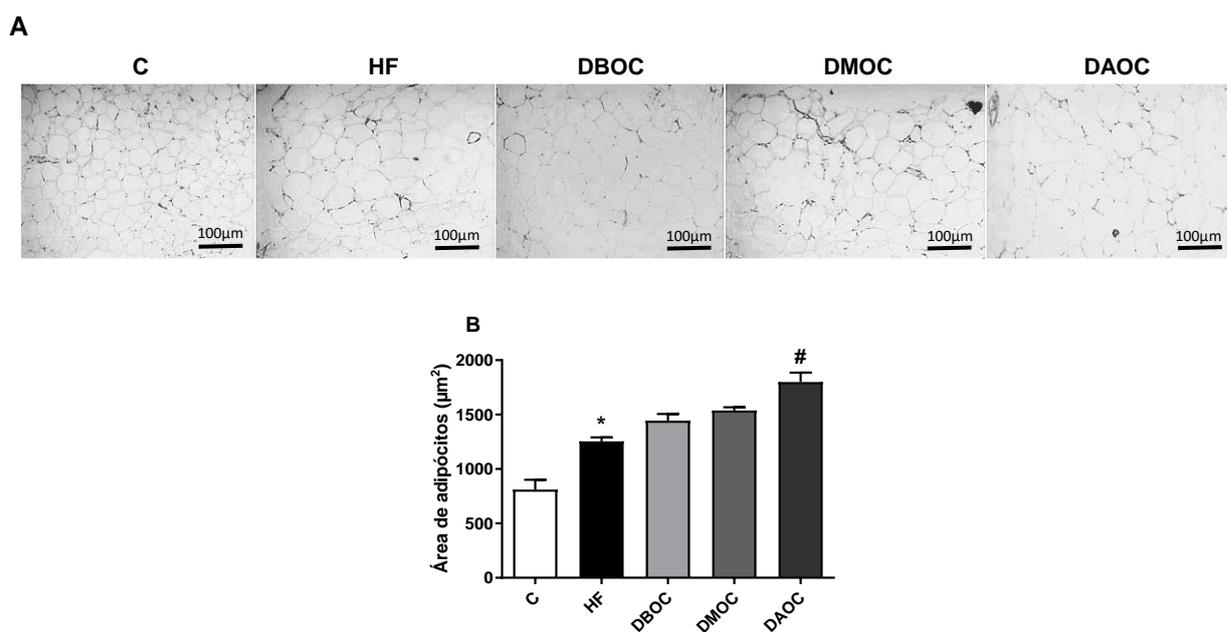
O animais alimentados com dieta HF apresentaram aumento de adiposidade em relação ao grupo controle, representado pelo aumento do peso dos tecidos adiposos epididimal (Figura 9A), retroperitoneal (Figura 9B), mesentérico (Figura 9C) e inguinal (Figura 9D). Não foi observada diferença na massa desses tecidos adiposos nos grupos tratados com as doses de OCV em relação aos animais alimentados somente com dieta HF (Figura 9A-D).



**Figura 9. Análise da adiposidade.** Peso dos tecidos adiposos (A) epididimal (TAE), (B) retroperitoneal (TAR), (C) mesentérico (TAM) e (D) inguinal (TAI) de camundongos alimentados com dieta controle ou dieta rica em gordura (HF) por 12 semanas e tratados com dose baixa (DBOC), média (DMOC) e alta (DAOC) de óleo de coco nas últimas 4 semanas. As barras representam os valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=7-8). \*diferença estatística HF vs. Controle, one-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls,  $P < 0,05$ .

## 5.5 Área de adipócitos

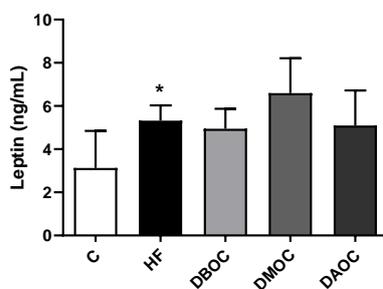
Foi observado aumento da área de adipócitos nos animais do grupo HF em relação ao grupo controle, indicativo de hipertrofia, no tecido adiposo epididimal (Figura 10A). Apesar das doses baixa e média não apresentarem diferença na área de adipócitos em relação ao grupo HF, o tratamento com dose alta demonstrou maior hipertrofia dos adipócitos em relação aos camundongos alimentados com dieta HF não tratado (Figura 10B).



**Figura 10. Análise da área de adipócitos do tecido adiposo epididimal.** (A) Fotos representativas da morfologia do tecido adiposo epididimal e (B) área de adipócitos nesse tecido de camundongos alimentados com dieta controle ou dieta rica em gordura (HF) por 12 semanas e tratados com doses baixa (DBOC), média (DMOC) e alta (DAOC) de óleo de coco nas últimas 4 semanas. As barras representam os valores médios  $\pm$  erro padrão da média (N=7-8). \*diferença estatística HF vs. controle ou #HF vs. DAOC, one-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls,  $P < 0,05$ .

## 5.6 Leptina

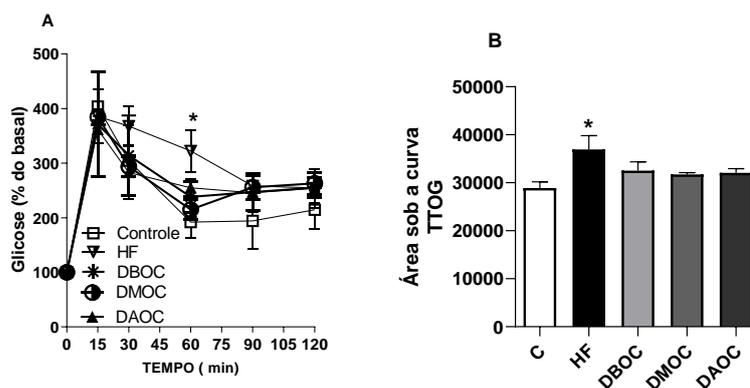
A concentração da leptina é descrita por estar diretamente associada com a quantidade de massa adiposa. O grupo HF apresentou aumento nas concentrações séricas de leptina quando comparado com o grupo controle. Contudo, os animais tratados com diferentes doses de OCV não mostraram diferença significativa em relação ao grupo HF (Figura 11).



**Figura 11. Concentrações séricas de leptina.** Dosagem sorológica de leptina de camundongos alimentados com dieta controle ou dieta rica em gordura (HF) por 12 semanas e tratados com doses baixa (DBOC), média (DMOC) e alta (DAOC) de óleo de coco nas últimas 4 semanas. As barras representam valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n= 7-8). Diferença estatística representada por \*HF vs. Controle, one-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls,  $P < 0,05$ .

## 5.7 Teste oral de tolerância à glicose (TTOG) e sua área sob a curva

No TTOG, o grupo HF apresentou intolerância a glicose em relação ao grupo controle, porém não foram observadas diferenças entre o grupo HF e os tratados com OCV (Figura 12A). Esse mesmo resultado pode ser evidenciado pelo gráfico da área sob a curva em o grupo HF apresentou aumento em relação ao grupo controle, mas sem diferença nos grupos tratados com as diferentes doses de OCV quando comparados com o grupo HF (Figura12B).

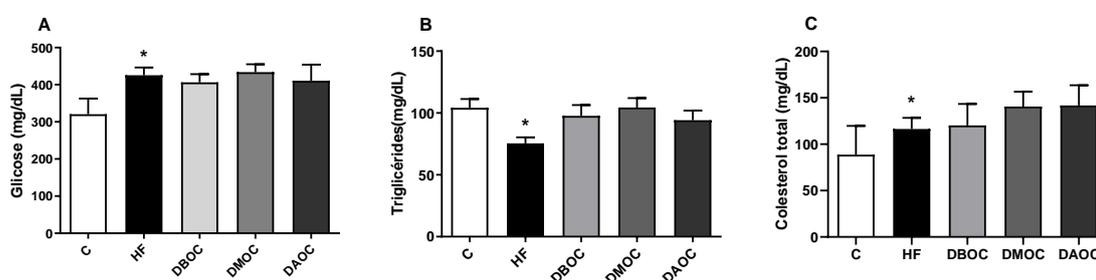


**Figura 12.** (A) Teste de tolerância oral a glicose e (B) sua área sob a curva de camundongos alimentados com dieta controle ou dieta rica em gordura (HF) por 12 semanas e tratados com doses baixa (DBOC), média (DMOC) e alta (DAOC) de óleo de coco nas últimas 4 semanas. As barras representam os valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n=7-8$ ). \*diferença estatística HF vs. Controle, two-way ANOVA, pós teste Bonferroni para o TTOG, e one-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls para a área sob a curva,  $P<0,05$ .

## 5.8 Avaliações sorológicas

Para avaliar possíveis alterações metabólicas sistêmicas decorrentes do consumo de dieta HF e dos tratamentos com OCV, alguns metabólitos foram avaliados no soro dos animais. Os camundongos alimentados com dieta HF não tratados apresentaram hiperglicemia de jejum em comparação ao grupo controle, e não foram observadas diferenças significativas nos grupos tratados com as doses graduais de OCV em comparação ao grupo HF (Figura 13A).

Em relação ao perfil lipídico, os camundongos alimentados com dieta HF sem tratamento apresentaram menor valor de triglicérides (Figura 13B) e um aumento do colesterol total (Figura 13C) em comparação ao grupo controle. Os animais tratados com as doses de OCV não exibiram alterações significativas nas concentrações de triglicérides (Figura 13B) e de colesterol total (Figura 13C) comparados ao grupo HF não tratado.



**Figura 13.** Dosagens sorológicas de (A) glicose, (B) triglicérides e (C) colesterol total de camundongos alimentados com dieta controle ou dieta rica em gordura (HF) por 12 semanas e tratados com doses baixa (DBOC), média (DMOC) e alta (DAOC) de óleo de coco nas últimas 4 semanas. As barras representam valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n=7-8$ ). Diferença estatística representada por \*HF vs. Controle, one-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls,  $P<0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

A perda óssea pode ser decorrente de diferentes etiologias, dentre elas a obesidade. Estudos com humanos obesos e animais pós indução de obesidade por dietas, demonstraram que o desenvolvimento dessa doença contribui para maior risco de perda óssea (CAO et al., 2009; CAO et al., 2010; LAU et al., 2010; CAO J. J. 2011; HEIJDEN et al., 2015; MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2017; MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2018; TENCEROVA et al., 2018; ZICKER et al., 2018; MCCABE et al., 2019). A investigação de tratamentos alternativos, principalmente provindos de alimentos, se torna interessante a fim de tentar reverter alterações na perda óssea e da obesidade. Nesse estudo foi avaliado o efeito do tratamento dietético com OCV na obesidade induzida por dieta HF em camundongos. Conforme esperado, ocorreu uma expansão do tecido adiposo associada a alterações metabólicas, como intolerância a glicose, dislipidemia e hiperglicemia nos animais alimentados com dieta HF. Como consequência, nesses animais obesos ocorreu prejuízo no tecido ósseo do fêmur e maxila, com perda de volume e densidade mineral óssea. O tratamento com a DMOC não reverteu a depleção óssea. Além disso, foi observado no grupo tratado com DMOC uma piora nos parâmetros ósseos da maxila porém no fêmur as alterações foram iguais ao HF, sem melhora quando tratado.

O consumo de dieta HF por animais de forma crônica é considerado como um modelo clássico de obesidade na literatura (FUJITA et al., 2016). No geral, o consumo dietético não demonstrou diferença significativa no grupo HF em relação ao grupo controle, mas apresentou maior peso final com consequente aumento de adiposidade, conforme evidenciado em estudos na literatura (CAO et al., 2011; HEIJDEN et al., 2017; DIAS et al., 2018; PORET et al., 2018). Além disso, esse modelo foi eficaz para indução da perda óssea, como já descrito em outros estudos de obesidade induzida por dieta (LAU et al., 2010; DONG et al., 2016; CAO et al., 2017; MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2018). A perda óssea pode ser evidenciada pela análises de duas moléculas importantes na regulação celular do remodelamento ósseo, o RANKL e a OPG, também através da microarquitetura óssea, realizada pela micro-Ct. Os animais alimentados com dieta HF não apresentaram alteração nas concentrações séricas de RANKL, um importante ativador de osteoclastos, nem de OPG, seu antagonista, comparado ao grupo controle, o que contribuiu para a não alteração significativa da relação RANKL/OPG. Da mesma forma, estudo de CAO et al. (2010) não demonstrou

alteração desses parâmetros sistêmicos em animais alimentados com dieta HF, mas ainda sim observou perda óssea significativa ao ser analisada a microarquitetura do fêmur. Neste estudo, o grupo tratado com a DMOC não apresentou diferença significativa, porém foi observada uma propensão para menor relação RANKL/OPG, nos servindo de escolha para a análise por micro-Ct, pois parece ser a dose com maior potencial de influenciar a alteração da microarquitetura óssea. A menor relação RANKL/OPG, é indicativo de redução no processo de reabsorção óssea, com consequente melhora na homeostase do remodelamento (BONET et al., 2019), sendo que, em modelos de obesidade induzida por dieta há um aumento na relação RANKL/OPG (IYER et al., 2017 WANG et al., 2018; MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2018). Contudo, é demonstrado que quando esses animais são tratados, ocorre melhoria dessa relação, podendo ser observada menor desmineralização (JING et al., 2013). Assim, um tratamento que reverta essa relação, RANKL/OPG pode ser importante, visto que estaria auxiliando na melhoria de doenças ósseas.

Como já mencionado a perda óssea é um quadro frequente na obesidade, e atinge mulheres e homens em diferentes faixas etárias (LEEUWEN et al., 2017; SCOOTE et al., 2017; PREMAOR et al., 2020). A análise da microarquitetura óssea reflete a sua estrutura em relação a densidade e morfologia (BOUXSEIN et al., 2010). A perda óssea é melhor identificada no osso alveolar entre as raízes alveolares da maxila, e no fêmur a área de maior impacto da perda óssea é a área da metáfise para análise trabecular e diáfise para análise cortical (POOLE et al., 2015; LOMBARDI et al., 2018). No presente estudo, o grupo HF, como esperado, apresentou perda óssea, a partir dos parâmetros ósseos trabeculares e corticais avaliados, confirmando que a dieta experimental ocasionou piora na morfologia óssea tanto do fêmur quanto maxila. Observado também em outros modelos experimentais de obesidade induzida por dieta HC ou HF, apresentaram redução da BMD, do BV/TV, do Tb.N, e aumento da Tb.Sp, características de perda óssea (CAO et al., 2017; MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2018). Contudo, a maxila do grupo tratado com DMOC apresentou uma piora nos parâmetros ósseos para BV/TV e aumento da Tb.Sp quando comparados ao grupo HF, mas no fêmur não foram encontradas diferenças significativas entre esses grupos. De outra forma, estudo realizado com ratos fêmeas ovariectomizados quando tratados com o OCV durante 6 semanas melhorou a perda óssea, sendo este efeito sugerido devido a sua propriedade antioxidante

(HAYATULLINA et al., 2012). Portanto, a partir dessa e outras evidências na literatura sobre os benefícios do OCV, esperávamos uma melhora na perda óssea. Então, nós hipotetizamos que alguns fatores poderiam ter contribuído para esse desfecho, como a dieta utilizada no delineamento experimental, uma vez que a composição da mesma é rica em gordura, as doses de óleo de coco não foram suficientes pois, a não ocorreu a melhora dos parâmetros relacionados ao desenvolvimento da obesidade, e a influencia da dieta HF em alterar a microbiota intestinal.

A gordura saturada é capaz de promover, de forma mais pronunciada a obesidade por contribuir com maior deposição de gordura e dislipidemia. Neste trabalho, foi utilizada a banha de porco, que apesar de conter majoritariamente ácidos graxos monoinsaturados, possui uma quantidade expressiva dos saturados (WHITE et al., 2013). Em contraste, o OCV é composto principalmente pelo ácido láurico, um AGCM saturado, mas que ainda sim, em conjunto com seus outros componentes, tem benefícios na modulação do sistema imunológico (EYRES et al., 2016), no controle glicêmico (DJURASEVIC et al., 2018) e tem potencial antioxidante (NEVIN K.G.; RAJAMOHAN T. R., 2006). O efeito benéfico do AGCM pode ser evidenciado em um estudo com camundongos alimentados com uma dieta HF ou enriquecida com AGCM, o qual mostrou que os camundongos que receberam dieta com AGCM apresentaram aumento da taxa metabólica e termogênese da dieta, resultando em menor peso corporal quando comparado com o grupo que recebeu dieta HF (BABA et al., 1982). Esses dados indicam que apesar dos ácidos graxos presentes na banha de porco ocasionar aumento da adiposidade (SUN et al., 2011) relacionada com a perda óssea (CAO et al., 2017), o potencial do ácido graxo presente no OCV poderia ter um outro resultado como, a diminuição da adiposidade, sendo que esse resultado pode ser observado em camundongos alimentados com dieta HC. Estudo anterior de nosso grupo de pesquisa realizou o mesmo protocolo experimental, assim como utilizou as mesmas concentrações das doses de OCV do presente estudo, mas com dieta HC e apresentou melhorias significativas dos parâmetros relacionados a obesidade (ZICKER et al., 2018). Além disso, ao avaliar a influência do OCV na perda óssea induzida por essa dieta, o seu uso foi associado a uma melhora significativa em todos os parâmetros ósseos avaliados (dados não publicados). Acredita-se que isso se deva por três motivos (i) as doses suplementadas de OCV podem não ter sido eficientes, por ter algum prejuízo em sua digestão, absorção ou metabolização ocasionado pela

dieta HF, ou (ii) por ser necessária uma concentração maior para tratar a obesidade desses camundongos que receberam a dieta HF, e obter o mesmo efeito observado anteriormente com dieta HC (ZICKER et al., 2018) ou (iii) o óleo de coco pode ser maléfico quando associado a dieta HF. Portanto, mais estudos nessa direção ainda são necessários, pois o perfil de consumo de dietas de pacientes obesos é variável, e pelo que parece, poderia influenciar na resposta ao tratamento com OCV.

A obesidade é evidenciada pela análise da adiposidade em tecidos viscerais e subcutâneos (ASSUNÇÃO et al., 2009). Nesse estudo pôde ser observado no grupo HF aumento de adiposidade quando comparado com o grupo controle, porém sem melhora quando tratados com as diferentes doses de OCV. Esse mesmo perfil de resultado pode ser evidenciado na literatura em camundongos alimentados também com dieta HF (HEIJDEN et al., 2015), contudo, quando os camundongos que receberam a dieta HF foram tratamento com OCV ocorreu uma piora na adiposidade (STRÖHER et al., 2019). Em contrapartida, camundongos alimentados com dieta HC tratados com OCV apresentaram melhora significativa na adiposidade com redução da hipertrofia de adipócitos (ZICKER et al., 2018). O consumo da dieta HF, ocasionou hipertrofia dos adipócitos do tecido adiposo epididimal, e quando tratados com a dose baixa e média do OCV não apresentaram diferença significativa, porém, o tratamento com a dose alta aumentou a hipertrofia dos adipócitos, assim este dado junto com a piora de BV/TV e Tb.Sp da maxila, pode-se observar que óleo de coco associado a dieta HF são maléficos ao osso. Além disso, o tecido adiposo por ser metabolicamente ativo, secreta adipocinas, que são citocinas que exercem funções autócrinas ou endócrinas (RENDINA-RUEDY e ROSEN, 2017). Dentre elas podemos destacar a leptina, a qual seu aumento presente em modelos de obesidade induzida por dieta (CAO et al., 2017; PORET et al., 2018), está associado a maior ativação da adipogênese, e como consequência há menor osteoblastogênese em animais (YUE et al., 2016). Nesse estudo, o grupo HF apresentou aumento das concentrações de leptina em relação ao controle, sem alteração com as diferentes doses de OCV, indicando um potencial para contribuir com a perda óssea, o que pode ser confirmado por meio dos parâmetros ósseos analisados pelo micro-Ct. De forma similar, o mesmo resultado foi evidenciado em ratos com dieta HF e tratados com o OCV, onde apresentaram um aumento da produção de leptina (STRÖHER et al., 2019). Além disso, a obesidade é uma doença cuja síntese de mediadores inflamatórios está

aumentada (MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2018; ENGIN, 2017). Essas citocinas pró-inflamatórias induzem atividade de osteoclastos por meio da maior diferenciação de pré-osteoclastos em células maduras via RANKL (FENG et al., 2017). Assim, a depleção óssea confirmada pela avaliação da microarquitetura do fêmur e maxila em animais obesos pode ser decorrente da inflamação no presente estudo, apesar de não verificada. Como o OCV não contribuiu para efeitos benéficos na obesidade e osso, acredita-se que não houve redução da inflamação que se encontra presente nesse modelo (MONTALVANY-ANTONUCCI et al., 2018). Então, ainda é interessante realizar uma avaliação do efeito da inflamação nesse estudo para determinar a sua relação existente entre obesidade e perda óssea.

A expansão da massa adiposa leva a uma alteração do metabolismo de glicose que pode ser evidenciado pelo TTOG e hiperglicemia no grupo HF. Esse mesmo resultado pode ser evidenciado em estudo com camundongos alimentados com dieta HF que apresentaram insensibilidade a insulina, hiperglicemia, além de maior acúmulo de gordura no fígado (AVTANSKI et al., 2019). Porém, nos grupos tratados não apresentaram nem melhora e nem piora do quadro clínico. Em um estudo com camundongos que receberam dieta HC e tratados com o OCV, os grupos que receberam o tratamento apresentaram melhora do perfil metabólico alterado (ZICKER et al., 2018). Outro estudo desenvolvido com mulheres obesas suplementadas com OCV no café da manhã, ou seja, de forma aguda, não foram observadas alterações metabólicas deletérias, somente supressão do apetite (VALENTE et al., 2018). Então, por esses e outros dados, acredita-se que o OCV seja benéfico para a obesidade e complicações associadas, pois parece ser menos propenso a promover resistência à insulina, inflamação e armazenamento de gordura (DINICOLANTONIO J. J.; O'KEEFE J.H. 2017). Em contraste em um estudo com ratos que receberam dieta HF e tratados com o OCV, o grupo que recebeu a dose de OCV, apresentou aumento da glicose, triglicerídeos e colesterol total, quando comparados com o grupo HF (STRÖHER et al., 2019). Ainda se encontra contraditório na literatura uma associação entre síndrome metabólica e osteoporose, pois diferentes fatores, como sexo, idade, raça, hábitos alimentares, podem influenciar os resultados dos estudos. Contudo, é sugerido que a síndrome metabólica deva ser algo a se considerar de tratar para prevenção da osteoporose (WONG et al., 2016). Sugerimos que as alterações

metabólicas, ainda presente nos animais tratados com OCV, podem ter contribuído com o impedimento da melhoria de sua perda óssea.

A dieta HF influencia também a permeabilidade intestinal (KIM et al., 2012), gerando um aumento das bactérias inflamatórias (GHOSH et al., 2013), o que contribui com alterações metabólicas, bem como a inflamação no tecido adiposo (LECOMTE et al., 2015). Assim, a alteração da microbiota intestinal é considerada um fator para o desenvolvimento da obesidade. Na literatura, camundongos alimentados com dieta HF, a base de banha de porco, desenvolveram inflamação no tecido adiposo relacionada à obesidade, enquanto aqueles animais alimentados com óleo de peixe não apresentaram doença metabólica e aumento da inflamação, sendo atribuída essas diferenças a composição da microbiota. Além disso, os camundongos alimentados com dieta HF demonstraram aumento da permeabilidade intestinal, o que resultou em concentrações mais elevadas de endotoxinas no intestino e no plasma, exacerbando assim a obesidade (CAESAR et al., 2015). Outro estudo que avaliou o efeito de dieta rica em óleo de coco em contraste com óleo de soja observou-se o mesmo ganho de peso em ambas as dietas. Porém, em relação a composição da microbiota intestinal, o grupo que recebeu o óleo de coco apresentou aumento de bactérias benéficas e uma diminuição das prejudiciais, e o inverso ocorreu no grupo que recebeu o óleo de soja (PATRONE et al., 2018). Por outro lado, RODRÍGUEZ-GARCÍA et al. (2020) avaliaram o impacto da suplementação do óleo de coco, de soja ou do azeite extravirgem em camundongos alimentados com dieta HF. Foi observado que os grupos que receberam a dieta enriquecida com o óleo de coco ou óleo de soja apresentaram aumento de bactérias inflamatórias no intestino, e somente o grupo que recebeu o azeite extravirgem apresentou um microambiente anti-inflamatório (RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2020). Esses dados demonstram como a microbiota intestinal de animais alimentados com dieta HF pode ser influenciada para um perfil mais deletério do que o consumo de óleo de coco por si, mesmo que ambas as dietas sejam provindas de gordura saturada, sendo, então, essa predominância da dieta HF, um dos possíveis motivos para que o efeito do tratamento com o OCV não fosse tão eficaz nesses animais.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que uma dieta HF promoveu expansão do tecido adiposo associada a uma perda óssea na maxila e no fêmur. Porém, esses animais não demonstraram reversão nessas alterações, e ainda na maxila houve piora da perda óssea quando tratados com a DMOC. Dessa forma, a suplementação dietética com OCV em camundongos alimentados com a dieta HF parece não ser benéfico para tratar a perda óssea e a obesidade. Sugere-se que o consumo de dieta HF possa implicar na perda de efetividade do OCV antes observada em animais também obesos alimentados com dieta HC. Assim, uma avaliação mais detalhada sobre efeito do tratamento com OCV na perda óssea deve ser realizada, tendo em vista os dados ainda iniciais na literatura sobre o seu efeito.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJAZIA, M. et al. The effects of virgin coconut oil on bone oxidative status in ovariectomised rat. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, p.1-6, jul. 2012.

ALMEIDA, M. et al. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, v. 97, n. 1, p. 135-187, jan 2017.

ASSUNÇÃO, M. et al. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. *Lipids*, v. 44, p. 593-601, may 2009.

AVTANSKI, D. et al. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Animal Model Experimental Medicine*, v. 25, p. 252-258, 2019.

BABA, N.; BRACCO, E.F.; HASHIM, S.A. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium chain triglyceride. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 35, p. 678-682, apr. 1982.

BARAZZONI, R. et al. Sarcopenic obesity: Time to meet the challenge. *Clinical Nutrition*, v. 37, p. 1787-1793, dec. 2018.

BAUM, R., GRAVALLESE, E. M. Impact of Inflammation on the Osteoblast in Rheumatic Diseases. *Current Osteoporosis Reports*, v. 12,p. 9-16, mar. 2014.

BRASIL. Brasileiros atingem maior índice de obesidade nos últimos treze anos. [www.saude.gov.br](http://saude.gov.br), 2019. Disponível em: <<http://saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45612-brasileiros-atingem-maior-indice-de-obesidade-nos-ultimos-treze-anos>>. Acesso em: 21 de setembro de 2020.

BOUXSEIN, M. L. et al., Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal Bone and Mineral Research**, v. 25, p. 1468-1486, jul. 2010.

BURGOS-FLÓREZ, F. J.; GAVILÁN-ALFONSO, M. E.; GARZÓN-ALVARADO, D. A. Flat bones and sutures formation in the human cranial vault during prenatal development and infancy: A computational model. **Journal of theoretical biology**, v. 21, n. 393, p. 127-144, mar. 2016.

CAESAR, R. et al., Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. **Cell Metabolism**, v. 22, p. 658–668, oct. 2015.

CAO J.; GREGOIRE B.; GAO H. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. **Bone**, v. 44, p.1097-1104, mar. 2009.

CAO, J. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v.6, p. 1-6, 2011.

CAO J.; WRONSKI T.; IWANIEC U. et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, p. 1659-1668, may 2005.

CAO J.; SUN L.; GAO H. Diet-induced obesity alters bone remodeling leading to decreased femoral trabecular bone mass in mice. **Annls of the New York Academy of Sciences**, p. 292-297, 2010.

CAO, J.; GREGOIRE, B.; SHEN, C. A high-fat diet decreases bone mass in growing mice with systemic chronic inflammation induced by low-dose, slow-release lipopolysaccharide pellets. **Journal of Nutrition**, v. 147, p.1909-1916, jul. 2017.

CHAN E.; ELEVITCH C. Cocos nucifera (coconut). **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**, apr. 2016.

CLARKE, B. L.; SUNDEEP, K. Physiology of Bone Loss. **Radiologic Clinics of north America**, v. 48, n. 3, p. 483-495, may 2010.

COSTA, N.M.; ROSA, C.O.B. Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos. 2º edição. Rio de Janeiro: editora Rubio, 2016.

CUNHA, J. S. et al., Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro. **Cell Tissue Res**, v. 358, p. 249–256, oct. 2014.

CZECH M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature Medicine**, v. 23, p. 8044-814, jul. 2017.

Dia Mundial da Obesidade, disponível em: **[endocrino.org.br/dia-mundial-da-obesidade-2020/](http://endocrino.org.br/dia-mundial-da-obesidade-2020/)**. Acessado em 28 de junho de 2020.

DIAS, M. D. M. et al., Consumption of virgin coconut oil in Wistar rats increases saturated fatty acids in the liver and adipose tissue, as well as adipose tissue inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 472-480, jul. 2018.

DEBMANDAL, M.; MANDAL S. Coconut (Cocos nucifera L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 241-247, mar. 2011.

DINICOLANTONIO, J.J.; O'KEEFE, J.H. Good Fats versus Bad Fats: A Comparison of Fatty Acids in the Promotion of Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity. **Missouri Medicine**, v. 114, p. 303-307, agu. 2017.

DJURASEVIC, S. et al., Beneficial Effect of Virgin Coconut Oil on Alloxan-Induced Diabetes and Microbiota Composition in Rats. ***Plant Foods for Human Nutrition***, v. 73, p. 295-301, aug. 2018.

DONG, X. L. et al., A High-Saturated-Fat, High-Sucrose Diet Aggravates Bone Loss in Ovariectomized Female Rats. ***The Journal of Nutrition***, v. 14, p. 1172-1179, jun. 2016.

EASTELL, R.; SZULC, P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. ***The Lancet Diabetes and Endocrinology***, v. 5, p. 908-923, jul. 2017.

EDWARDS, M. S. et al., Effect of dietary fat and aging on adipose tissue cellularity in mice differing in genetic predisposition to obesity. ***Growth, development and aging***, v. 57, n. 1, p. 45-51, 1993.

ENGIN, A. The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. ***Advances in experimental medicine and biology***, p. 221-245, jun. 2017.

EYRES, L. et al., Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. ***Nutrition Reviews***, v. 74, p. 267-280, apr. 2016.

FARESIN, R. et al., Effects of obesity on bone mass and quality in ovariectomized female Zucker rats. ***Journal of Obesity***, v. 2014, p. 1-7, sep. 2014.

FEHRENDT, H. et al., Negative Influence of a Long-Term High-Fat Diet on Murine Bone Architecture. ***International Journal of Endocrinology***, v. 2014, p.9, sep. 2016.

FELSON, D.T.; ZHANG, Y.; HANNAN M. T. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. ***Journal Bone Mineral Research***, v.8, p. 567-573, may. 1993.

FENG, W. et al. Combination of IL-6 and sIL-6R differentially regulate varying levels of RANKL-induced osteoclastogenesis through NF- $\kappa$ B, ERK and JNK signaling pathways. ***Scientific reports***, v. 27, n. 7, Jan 2017.

FERNANDO, W. et al., The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: Potential mechanisms of action. **British Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1-14, apr. 2015.

FRIGOLET, M.E.; GUITIÉRREZ-AGUILAR, R. The colors of adipose tissue. **Gaceta Médica de México**, v. 156, p. 142-149, jan. 2020.

FUJITA, Y.; MAKI, K. High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice. **BMC Obesity**, v. 3, n. 1, Jan 2016.

GHABEN, A.L.; SCHERER P.E. Adipogenesis and metabolic health. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 242-258, jan. 2019.

GHOSH, S. et al., Fish oil attenuates Omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced Dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS Dephosphorylation activity causing sepsis. **Plos One**, v. 8, p. 1-12, feb. 2013.

GORDEN, P. et al. Biosynthesis and regulation of the insulin receptor. **Yale journal of biology and medicine**, v. 62, n. 5, p. 521-531, Oct 1989.

GUYTON, A.C. e Hall J.E.; **Tratado de Fisiología Médica**. Editora Elsevier. 13<sup>a</sup> ed., 2017.

HALADE, G.V; RAHMANM, M.; FERNANDES, G. High Fat Diet-Induced Animal Model of Age-associated Obesity and Osteoporosis. **The Journal of Nutritional biochemistry**, v. 12, p. 1162-1169, dec. 2010.

HAMRICK, M.W.; PENNINGTON, C.; NEWTON, D. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. **Bone**, v. 34, p. 376-383, mar. 2004.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 270-299, dec. 2010.

HAYATULLINA, Z. et al. Virgin coconut oil supplementation prevents bone loss in osteoporosis rat model. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p; 1-8, aug. 2012.

HEIJDEN, R.A.V.D. et al., High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Aging**, v. 7, p. 256-267, apr. 2015.

HILMA, L. et al. Virgin coconut oil supplementation in diet modulates immunity mediated through survival signaling pathways in rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v.17, p. 1-11, may 2020.

HOROWITZ, M. et al. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v.12, p. 9-18, mar. 2012.

HSU, Y. H. et al. Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 146-154, jan. 2006.

HUI, S. L.; SLEMENDA, C. W.; JOHNSTON, C. The Contribution of Bone Loss to Postmenopausal Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v.1, p.30-34, oct. 1990.

JING, D. et al. Pulsed Electromagnetic Fields Improve Bone Microstructure and Strength in Ovariectomized Rats through a Wnt/Lrp5/ $\beta$ -Catenin Signaling-Associated Mechanism. **Plos One**, v. 8, p. 1-9, nov. 2013.

JOSSE, A. et al. Diets higher in dairy foods and dietary protein support bone health during diet- and exercise-induced weight loss in overweight and obese premenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, p. 251-260, nov. 2012.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANIS, J. A. et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis international**, v. 24, n. 1, p. 23-57, oct. 2012.

KELLER, K. L. et al. Increased sweetened beverage intake is associated with reduced milk and calcium intake in 3- to 7-year-old children at multi-item laboratory lunches. **Journal of the american dietetic association**, v. 109, n. 3, p. 497-501, mar. 2009.

KIERSZENBAUM, Abraham L.. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 4 ed. Rio De Janeiro: Elsevier Science - Contents Direct , 2016.

KIM, K.A. et al., High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. **Plos One**, v. 7, p. 1-11, oct. 2012.

KLOSS, R. et al. Effects of conjugated linoleic acid supplementation on blood lipids and adiposity of rats fed diets rich in saturated versus unsaturated fat. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 503-507, 51, dec. 2005.

KOBAYASHI, Y. et al., Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 19, p. 61-72, 2009.

LAU, B. et al. Influence of high-fat diet from differential dietary sources on bone mineral density, bone strength, and bone fatty acid composition in rats. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 35, p. 598-606, sep. 2010.

LECOMTE, V. et al. Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters. **Plos One**, v. 10, p. 1-22, 2015.

LIAU, K. et al., An Open-Label Pilot Study to Assess the Efficacy and Safety of Virgin Coconut Oil in Reducing Visceral Adiposity. ***International Scholarly Research Network Pharmacology***, v. 2011, p. 1-7, jan. 2011.

LOCKE, M. Structure of long bones in mammals. ***Journal of morphology***, v. 262, n. 2, p. 546-565, sep. 2004.

LOMBARDI, T. et al. Efficacy of Alveolar Ridge Preservation after Maxillary Molar Extraction in Reducing Crestal Bone Resorption and Sinus Pneumatization: A Multicenter Prospective Case-Control Study. ***Biomed research international***, v. 4, Nov 2018.

LÓPEZ- GÓMEZ J.; CASTRILLION J. L. P.; RÓMAN D. A. D. L. Impact of obesity on bone metabolismo. ***Endocrinología y Nutrición***, v. 63, p. 551-559, dec. 2016.

MARINA A.; CHE MAN Y.; AMIN I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. ***Trends in Food Science and Technology***, v. 20, p. 481-487, oct. 2009.

MARINA, A. et al., Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. ***International Journal of Food Sciences and Nutrition***, v. 60, p. 114-123, aug. 2009.

MCARDLE M. et al., Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. ***Frontiers in Endocrinology***, v. 10, p. 1-23, may 2013.

MCCABE, L.R. et al., Exercise prevents high fat diet-induced bone loss, marrow adiposity and dysbiosis in male mice. ***Bone***, v. 118, p – 20-31, oct. 2019.

MONTALVANY-ANTONUCCI, C. et al., High-refined carbohydrate diet promotes detrimental effects on alveolar bone and femur microarchitecture. ***Archives of Oral Biology***, v. 86, p. 101-107, nov. 2017.

MONTALVANY-ANTONUCCI, C. et al., High-fat diet disrupts bone remodeling by inducing local and systemic alterations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 59, p. 93-103, jun. 2018.

MARONE, M.M.S. et al., Influence of body composition on the bone mass of postmenopausal women. **São Paulo Medical Journal**, v.115, p. 1580-1588, 1997.

MOZAFFARIAN, D. et al., Heart disease and stroke statistics-2016 update a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 133, p. 38-48, jun. 2016.

NEVIN K.; RAJAMOHAN T. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. **Food Chemistry**, v. 99; p. 20-266, jun. 2006.

OFTADEH, R. et al. Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review. **Journal of biomechanical engineering**, v. 137, n. 1, jan. 2015.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, v. 21, n. 9, p. 396-406, may 2013.

OLIVEIRA, M.C. et al. Platelet-activating factor modulates fat storage in the liver induced by a high-refined carbohydrate-containing diet. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, p. 978-985, may 2015.

Organização Mundial de Saúde - OMS. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation, Geneva, 3-5 Jun 1997. **Geneva: World Health Organization**, 1998.

PARKS B.W.; NAM E.; ORG E. Genetic Control of Obesity and Gut Microbiota Composition in Response to High-Fat, High-Sucrose Diet in Mice. **Cell Metabolism**, v. 17,p. 1441-152, jan. 2013.

PATRONE, V. et al., Differential effects of coconut versus soy oil on gut microbiota composition and predicted metabolic function in adult mice. ***BMC Genomics***, v. 19, p. 1-17, nov. 2018.

PEEDIKAYIL F.; SREENIVASAN P.; NARAYANAN A. Effect of coconut oil in plaque related gingivitis - A preliminary report. ***Nigerian Medical Journal***, v. 56, p. 143- 147, apr. 2015.

PIRI, F. et al., The Effects of Dietary Supplements of Calcium, Vitamin D and Estrogen Hormone on Serum Levels of OPG and RANKL Cytokines and their Relationship with Increased Bone Density in Rats. ***Journal of Clinical and Diagnostic Research***, v. 10, p.1-4, sep. 2016.

POOLE, K. E. et al. Denosumab rapidly increases cortical bone in key locations of the femur: a 3D bone mapping study in women with osteoporosis. ***Journal of bone and mineral research***, v. 30, n. 1, p. 46-54, Jan 2015.

PORET, J. et al., High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. ***International Journal of Obesiy***, v. 42, p. 535-541, may 2018.

PREMAOR, M. et al., Obesity and fractures in postmenopausal women. ***Journal of Bone and Mineral Research***, v. 25, p.292-297, feb. 2010.

RENDINA-RUEDY, E.; ROSEN, C. J. Bone-Fat Interaction. ***Endocrinology and metabolism clinics of North America***, v. 46, n. 1, p. 41-50, Mar 2017.

RIAL, S. et al., A high-fat diet enriched in medium chain triglycerides triggers hepatic thermogenesis and improves metabolic health in lean and obese mice. ***Biochimica et Biophysica Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids***, v. 1865, p. 1-39, dec. 2020.

ROBLING, A. et al., Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. ***Annu Reviews Full-text Article***, v. 8, p. 455-498, apr. 2006.

RODRÍGUEZZ-GARCÍA, C. et al., The High-Fat Diet Based on Extra-Virgin Olive Oil Causes Dysbiosis Linked to Colorectal Cancer Prevention. **Nutrients**, v. 12, p. 1-17, jun. 2020.

SHAPSES, S. A. et al., Bone Metabolism in Obesity and Weight Loss. **Annual Reviews**, v.32, pp 287-309, aug. 2012.

SHAU L.; BEIER E.; SHEU T. High-Fat Diet Causes Bone Loss in Young Mice by Promoting Osteoclastogenesis Through Alteration of the Bone Marrow Environment. **Calcifield Tissue International**, v. 96, p. 313-323, apr. 2015.

ST-ONGE M.; JONES P. Recent Advances in Nutritional Sciences Physiological Effects of Medium-Chain Triglycerides: Potential Agents in the Prevention of Obesity. **Recent Advances in Nutritional Sciences**, v. 132, p. 329-332, feb. 2002.

ST-ONGE M.P.; BOSARGE A. Weight-loss diet that includes consumption of medium-chain triacylglycerol oil leads to a greater rate of weight and fat mass loss than does olive oil. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 621-626, mar. 2008.

ST-ONGE, M. P. et al., Impact of medium and long chain triglycerides consumption on appetite and food intake in overweight men. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1134-1140, oct. 2014.

STEPAN, J.J. et al., Bone Loss and Biochemical Indices of Bone Remodeling in Surgically Induced Postmenopausal Women. **Bone**, v. 8, p. 279-284, 1987.

STRÖHER, D. et al., Virgin Coconut Oil Associated with High-Fat Diet Induces Metabolic Dysfunctions, Adipose Inflammation, and Hepatic Lipid Accumulation. **Journal of Medicinal Food**, v.23, p.689-698, sep. 2019.

SUE A.; SUKUMAR D. Bone Metabolism in Obesity and Weight Loss. **Annual Review of Nutrition**, v. 32, p. 287-309, aug. 2012.

SUN, K. et al., Adipose tissue remodeling and obesity. ***The Journal of Clinical Investigation***, v. 121, p. 2094-2101, jun. 2011.

TAKEGAMI, N. et al. RANK/RANKL/OPG system in the intervertebral disc. ***Arthritis research & therapy***, v. 19, n. 1, p. 121, jun. 2017.

TENCEROVA, M. et al. High-Fat Diet-Induced Obesity Promotes Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue and Impairs Skeletal Stem Cell Functions in Mice. ***Journal of bone and mineral research***, v. 33, n. 6, p. 1154-1165, Jun 2018.

TILG H.; MOSCHEN A. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. ***Nature Reviews Immunology***, v.6, p. 772-783, oct. 2006.

TILG H.; MOSCHEN A. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. ***Trends in Endocrinology and Metabolism***, v.19, p. 371-379, oct. 2008.

TRZECIAKIEWICZ A.; HABAUZIT V.; HORCAJADA M. When nutrition interacts with osteoblast function: Molecular mechanisms of polyphenols. ***Nutrition Research Reviews***, v. 22, p. 68-81, jun. 2009.

VALENTE, F. et al., Effects of coconut oil consumption on energy metabolism, cardiometabolic risk markers, and appetitive responses in women with excess body fat. ***European Journal of Nutrition***, v. 57, p. 1627-1637, apr. 2018.

VERELLO-ROWELL V.; DILLAGUE K.; SYAH-TJUNDAWAN B. Novel antibacterial and emollient effects of coconut and virgin olive oils in adult atopic dermatitis. ***Dermatitis***, v. 19, p. 308-315, dec. 2008.

VYSAKH A.; RATHEESH M.; RAJMOHANAN T. et al. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. ***Internaional Immunopharmacology***, v.20, p. 12-130, mar. 2014.

WALLACE T. Health Effects of Coconut Oil—A Narrative Review of Current Evidence. ***Journal of the American College of Nutrition***, v. 38, p. 97-107, nov. 2019.

WAUQUIER, F. et al., Oxidative stress in bone remodelling and disease. ***Trends Mol Med.*** , v. 77, p. 468-477, oct. 2009.

WHITE P. A.S.; CERCATO L. M.; ARAÚJO J. M.D. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. ***Arq Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo***, v. 57, p. 339-345, 2013.

WONG, S. et al., The relationship between metabolic syndrome and osteoporosis: A Review. ***Nutrients***, v. 8, p. 1-18, jun. 2016.

ZICKER, M. et al., Virgin coconut oil is effective to treat metabolic and inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. ***Journal of Nutritional Biochemistry***, v. 63, p. 117-128, aug. 2019.