

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Enfermagem
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde

Ana Luísa Andrade Leite

**EFEITO DO TRATAMENTO COM RESTRIÇÃO CALÓRICA NA SAÚDE ÓSSEA DE
CAMUNDONGOS OBESOS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM GORDURA**

Belo Horizonte

2024

Ana Luísa Andrade Leite

**EFEITO DO TRATAMENTO COM RESTRIÇÃO CALÓRICA NA SAÚDE ÓSSEA DE
CAMUNDONGOS OBESOS 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 para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde.

Linha de pesquisa: Nutrição Clínica e Experimental

Orientadora: Prof^a Dra. Marina Chaves de Oliveira

Coorientadora: Prof^a Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira

Belo Horizonte

2024

L533e Leite, Ana Luisa Andrade.
Efeito do tratamento com restrição calórica na saúde óssea de camundongos obesos alimentados com dieta rica em gordura [recurso eletrônico] / Ana Luisa Andrade Leite. -- Belo Horizonte: 2024.
75f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientadora: Marina Chaves de Oliveira
Coorientadora: Adaliene Versiani Matos Ferreira
Área de concentração: Nutrição
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Restrição Calórica. 2. Obesidade. 3. Dieta Hiperlipídica. 4. Osso e Ossos. 5. Metabolismo. 6. Dissertação Acadêmica. I. Oliveira, Marina Chaves de. II. Ferreira, Adaliene Versiani. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: WB 415



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ENFERMAGEM - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO SAÚDE

ATA DE NÚMERO 108 (CENTO E OITO) DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA ANA LUÍSA ANDRADE LEITE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.

Aos 27 (vinte e sete) dias do mês de agosto de dois mil e vinte e quatro, às 09:00 horas, realizou-se por meio de videoconferência, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação "**EFEITO DO TRATAMENTO COM RESTRIÇÃO CALÓRICA NA SAÚDE ÓSSEA DE CAMUNDONGOS OBESOS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM GORDURA**", da aluna **Ana Luísa Andrade Leite**, 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, Soraia Macari e Simone Vargas da Silva, 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 publicamente 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 demais membros da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 27 de agosto de 2024.

Profa. Dra. Marina Chaves de Oliveira
Orientadora (UFMG)

Profa. Dra. Soraia Macari
Membro Titular (UFMG)

Profa. Dra. Simone Vargas da Silva
Membro Titular (UERJ)



Documento assinado eletronicamente por **Marina Chaves de Oliveira, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 30/08/2024, às 08:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Vargas da Silva, Usuária Externa**, em 30/08/2024, às 14:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraia Macari, Professora do Magistério Superior**, em 05/09/2024, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3504878** e o código CRC **EBB4974C**.

AGRADECIMENTOS

São tantos os agradecimentos que me vem à mente. Foi um período muito intenso, com altos e baixos, com histórias preciosas que ficarão guardadas no meu coração e memória. Conheci pessoas incríveis: colegas, amigos, professores e funcionários. Essas pessoas me proporcionaram um grande aprendizado, tanto profissionalmente como no aspecto pessoal.

Serei eternamente grata pela oportunidade de fazer parte do grupo Imunometabolismo, grupo que me acolheu e ensinou tanta coisa! Sempre dispostas a discutir ideias novas, a fazer críticas construtivas, a ajudar, seja na bancada ou oferecer conselhos para a vida. Agradeço de coração por todos os ensinamentos, paciência, carinho, compreensão e principalmente, por acreditarem no meu potencial. E agradeço também por serem mulheres incríveis, que me inspiram com a paixão pela ciência e dedicação na pesquisa.

Agradeço também aos professores da UFMG, por abrirem as portas de suas salas, como também dos laboratórios para discutir e realizar esses experimentos, assim como conselhos profissionais. Além disso, agradeço às agências financiadoras e ao programa de Pós-graduação que também proporcionaram essa oportunidade de desenvolver este trabalho.

Quero agradecer também agradecer a meus pais, meu irmão e toda minha família, meu namorado, minhas amigas do colégio, da farmácia e da nutrição. Me deram conselhos, me fizeram rir, estudaram comigo... tornaram meus dias mais leves de alguma forma e me ajudaram a ser uma pessoa e profissional melhor. Muito obrigada por tudo!

RESUMO

Na obesidade ocorre a secreção excessiva de adipocinas pró-inflamatórias por adipócitos e macrófagos decorrente do aumento de adiposidade. Isso desencadeia eventos que afetam negativamente parâmetros glicêmicos, cardiovasculares, além do metabolismo ósseo. A restrição calórica (RC) é uma estratégia muito utilizada como tratamento da obesidade, uma vez que o déficit calórico é um dos fatores chave para a perda de peso. Entretanto, os efeitos da restrição calórica na saúde óssea são complexos e apresentam aspectos contraditórios. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da restrição calórica como tratamento dietético na saúde óssea de camundongos com obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica (HF). Para isso, camundongos machos C57BL/6 foram divididos em: (i) camundongos alimentados com dieta Labina® (controle) e (ii) camundongos alimentados com dieta HF - 45% do total calórico da dieta. Ao alcançarem 40 gramas, alguns animais do grupo HF foram direcionados ao terceiro grupo: (iii) camundongos alimentados com dieta HF, seguida pela intervenção dietética por meio de RC. Essa intervenção compreendeu a troca da dieta HF pela dieta Labina®, sendo submetidos a esse protocolo pelo período de 35 dias. Ao final da intervenção foi realizado o teste de tolerância à glicose. Os animais foram eutanasiados com coleta de tecido adiposo, fêmur e tíbia. Foram realizadas análises de histologia, microtomografia computadorizada (MicroCT), dosagem sérica de marcadores ósseos/metabólicos e expressão gênica por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que a dieta HF induziu aumento do índice de adiposidade e da área de adipócitos, associada a alterações metabólicas, como aumento da glicose sérica de jejum e piora na tolerância oral à glicose. Na microarquitetura óssea foi observado o aumento do percentual de volume ósseo (BV/TV) e o aumento do número de trabéculas (T.Sp) associado a alterações na histologia, apresentando menor número de osteoblastos e osteoclastos. Esse efeito não parece benéfico devido às consequências adversas na saúde metabólica e ao aumento da adiposidade induzidas pela dieta HF. Em contrapartida, a RC mostrou ser uma estratégia de tratamento válida para a obesidade, revertendo completamente o aumento de adiposidade e as alterações no metabolismo glicêmico induzidas pela dieta HF. No contexto ósseo, a RC apresentou uma relação RANKL/OPG aumentada, com aumento de osteoblastos e osteoclastos. Na microarquitetura óssea, a RC induziu ao retorno aos parâmetros basais, com redução da densidade mineral óssea (DMO), BV/TV e T.Sp, sugerindo uma redução proporcional à perda de peso. Portanto, o tratamento com a restrição calórica parece reverter as alterações metabólicas e ósseas decorrentes do consumo de dieta HF. Entretanto, é ainda crucial investigar mais essa reversão óssea induzida pela RC para determinar seu real impacto na saúde óssea, apesar dos seus benefícios, especialmente em indivíduos com alterações ósseas decorrentes da obesidade.

Palavras-chave: restrição calórica; obesidade; osso; dieta hiperlipídica; metabolismo.

ABSTRACT

Obesity involves excessive secretion of pro-inflammatory adipokines by adipocytes and macrophages due to increased adiposity. This triggers events that negatively affect glycemic and cardiovascular parameters, as well as bone metabolism. Caloric restriction (CR) is a strategy widely used as a treatment for obesity, since caloric deficit is one of the key factors for weight loss. However, the effects of caloric restriction on bone health are complex and present contradictory aspects. The aim of this study was to evaluate the effect of caloric restriction as a dietary treatment on bone health in mice with obesity induced by a high-fat diet (HF). For this purpose, male C57BL/6 mice were divided into: (i) mice fed a Labina® diet (control) and (ii) mice fed a HF diet - 45% of the total calories of the diet. Upon reaching 40 grams, some animals from the HF group were directed to the third group: (iii) mice fed a HF diet, followed by dietary intervention through CR. This intervention included replacing the HF diet with the Labina® diet, and they were subjected to this protocol for a period of 35 days. At the end of the intervention, a glucose tolerance test was performed. The animals were euthanized and adipose tissue, femur and tibia were collected. Histology, micro-computed tomography (MicroCT), serum measurement of bone/metabolic markers and gene expression by real-time PCR were performed. The results showed that the HF diet induced an increase in the adiposity index and adipocyte area, associated with metabolic changes, such as increased fasting serum glucose and worsening oral glucose tolerance. In bone microarchitecture, an increase in the percentage of bone volume (BV/TV) and an increase in the number of trabeculae (T.Sp) were observed, associated with changes in histology, showing a lower number of osteoblasts and osteoclasts. This effect does not seem beneficial due to the adverse consequences on metabolic health and the increase in adiposity induced by the HF diet. In contrast, CR has shown to be a valid treatment strategy for obesity, completely reversing the increase in adiposity and changes in glycemic metabolism induced by the HF diet. In the bone context, CR showed an increased RANKL/OPG ratio, with an increase in osteoblasts and osteoclasts. In bone microarchitecture, CR induced a return to baseline parameters, with a reduction in bone mineral density (BMD), BV/TV and T.Sp, suggesting a reduction proportional to weight loss. Therefore, treatment with caloric restriction appears to reverse the metabolic and bone changes resulting from the consumption of the HF diet. However, it is still crucial to further investigate this CR-induced bone reversal to determine its real impact on bone health, despite its benefits, especially in individuals with bone alterations resulting from obesity.

Keywords: caloric restriction; obesity; bone; high-fat diet; metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação do tecido ósseo e etapas do remodelamento ósseo	18
Figura 2. Alterações metabólicas nos tecidos adiposo e ósseo no contexto de obesidade	21
Figura 3. Delineamento experimental	26
Quadro 1. Relação de primers utilizados no PCR em tempo real	31
Figura 4. Alterações de peso corporal e adiposidade decorrentes do consumo calórico de dieta high-fat (HF) e intervenção dietética com restrição calórica (RC)	34
Figura 5. Alterações de metabolismo glicêmico decorrentes do consumo calórico de dieta high-fat (HF) e intervenção dietética com restrição calórica (RC)	35
Figura 6. Análise da da região trabecular do fêmur de camundongos por meio de microtomografia computadorizada	36
Figura 7. Análise da região cortical do fêmur de camundongos por meio de microtomografia computadorizada	36
Figura 8. Dosagem sérica de marcadores sistêmicos de remodelamento ósseo	37
Figura 9. Análise histológica de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos em fêmur de camundongos	38
Figura 10. Análise de expressão gênica de marcadores de remodelação e qualidade óssea na tíbia de camundongos por PCR em tempo real	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes da dieta *high-fat* 45%

27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BMAT	Tecido adiposo da medula óssea
BMP-6	Proteína morfogenética óssea 6
BV/TV	Percentual volume ósseo / volume de tecido
Ct.Ar	Área cortical
Ct.Th	Espessura transversal
DMO	Densidade mineral óssea
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GADPH	Gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HE	Hematoxilina-Eosina
HF	<i>High-fat</i> - hiperlipídica
IGF-1	Fator de crescimento de insulina-1
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MicroCT	Microtomografia Computadorizada
OCN	Osteocalcina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor ativador Kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador Kappa B
RC	Restrição calórica
RUNX2	Fator de transcrição ligado ao domínio Runt-2

SMI	Índice de modelo de estrutura
SOST	Esclerostina
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAM	Tecido adiposo mesentérico
TAR	Tecido adiposo retroperitoneal
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
Tb.Th	Espessura das trabéculas
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação das trabéculas
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TTOG	Teste de tolerância oral à glicose
Tt.Ar	Área total

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Tecido ósseo	15
2.1.1	Matriz óssea	15
2.1.2	Remodelamento ósseo	18
2.2	Obesidade e saúde óssea	19
2.3	Restrição calórica: relação com obesidade e perda óssea	22
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Protocolo experimental dos animais	26
4.2	Composição das dietas	27
4.3	Consumo alimentar e acompanhamento do peso corporal	27
4.4	Teste oral de tolerância oral à glicose (TTOG)	28
4.5	Eutanásia	28
4.6	Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)	28
4.7	Análise Histológica	29
4.7.1	Tecido ósseo	29
4.7.2	Tecido adiposo	30
4.8	Avaliações sorológicas	30
4.9	PCR em tempo real	31
4.10	Análise Estatística	32
5	RESULTADOS	33
5.1	Restrição calórica reverte o aumento de peso, de adiposidade e alterações glicêmicas causadas pelo consumo de uma dieta hiperlipídica	33
5.2	Restrição calórica reverte alterações da microarquitetura óssea trabecular em camundongos obesos, mas não interfere na parte cortical	35
5.3	Restrição calórica altera a relação RANKL/OPG nos animais com obesidade	37

5.4	Restrição calórica aumenta número de osteoblastos e osteoclastos no fêmur, sem afetar osteócitos	37
5.5	Restrição calórica não influencia na expressão gênica de marcadores de remodelamento e qualidade óssea	38
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICES	55

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que propicia suporte estrutural, proteção para tecidos e órgãos vitais, auxilia na locomoção, é um reservatório de minerais, como também abriga a medula óssea, onde ocorre a produção de células sanguíneas e abriga as células-tronco mesenquimais (1). Esse tecido é composto por uma matriz extracelular formada por minerais e colágeno, dando resistência e rigidez ao osso (2) também células especializadas tais como os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (3). Os osteoblastos são responsáveis pela produção e mineralização da matriz óssea, enquanto os osteócitos são células maduras incorporadas na matriz e atuam como sensores do ambiente ósseo, respondendo a estímulos mecânicos e hormonais (4). Os osteoclastos, por sua vez, são células especializadas na reabsorção do tecido ósseo, permitindo a renovação contínua do osso (5). Contudo, alterações metabólicas e inflamatórias podem alterar o remodelamento ósseo, interferindo na diferenciação celular, taxa de renovação e reabsorção óssea (6).

No contexto de obesidade, ocorre o aumento da secreção de adipocinas pró-inflamatórias por adipócitos e macrófagos, levando a um estado inflamatório sistêmico de baixo grau (7). Esse estado inflamatório crônico pode desencadear uma cascata de eventos que afetam negativamente a regulação do metabolismo ósseo. O excesso de adiposidade também torna o indivíduo com obesidade mais suscetível a fraturas, tanto pelo aumento da fragilidade óssea, como também pelo maior risco de queda (8). Sendo assim, compreender as principais moléculas e vias envolvidas na obesidade possibilitam traçar terapias multidisciplinares direcionadas no tratamento de complicações ósseas e metabólicas (9,10), como também manter a qualidade de vida. No âmbito nutricional, uma estratégia muito utilizada no tratamento de obesidade é a restrição calórica, tendo em vista que o déficit calórico é um dos fatores chave para a perda de peso.

A restrição calórica (RC) é uma abordagem nutricional caracterizada pela redução controlada da ingestão calórica diária sem que haja deficiências nutricionais (Hofer et al, 2022) (11). Essa estratégia tem sido estudada tanto em modelos humanos, como em modelos animais. A RC tem sido associada à extensão da longevidade em várias espécies, desde leveduras até mamíferos (12), como também

retarda o aparecimento de doenças relacionadas ao envelhecimento (13). Os benefícios da RC também se estendem à prevenção de doenças crônicas. Ela ajuda a melhorar a sensibilidade à insulina, reduz os níveis de glicose no sangue e diminui a pressão arterial, fatores que contribuem para a prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer (14). Por outro lado, os efeitos da RC na saúde óssea são mais complexos e apresentam tanto aspectos favoráveis quanto desfavoráveis.

No tecido ósseo, o efeito da RC em roedores demonstra que o período da vida no qual a RC é aplicada é um dos fatores que influencia no impacto ósseo (15). Em camundongos jovens, a RC está associada a prejuízos no desenvolvimento esquelético, com baixos níveis de leptina e IGF-1 e alta adiposidade medular, o que seria deletério para a massa e arquitetura óssea cortical e trabecular (16). Por outro lado, em camundongos adultos, observou-se menor massa óssea cortical, mas maior volume de osso trabecular, como também há potenciais benefícios esqueléticos da RC em animais idosos (15,16).

Há poucos estudos de RC investigando a saúde óssea no contexto do tratamento da obesidade, embora os temas de longevidade e saúde cardiovascular sejam bastante explorados. A maioria das pesquisas foca nos efeitos da RC sobre a perda de peso, ignorando os impactos potenciais na saúde óssea. Considerando que a obesidade está associada a inflamação crônica e alterações metabólicas que podem prejudicar a densidade e a qualidade óssea, é crucial explorar abordagens que possam tratar a obesidade e melhorar ou manter a saúde óssea. Portanto, este trabalho propõe investigar os efeitos de uma dieta com RC em camundongos obesos alimentados com dieta rica em gorduras, visando entender como a RC possa atuar como uma abordagem nutricional eficaz no tratamento de obesidade, com potencial para modular o processo inflamatório exacerbado característico dessa condição e causar impacto na saúde óssea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo desempenha funções cruciais para o corpo humano. É um tecido conjuntivo especializado que propicia suporte estrutural, proteção para tecidos e órgãos vitais, auxilia na locomoção, como também abriga a medula óssea, onde ocorre a produção de células sanguíneas (1,2). Além disso, o tecido ósseo é um reservatório de minerais, como cálcio e fósforo, que são fundamentais para a saúde óssea e outras funções metabólicas (17). Nos últimos anos, também se tem estudado o papel endócrino do tecido ósseo, com a secreção de substâncias bioativas com a ação sistêmica que atuam no metabolismo ósseo, como também na regulação energética (4). Embora apresente ser um tecido sólido e estático, o tecido ósseo é muito dinâmico, sendo composto por uma matriz extracelular calcificada e células responsáveis por sua homeostase (18).

2.1.1 Matriz óssea

A matriz óssea é uma estrutura complexa composta por componentes orgânicos e inorgânicos que conferem ao tecido ósseo suas propriedades funcionais (19,20).

A matriz não mineralizada, ou osteoide, é a fase inicial da formação óssea e é produzida pelos osteoblastos. O osteoide é composto principalmente por colágeno tipo I e proteínas, como osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea (18,21). Esta matriz orgânica fornece uma estrutura de suporte sobre a qual os minerais serão depositados posteriormente. O osteoide proporciona flexibilidade ao osso em formação. No entanto, por não conter minerais, o osteoide não possui a rigidez característica do osso maduro e não é capaz de suportar grandes cargas mecânicas (20).

A matriz mineralizada, por outro lado, é o resultado da deposição de minerais sobre o osteoide. A principal substância mineral presente é a hidroxiapatita, uma forma cristalina de fosfato de cálcio. A mineralização transforma a matriz orgânica em um tecido rígido e resistente, capaz de suportar cargas compressivas e fornecer suporte estrutural (18–20). A hidroxiapatita se deposita ao longo das fibras de colágeno,

formando cristais que interagem com a matriz orgânica para criar um material que combina a flexibilidade do colágeno com a rigidez dos minerais, resultando em um tecido capaz de resistir a diversas formas de estresse mecânico, características essenciais para as funções do tecido ósseo (19,20).

Essas características da matriz refletem na composição do osso trabecular e osso cortical. O osso trabecular, também conhecido como osso esponjoso, apresenta uma estrutura porosa e leve, composta por uma rede de trabéculas ósseas interconectadas. Ele tem uma alta taxa de remodelamento, o que permite uma resposta rápida a mudanças nas cargas mecânicas e necessidades metabólicas (18). Em contraste, o osso cortical, ou osso compacto, é denso e sólido, formando a camada externa dos ossos. Ele proporciona suporte estrutural e proteção, além de ser essencial para a resistência mecânica do esqueleto, para suportar as forças de compressão e tensão (18,22).

Sendo assim, a matriz óssea é um ambiente dinâmico, sujeito a remodelação constante através da atividade coordenada das células ósseas (5). As células principais encontradas no tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (3). Os osteoblastos são células cuboides localizadas na superfície óssea, responsáveis pela formação e mineralização da matriz óssea (3,23). A diferenciação de células mesenquimais para osteoblastos maduros é regulada por fatores como a proteína morfogenética óssea 6 (BMP-6) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (4,23). Os osteoblastos produzem e liberam diversas proteínas essenciais para a mineralização óssea, incluindo osteocalcina, osteopontina, entre outras (3,4,21).

A osteocalcina é uma proteína vital para a regulação do metabolismo mineral do osso, influenciando a ligação do cálcio (24). Já a osteopontina é uma fosfoproteína que participa da adesão celular e da sinalização intracelular, além de ser um componente chave nas lacunas de reabsorção criadas pelos osteoclastos(4). Ademais, durante o processo de mineralização da matriz, há a atuação de uma enzima expressa em altas concentrações nos osteoblastos, a fosfatase alcalina. Esta enzima promove a hidrólise de grupos fosfato de diversas moléculas, aumentando a concentração local de fosfato inorgânico e facilitando a precipitação de cristais de hidroxiapatita na matriz óssea (21). No decorrer da formação óssea, os osteoblastos

eventualmente podem ficar aprisionados na própria matriz que secretaram, em que podem sofrer apoptose ou iniciar a diferenciação de osteoblasto para osteócito (25).

O processo de transição de osteoblasto para osteócito é regulado por fatores de transcrição específicos, como RUNX2 e osterix (3). O RUNX2 é essencial para a diferenciação inicial dos precursores mesenquimais em osteoblastos, e assim, para a transição desses osteoblastos aprisionados em osteócitos (26). Osterix é outro fator de transcrição crucial que atua na maturação dos osteoblastos e na sua transformação em osteócitos (27). A ausência ou disfunção desses fatores pode levar a defeitos na formação e manutenção óssea, evidenciando sua importância crítica no desenvolvimento esquelético.

Os osteócitos desempenham um papel central na manutenção óssea, respondendo a estímulos mecânicos e químicos e regulando a remodelação óssea (28). Eles são altamente sensíveis a mudanças no ambiente mecânico, como a carga ou a falta de uso, e podem desencadear respostas celulares apropriadas para adaptar o tecido ósseo a essas condições (29). Além disso, essas células também desempenham um papel crucial na regulação da concentração de cálcio no sangue, uma função vital para a homeostase mineral. Eles produzem esclerostina (SOST), uma proteína que inibe a formação óssea ao bloquear a via de sinalização Wnt, essencial para a atividade osteoblástica (28,30). A esclerostina funciona como um mecanismo de feedback negativo para impedir a formação excessiva de osso, sendo influenciada pelos níveis de cálcio e outros fatores (4,29). Este mecanismo assegura que as concentrações de cálcio no sangue permaneçam dentro de limites estreitos, prevenindo hipercalcemia.

Em contraste, os osteoclastos são células multinucleadas, com uma borda ondulada, que tem um papel crucial na reabsorção óssea. Além disso, expressam a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), na qual é utilizada na identificação histológica (5). Eles se originam de precursores hematopoiéticos da linhagem mononuclear fagocítica, sob a influência de fatores de crescimento e citocinas, como o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (1,5). Os osteoclastos criam áreas de reabsorção óssea chamadas lacunas de Howship, onde degradam a matriz óssea mineralizada, dissolvendo a hidroxiapatita da matriz óssea e assim, liberando

cálcio e fósforo na circulação. Além disso, os osteoclastos secretam enzimas proteolíticas, como a catepsina K, que degradam os componentes orgânicos da matriz óssea, como o colágeno tipo I (5). A hiperatividade dos osteoclastos pode resultar em condições como a osteoporose, onde a reabsorção óssea excede a formação óssea, levando a ossos frágeis e suscetíveis a fraturas (31).

2.1.2 Remodelamento ósseo

Os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos atuam de forma coordenada no remodelamento do tecido ósseo, também chamado de metabolismo ósseo. É um ciclo contínuo essencial para a manutenção da integridade estrutural do esqueleto e para a regulação das concentrações de cálcio no organismo (32).

As etapas do remodelamento ósseo podem ser divididas em cinco, em que o ciclo se inicia com a atividade reabsortiva dos osteoclastos, removendo tecido antigo ou danificado. O ciclo avança com a formação de uma nova matriz óssea feita por osteoblastos. Essas células podem se diferenciar em osteócitos posteriormente. O processo é ilustrado na **Figura 1** (32,33).

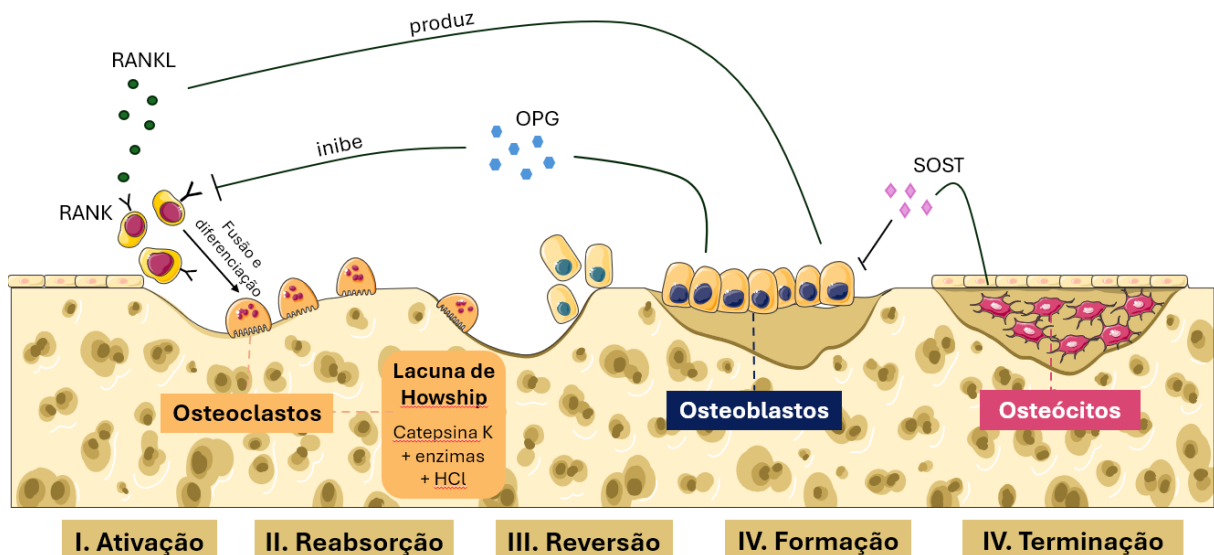


Figura 1. Representação do tecido ósseo e etapas do remodelamento ósseo. O remodelamento ósseo é descrito em cinco etapas: (I) **Ativação**: um sinal mecânico ou hormonal desencadeia a ativação dos precursores de osteoclastos, a partir da ligação do complexo RANK/RANKL, e assim, se diferenciam em osteoclastos maduros e se dirigem ao local específico do osso onde ocorrerá o remodelamento. (II) **Reabsorção**: os osteoclastos aderem à superfície óssea e criam microambientes ácidos que, com a atuação de enzimas, dissolvem a matriz mineralizada e degradam a matriz orgânica, formando as lacunas de Howship. (III) **Reversão**: a OPG atua sobre o complexo RANK/RANKL nos osteoclastos, reduzindo a reabsorção. Os osteoclastos sofrem apoptose e células mononucleares, incluindo pré-osteoblastos, preenchem a lacuna e preparam a superfície óssea para a nova formação

óssea. (IV) **Formação**: os osteoblastos produzem uma nova matriz óssea não mineralizada e, posteriormente, facilitam a mineralização da matriz, formando uma nova estrutura óssea. (V) **Terminação**: uma vez terminada a mineralização, os osteoblastos podem entrar em apoptose, ou podem se diferenciar em osteócitos. Os osteócitos secretam SOST, que inibem a formação óssea. O novo tecido fica numa fase de repouso até que seja necessário um novo ciclo de remodelamento. Imagem criada utilizando mix de figuras do Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>) de acordo com o Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

A regulação do equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea é controlada por uma complexa rede de sinalização celular e moléculas específicas. Uma das principais vias envolvidas é o sistema RANK/RANKL/OPG (receptor ativador do fator nuclear κ B / RANK ligante / osteoprotegerina).

O RANKL é uma molécula produzida pelos osteoblastos e outros tipos de células, que atua como um sinal para ativar os osteoclastos e promover a reabsorção óssea. Quando o RANKL se liga ao seu receptor RANK na superfície dos osteoclastos, estimula a sua atividade e função (1,34). Por outro lado, a osteoprotegerina (OPG) é uma proteína secretada pelos osteoblastos e age como um antagonista do RANK. A OPG se liga ao RANK, bloqueando a interação do receptor com o RANKL nos osteoclastos e, assim, inibindo a formação e ativação dessas células, resultando em uma menor taxa de reabsorção óssea (3,34).

O equilíbrio entre RANKL e OPG é crucial para a homeostase óssea. Assim, fatores, como a obesidade, demonstram ter um efeito prejudicial na homeostase óssea devido a processos inflamatórios crônicos e alterações na medula óssea, afetando negativamente o metabolismo ósseo (9).

2.2 Obesidade e saúde óssea

A obesidade é geralmente definida por um excesso de gordura corporal que causa prejuízo à saúde, avaliada apenas pelo índice de massa corporal - expresso pelo índice de massa corporal (IMC), em kg/m² (35,36). Entretanto, este conceito tem sido revisto uma vez que há diferentes fenótipos na obesidade, indicando que ela apresenta mais nuances do que apenas o peso e excesso de massa corporal, como por exemplo, o local em que o tecido adiposo se acumula. Quantidades excessivas de tecido adiposo visceral e de gordura ectópica definem amplamente o risco de

doença cardiovascular de sobrepeso e obesidade moderada (35). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma doença de prevalência crescente a nível mundial, quase triplicou desde 1975, sendo um desafio de saúde pública global. A obesidade é fator de risco para outras doenças, como diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica, como também está associada à menor expectativa de vida (10). Além disso, está associada a um aumento da prevalência de depressão, ansiedade e outros transtornos psiquiátricos (7).

Sua etiologia é influenciada por fatores hereditários, fisiológicos e/ou ambientais (10). A hipertrofia dos adipócitos, células do tecido adiposo, está relacionada com um consumo calórico maior que o gasto energético, em que o tipo de nutriente consumido também pode influenciar no processo de acúmulo de gordura (37). Além disso, a mudança do padrão alimentar, com o aumento do consumo de alimentos ultraprocessados, com alto teor calórico e pobres em nutrientes, ao mesmo tempo em que há menor consumo de alimentos in natura ricos em nutrientes, tem levado ao aumento da prevalência da obesidade (38).

O excesso de adiposidade progride com o processo de formação, crescimento e hipertrofia de adipócitos, levando a características disfuncionais. Isso acontece pois há uma redução da capacidade do oxigênio de se difundir dos capilares para os adipócitos. Essa hipóxia ocasiona uma série de alterações, como a redução da sinalização da insulina pelos adipócitos maduros, acarretando efeitos metabólicos como a resistência local à insulina, o aumento da inflamação e dano celular (39). A secreção excessiva de adipocinas pró-inflamatórias, por adipócitos e macrófagos, leva a um estado inflamatório sistêmico de baixo grau. Além disso, há deposição de triglicerídeos em outros lugares do corpo, especialmente no fígado e no músculo esquelético, podendo causar lipotoxicidade (7,39).

Por outro lado, tecidos como o ósseo podem ser influenciados pelo desenvolvimento da obesidade, levando a alterações negativas na saúde óssea. O excesso de adiposidade, especialmente a visceral, torna o indivíduo com obesidade mais suscetível a fraturas, tanto pelo aumento da fragilidade óssea quanto pelo maior risco de quedas (8). A **Figura 2** resume as repercussões do excesso de adiposidade no tecido adiposo e no ósseo.

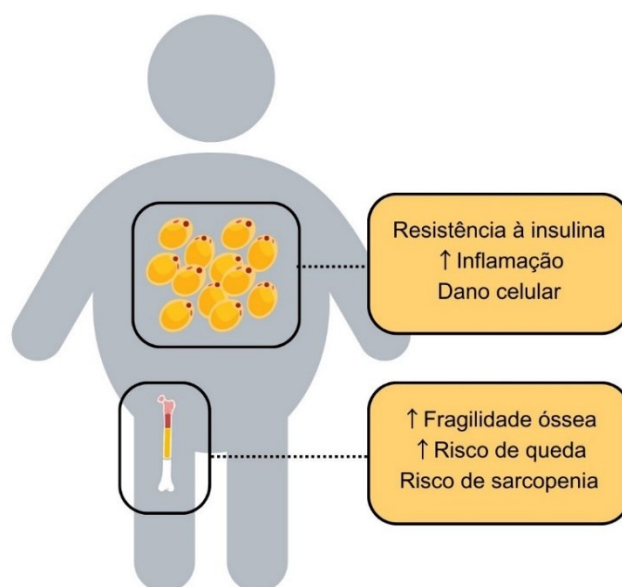


Figura 2. Repercussões do excesso de adiposidade no tecido adiposo e no ósseo.

Para se avaliar a saúde óssea, o exame padrão utilizado é o da densidade mineral óssea (DMO), medida por meio de absormetria por dupla emissão de raios X (DEXA), que quantifica o tecido ósseo (40). Além disso, avalia-se o risco de fraturas e quedas, o qual pessoas idosas e mulheres pós-menopausa são os grupos com maior risco de piora na qualidade de vida nestes desfechos.

Estudos epidemiológicos correlacionaram um maior índice de massa corporal (IMC), parâmetro utilizado na classificação de obesidade, com uma maior DMO, sugerindo que a obesidade poderia ser um fator protetor para a saúde óssea (41). No entanto, quando se avalia o risco de fraturas, observa-se um perfil diferenciado de fraturas de acordo com o IMC - especialmente ao se considerar grupos com maior risco. Pessoas com maior IMC apresentam uma maior frequência de fraturas de tornozelo, fêmur e úmero. Por outro lado, há uma menor frequência de fraturas de quadril e punho em pessoas com obesidade (42,43). Esse contexto epidemiológico parece mostrar um paradoxo entre obesidade e saúde óssea, em que a obesidade parece oferecer proteção em algumas circunstâncias, enquanto aumenta o risco de desfechos piores em outras.

Entretanto, nos últimos anos, outros parâmetros funcionais têm sido incluídos na avaliação da saúde óssea. Esses parâmetros avaliam a qualidade do osso formado, o processo de remodelamento ósseo e a massa muscular (40). No contexto

da obesidade, observa-se uma piora na qualidade óssea e uma perda de força muscular. Isso resulta em condições como a osteoporose e a obesidade sarcopênica, aumentando significativamente o risco de quedas e fraturas, como também há piora da qualidade de vida dos indivíduos ao longo do tempo (44).

Diferentes fatores influenciam a relação entre obesidade e saúde óssea. Alterações metabólicas decorrentes do aumento da massa adiposa na medula óssea influenciam a atuação do sistema imune, com consequências no metabolismo ósseo. Os macrófagos iniciam uma resposta inflamatória aguda, resultando na secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas, incluindo IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18. Essas citocinas inibem a formação óssea, recrutam precursores monocíticos e estimulam a reabsorção óssea (45,46). Esses mediadores podem ter um papel importante no desenvolvimento de doenças ósseas como a osteoporose (34).

Sendo assim, compreender as principais moléculas e vias envolvidas na obesidade possibilitam traçar terapias multidisciplinares direcionadas focadas no tratamento de complicações ósseas e metabólicas (9,10), como também manter a qualidade de vida. No âmbito nutricional, uma estratégia muito utilizada no tratamento de obesidade é a restrição calórica, tendo em vista que o déficit calórico é um dos fatores chave para a perda de peso.

2.3 Restrição calórica: relação com a obesidade e perda óssea

A restrição calórica (RC) se caracteriza pela redução controlada da ingestão calórica diária sem que haja deficiências nutricionais (47). Essa estratégia tem sido estudada tanto em modelos humanos, como em modelos animais. Em humanos, é recomendado 750 kcal de déficit energético diário ou redução calórica correspondente a 30% do gasto energético total (48). Em modelos com roedores, a redução calórica varia entre 10-50% (47,49). Como estratégia nutricional de tratamento, a RC tem apresentado benefícios importantes para a saúde.

A RC tem sido associada à extensão da longevidade em várias espécies, desde leveduras até mamíferos (12). A redução de calorias pode aumentar a expectativa de

vida e retardar o aparecimento de doenças relacionadas ao envelhecimento (13). Essas mudanças resultam numa redução de marcadores de inflamação, estresse oxidativo e de danos celulares, sugerindo uma diminuição no ritmo de envelhecimento celular (50). Os benefícios da RC também se estendem à prevenção de doenças crônicas. Ela ajuda a melhorar a sensibilidade à insulina, reduz os níveis de glicose no sangue e diminui a pressão arterial, fatores que contribuem para a prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer (51). Por outro lado, os efeitos da RC na saúde óssea são mais complexos e apresentam tanto aspectos favoráveis quanto desfavoráveis.

O efeito da RC em roedores demonstra que o período da vida no qual é a RC é aplicada influencia no resultado, assim como outros fatores (15). Em camundongos jovens, em fase de crescimento, a RC está associada a prejuízos no desenvolvimento esquelético, com baixos níveis de leptina e IGF-1 e alta adiposidade medular, o que seria danoso para a massa e arquitetura óssea cortical e trabecular (16). Por outro lado, em camundongos adultos observou-se menor massa óssea cortical, mas maior volume de osso trabecular, como também há potenciais benefícios esqueléticos da RC em animais idosos (15,16). A prática de RC combinada com exercício físico pode ajudar a mitigar alguns dos efeitos adversos na estrutura óssea. Isso foi demonstrado em estudos com ratos obesos, em que a combinação de restrição calórica e exercício resultou em menores danos na estrutura óssea (52). No geral, pela RC ser associada a uma diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio e inflamação, entende-se que indiretamente ela possa beneficiar a saúde óssea ao longo do tempo (53,54).

Poucos estudos investigaram sobre a restrição calórica (RC) como estratégia nutricional na saúde óssea no contexto do tratamento da obesidade. Embora os temas de longevidade, saúde cardiovascular sejam bastante explorados, assim como a perda de peso e a composição corporal, explora-se pouco os impactos potenciais sobre a saúde óssea, que é um componente importante da saúde geral. Além disso, a obesidade está associada a inflamação crônica e a alterações metabólicas que podem afetar negativamente a densidade e a qualidade óssea. Portanto, é imprescindível explorar abordagens nutricionais que possam simultaneamente tratar a obesidade, como também melhorar ou manter a saúde óssea. Sendo assim, este

trabalho propõe investigar os efeitos de uma dieta com RC em um modelo de camundongos obesos alimentados com dieta rica em gorduras. Hipotetiza-se que a RC possa atuar como uma abordagem nutricional eficaz no tratamento de obesidade, com potencial para modular o processo metabólico e inflamatório exacerbado característico dessa condição e trazer benefícios para a saúde óssea.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da restrição calórica como tratamento dietético na saúde óssea de camundongos com obesidade induzida por uma dieta rica em gordura.

3.2 Objetivos específicos

- I) Avaliar o impacto do tratamento com restrição calórica em alterações metabólicas induzidas por dieta rica em gorduras;
- II) Avaliar a microarquitetura óssea do fêmur em camundongos submetidos à dieta rica em gorduras e tratados com restrição calórica;
- III) Quantificar a presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos após restrição calórica
- IV) Investigar a influência da restrição calórica sobre marcadores sistêmicos de remodelação óssea.
- V) Verificar a influência da restrição calórica na expressão gênica de marcadores envolvidos no remodelamento ósseo após alimentação com dieta rica em gorduras;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Protocolo experimental dos animais

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 245/2022. Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com 12 semanas de idade. Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos experimentais: (i) camundongos alimentados com dieta Labina® (C) e (ii) camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HF) - 45% do total da dieta. À medida que os animais do grupo HF alcançaram 40 gramas (média de 12 semanas para a indução de obesidade), alguns permaneciam com a mesma dieta e outros eram direcionados ao terceiro grupo: (iii) camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, seguida pela intervenção dietética por meio de restrição calórica (RC). Essa intervenção ocorreu com a troca da dieta HF pela dieta Labina® comercial, sendo submetidos a esse protocolo pelo período de 35 dias (5 semanas), conforme delineamento experimental apresentado na **Figura 3**.

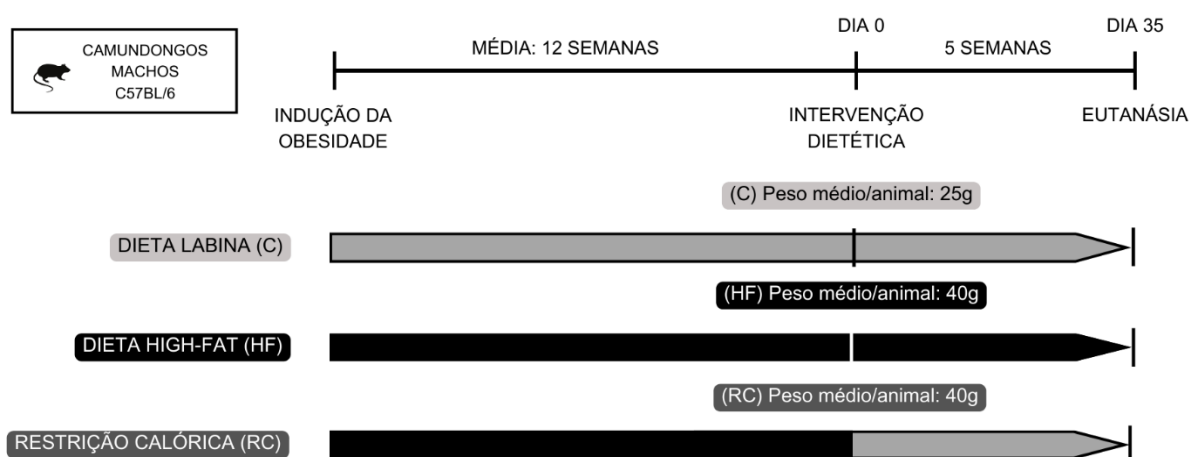


Figura 3. Delineamento experimental.

Os camundongos foram mantidos em caixas, em uma sala controlada ($25.4^{\circ}\text{C} \pm 3.4^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro-escuro de 12h:12h (luz acessa às 7h = ZT 0; luz apagada às 19h = ZT 12) e foram alimentados com o protocolo alimentar estabelecido e livre acesso à água. Todos os animais foram obtidos do Biotério Central da

Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos em um biotério no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG.

4.2. Composição das dietas

A composição de macronutrientes da ração Labina® era de 65,8% carboidrato, 3,1% lipídeo e 31,1% proteína (4,15 kcal/g). Já a composição de macronutrientes da dieta HF era de 39% carboidratos, 44% de gordura e 17% de proteína (6,20 kcal/g). Os ingredientes da dieta HF podem ser observados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Composição da dieta *high-fat* 45% (HF).

Ingrediente	Quantidade (g)
BHT	0,040
Bitartaro de colina	2,0
Metionina	4,0
Vitaminas AIN93M	12,0
Minerais	42,0
Celulose	60,0
Amido de milho	253,0
Caseína	241,0
Óleo de soja	60,0
Groselha	181,0
Banha	145,0

4.3 Consumo alimentar e acompanhamento de peso corporal

Durante todo o período experimental, os animais foram pesados uma vez por semana e o consumo da dieta foi mensurado duas vezes por semana. A ingestão alimentar foi calculada subtraindo o peso da ração remanescente pelo peso inicial. A partir do cálculo de consumo alimentar, também foi possível avaliar o consumo energético durante o experimento. Para a avaliação de ganho ou perda de peso por

meio da alteração de quantidade do tecido adiposo, os tecidos adiposos brancos epididimal, inguinal, retroperitoneal e mesentérico foram pesados após a eutanásia.

4.4 Teste de tolerância oral a glicose (TTOG)

Na quarta semana de intervenção dietética, realizou-se o TTOG. Para tal, os animais foram submetidos ao jejum de 6 horas e receberam, via gavagem, D-glicose na dose de 0,2g/100g de peso corporal. Após a gavagem, a concentração de glicose foi mensurada nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. O sangue foi obtido por meio de um corte na cauda dos animais e avaliado pelo glicosímetro Accu-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA).

4.5 Eutanásia

Ao final da quinta semana de tratamento, os animais ficaram em jejum por 6 horas, seguida por eutanásia por meio de exsanguinação. Os animais receberam anestesia geral por injeção intraperitoneal de uma solução de quetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg), diluídas em NaCl 0,9%. Durante a eutanásia foram coletados: o sangue, para a obtenção do soro; joelho, fêmur e tíbia, para as análises do tecido ósseo; e os tecidos adiposos, epididimal (TAE), mesentérico (TAM), retroperitoneal (TAR) e subcutâneo (TAS), que foram pesados. TAE, TAS, soro e tíbia foram armazenados em freezer -80°C. A partir do joelho, foi obtido um corte transversal no fêmur proximal para obtenção de corte histológico. Esse tecido foi fixado em formol 4%, descalcificado em EDTA 14% e conservadas em álcool 70% para posterior análise histológica. A partir da tíbia foram feitas as análises por PCR em tempo real. As amostras do fêmur foram fixadas em formol 4% e armazenadas em álcool para análise de microtomografia computadorizada.

4.6 Microtomografia computadorizada (MicroCT)

As amostras de fêmur fixadas em formalina tamponada (4%) foram escaneadas utilizando um MicroCT, 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 foi utilizado o software Datawiew (Bruker, Kontich, Bélgica), enquanto as análises morfológicas do osso trabecular e cortical utilizou-se o software CTAnalyzer (Bruker, Kontich, Bélgica). O alinhamento foi realizado de forma longitudinal, na região proximal do fêmur, sendo considerados 135 cortes a partir do disco epifisário. O tecido foi analisado para determinar no osso trabecular 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). Na região cortical, foi avaliada a área cortical (Ct.Ar), área total (Tt.Ar), a proporção da área cortical em relação à área total (Ct.Ar/Tt.Ar) e a espessura transversal (Ct.Th), sendo considerados 135 cortes a partir do disco epifisário.

4.7 Análise histológica

4.7.1 Tecido ósseo

Para o processamento histológico, as amostras de fêmur foram coletadas e foram fixadas com solução de formol 4% tamponado. Após o período de fixação de no máximo 48 horas, as amostras de fêmur foram conservadas em álcool 70% para posterior utilização. As amostras passaram pelo processo de descalcificação com EDTA 14% e pH: 7,2 por 28 dias com trocas de solução a cada 3-4 dias. Os tecidos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Os ossos do fêmur foram seccionados no sentido póstero-anterior, com a realização de cortes de 5 µm por meio de microtomia.

A técnica Hematoxilina-Eosina (HE) foi utilizada para coloração dos cortes histológicos para avaliação de número de osteócitos no tecido. Para observar a atividade de osteoclastos, foi utilizada a coloração por TRAP. Para a observação do número de osteoblastos, utilizou-se a técnica Tricrômico de Masson (55). As lâminas obtidas foram avaliadas em microscópio de luz (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça) com câmera digital acoplada (Flexacam i5 Compound, Leica Microsystems, Suíça).

Para a contagem de osteócitos e osteoblastos, foram feitas cinco fotografias numa área padronizada da diáfise proximal, abaixo do disco epifisário. Para a contagem de osteoclastos, padronizou-se a contagem na metáfise. O número de osteócitos foi determinado no osso trabecular e foi normalizado pela medição da área óssea total na região de análise, enquanto os osteoblastos e osteoclastos foram normalizados pelo perímetro do osso avaliado e do disco epifisário, respectivamente. A densidade das células foi calculada dividindo o número de células contadas pela área/perímetro do osso avaliado. Em seguida foi calculada a média de valores para a obtenção do número de células. As imagens foram capturadas na objetiva de 40x. Para determinação da área óssea foi utilizado o programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

4.7.2 Tecido adiposo

Os tecidos adiposos epididimal e subcutâneo foram armazenados a -80°C após a eutanásia. Antes do processamento, foi feita a reidratação e lavagem em etanol. Posteriormente, as amostras foram fixadas em solução de formaldeído a 4% durante 24 horas. Em seguida, procederam-se etapas de desidratação em série crescente de álcoois, diafanização com xilol, e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5µm de espessura e colocadas em lâminas.

As lâminas coradas em HE foram avaliadas em microscópio de luz equipado com câmera digital. 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 pelo menos 100 adipócitos, presentes em até 5 imagens (objetiva de 40x) para cada animal.

4.8 Avaliações sorológicas

No soro foi quantificada a glicose por kit enzimático (Bioclin, Belo Horizonte, MG). As concentrações do ligante do receptor ativador kappa-B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), por sua vez, foram determinadas pelo ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay), segundo as instruções do fabricante (R&D System, Inc., Minneapolis, USA).

4.9 PCR em tempo real

Para a análise de PCR em tempo real foram utilizadas amostras de tibia. Para a extração do RNA, foi utilizado o kit Invitrogen PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies Corp, North America), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, foi adicionado às amostras tampão de lise com 2-mercaptoethanol, seguida de homogeneização com um homogeneizador rotor-estator (IKA, Staufen, Alemanha). Etanol foi adicionado ao lisado e a solução foi transferida para a coluna de extração. Após a centrifugação, foram feitas sucessivas lavagens do RNA com tampão de lavagem. Por fim, foi feita a eluição do RNA com água RNase-free.

A partir do RNA foi realizada a transcrição para obtenção do cDNA, para isso foi utilizado termociclador (BioRad T100, Hercules, Califórnia, EUA) e a enzima transcriptase reversa iScript cDNA Synthesis (BioRad T100, Hercules, Califórnia, EUA). O sistema ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) foi utilizado para a análise, e o SYBR® Green PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado.

A expressão gênica dos seguintes marcadores foi avaliada: RANKL, OPG e a relação RANKL/OPG, para avaliar o remodelamento ósseo; RUNX2, PPAR γ e a relação RUNX2/PPAR γ , para observar a diferenciação de osteoblastos e adipócitos; TNF, osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), esclerostina (SOST) e catepsina K, para analisar parâmetros relacionados à inflamação, mineralização, adesão celular e atividade de reabsorção óssea, respectivamente. Como controle foi utilizada expressão do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A sequência gênica dos primers dos marcadores mencionados acima está no **Quadro 1**.

Quadro 1. Relação de primers utilizados no PCR em tempo real.

MARCADOR	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
RANKL	5'- CGT GCA GAA GGA ACT GCA ACA C -3'	5'- TGG TGA GGT GTG CAA ATG GCT -3'
OPG	5'- TCA TCC AAG ACA TTG ACC TCT GTG A -3'	5'- GCT GCT CGC TCG ATT TGC AG -3'
RUNX2	5'- GGC CGG GAA TGA TGA GAA CTA -3'	5'- CAG ATC GTT GAA CCT GGC TAC TT -3'

PPARY	5'- ATC TCC GCC AAC AGC TTC T -3'	5'- TAA CTG CCG GAT CCA CAA A -3'
TNF	5'- ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC -3'	5'- AGA TAG CAA ATC GGC TGA CG -3'
OCN	5'- AAG CCT TCA TGT CCA AGC AGG -3'	5'- TTT GTA GGC GGT CTT CAA GCC -3'
OPN	5'- CCA ATG AAA GCC ATG ACC AC -3'	5'- CGT CAG ATT CAT CCG AGT CCA -3'
SOST	5'- TGT CAG GAA GCG GGT GTA GT -3'	5'- GAG CCT CCT CCT GAG AAC AA -3'
CATEPSINA K	5'- CTC CCT CTC GAT CCT ACA GTA ATG A -3'	5'- TCA GAG TCA ATG CCT CCG TTC -3'
GAPDH	5'- ACG GCC GCA TCT TCT TGT GCA -3'	5'- CGC CCA AAT CCG TTC ACA CCG A -3'

Os dados foram avaliados utilizando o método Delta-Delta CT ($\Delta\Delta CT$). O ΔCT de cada amostra foi calculado, e foi subtraído o valor de CT (threshold cycle ou ciclo limiar) de GAPDH, dos valores de CT dos genes avaliados. O cálculo do $\Delta\Delta CT$ foi realizado utilizando a seguinte fórmula: [ΔCT (amostra) - ΔCT (GAPDH)]. Após obtenção do valor de $\Delta\Delta CT$, a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizada para comparação da expressão gênica dos ossos dos animais dos grupos.

4.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo software GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Realizou-se o teste de normalidade de Kolmogorof-Smirnoff nas amostras para verificação da distribuição Gaussiana. Posteriormente, as comparações estatísticas entre os 3 grupos foram realizadas por *one-way* ANOVA, quando distribuição normal, ou Kruskal-Wallis, quando distribuição não normal. Em seguida, foi feito o pós-teste de Dunnett (3 grupos). Para o ganho de peso e TTOG foi utilizado *two-way* ANOVA, seguido de pós-teste Dunnett. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Restrição calórica reverte o aumento de peso, de adiposidade e alterações glicêmicas causadas pelo consumo de uma dieta rica em gorduras

Os dados de ingestão calórica mostram que o grupo que recebeu dieta HF consumiu mais calorias em média comparado ao grupo controle com dieta LABINA® (C) (Figura 4A). O grupo que foi submetido à restrição calórica (RC) demonstrou menor consumo de calorias comparado ao grupo HF (Figura 4A) no período de intervenção. A análise do peso corporal dos animais mostrou que enquanto os grupos C e HF mantiveram o peso, o grupo RC teve redução de peso corporal de $10,33 \pm 2,56$ gramas ao longo de 35 dias (Figura 4B). Como esperado, o índice de adiposidade indicou aumento da massa adiposa nos animais alimentados com dieta HF comparados ao grupo controle, mas houve redução do tecido adiposo branco no grupo RC (Figura 4C). Essas alterações na adiposidade foram associadas com o aumento na hipertrofia dos adipócitos no grupo HF comparado ao controle, sendo observada uma redução naqueles com RC comparado aos animais alimentados com dieta HF, tanto no tecido adiposo epididimal (Figuras 4D-F) como no tecido subcutâneo (Figuras 4G-I).

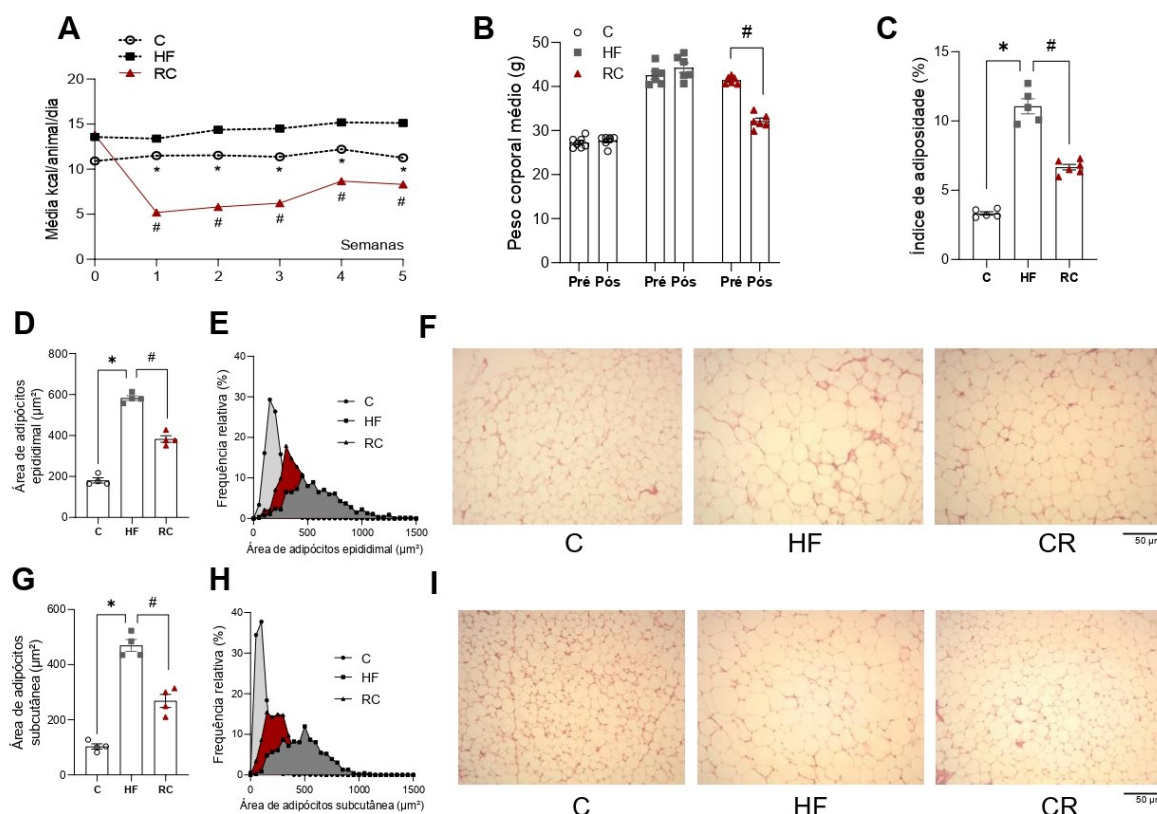


Figura 4. Alterações de peso corporal e adiposidade decorrentes do consumo calórico de dieta high-fat (HF) e intervenção dietética com restrição calórica (RC). (A) Consumo energético (Kcal de dieta por animal por dia), (B) Peso corporal médio antes e após o tratamento, (C) Índice de adiposidade [(soma do peso do tecido epididimal, subcutâneo, retroperitoneal e mesentérico (g)) ÷ peso corporal x 100], (D) Área de adipócitos epididimais, (E) Distribuição percentual de área de adipócitos epididimais, (F) Imagens representativas da área de adipócitos do tecido adiposo epididimal, em coloração hematoxilina-eosina, (G) Área de adipócitos subcutâneos, (H) Distribuição percentual de área de adipócitos subcutâneos, (I) Imagens representativas da área de adipócitos do tecido adiposo subcutâneo, em coloração hematoxilina-eosina. Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta *high-fat* (HF), ou tratados com dieta de restrição calórica (RC) durante 35 dias. Os dados representam média ± erro padrão da média de 4-6 animais por grupo. Análises feitas por meio do teste one-way ANOVA ou two-way ANOVA, seguidos pelo pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. RC.

No metabolismo glicêmico, foi possível observar que o grupo HF apresentou intolerância à glicose comparado aos animais controle representada pela curva glicêmica e área sob a curva do TTOG (Figuras 5A e B) associada a maior glicemia de jejum (Figura 5C). Os camundongos submetidos a RC apresentaram uma reversão na intolerância e glicemia de jejum quando comparados com o grupo HF (Figuras 5A-C).

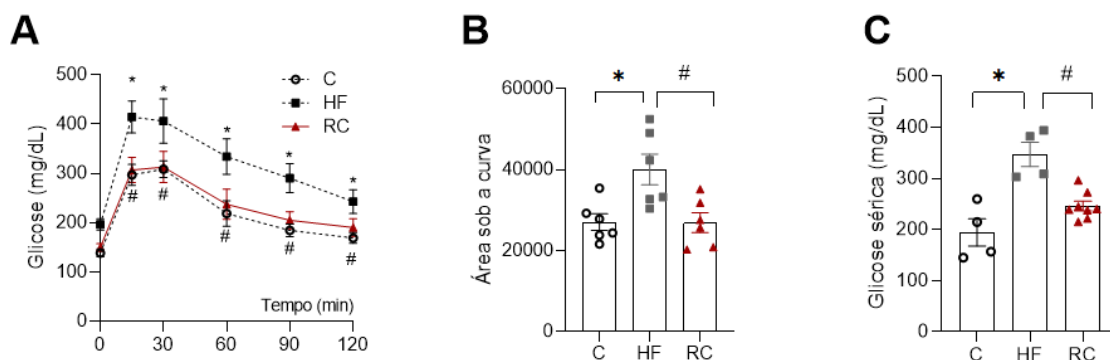


Figura 5. Alterações de metabolismo glicêmico decorrentes do consumo calórico de dieta high-fat (HF) e intervenção dietética com restrição calórica (RC). (A) Teste de tolerância oral à glicose, (B) Área sob a curva do TTOG, (C) Glicose sérica de jejum. Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta *high-fat* (HF), ou tratados com dieta de restrição calórica (RC) durante 35 dias. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média de 4-6 animais por grupo. Análises feitas por meio do teste one-way ANOVA ou two-way ANOVA, seguidos pelo pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. RC.

5.2 Restrição calórica reverte alterações da microarquitetura óssea trabecular em camundongos obesos, mas não interfere na cortical

A análise da microarquitetura óssea realizada pela micro-CT no fêmur mostrou que o grupo HF não apresentou alteração na BMD (Figura 6A e 6B), mas teve um aumento do BV/TV (Figura 6C) e Tb.N (Figura 6D), enquanto os valores de Tb.Sp (Figura 6E) apresentaram-se reduzidos em relação aos animais controle. Por outro lado, os camundongos com RC demonstram menor BMD (Figura 6A e 6B), BV/TV (Figura 6C) e Tb.N (Figura 6D) associado a maior Tb.Sp (Figura 6E) comparado com os animais alimentados com dieta HF. Os valores de Tb.Th (Figuras 6F e 6G) e SMI (Figura 6H) não apresentaram diferença significativa entre os grupos avaliados.

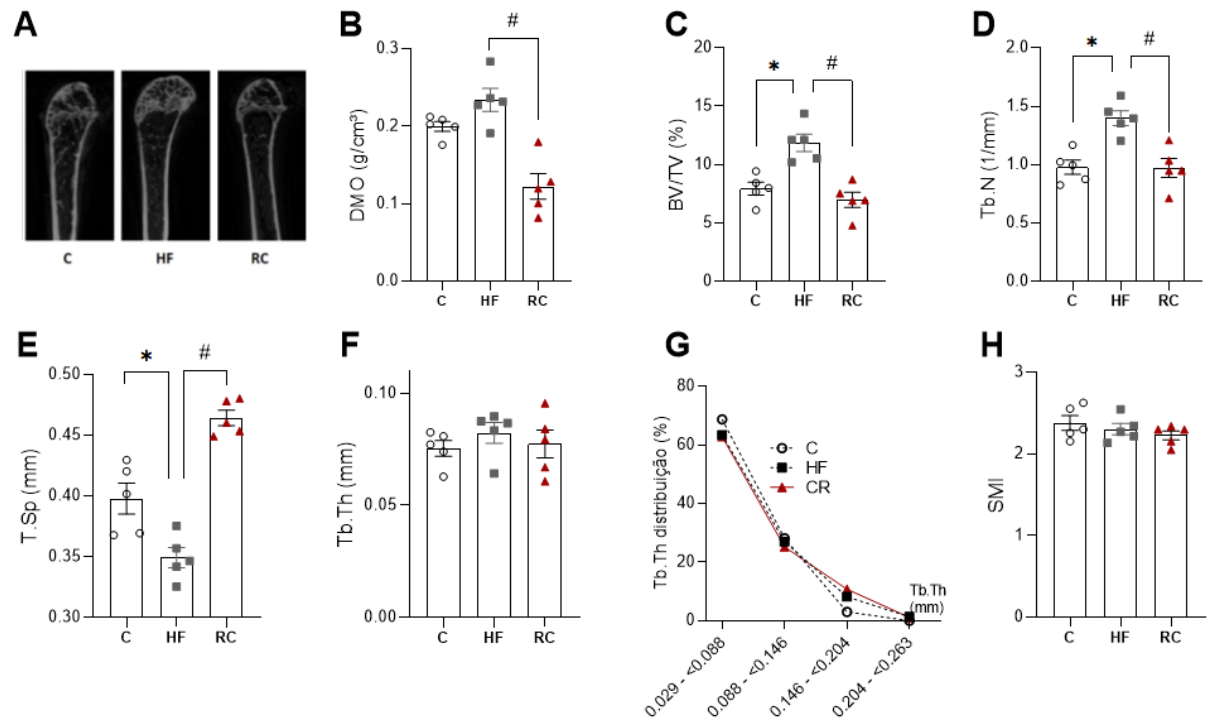


Figura 6. Análise da região trabecular do fêmur de camundongos por meio de microtomografia computadorizada. (A) Imagens representativas de corte da porção sagital do fêmur, (B) Densidade mineral óssea (BMD), (C) Percentual volume ósseo/volume do tecido (BV/TV), (D) Número de trabéculas (Tb.N), (E) Separação entre as trabéculas (Tb.Sp), (F) Espessura de trabéculas (Tb.Th), (G) Distribuição percentual da espessura de trabéculas (Tb.Th - %) (H) Índice de modelo da estrutura (SMI). Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta *high-fat* (HF), ou tratados com dieta de restrição calórica (RC) durante 35 dias. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média de 5 animais por grupo. Análises feitas por meio do teste one-way ANOVA, seguidos pelo pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. RC.

Ao ser avaliado o osso cortical por micro-CT, nenhuma diferença na microarquitetura óssea cortical foi encontrada entre os grupos considerando área total (Tt.Ar), área cortical (Ct.Ar), proporção da área cortical em relação à área total (Ct.Ar/Tt.Ar) e espessura transversal (Ct.Th) (Figuras 7A-E).

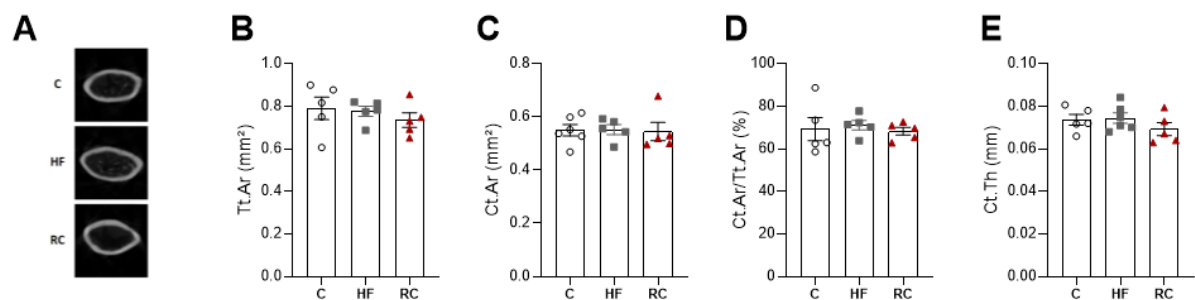


Figura 7. Análise da região cortical do fêmur de camundongos por meio de microtomografia computadorizada. (A) Imagens representativas de corte da porção axial do fêmur, (B) Área total (Tt.Ar), (C) Área cortical (Ct.Ar), (D) Proporção da área cortical em relação à área total (Ct.Ar/Tt.Ar - %), (E) Espessura transversal (Ct.Th). Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta *high-fat* (HF), ou tratados com dieta de restrição calórica (RC) durante 35 dias. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média de 5 animais por grupo. Análises feitas por meio do teste one-way ANOVA, seguidos pelo pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. RC.

5.3 A restrição calórica altera a relação RANKL/OPG nos animais com obesidade

Em marcadores do metabolismo ósseo sistêmico, não houve diferença significativa entre os grupos para RANKL (Figura 8A) e OPG (Figura 8B). Apesar de não ter sido observada diferença na relação RANKL/OPG entre os animais alimentados com dieta HF e grupo controle, os camundongos que receberam a intervenção com a RCA apresentaram um aumento nesta relação comparado ao grupo HF (Figura 8C).

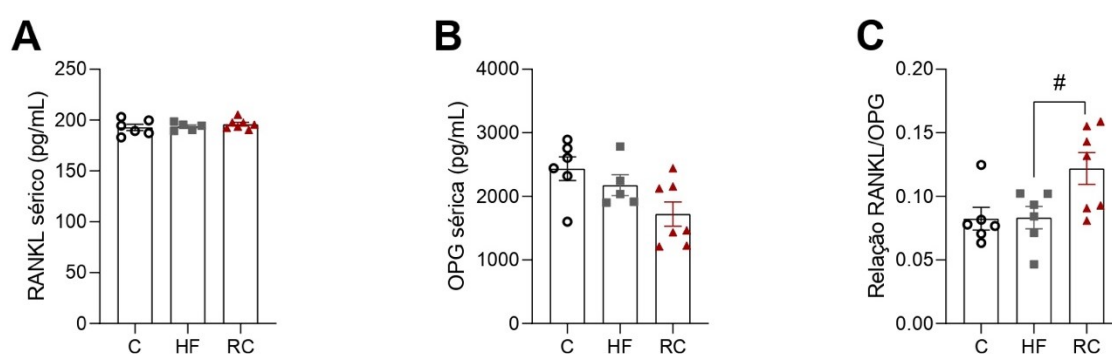


Figura 8. Dosagem sérica de marcadores sistêmicos de remodelamento ósseo. (A) RANKL sérico, (B) OPG sérica e (C) Relação RANKL/OPG. Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta *high-fat* (HF), ou tratados com dieta de restrição calórica (RC) durante 35 dias. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média de 6 animais por grupo. Análises feitas por meio do teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. RC.

5.4 Restrição calórica aumenta número de osteoblastos e osteoclastos no fêmur, sem afetar osteócitos

Na análise histológica do fêmur, observou-se que o grupo HF apresentou um número estatisticamente menor de osteoblastos (Figuras 9A e 9B), assim como de osteoclastos (Figuras 9C e 9D) em relação ao grupo controle. Paralelamente, o grupo RC apresentou um aumento nas mesmas células comparado com aqueles animais alimentados com dieta HF (Figuras 9A-D). Em relação aos osteócitos, não houve diferença entre os grupos avaliados (Figuras 9E e 9F).

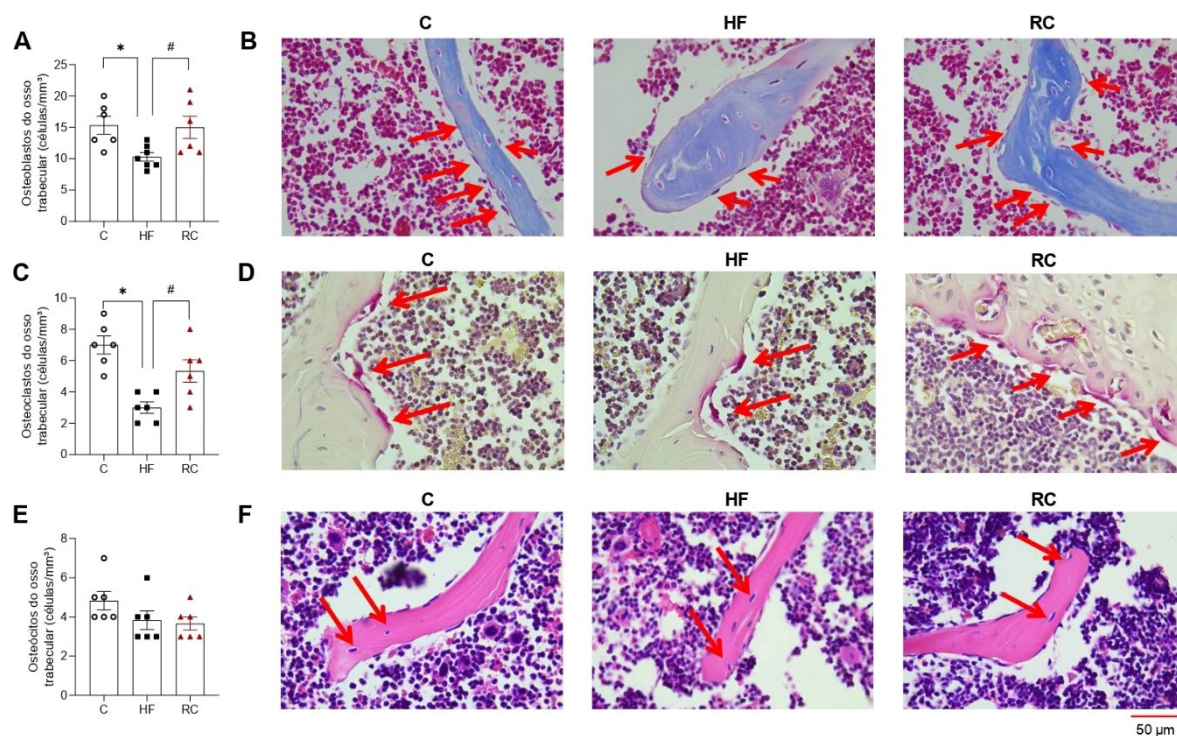


Figura 9. Análise histológica de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos em fêmur de camundongos. (A) Contagem de osteoblastos na diáfise proximal do fêmur, abaixo do disco epifisário, (B) Imagens representativas de osteoblastos no fêmur (40x), (C) Contagem de osteoclastos na metáfise do fêmur, (D) Imagens representativas de osteoclastos no fêmur (40x), (E) Contagem de osteócitos na diáfise proximal do fêmur, abaixo do disco epifisário, (F) Imagens representativas de osteócitos no fêmur (40x). Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta *high-fat* (HF), ou tratados com dieta de restrição calórica (RC) durante 35 dias. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados por meio do teste one-way ANOVA, seguidos pelo pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. RC.

5.5 Restrição calórica não influencia na expressão gênica de marcadores de remodelamento e qualidade óssea

A análise da expressão de mRNA realizada por PCR em tempo real na tíbia mostrou que não houve diferença significativa na expressão de RANKL e OPG, assim como na relação RANKL/OPG, marcadores de formação e reabsorção óssea (Figuras 10A-C). Em relação à diferenciação de osteoblastos e adipócitos, representada pelos marcadores RUNX2 e PPARY, respectivamente, assim como a proporção entre eles não apresentaram diferença significativa (Figuras 10D-F). Os marcadores TNF, osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), e catepsina K, para analisar parâmetros relacionados à inflamação, mineralização, adesão celular e atividade de reabsorção óssea também não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figuras G a K).

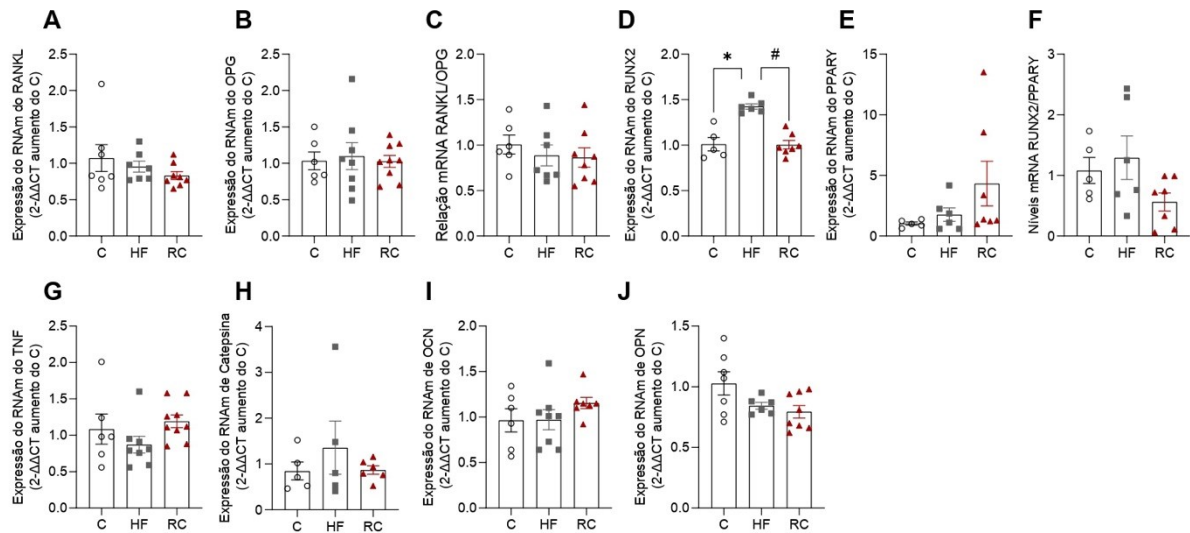


Figura 10. Análise da expressão gênica de marcadores de remodelamento e qualidade óssea na tíbia de camundongos por PCR em tempo real. Análise da expressão de (A) RANKL, (B) OPG, (C) Relação RANKL/OPG (D) RUNX2, (E) PPARY, (F) Relação RUNX2/PPARY, (G) TNF, (H), Cathepsina K, (I) osteocalcina (OCN), (J) osteopontina (OPN). Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta *high-fat* (HF), ou tratados com dieta de restrição calórica (RC) durante 35 dias. Os dados representam média ± erro padrão da média de 4-8 animais por grupo. Os dados foram analisados por meio do teste one-way ANOVA, seguidos pelo pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. RC.

6. DISCUSSÃO

O excesso de adiposidade torna o indivíduo mais suscetível a fraturas, tanto pelo aumento da fragilidade óssea, como também pelo maior risco de queda (8). A RC é uma estratégia nutricional muito utilizada no tratamento da obesidade, tendo em vista que o déficit calórico é fundamental para a perda de peso. Estudos mostram os benefícios da RC na longevidade e prevenção de doenças crônicas, porém os efeitos na saúde óssea são mais complexos, apresentando aspectos contraditórios. O presente trabalho demonstrou que a RC reverteu as alterações nos parâmetros da microarquitetura óssea trabecular em camundongos obesos ao reduzir a aumentada massa óssea no fêmur. Esse efeito foi associado com o aumento do número de osteoblastos e osteoclastos no mesmo tecido e da relação RANKL/OPG no soro. No entanto, a restrição calórica não influenciou a expressão gênica de marcadores de diferenciação celular, remodelamento e qualidade óssea. Ao serem avaliados aspectos metabólicos relacionados com a obesidade, a restrição calórica reduziu o peso corporal e a adiposidade apresentada pelos camundongos alimentados com dieta rica em gorduras, revertendo consequentemente as alterações metabólicas.

Neste trabalho, a indução da obesidade por meio da dieta HF apresentou o aumento do volume ósseo e número de trabéculas, assim como um menor espaçamento entre trabéculas, indicando maior massa óssea. No estudo de Malvi et al (56), observou-se que uma dieta HF contribuiu para o alcance do pico de massa óssea em ratos jovens mesmo após a retirada da dieta HF, sugerindo que o aumento da massa óssea poderia ter sido causado pelo aumento da atividade de osteoblastos, por meio de um aumento de fosfatase alcalina. Yanagihara et al (57) também observou aumento de DMO em ratos jovens alimentados com dieta HF, que foi implicada como uma consequência do aumento de peso. Em contraste, outros estudos demonstram uma perda óssea em modelos de obesidade induzida por dieta, tanto em camundongos alimentados com dieta HF (58), como ratos alimentados com dieta de cafeteria (59). Halade et al (60) observaram o aumento da reabsorção óssea em camundongos alimentados com uma dieta HF, indicando que houve aumento da inflamação mediada pelo acúmulo de adipócitos na medula óssea. Essa inflamação pode consequentemente aumentar a osteoclastogênese, enquanto reduz o desenvolvimento de osteoblastos. Por outro lado, estudo de Tian et al (61) analisou o

efeito da dieta HF ou rica em frutose em camundongos, a curto e longo prazo, o qual observaram, em ambas as dietas, aumento da DMO em curto prazo, mas com sua diminuição em longo prazo. Os autores propuseram que o aumento de peso poderia estar associado a maior carga mecânica, ao estimular a proliferação e diferenciação de osteoblastos e osteócitos por meio da via de sinalização Wnt/ β -catenina, promovendo a formação óssea. Porém, o aumento de massa óssea não necessariamente estaria ligado à melhor qualidade óssea, uma vez que a qualidade óssea envolve outras propriedades biofísicas, como a força (62). A longo prazo, os camundongos apresentaram maior expressão de TNF- α , indicando maior inflamação sistêmica, além de maior quantidade de tecido adiposo na medula óssea (61).

Em nossos resultados a expressão gênica de TNF- α no osso não apresentou diferença significativa entre os grupos. Porém, existem outras citocinas que podem ser avaliadas, como a IL-6, para demonstrar o processo inflamatório característico da obesidade, assim como explorar a via NF- κ B que ao ser ativada promove a expressão de RANKL, sendo essencial para a diferenciação e ativação dos osteoclastos (63). Dados em humanos mostram que pacientes com obesidade apresentam aumento de massa óssea relacionada ao IMC (64,65). Contudo, utilizando o índice de peso ajustado pela circunferência do quadril, foi observado uma relação negativa com a DMO, indicando que o tecido adiposo visceral pode influenciar negativamente o tecido ósseo (66). Em nosso estudo, camundongos alimentados com dieta HF apresentaram aumento de peso muito significativo em relação ao grupo controle, o que pode estar relacionado ao aumento do volume ósseo observado. No geral, os resultados obtidos associados aos da literatura podem indicar uma adaptação do organismo ao excesso de peso dependente do tempo de exposição à dieta obesogênica, média de ganho de peso e momento da vida do camundongo, sendo envolvidos por diferentes mecanismos, como a via de sinalização Wnt, a atuação de citocinas inflamatórias, enzimas como a fosfatase alcalina, e hormônios como a leptina.

Em relação às células ósseas e metabolismo ósseo, os efeitos observados pela dieta HF neste trabalho foram inesperados. Apesar do aumento do volume ósseo observado nos animais alimentados com dieta HF, o número de osteoblastos estava reduzido em relação ao controle, enquanto a expressão de RUNX2, o principal fator de transcrição para diferenciação de osteoblastos, estava aumentada. A relação entre

PPAR γ e RUNX2 influencia significativamente a regulação do tecido adiposo e do tecido ósseo. PPAR γ é um fator de transcrição crítico para a adipogênese, promovendo a formação de adipócitos, e sua ativação pode inibir a expressão de RUNX2, diminuindo a osteogênese (67). Devido à obesidade, esperava-se uma alteração na relação entre os dois genes, porém não foi encontrada. Já o número de osteoclastos também estava reduzido, enquanto a catepsina K, que mostra atividade dos osteoclastos, não apresentou diferença significativa. Zhu et al (68) também encontraram menor número de osteoblastos em camundongos alimentados com dieta HF, enquanto o número de osteoclastos não teve alterações significativas. Já Montalvany-Antonucci et al (69) observaram a redução de osteoblastos e aumento de osteoclastos no osso alveolar de camundongos obesos alimentados com dieta rica em carboidratos. Por outro lado, Tian et al (61) avaliaram a expressão de RUNX2 e catepsina K a curto prazo e a longo prazo, em camundongos alimentados com dieta HF e dieta rica em frutose. A expressão de mRNA de RUNX2 foi regulada positivamente a curto prazo, mas regulada negativamente a longo prazo nos camundongos em ambas as dietas. A expressão de mRNA de catepsina K apresentou resultados quase semelhantes, foi regulada positivamente a curto prazo em camundongos com dieta HF, mas regulada negativamente a longo prazo em ambas as dietas. Portanto, observou-se uma discrepância entre fenótipo e expressão gênica no contexto de remodelamento ósseo em nosso trabalho. Essas diferenças poderiam ser explicadas por mecanismos como mudanças pós-transcricionais, que também podem influenciar a formação óssea (70). Além disso, os marcadores séricos e de expressão gênica de RANKL, OPG, assim como a relação RANKL/OPG também não apresentaram diferenças significativas nos camundongos obesos. Em relação ao RANKL, OPG e relação RANKL/OPG, há estudos mostrando maior expressão de RANKL (60,71) e maior relação RANKL/OPG (69,71) em camundongos obesos, o que indicaria uma maior atividade dos osteoclastos no contexto de obesidade. Esses estudos, em conjunto com o trabalho apresentado, permitem inferir que o remodelamento ósseo é influenciado pelo tempo de exposição à dieta, como também que outras vias metabólicas estão influenciando no fenótipo celular e expressão gênica - como por exemplo, a ação de citocinas inflamatórias e da leptina, que são aumentadas no contexto de obesidade e atuam negativamente a saúde óssea (31,72).

Os níveis de RANKL e OPG são alterados de acordo com os níveis de leptina, inibindo a formação óssea (73,74).

Tratamentos para a obesidade têm sido amplamente baseados na RC por causar déficit calórico e consequentemente a perda de adiposidade, mas o estudo de seus efeitos e a preocupação com a saúde óssea ainda estão em ascensão (75). Em humanos, um estudo com RC muito relevante é o CALERIE (*Comprehensive Assessment of Long Term Effects of Reducing Intake of Energy*). Na segunda fase do estudo, foi avaliado o efeito de 25% de RC por 2 anos em marcadores de remodelamento ósseo e na DMO em adultos jovens saudáveis. O grupo RC apresentou menor DMO na coluna lombar, quadril e colo femoral (76). Os resultados poderiam indicar um motivo de preocupação para a saúde óssea no contexto da perda de peso. Entretanto, outro estudo utilizou equações preditivas e regressão múltipla com o banco de dados do CALERIE, comparando a BMD medida por DEXA e a BMD esperada a partir dos modelos preditivos. Eles não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os valores reais e esperados, e assim, concluíram que a perda óssea foi proporcional à quantidade de peso perdido (77). Em nosso estudo, animais obesos que foram submetidos ao tratamento com RC apresentaram uma perda óssea significativa em relação ao grupo não tratado, similar ao observado no estudo CALERIE. Em outro trabalho, Behrendt et al (78) avaliaram a RC em camundongos ao longo da vida, comparando com RC de curto prazo em camundongos idosos, para observar o desenvolvimento da osteoporose. Os resultados mostraram que a RC pode reduzir a densidade mineral óssea cortical e a espessura nos grupos avaliados. Por outro lado, a RC ao longo da vida teve efeitos benéficos na densidade mineral óssea trabecular e na microarquitetura óssea das vértebras lombares. Entretanto, esses efeitos não foram observados após RC de curto prazo em camundongos idosos. Assim, os ossos mostraram uma capacidade de compensação ao longo da vida ao reorganizar o osso trabecular. Já Montalvany-Antonucci et al (79) mostraram que camundongos alimentados com dieta HF por 8 semanas tiveram redução de DMO e maior espaçamento entre trabéculas. Além disso, observaram um menor número de osteoblastos e maior de osteoclastos, que foram revertidos com a restrição dietética, mostrando um efeito positivo da RC no osso. Porém, nesse estudo o modelo de RC realizado ofereceu menor quantidade de dieta HF, não mudando o perfil da dieta para dieta padrão. Em contraste, Shen et al

(80) encontraram resultados similares aos apresentados neste trabalho. Eles induziram a obesidade por meio de dieta HF em ratas Sprague-Dawley, das quais parte continuou recebendo dieta HF e o restante foi feita a RC. Nas ratas com apenas dieta HF, observaram um aumento de DMO, área total óssea e cortical, enquanto no grupo RC houve a reversão destes parâmetros, apresentando um efeito negativo da RC no osso. Duque et al (81) avaliaram ratos Sprague-Dawley machos submetidos por 12 meses a RC, em que os grupos foram alimentados com fontes proteicas diferentes: caseína e soja. Houve uma diminuição significativa no BV/TV em ambos os grupos com RC, então os autores também consideraram que a RC teve efeito negativo no osso, independentemente da fonte de proteína da dieta. A inconsistência nos resultados dos estudos de RC pode ser atribuída aos diferentes protocolos experimentais, como o grau de restrição e a duração da intervenção dietética, bem como às diferentes idades dos animais estudados. Além disso, não há uma definição clara se as alterações observadas, principalmente aquelas relacionadas a redução da microarquitetura óssea, seriam consideradas prejudiciais ou não, tendo em vista os diferentes benefícios relacionados a prática da RC como tratamento da obesidade. Embora a RC possa influenciar a microarquitetura óssea, ainda não é possível concluir se essas mudanças afetam negativamente a qualidade óssea em termos funcionais. A combinação de marcadores bioquímicos e testes de rigidez e/ou mineralização forneceria uma visão mais abrangente dos mecanismos moleculares envolvidos nas mudanças observadas na massa, qualidade e funcionalidade óssea, no qual se especula uma adaptação do osso de acordo com o contexto de obesidade ou RC. Portanto, uma abordagem futura que combine esses parâmetros pode proporcionar uma compreensão mais completa dos efeitos da RC no metabolismo ósseo, e assim, esclarecer se o efeito ósseo observado na RC é uma resposta fisiológica proporcional à diminuição de carga mecânica por meio da perda de peso.

No presente trabalho, foi observado o aumento no número de osteoblastos e osteoclastos observados na RC. Isso pode estar relacionado à ativação do ciclo de remodelação óssea, em que os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea, e os osteoclastos, envolvidos na reabsorção óssea, desempenham papéis críticos na manutenção do equilíbrio ósseo (3). A elevação na relação RANKL/OPG sugere uma maior osteoclastogênese, uma vez que o RANKL promove a formação e atividade dos osteoclastos, enquanto a osteoprotegerina (OPG) atua como um inibidor competitivo

do RANKL, protegendo o osso da reabsorção excessiva (1). A constância nos osteócitos, que são os principais mecanossensores do osso e reguladores da remodelação óssea (82), indica que, apesar das alterações observadas, a capacidade de resposta mecânica do osso pode ter sido preservada, mantendo o papel dos osteócitos na modulação da atividade dos osteoblastos e osteoclastos sob RC. Esta análise traz uma contribuição para a literatura, uma vez que nos estudos de RC estes parâmetros não são comumente analisados, assim como a expressão gênica de marcadores como a osteocalcina, osteopontina e catepsina K.

A indução da obesidade em modelos experimentais causa o aumento de peso corporal e de adiposidade, que está associado à hipertrofia dos adipócitos e ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias no tecido adiposo. Além disso, tem diversas consequências metabólicas, incluindo inflamação, resistência à insulina e deposição ectópica de gordura no fígado (83). Neste trabalho, foi observado o aumento de adiposidade, ganho de peso, assim como alterações no metabolismo glicêmico com a dieta HF, sendo que essas alterações foram revertidas com a RC. O aumento de adiposidade e alterações metabólicas presentes na obesidade têm sido associadas com disfunções ósseas. Wei et al (84) mostraram que a resistência à insulina se desenvolve no osso como resultado da perda de receptores de insulina associada à lipotoxicidade. A resistência à insulina em osteoblastos levou a uma diminuição nos níveis circulantes da forma ativa da osteocalcina, diminuindo assim a sensibilidade à insulina no músculo esquelético. Outro fator relevante é a leptina, hormônio ligado ao metabolismo energético, que também influencia no metabolismo ósseo. Em modelos de crescimento compensatório induzido por dieta HF, a administração de um antagonista de leptina durante esse período prejudicou a formação óssea, sugerindo que a leptina exerce um efeito protetor na manutenção do metabolismo ósseo equilibrando a expressão de OPG e RANKL (74). Além disso, a diminuição dos níveis de adiponectina, frequentemente observada na obesidade, pode reduzir a proteção contra a reabsorção óssea, exacerbando os efeitos negativos das citocinas inflamatórias (85). Entretanto, não é muito clara essa associação das alterações metabólicas e saúde óssea no contexto da RC.

Nosso trabalho mostrou uma melhora nas alterações metabólicas e adiposidade observadas nos camundongos alimentados com dieta HF quando

tratados com a RC. A expansão do tecido adiposo na medula óssea (BMAT) é influenciado por diferentes fatores, incluindo envelhecimento, uso de medicamentos corticoides, e a RC (86). Devlin et al (16,87) observaram o aumento de BMAT com a RC, o que pode estar associado a uma perda de massa óssea e à fragilidade óssea. Apesar de não ter sido avaliado em nosso estudo a presença dos adipócitos no osso, observa-se uma tendência para aumento de PPAR γ em relação àqueles animais obesos não tratados, o que poderia indicar um favorecimento a diferenciação de adipócitos em detrimento dos osteoblastos. Entendemos que a RC é uma alternativa terapêutica com benefícios evidentes, principalmente metabólicos, contudo, sugerimos que o impacto negativo no osso parece existir a fim de alcançar novamente a homeostase, tendo em vista que o remodelamento ósseo é um processo dinâmico. Assim, supomos que alternativas adjuvantes a RC podem ser necessárias a fim de preservar a saúde óssea neste contexto.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. A análise foi direcionada para estrutura óssea e marcadores específicos de remodelamento ósseo, não abrangendo outras vias metabólicas regulatórias que também poderiam influenciar a saúde óssea. Outro aspecto importante a se considerar é que o osso é um tecido dinâmico, e o aumento do impacto no osso devido ao peso corporal pode desencadear uma resposta adaptativa de aumento da massa óssea. No entanto, a literatura demonstra que essas alterações na composição corporal podem prejudicar a saúde óssea. Portanto, seria necessário avaliar a qualidade óssea de maneira mais aprofundada, utilizando análises de rigidez óssea ou composição da matriz óssea. Por fim, para ampliar os conhecimentos obtidos neste estudo, futuras pesquisas poderiam explorar outras abordagens, como a combinação da RC com exercícios físicos ou o uso de suplementos nutricionais. Essas intervenções combinadas poderiam revelar abordagens mais eficazes para o manejo da saúde óssea no contexto da obesidade.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a dieta HF levou a um aumento na massa óssea trabecular, um efeito que pode ser entendido como uma adaptação do organismo frente ao excesso de peso. Esse efeito não parece benéfico devido às consequências adversas na saúde metabólica e ao aumento da adiposidade induzidas pela dieta HF. Em contrapartida, a RC mostrou ser uma estratégia de tratamento válida para a obesidade, revertendo completamente os aumentos na adiposidade e as alterações no metabolismo glicêmico induzidas pela dieta HF. Contudo, no contexto ósseo, a RC induziu o retorno aos parâmetros basais, o que pode ser sugerido como uma redução proporcional à perda de peso. Ainda assim, é crucial investigar mais essa reversão óssea induzida pela RC para determinar seu real impacto na saúde óssea. Desta maneira, apesar dos benefícios da prática de RC, é necessário considerar cuidadosamente seus efeitos sobre o tecido ósseo, o que pode indicar a necessidade de intervenções complementares na prática clínica, especialmente em indivíduos com alterações ósseas decorrentes da obesidade.

REFERÊNCIAS

1. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. Vol. 9, Cells. NLM (Medline); 2020.
2. Ansari M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. Vol. 8, Progress in Biomaterials. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2019. p. 223–37.
3. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Vol. 2015, BioMed Research International. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
4. Zhou R, Guo Q, Xiao Y, Guo Q, Huang Y, Li C, et al. Endocrine role of bone in the regulation of energy metabolism. Vol. 9, Bone Research. Springer Nature; 2021.
5. Veis DJ, O'brien CA. Osteoclasts, Master Sculptors of Bone. Rev Pathol Mech Dis [Internet]. 2023;18:2022. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-2023-18:2022>.
6. Fuglsang-Nielsen R, Rakvaag E, Vestergaard P, Hartmann B, Holst JJ, Hermansen K, et al. Consumption of nutrients and insulin resistance suppress markers of bone turnover in subjects with abdominal obesity. Bone. 2020 Apr 1;133.
7. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. New England Journal of Medicine. 2017 Jan 19;376(3):254–66.
8. Rinonapoli G, Pace V, Ruggiero C, Ceccarini P, Bisaccia M, Meccariello L, et al. Obesity and bone: A complex relationship. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2021.
9. Benova A, Tencerova M. Obesity-Induced Changes in Bone Marrow Homeostasis. Vol. 11, Frontiers in Endocrinology. Frontiers Media S.A.; 2020.
10. Wen X, Zhang B, Wu B, Xiao H, Li Z, Li R, et al. Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. Vol. 7, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2022.
11. Hofer SJ, Carmona-Gutierrez D, Mueller MI, Madeo F. The ups and downs of caloric restriction and fasting: from molecular effects to clinical application. EMBO Mol Med. 2022 Jan 11;14(1).
12. Hwangbo DS, Lee HY, Abozaid LS, Min KJ. Mechanisms of lifespan regulation by calorie restriction and intermittent fasting in model organisms. Vol. 12, Nutrients. MDPI AG; 2020.
13. Acosta-Rodríguez VA, Rijo-Ferreira F, Green CB, Takahashi JS. Importance of circadian timing for aging and longevity. Vol. 12, Nature Communications. Nature Research; 2021.
14. Most J, Redman LM. Impact of calorie restriction on energy metabolism in humans. Vol. 133, Experimental Gerontology. Elsevier Inc.; 2020.
15. Liu L, Rosen CJ. New Insights into Calorie Restriction Induced Bone Loss. Vol. 38, Endocrinology and Metabolism. Korean Endocrine Society; 2023. p. 203–13.
16. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, et al. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. Journal of Bone and Mineral Research. 2010 Sep;25(9):2078–88.
17. De Paula FJA, Rosen CJ. Bone Remodeling and Energy Metabolism: New Perspectives. Vol. 1, Bone Research. Sichuan University; 2013. p. 72–84.
18. Kenkre JS, Bassett JHD. The bone remodelling cycle. Vol. 55, Annals of Clinical Biochemistry. SAGE Publications Ltd; 2018. p. 308–27.

19. Ma C, Du T, Niu X, Fan Y. Biomechanics and mechanobiology of the bone matrix. Vol. 10, Bone Research. Springer Nature; 2022.
20. Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. Vol. 11, Frontiers in Pharmacology. Frontiers Media S.A.; 2020.
21. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. Vol. 51, Annals of Clinical Biochemistry. Royal Society of Medicine Press Ltd; 2014. p. 189–202.
22. Wang L, You X, Zhang L, Zhang C, Zou W. Mechanical regulation of bone remodeling. Vol. 10, Bone Research. Springer Nature; 2022.
23. Mizoguchi T, Ono N. The diverse origin of bone-forming osteoblasts. Vol. 36, Journal of Bone and Mineral Research. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 1432–47.
24. Jaschke N, Sipos W, Hofbauer LC, Rachner TD, Rauner M. Skeletal endocrinology: where evolutionary advantage meets disease. Vol. 9, Bone Research. Springer Nature; 2021.
25. Creecy A, Damrath JG, Wallace JM. Control of Bone Matrix Properties by Osteocytes. Vol. 11, Frontiers in Endocrinology. Frontiers Media S.A.; 2021.
26. Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by runx2. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2019.
27. Kitase Y, Prideaux M. Targeting osteocytes vs osteoblasts. Bone. 2023 May 1;170.
28. Tresguerres FGF, Torres J, López-Quiles J, Hernández G, Vega JA, Tresguerres IF. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. Vol. 227, Annals of Anatomy. Elsevier GmbH; 2020.
29. Compton JT, Lee FY. Current concepts review: A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. Vol. 96, Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume. Journal of Bone and Joint Surgery Inc.; 2014. p. 1659–68.
30. Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. Bone. 2017 Mar 1;96:29–37.
31. Xu J, Yu L, Liu F, Wan L, Deng Z. The effect of cytokines on osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling in osteoporosis: a review. Vol. 14, Frontiers in Immunology. Frontiers Media SA; 2023.
32. Li S, Liu G, Hu S. Osteoporosis: interferon-gamma-mediated bone remodeling in osteoimmunology. Vol. 15, Frontiers in Immunology. Frontiers Media SA; 2024.
33. Adejuyigbe B, Kallini J, Chiou D, Kallini JR. Osteoporosis: Molecular Pathology, Diagnostics, and Therapeutics. Vol. 24, International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
34. Saxena Y, Routh S, Mukhopadhyaya A. Immunoporosis: Role of Innate Immune Cells in Osteoporosis. Vol. 12, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2021.
35. Piché ME, Tchernof A, Després JP. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. Vol. 126, Circulation Research. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 1477–500.
36. Schwartz MW, Seeley RJ, Zeltser LM, Drewnowski A, Ravussin E, Redman LM, et al. Obesity pathogenesis: An endocrine society scientific statement. Endocr Rev. 2017;38(4):267–96.
37. San-Cristobal R, Navas-Carretero S, Martínez-González MÁ, Ordovas JM, Martínez JA. Contribution of macronutrients to obesity: implications for precision nutrition. Vol. 16, Nature Reviews Endocrinology. Nature Research; 2020. p. 305–20.

38. Chong B, Jayabaskaran J, Kong G, Chan YH, Chin YH, Goh R, et al. Trends and predictions of malnutrition and obesity in 204 countries and territories: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *EClinicalMedicine*. 2023 Mar 1;57.
39. Cypess AM. Reassessing Human Adipose Tissue. *New England Journal of Medicine*. 2022 Feb 24;386(8):768–79.
40. Link TM, Heilmeier U. Bone quality-beyond bone mineral density. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2016 Jul 1;20(3):269–78.
41. Piñar-Gutierrez A, García-Fontana C, García-Fontana B, Muñoz-Torres M. Obesity and Bone Health: A Complex Relationship. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
42. Fassio A, Idolazzi L, Rossini M, Gatti D, Adami G, Giollo A, et al. The obesity paradox and osteoporosis. Vol. 23, *Eating and Weight Disorders*. Springer International Publishing; 2018. p. 293–302.
43. Gruneisen E, Kremer R, Duque G. Fat as a Friend or Foe of the Bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2024 Apr 1;22(2):245–56.
44. Öztürk ZA, Türkbeyler İH, Abiyev A, Kul S, Edizer B, Yakaryılmaz FD, et al. Health-related quality of life and fall risk associated with age-related body composition changes; sarcopenia, obesity and sarcopenic obesity. *Intern Med J*. 2018 Aug 1;48(8):973–81.
45. Hou J, He C, He W, Yang M, Luo X, Li C. Obesity and Bone Health: A Complex Link. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
46. Pachón-Peña G, Bredella MA. Bone marrow adipose tissue in metabolic health. Vol. 33, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Inc.; 2022. p. 401–8.
47. Hofer SJ, Carmona-Gutierrez D, Mueller MI, Madeo F. The ups and downs of caloric restriction and fasting: from molecular effects to clinical application. *EMBO Mol Med*. 2022 Jan 11;14(1).
48. Jensen VFH, Mølck AM, Dalgaard M, McGuigan FE, Akesson KE. Changes in bone mass associated with obesity and weight loss in humans: Applicability of animal models. Vol. 145, *Bone*. Elsevier Inc.; 2021.
49. Green CL, Lamming DW, Fontana L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. Vol. 23, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research; 2022. p. 56–73.
50. Redman LM, Smith SR, Burton JH, Martin CK, Il'yasova D, Ravussin E. Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging. *Cell Metab*. 2018 Apr 3;27(4):805-815.e4.
51. Most J, Tosti V, Redman LM, Fontana L. Calorie restriction in humans: An update. Vol. 39, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2017. p. 36–45.
52. Cao JJ. Caloric restriction combined with exercise is effective in reducing adiposity and mitigating bone structural deterioration in obese rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2018 Dec 1;1433(1):41–52.
53. Gouspillou G, Hepple RT. Facts and controversies in our understanding of how caloric restriction impacts the mitochondrion. *Exp Gerontol*. 2013 Oct;48(10):1075–84.
54. Ohyama Y, Ito J, Kitano VJ, Shimada J, Hakeda Y. The polymethoxy flavonoid sudachitin suppresses inflammatory bone destruction by directly inhibiting osteoclastogenesis due to reduced ROS production and MAPK activation in osteoclast precursors. *PLoS One*. 2018 Jan 1;13(1).

55. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. Vol. 8, Global journal of health science. 2015. p. 72–9.
56. Malvi P, Piprode V, Chaube B, Pote ST, Mittal M, Chattopadhyay N, et al. High fat diet promotes achievement of peak bone mass in young rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Dec 5;455(1–2):133–8.
57. Yanagihara GRSRCTJAYJS; FSY; IJSACTJMRS. yanagihara et al 2017 - HF diet on bone - PPAR α genes. *J Nutr Health Aging*. 2017;21(10):1337–43.
58. Aslam MN, Jepsen KJ, Khoury B, Graf KH, Varani J. Bone structure and function in male C57BL/6 mice: Effects of a high-fat Western-style diet with or without trace minerals. *Bone Rep*. 2016 Dec 1;5:141–9.
59. Cavagni J, de Macedo IC, Gaio EJ, Souza A, de Molon RS, Cirelli JA, et al. Obesity and Hyperlipidemia Modulate Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *J Periodontol*. 2016 Feb;87(2).
60. Halade G V., El Jamali A, Williams PJ, Fajardo RJ, Fernandes G. Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. *Exp Gerontol*. 2011 Jan;46(1):43–52.
61. Tian L, Wang C, Xie Y, Wan S, Zhang K, Yu X. High Fructose and High Fat Exert Different Effects on Changes in Trabecular Bone Micro-structure. *Journal of Nutrition, Health and Aging*. 2018 Mar 1;22(3):361–70.
62. Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJA, Duarte JA. Bone quality: The determinants of bone strength and fragility. Vol. 44, *Sports Medicine*. 2014. p. 37–53.
63. Ilchovska D (Daisy), Barrow DM. An Overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions. Vol. 20, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2021.
64. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of Weight and Body Mass Index on Bone Mineral Density in Men and Women: The Framingham Study. Vol. 8, *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*. 1993.
65. Li Y. Association between obesity and bone mineral density in middle-aged adults. *J Orthop Surg Res*. 2022 Dec 1;17(1).
66. Zhang Y, Wu H, Li C, Liu C, Liu M, Liu X, et al. Associations between weight-adjusted waist index and bone mineral density: results of a nationwide survey. *BMC Endocr Disord*. 2023 Dec 1;23(1).
67. Liu LF, Shen WJ, Zhang ZH, Wang LJ, Kraemer FB. Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: Roles of PPAR γ and adiponectin. *J Cell Physiol*. 2010 Dec;225(3):837–45.
68. Zhu R, Wang Z, Xu Y, Wan H, Zhang X, Song M, et al. High-Fat Diet Increases Bone Loss by Inducing Ferroptosis in Osteoblasts. *Stem Cells Int*. 2022;2022.
69. Montalvany-Antonucci CC, Zicker MC, Macari S, Pereira TSF, Diniz IMA, Andrade I, et al. High-refined carbohydrate diet promotes detrimental effects on alveolar bone and femur microarchitecture. *Arch Oral Biol*. 2018 Feb 1;86:101–7.
70. Stechschulte LA, Czernik PJ, Rotter ZC, Tausif FN, Corzo CA, Marciano DP, et al. PPAR γ Post-translational Modifications Regulate Bone Formation and Bone Resorption. *EBioMedicine*. 2016 Aug 1;10:174–84.
71. Cao JJ, Gregoire BR, Gao H. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. *Bone*. 2009 Jun;44(6):1097–104.

72. Upadhyay J, Farr OM, Mantzoros CS. The role of leptin in regulating bone metabolism. Vol. 64, *Metabolism: Clinical and Experimental*. W.B. Saunders; 2015. p. 105–13.
73. Cheng M, Li T, Li W, Chen Y, Xu W, Xu L. Leptin can promote mineralization and up-regulate RANKL mRNA expression in osteoblasts from adult female SD rats [Internet]. Vol. 11, *Int J Clin Exp Pathol*. 2018. Available from: www.ijcep.com/
74. Liu X, Liang Y, Xia N, Liu W, Yang Q, Wang C. Decrease in leptin mediates rat bone metabolism impairments during high-fat diet-induced catch-up growth by modulating the OPG/RANKL balance. *3 Biotech*. 2021 Feb 1;11(2).
75. Suchacki KJ, Thomas BJ, Ikushima YM, Chen KC, Fyfe C, Tavares AAS, et al. The effects of caloric restriction on adipose tissue and metabolic health are sex-and age-dependent. *Elife*. 2023;12.
76. Villareal DT, Fontana L, Das SK, Redman L, Smith SR, Saltzman E, et al. Effect of Two-Year Caloric Restriction on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in Non-Obese Younger Adults: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2016 Jan 1;31(1):40–51.
77. Schafer AL. Decline in Bone Mass during Weight Loss: A Cause for Concern? Vol. 31, *Journal of Bone and Mineral Research*. John Wiley and Sons Inc.; 2016. p. 36–9.
78. Behrendt AK, Kuhla A, Osterberg A, Polley C, Herlyn P, Fischer DC, et al. Dietary Restriction-Induced Alterations in Bone Phenotype: Effects of Lifelong Versus Short-Term Caloric Restriction on Femoral and Vertebral Bone in C57BL/6 Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2016 Apr 1;31(4):852–63.
79. Montalvany-Antonucci CC, Zicker MC, Ferreira AVM, Macari S, Ramos-Junior ES, Gomez RS, et al. High-fat diet disrupts bone remodeling by inducing local and systemic alterations. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018 Sep 1;59:93–103.
80. Shen CL, Zhu W, Gao W, Wang S, Chen L, Chyu MC. Energy-restricted diet benefits body composition but degrades bone integrity in middle-aged obese female rats. *Nutrition Research*. 2013 Aug;33(8):668–76.
81. Duque G, Al Saedi A, Rivas D, Miard S, Ferland G, Picard F, et al. Differential Effects of Long-Term Caloric Restriction and Dietary Protein Source on Bone and Marrow Fat of the Aging Rat. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2020 Nov 1;75(11):2031–6.
82. Hao Z, Ma Y, Wu J, Li X, Chen H, Shen J, et al. Osteocytes regulate osteoblast differentiation and osteoclast activity through Interleukin-6 under mechanical loading. *RSC Adv*. 2017;7(79):50200–9.
83. Gao M, Ma Y, Liu D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLoS One*. 2015 Mar 13;10(3).
84. Wei J, Ferron M, Clarke CJ, Hannun YA, Jiang H, Blaner WS, et al. Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation. *Journal of Clinical Investigation*. 2014 Apr 1;124(4):1–13.
85. Lewis JW, Edwards JR, Naylor AJ, McGettrick HM. Adiponectin signalling in bone homeostasis, with age and in disease. Vol. 9, *Bone Research*. Springer Nature; 2021.
86. Hardouin P, Rharass T, Lucas S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? Vol. 7, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2016.

87. Devlin MJ, Rosen CJ. The bone-fat interface: Basic and clinical implications of marrow adiposity. Vol. 3, *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. Lancet Publishing Group; 2015. p. 141–7.

APÊNDICE A - Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA TRATAMENTO DIETÉTICO E FARMACOLÓGICO DE OBESIDADE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR DIETA ", protocolo do CEUA: 245/2022 sob a responsabilidade de Adaliene Versiani Matos Ferreira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 25/10/2022.

Vigência da Autorização	24/10/2022 a 23/10/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	8
Peso/Idade	17g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	8
Peso/Idade	17g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	8
Peso/Idade	17g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	8
Peso/Idade	17g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	8

APÊNDICE B – ARTIGO

Será submetido ao *The Journal of Nutritional Biochemistry*.

Balancing Weight Loss and Bone Health: The Role of Caloric Restriction in Diet-Induced Obesity

Ana Luísa Andrade Leite^a, Bruna Carolina de Oliveira^a, Joyce Heredia^a, Laura Fernandes^a, Adaliene Versiani Matos Ferreira^{a,b}, Marina Chaves de Oliveira^{a*}

^a Laboratory of Immunometabolism, Department of Nutrition, Nursing School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

*Correspondence: Marina C. Oliveira; marina.cdoliveira@gmail.com

ABSTRACT

In obesity, there is excessive secretion of pro-inflammatory adipokines by adipocytes and macrophages. This can trigger a cascade of events that negatively affect glycemic and cardiovascular parameters, as well as bone metabolism. Caloric restriction (CR) is a widely used strategy in obesity treatment since caloric deficit is one of the key factors for weight loss. However, the effects of caloric restriction on bone health are complex and present contradictory aspects. The aim of this study was to evaluate the effect of caloric restriction as a dietary treatment on bone health in mice with obesity induced by a high-fat (HF) diet. For this purpose, male C57BL/6 mice were divided into: (i) mice fed a Labina® diet (control) and (ii) mice fed an HF diet—45% of the diet's total caloric intake. Upon reaching 40 grams, some animals from the HF group were directed to a third group: (iii) mice fed the HF diet, followed by dietary intervention through CR. This intervention involved switching from the HF diet to the Labina® diet, and the mice were subjected to this protocol for a period of 35 days. At the end of the intervention, glucose tolerance tests were performed on the groups. The animals were euthanized, and adipose tissue, femur and tibia were collected. Bone analysis was performed by histology, computed microtomography, serum measurement of bone/metabolic markers and gene expression by real-time PCR. The results showed that the HF diet induced changes in bone microarchitecture, with a consequent increase in bone mass. This effect does not seem beneficial due to the adverse consequences on metabolic health and the increase in adiposity induced by the HF

diet. On the other hand, CR induced a reduction in bone mass to baseline parameters, suggesting a reduction proportional to weight loss. Overall, CR proved to be a valid treatment strategy for obesity, completely reversing the increases in adiposity and changes in glycemic metabolism induced by the HF diet. Nevertheless, it is crucial to further investigate the bone decrease induced by CR to determine its real impact on bone health. Thus, despite the benefits of CR practice, it is necessary to carefully consider its effects on bone tissue, which may indicate the need for complementary interventions in clinical practice, especially in individuals with bone changes resulting from obesity.

Key words: Caloric restriction. Obesity. Bone Health. HF diet. MicroCT.

1. Introduction

Bone tissue is a specialized connective tissue that provides structural support, protection for vital tissues and organs, assists in locomotion, serves as a reservoir of minerals, and houses the bone marrow where blood cell production occurs (Kim et al., 2020). This tissue is composed of an extracellular matrix made up of minerals and collagen, providing strength and rigidity to the bone (Ansari, 2019), as well as specialized cells such as osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts (Florencio-Silva et al., 2015). Osteoblasts are responsible for the production and mineralization of the bone matrix, while osteocytes are mature cells embedded in the matrix that act as sensors of the bone environment, responding to mechanical and hormonal stimuli (Zhou et al., 2020). Osteoclasts, on the other hand, are specialized cells that resorb bone tissue, allowing for continuous bone renewal (Vies & O'Brien, 2023). However, metabolic and inflammatory alterations can disrupt bone remodeling, interfering with the rate of bone renewal and resorption (Fuglsang-Nielsen et al, 2020).

In obesity, there is an increased secretion of pro-inflammatory adipokines by adipocytes and macrophages, leading to a low-grade systemic inflammatory state (Heymsfield & Wadden, 2017). This chronic inflammatory state can trigger a cascade of events that negatively affect bone metabolism. Excess adiposity also makes obese individuals more susceptible to fractures, both due to increased bone fragility and a higher risk of falls (Rinonapoli et al., 2021). Therefore, understanding the key molecules and pathways involved in obesity allows for the development of multidisciplinary therapies aimed at treating bone and metabolic complications (Benova & Tencerova, 2020; Wen et al., 2022), thereby maintaining quality of life. Nutritionally, a common strategy in treating obesity is caloric restriction, given that a caloric deficit is a key factor in weight loss.

Caloric restriction (CR) is a nutritional approach characterized by a controlled reduction in daily caloric intake without causing nutritional deficiencies (Hofer et al., 2022). This strategy has been studied in both human and animal models. CR has been

associated with increased longevity across various species, from yeast to mammals (Hwangbo et al., 2020), and delays the onset of age-related diseases (Acosta-Rodriguez et al., 2021). The benefits of CR also extend to the prevention of chronic diseases. It helps improve insulin sensitivity, reduces blood glucose levels, and lowers blood pressure, which contribute to the prevention of cardiovascular diseases, type 2 diabetes, and some types of cancer (Most et al., 2017). However, the effects of CR on bone health are more complex and present both favorable and unfavorable aspects.

In bone tissue, the effect of CR in rodents demonstrates that the life stage during which CR is applied is a factor influencing bone impact (Liu & Rosen, 2023). In young mice, CR is associated with impairments in skeletal development, with low levels of leptin and IGF-1 and high marrow adiposity, which would be detrimental to cortical and trabecular bone mass and architecture (Devlin et al., 2010). Conversely, in adult mice, lower cortical bone mass but higher trabecular bone volume have been observed, as well as potential skeletal benefits of CR in older animals (Devlin et al., 2010; Liu & Rosen, 2023).

There are few CR studies investigating bone health in the context of obesity treatment, although longevity and cardiovascular health are well-explored topics. Most research focuses on the effects of CR on weight loss, ignoring the potential impacts on bone health. Considering that obesity is associated with chronic inflammation and metabolic changes that can impair bone density and quality, it is crucial to explore approaches that can treat obesity and improve or maintain bone health. Therefore, this study aims to investigate the effects of a CR diet in obese mice fed a high-fat diet, to understand how CR may act as an effective nutritional approach in treating obesity, with the potential to modulate the exacerbated inflammatory process characteristic of this condition and impact bone health.

2. Materials and methods

2.1 Diet-Induced Obesity Model

Male C57BL/6 mice at 8 weeks of age were obtained from the animal care center of Universidade Federal de Minas Gerais (Biotério Central/UFMG) and kept in an environmentally controlled room under a 12/12h light-dark cycle. Animals had free access to tap water and food and were maintained according to ethical guidelines of our institution. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the University (protocol number 245/2022).

Mice were divided into: (i) mice fed with Labin® commercial diet (4 kcal/g) and (ii) mice fed with HF diet - 45% of total caloric diet (6,20 kcal/g). Upon reaching 40 grams, some animals from the HF group were directed to a third group: (iii) mice fed

with HF diet, followed by dietary intervention through CR. This intervention involved switching from the HF diet to the Labin® diet, and the mice were subjected to this protocol for a 35-day period. The experimental design was described in **Fig. 1**.

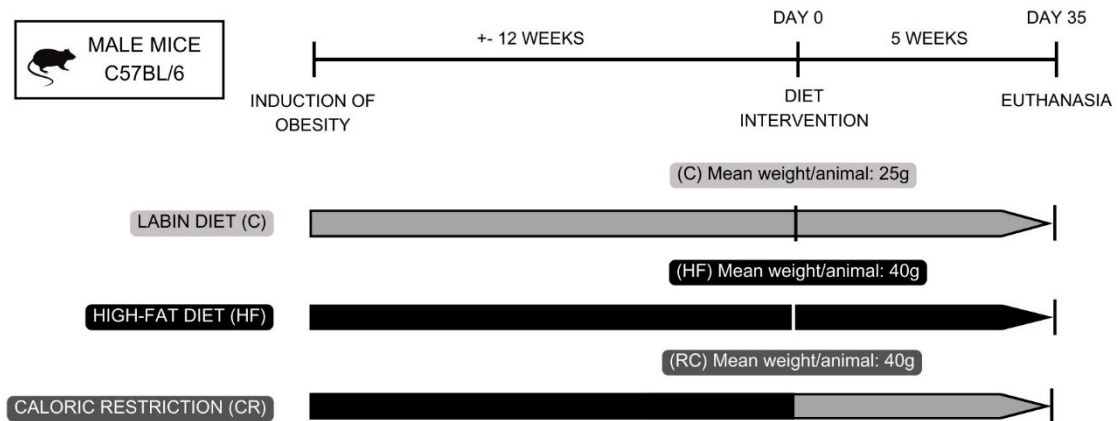


Figure 1. Experimental design of obesity induced by high fat-diet in mice and caloric restriction treatment. Mice were fed a Labin® diet (C), or high fat diet (HF) for 12 weeks in average to induce adiposity gain. Upon reaching 40 grams, some animals from the HF group were directed to a third group (CR): mice fed with HF diet, followed by switching from the HF diet to the Labin® diet. Mice were subjected to this protocol for a 35-day period.

Throughout the experimental period, the animals were weighed once a week and diet consumption was measured twice a week. At the end of the dietary treatment, mice were fasted for 6 hours and were anesthetized with 130 mg/kg BW of ketamine and 0.3 mg/kg BW of xylazine then killed by exsanguination. Blood was collected to obtain serum. Tibia, epididymal, subcutaneous, mesenteric and retroperitoneal white adipose tissues were collected, weighed and stored at -80°C until further analysis. From the knee, a transverse section was obtained in the proximal femur to obtain a histological section. This tissue was fixed in 4% formaldehyde, decalcified in 14% EDTA and preserved in 70% alcohol for subsequent histological analysis. The femur samples were fixed in 4% formaldehyde and stored in alcohol for microcomputed tomography analysis.

2.2 Oral glucose tolerance test

Mice were fasted for 6 hours and then D-glucose (2 mg/g BW) was given to them orally by gavage. Glucose levels were monitored from tail blood samples at 0, 15, 30, 60 and 90 minutes after glucose overload using an Accu-Check glucometer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).

2.3 Histomorphometric Analysis

Epididymal and subcutaneous adipose tissue were excised and fixed in a phosphate-buffered formaldehyde solution for 48 h and were then incubated in 70%

ethanol. Histological sections measuring 5µm thick were obtained using the microtome and placed on slides. The HE-stained slides were evaluated under a light microscope equipped with a digital camera (Flexacam i5 Compound, Leica Microsystems, Switzerland). ImageJ program (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) was used to calculate the mean adipocyte area (µm²) and frequency distribution of adipocytes' cell surface area. The area of at least 100 adipocytes, present in up to 5 images (40x objective) for each animal.

The femur was fixed in 4% formaldehyde, decalcified in 14% EDTA, and embedded in paraffin. Sections of 5 µm were stained with tartrate-resistant acid phosphatase. Osteoclast number over bone surface area (N.Oc/BS) and density of osteocytes per trabecular bone area were determined in the distal femur by using ImageJ software (NIH Image, Bethesda, MD, United States). Osteocyte and lacunae numbers were determined in a selected trabecular bone that was also quantified by measuring the total bone area in the analysis region. Osteocyte density was calculated by dividing the number of counted cells/lacunae by the area of trabecular bone. Sections of the femur were also stained with Masson's Trichrome. Osteoblast number per bone perimeter (N.Oc/B.Pm) was determined in the distal femur by using ImageJ software (NIH Image, Bethesda, MD, United States). Osteoblast number and the trabecular bone perimeter were quantified in the analysis region. Osteoblast density was calculated by dividing the number of counted cells (#)/the perimeter of trabecular bone (mm).

2.4 Serum parameters

Glucose was quantified in serum using an enzymatic kit (Bioclin, Belo Horizonte, MG). The concentrations of receptor activator kappa-B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG), in turn, were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay ELISA (Enzyme Linked ImmuneSorbent Assay), according to the manufacturer's instructions (R&D System, Inc., Minneapolis, USA).

2.5 Micro-Computed Tomography Analysis

Femur samples were fixed in 4% neutral buffered formalin for 48 h and scanned using a microCT system (Skyscan 1172 X-Ray microtomography; Skyscan, Aartselaar, Belgium). The calibration was carried out with known density calcium hydroxyapatite phantoms (Skyscan, Aartselaar, Belgium). The tissues were analyzed to determine the bone mineral density (BMD), percent bone volume/tissue volume (BV/TV), trabecular separation (Tb.Sp), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular thickness distribution (Tb.Th distribution), trabecular number (Tb.N), cortical percentage of bone volume/tissue volume (Ct.BV/TV), and cortical thickness (Ct.Th).

2.6 Real-time polymerase chain reaction (PCR)

For real-time PCR analysis, tibia samples were used. For RNA extraction, the Invitrogen PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies Corp, North America) was used, according to the manufacturer's instructions. Transcription was performed from the RNA to obtain cDNA, using a thermocycler (BioRad T100, Hercules, California, USA) and the reverse transcriptase enzyme iScript cDNA Synthesis (BioRad T100, Hercules, California, USA). The ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) was used for analysis, and the SYBR® Green PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific) was used. The relative gene expression of RANKL, OPG, RUNX2, PPAR γ , TNF, osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), sclerostin (SOST) and cathepsin K were assessed, determined by the 2- $\Delta\Delta C_t$ method, and normalized by the housekeeping glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) expression. The primer sequences are listed in Table 1.

Table 1 . List of primers used in real-time PCR.

GENE/ PROTEIN	FORWARD	REVERSE
RANKL	5'- CGT GCA GAA GGA ACT GCA ACA C -3'	5'- TGG TGA GGT GTG CAA ATG GCT -3'
OPG	5'- TCA TCC AAG ACA TTG ACC TCT GTG A -3'	5'- GCT GCT CGC TCG ATT TGC AG -3'
RUNX2	5'- GGC CGG GAA TGA TGA GAA CTA -3'	5'- CAG ATC GTT GAA CCT GGC TAC TT -3'
PPAR γ	5'- ATC TCC GCC AAC AGC TTC T -3'	5'- TAA CTG CCG GAT CCA CAA A -3'
TNF	5'- ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC -3'	5'- AGA TAG CAA ATC GGC TGA CG -3'
OCN	5'- AAG CCT TCA TGT CCA AGC AGG -3'	5'- TTT GTA GGC GGT CTT CAA GCC -3'
OPN	5'- CCA ATG AAA GCC ATG ACC AC -3'	5'- CGT CAG ATT CAT CCG AGT CCA -3'
SOST	5'- TGT CAG GAA GCG GGT GTA GT -3'	5'- GAG CCT CCT CCT GAG AAC AA -3'
CATEPSIN K	5'- CTC CCT CTC GAT CCT ACA GTA ATG A -3'	5'- TCA GAG TCA ATG CCT CCG TTC -3'
GAPDH	5'- ACG GCC GCA TCT TCT TGT GCA -3'	5'- CGC CCA AAT CCG TTC ACA CCG A -3'

2.7 Statistical analysis

The data obtained were analyzed using GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Kolmogorof-Smirnoff normality test was performed on the samples to verify the Gaussian distribution. Subsequently, statistical comparisons between the 3 groups were performed by *one-way* ANOVA, when normal distribution, or Kruskal-Wallis, when non-parametric distribution. Next, the Dunnett post-test was carried out (3 groups). For weight gain and TTOG, *two-way* ANOVA was used, followed by Dunnett post-test. The results were presented as the mean $\pm$ standard error of the mean. The significance level adopted was $P < 0.05$.

3. Results

Caloric restriction reverses changes in trabecular bone microarchitecture in obese mice, but does not interfere with cortical bone

The analysis of bone microarchitecture performed by microCT on the femur showed that the HF group showed no change in BMD (Figure A and B), but had an increase in BV/TV (Figure C) and Tb.N (Figure D), while Tb.Sp values (Figure E) were reduced in relation to control animals. On the other hand, CR mice demonstrate lower BMD (Figure A and B), BV/TV (Figure C) and Tb.N (Figure D) associated with higher Tb.Sp (Figure E) compared to animals fed with HF diet. The values of SMI (Figure F) and Tb.Th (Figures G and H) did not show significant difference between the groups evaluated.

When evaluating the cortical bone by microCT, no difference in the cortical bone microarchitecture was found between the groups considering total area (Tt.Ar), cortical area (Ct.Ar), proportion of the cortical area in relation to the total area (Ct.Ar/Tt.Ar) and transverse thickness (Ct.Th) (Figures I-K).

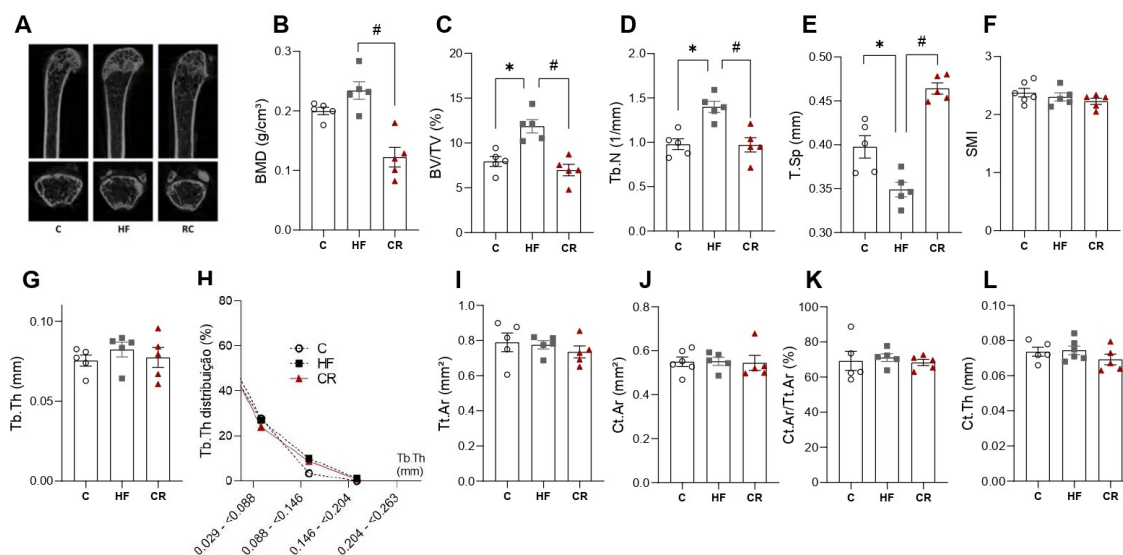


Figure 2. Analysis of the trabecular and cortical region of the mouse femur using microcomputed tomography. (A) Representative section images of the sagittal and axial portion of the femur, (B) Bone mineral density (BMD), (C) Bone volume/tissue volume percentage (BV/TV), (D) Number of trabecular (Tb.N), (E) Separation between trabecular (Tb.Sp), (F) Structure model index (SMI), (G) Trabecular thickness (Tb.Th), (H) Percentage distribution of trabecular thickness (Tb.Th - %) (I) Total area (Tt.Ar), (J) Cortical area (Ct.Ar), (K) Proportion of the cortical area in relation to the total area (Ct.Ar/Tt.Ar - %), (L) Transverse thickness (Ct.Th). Data from control mice (C), high-fat diet (HF) or caloric restriction intervention (CR) for 35 days. Data represent mean $\pm$ standard error of the mean of 5 animals per group. Analyses carried out using the one-way ANOVA test, followed by Dunnett's post-test. Statistical difference represented by * $p < 0.05$ C vs. HF, # $p < 0.05$ HF vs. CR.

Calorie restriction alters the RANKL/OPG ratio in obese animals

In markers of systemic bone metabolism, there was no significant difference between groups for RANKL (Figure A) and OPG (Figure B). Although no difference was observed in the RANKL/OPG ratio between HF diet animals and the control group, the mice that received CR intervention showed an increase in this ratio compared to the HF group (Figure C).

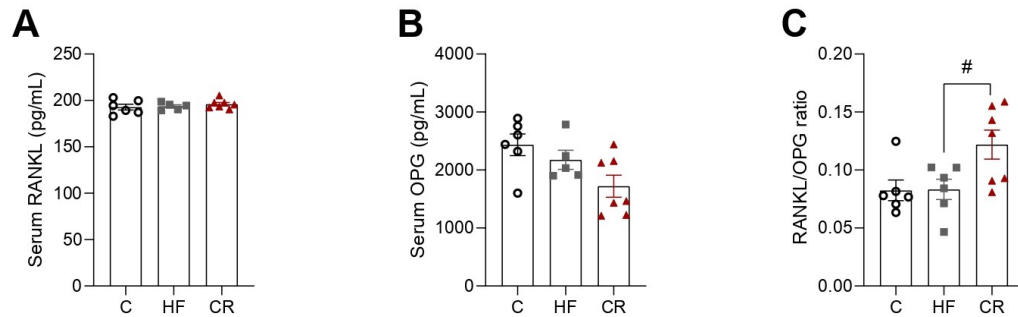


Figure 3. Serum measurement of systemic markers of bone remodeling. (A) Serum RANKL, (B) Serum OPG and (C) RANKL/OPG ratio. Data from control mice (C), high-fat diet (HF) or caloric restriction intervention (CR) for 35 days. Data represent mean $\pm$ standard error of the mean of 6 animals per group. Analyzes carried out using the one-way ANOVA test, followed by Dunnett's post-test. Statistical difference represented by * $p < 0.05$ C vs. HF, # $p < 0.05$ HF vs. CR.

Caloric restriction increases the number of osteoblasts and osteoclasts in femur, without affecting osteocytes

In the histological femur analysis, it was observed that the HF group presented a statistically lower number of osteoblasts (Figures A and B), as well as osteoclasts (Figures C and D) in relation to the control group. In parallel, the CR group showed an increase in the same cells compared to those animals fed with HF diet (Figures A-D). Regarding osteocytes, there was no difference between the groups evaluated (Figures E and F).

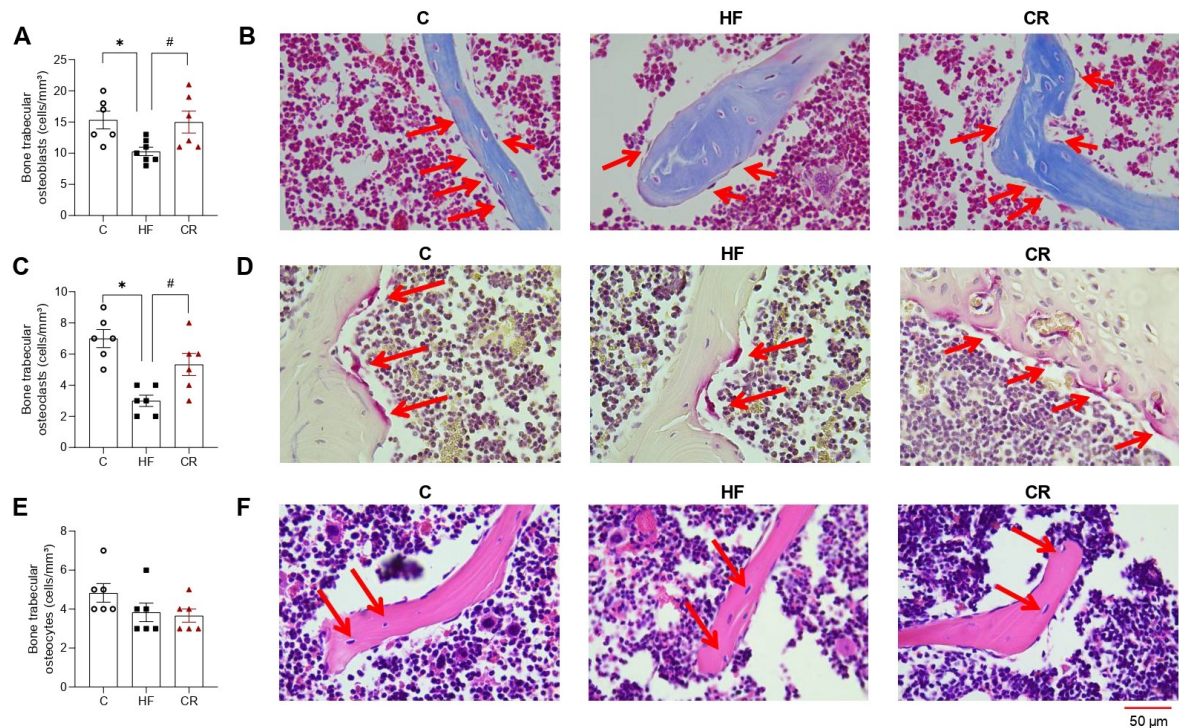


Figure 4. Histological analysis of osteoblasts, osteoclasts and osteocytes in mouse femur. (A) Osteoblast count in the proximal diaphysis of the femur, below the epiphyseal disc, (B) Representative images of osteoblasts in the femur (40x), (C) Osteoclast count in the femoral metaphysis, (D) Representative images of osteoclasts in the femur (40x), (E) Osteocyte count in the proximal diaphysis of the femur, below the epiphyseal disc, (F) Representative images of osteocytes in the femur (40x). Data from control mice (C), *high-fat diet* (HF), or caloric restriction intervention (CR) for 35 days. Data represent mean $\pm$ standard error of the mean of 6 animals per group. Data were analyzed using the one-way ANOVA test, followed by Dunnett's post-test. Statistical difference represented by * $p < 0.05$ C vs. HF, # $p < 0.05$ HF vs. CR.

Caloric restriction does not influence the gene expression of bone remodeling and quality markers

Analysis of mRNA expression performed by real-time PCR in the tibia showed that there was no significant difference in the expression of RANKL and OPG, as well as in the RANKL/OPG ratio, markers of bone formation and resorption (Figures A-C). Regarding the differentiation of osteoblasts and adipocytes, represented by the markers RUNX2 and PPAR γ , respectively, only RUNX2 was increased in animals fed a HF diet and there was a reduction in those treated with CR (Figure D). However, the expression of PPAR γ , as well as the ratio between RUNX2 and PPAR γ , did not show a significant difference between the groups (Figures E and F). The markers TNF, osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) and cathepsin K, related to inflammation, mineralization, cell adhesion and bone resorption activity also showed no significant difference between the groups (Figures G-J).

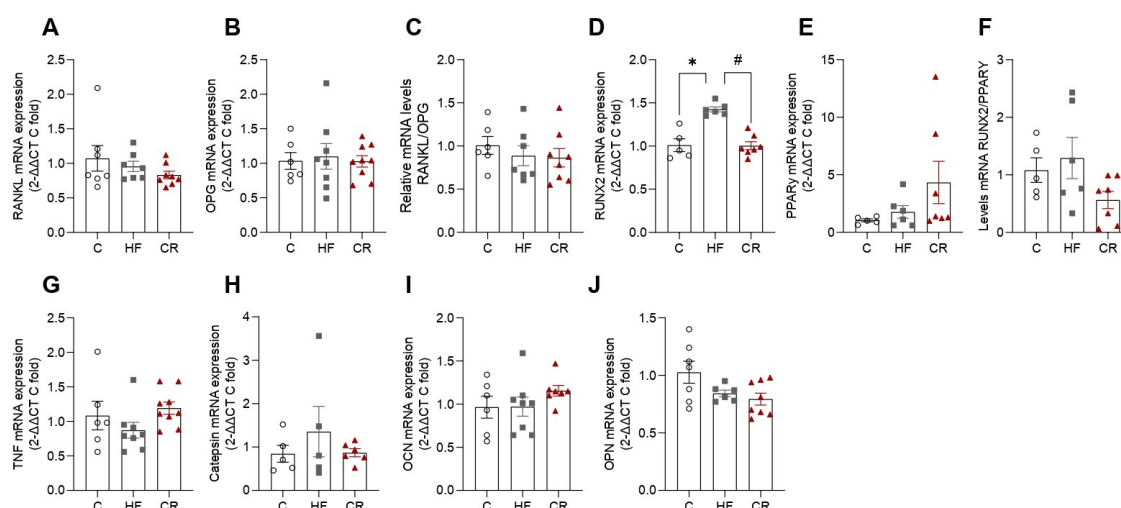


Figure 5. Analysis in tibia mice of gene expression of markers of bone remodeling and quality by rt-PCR. Expression analysis of (A) RANKL, (B) OPG, (C) RANKL/OPG ratio (D) RUNX2, (E) PPARY, (F) RUNX2/PPARY ratio, (G) TNF, (H) Cathepsin K, (I) osteocalcin (OCN), (J) osteopontin (OPN). Data from control mice (C), high-fat diet (HF), or caloric restriction intervention (CR) for 35 days. Data represent mean $\pm$ standard error of the mean of 4-8 animals per group. Data were analyzed using the one-way ANOVA test, followed by Dunnett's post-test. Statistical difference represented by * $p < 0.05$ C vs. HF, # $p < 0.05$ HF vs. CR.

Caloric restriction reverses the increase in weight, adiposity and glycemic changes caused by the consumption of a diet rich in fats

The caloric intake data show that the group receiving the HF diet consumed more calories on average compared to the control group with the LABINA® diet (C) (Figure A). The group that underwent calorie restriction (CR) demonstrated lower calorie consumption compared to the HF group (Figure A) in the intervention period. Analysis of the animals' body weight showed that while the C and HF groups maintained their weight, the CR group had a reduction in body weight of 10.33 ± 2.56 grams over 35 days (Figure B). As expected, the adiposity index indicated an increase in adipose mass in animals fed the HF diet compared to the control group, but there was a reduction in white adipose tissue in the CR group (Figure C). These changes in adiposity were associated with an increase in adipocyte hypertrophy in the HF group compared to the control, with a reduction observed in those with CR compared to animals fed a HF diet, both in epididymal adipose tissue (Figures D-F) and in subcutaneous tissue. (Figures G-I).

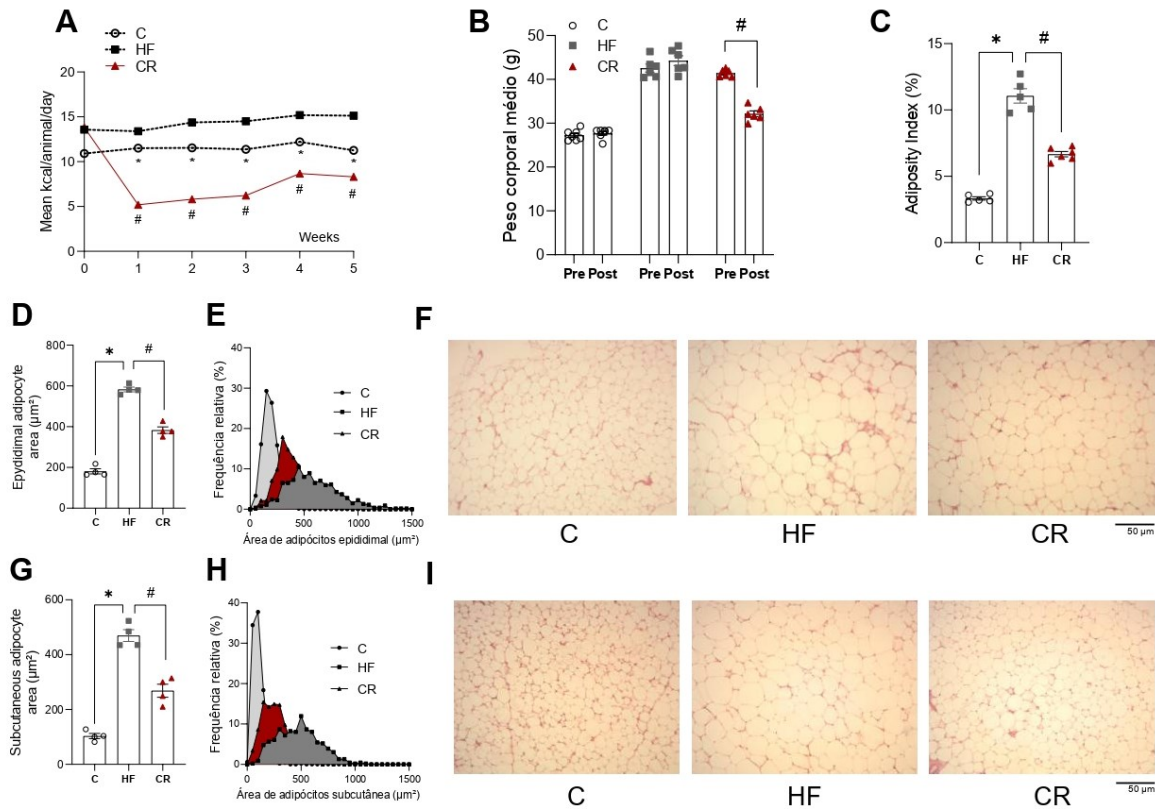


Figure 6. Changes in body weight and adiposity resulting from caloric intake from a high-fat diet (HF) and dietary intervention with caloric restriction (CR). (A) Energy consumption (Kcal of diet per animal per day), (B) Average body weight before and after treatment, (C) Adiposity index [(sum of weight of epididymal, subcutaneous, retroperitoneal and mesenteric tissue (g)) $\div$ body weight $\times$ 100], (D) Epididymal adipocyte area, (E) Percentage distribution of epididymal adipocyte area, (F) Representative images of the adipocyte area of the epididymal adipose tissue, in hematoxylin-eosin staining, (G) Subcutaneous adipocyte area, (H) Percentage distribution of subcutaneous adipocyte area, (I) Representative images of the adipocyte area of the tissue subcutaneous adipose tissue, with hematoxylin-eosin staining. Data from control mice (C), high-fat diet (HF) or caloric restriction intervention (CR) for 35 days. Data represent mean $\pm$ standard error of the mean of 4-6 animals per group. Analyzes carried out using the one-way ANOVA or two-way ANOVA test, followed by Dunnett's post-test. Statistical difference represented by * $p < 0.05$ C vs. HF, # $p < 0.05$ HF vs. CR.

In glycemic metabolism, it was possible to observe that the HF group showed greater glucose intolerance compared to control animals represented by the glycemic curve and area under the TTOG curve (Figures A and B) associated with higher fasting glycemia (Figure C). Mice subjected to CR showed a reversal in intolerance and fasting glycemia when compared to the HF group (Figures A-C).

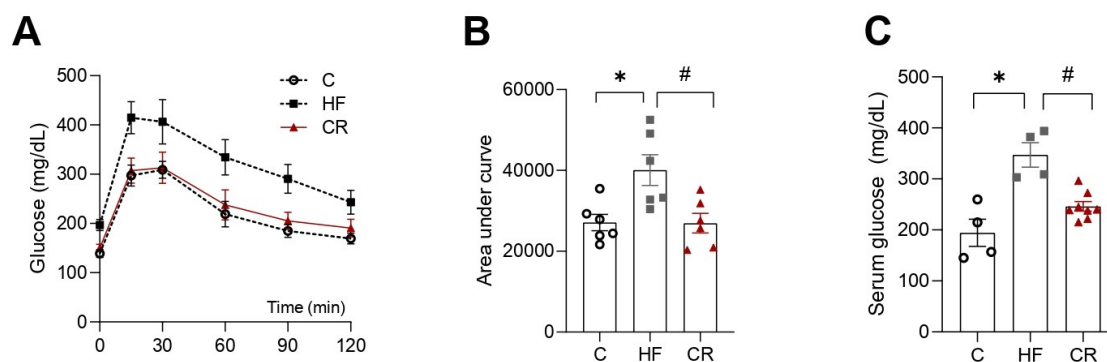


Figure 7. Changes in glycemic metabolism resulting from caloric intake from a high-fat diet (HF) and dietary intervention with caloric restriction (CR). (A) Oral glucose tolerance test, (B) Area under the OTT curve, (C) Fasting serum glucose. Data from control mice (C), high-fat diet (HF) or caloric restriction intervention (CR) for 35 days. Data represent mean $\pm$ standard error of the mean of 4-8 animals per group. Analyzes carried out using the one-way ANOVA or two-way ANOVA test, followed by Dunnett's post-test. Statistical difference represented by * $p < 0.05$ C vs. HF, # $p < 0.05$ HF vs. CR.

4. Discussion

Excess adiposity makes the individual more susceptible to fractures, both due to increased bone fragility and a greater risk of falling (Rinonapoli et al., 2021). CR is a nutritional strategy widely used in the treatment of obesity, considering that calorie deficit is essential for weight loss. Studies show the benefits of CR in longevity and prevention of chronic diseases, but the effects on bone health are more complex, presenting contradictory aspects. The present work demonstrated that CR reversed changes in trabecular bone microarchitecture parameters in obese mice by reducing the increased bone mass in the femur. This effect was associated with an increase in the number of osteoblasts and osteoclasts in the same tissue and the RANKL/OPG ratio in serum. However, calorie restriction did not influence the gene expression of markers of cellular differentiation, remodeling and bone quality. When metabolic aspects related to obesity were evaluated, calorie restriction reduced body weight and adiposity presented by mice fed a high-fat diet, consequently reversing the metabolic changes.

In this study, the induction of obesity through the HF diet showed an increase in bone volume and number of trabeculae, as well as a smaller spacing between trabeculae, indicating greater bone mass. In the study by Malvi et al (56), it was observed that an HF diet contributed to the achievement of peak bone mass in young rats even after withdrawal from the HF diet, suggesting that the increase in bone mass could have been caused by increased osteoblast activity, through an increase in alkaline phosphatase. Yanagihara et al. (2017) also observed increased BMD in young rats fed an HF diet, which was implicated as a consequence of weight gain. In contrast, other studies demonstrate bone loss in models of diet-induced obesity, both in mice fed an

HF diet (Aslam et al., 2016) and rats fed a cafeteria diet (Cavagni et al., 2016). Halade et al., (2010) observed increased bone resorption in mice fed an HF diet, indicating that there was increased inflammation mediated by the accumulation of adipocytes in the bone marrow. This inflammation can consequently increase osteoclastogenesis, while reducing osteoblast development. On the other hand, a study by Tian et al. (2018) analyzed the effect of the HF or high-fructose diet in mice, in the short and long term, which observed, in both diets, an increase in BMD in the short term, but with its long-term decrease. The authors proposed that weight gain could be associated with greater mechanical load, by stimulating the proliferation and differentiation of osteoblasts and osteocytes through the Wnt/ β -catenin signaling pathway, promoting bone formation. However, increased bone mass would not necessarily be linked to better bone quality, since bone quality involves other biophysical properties, such as strength (Fonseca et al., 2014). In the long term, mice showed greater expression of TNF- α , indicating greater systemic inflammation, as well as a greater amount of adipose tissue in the bone marrow (Tian et al., 2018).

In our results, gene expression of TNF- α in bone showed no significant difference between the groups. However, there are other cytokines that can be evaluated, such as IL-6, to demonstrate the inflammatory process characteristic of obesity, as well as exploring the NF- κ B pathway, which when activated promotes the expression of RANKL, being essential for differentiation and activation of osteoclasts (Ilchovska and Barrow, 2021). Data in humans show that patients with obesity have an increase in bone mass related to BMI (Felson et al., 1993; Li, 2022). However, using the weight index adjusted for hip circumference, a negative relationship with BMD was observed, indicating that visceral adipose tissue can negatively influence bone tissue (Zhang et al., 2023). In our study, mice fed an HF diet showed very significant weight gain compared to the control group, which may be related to the increase in bone volume observed. In general, the results obtained associated with those in the literature may indicate an adaptation of the organism to excess weight depending on the time of exposure to the obesogenic diet, average weight gain and moment in the mouse's life, being involved by different mechanisms, such as the of Wnt signaling, the action of inflammatory cytokines, enzymes such as alkaline phosphatase, and hormones such as leptin.

Regarding bone cells and bone metabolism, the effects observed by the HF diet in this work were unexpected. Despite the increase in bone volume observed in animals fed the HF diet, the number of osteoblasts was reduced in relation to the control, while the expression of RUNX2, the main transcription factor for osteoblast differentiation, was increased. The relationship between PPAR γ and RUNX2 significantly influences the regulation of adipose tissue and bone tissue. PPAR γ is a critical transcription factor for adipogenesis, promoting the formation of adipocytes, and its activation can inhibit the expression of RUNX2, decreasing osteogenesis (Liu et al., 2010). Due to obesity, a change in the relationship between the two genes was expected, but this was not found. The number of osteoclasts was also reduced, while cathepsin K, which shows

osteoclast activity, did not show a significant difference. Zhu et al. (2022) also found lower numbers of osteoblasts in mice fed an HF diet, while the number of osteoclasts did not change significantly. Montalvany-Antonucci et al. (2018) observed a reduction in osteoblasts and an increase in osteoclasts in the alveolar bone of obese mice fed a diet rich in carbohydrates. On the other hand, Tian et al., (2018) evaluated short-term and long-term expression of RUNX2 and cathepsin K in mice fed an HF diet and a high-fructose diet. RUNX2 mRNA expression was upregulated in the short term but downregulated in the long term in mice on both diets. Cathepsin K mRNA expression showed almost similar results, it was upregulated in the short term in mice on HF diet, but downregulated in the long term in both diets. Therefore, a discrepancy between phenotype and gene expression was observed in the context of bone remodeling in our work. These differences could be explained by mechanisms such as post-transcriptional changes, which can also influence bone formation (Stechschulte et al., 2016). Furthermore, serum and gene expression markers of RANKL, OPG, as well as the RANKL/OPG ratio also did not show significant differences in obese mice. Regarding RANKL, OPG and RANKL/OPG ratio, there are studies showing higher expression of RANKL (Cao et al., 2009, p. 20; Halade et al., 2010) and higher RANKL/OPG ratio (Cao et al., 2009; C.C. Montalvany-Antonucci et al., 2018) in obese mice, which would indicate a greater activity of osteoclasts in the context of obesity. These studies, together with the work presented, allow us to infer that bone remodeling is influenced by the time of exposure to the diet, as well as that other metabolic pathways are influencing the cellular phenotype and gene expression - such as, for example, the action of inflammatory cytokines and of leptin, which are increased in the context of obesity and negatively affect bone health (Upadhyay et al., 2015; Xu et al., 2023). RANKL and OPG levels are altered in accordance with leptin levels, inhibiting bone formation (Cheng et al., 2018; Liu et al., 2021).

Treatments for obesity have been largely based on CR because it causes caloric deficit and consequently loss of adiposity, but the study of its effects and concern about bone health are still on the rise (Suchacki et al., 2023). In humans, a study with a very relevant CR is CALERIE (Comprehensive Assessment of Long Term Effects of Reducing Intake of Energy). In the second phase of the study, the effect of 25% CR for 2 years on markers of bone remodeling and BMD in healthy young adults was evaluated. The RC group had lower BMD in the lumbar spine, hip and femoral neck (Villareal et al., 2016). The results could indicate a cause for concern for bone health in the context of weight loss. However, another study used predictive equations and multiple regression with the CALERIE database, comparing BMD measured by DEXA and BMD expected from predictive models. They found no statistically significant differences between actual and expected values, and thus concluded that bone loss was proportional to the amount of weight lost (Schafer, 2016).

In our study, obese animals that underwent CR treatment showed significant bone loss compared to the untreated group, similar to what was observed in the CALERIE study. In another work, Behrendt et al., (2016) evaluated CR in mice throughout life,

compared with short-term CR in aged mice, to observe the development of osteoporosis. The results showed that CR can reduce cortical bone mineral density and thickness in the evaluated groups. On the other hand, lifelong CR had beneficial effects on trabecular bone mineral density and bone microarchitecture of lumbar vertebrae. However, these effects were not observed after short-term CR in aged mice. Thus, the bones showed a lifelong compensatory capacity by reorganizing the trabecular bone. Carina Cristina Montalvany-Antonucci et al., (2018) showed that mice fed an HF diet for 8 weeks had a reduction in BMD and greater spacing between trabeculae. Furthermore, they observed a lower number of osteoblasts and a higher number of osteoclasts, which were reversed with dietary restriction, showing a positive effect of CR on bone. However, in this study the CR model offered a smaller amount of HF diet, without changing the diet profile to a standard diet. In contrast, Shen et al., (2013) found results similar to those presented in this work. They induced obesity through an HF diet in Sprague-Dawley rats, part of which continued to receive an HF diet and the rest received CR. In rats on only HF diet, an increase in BMD, total bone and cortical area was observed, while in the RC group there was a reversal of these parameters, showing a negative effect of RC on the bone. Duque et al., (2020) evaluated male Sprague Dawley rats subjected to CR for 12 months, in which the groups were fed different protein sources: casein and soy. There was a significant decrease in BV/TV in both CR groups, so the authors also considered that CR had a negative effect on bone regardless of the dietary protein source. The inconsistency in the results of CR studies can be attributed to the different experimental protocols, such as the degree of restriction and duration of dietary intervention, as well as the different ages of the animals studied. Furthermore, there is no clear definition of whether the changes observed, especially those related to the reduction of bone microarchitecture, would be considered harmful or not, given the different benefits related to the practice of CR as a treatment for obesity. Although CR can influence bone microarchitecture, it is not yet possible to conclude whether these changes negatively affect bone quality in functional terms. The combination of biochemical markers and stiffness and/or mineralization tests would provide a more comprehensive view of the molecular mechanisms involved in the changes observed in bone mass, quality and functionality, in which bone adaptation is speculated according to the context of obesity or CR. Therefore, a future approach that combines these parameters may provide a more complete understanding of the effects of CR on bone metabolism, and thus clarify whether the bone effect observed in CR is a physiological response proportional to the decrease in mechanical load through weight loss.

In the present study, an increase in the number of osteoblasts and osteoclasts observed in CR was observed. This may be related to the activation of the bone remodeling cycle, in which osteoblasts, responsible for bone formation, and osteoclasts, involved in bone resorption, play critical roles in maintaining bone balance (Kim et al., 2020). The increase in the RANKL/OPG ratio suggests greater osteoclastogenesis, since RANKL promotes the formation and activity of osteoclasts, while osteoprotegerin (OPG) acts as a competitive inhibitor of RANKL, protecting the

bone from excessive resorption (Florencio-Silva et al., 2015). The constancy in osteocytes, which are the main mechanosensors of bone and regulators of bone remodeling (Hao et al., 2017), indicates that, despite the changes observed, the mechanical responsiveness of bone may have been preserved, maintaining the role of osteocytes in modulation of osteoblast and osteoclast activity under CR. This analysis contributes to the literature, since in CR studies these parameters are not commonly analyzed, as is the gene expression of markers such as osteocalcin, osteopontin and cathepsin K.

The induction of obesity in experimental models causes an increase in body weight and adiposity, which is associated with adipocyte hypertrophy and increased expression of inflammatory cytokines in adipose tissue. Furthermore, it has several metabolic consequences, including inflammation, insulin resistance and ectopic fat deposition in the liver (Gao et al., 2015). In this study, an increase in adiposity, weight gain, as well as changes in glycemic metabolism were observed with the HF diet, and these changes were reversed with CR. The increase in adiposity and metabolic changes present in obesity have been associated with bone dysfunction. Wei et al., (2014) showed that insulin resistance develops in bone as a result of loss of insulin receptors associated with lipotoxicity. Insulin resistance in osteoblasts led to a decrease in circulating levels of the active form of osteocalcin, thereby decreasing insulin sensitivity in skeletal muscle. Another relevant factor is leptin, a hormone linked to energy metabolism, which also influences bone metabolism. In HF diet-induced compensatory growth models, administration of a leptin antagonist during this period impaired bone formation, suggesting that leptin exerts a protective effect in maintaining bone metabolism by balancing the expression of OPG and RANKL (Liu et al., 2021). Furthermore, decreased adiponectin levels, often seen in obesity, may reduce protection against bone resorption, exacerbating the negative effects of inflammatory cytokines (Lewis et al., 2021). However, this association between metabolic changes and bone health within the context of CR is not very clear.

Our work showed an improvement in the metabolic changes and adiposity observed in mice fed an HF diet when treated with CR. The expansion of bone marrow adipose tissue (BMAT) is influenced by different factors, including aging, use of corticosteroid medications, and CR (Hardouin et al., 2016). Devlin et al., (2010); Devlin and Rosen (2015) observed an increase in BMAT with CR, which may be associated with a loss of bone mass and bone fragility. Although the presence of adipocytes in the bone was not evaluated in our study, a tendency for an increase in PPAR γ was observed in relation to untreated obese animals, which could indicate a favoring of the differentiation of adipocytes to the detriment of osteoblasts. We understand that CR is a therapeutic alternative with evident benefits, mainly metabolic, however, we suggest that the negative impact on the bone seems to exist to achieve homeostasis again, considering that bone remodeling is a dynamic process. Therefore, we hypothesize that adjuvant alternatives to CR may be necessary in order to preserve bone health in this context.

This study has some limitations that must be considered. Firstly, the research was conducted in an animal model, which may limit the extrapolation of the findings to humans. Furthermore, the period of exposure to diet and calorie restriction may not fully reflect the long-term effects of these interventions on bone metabolism. The analysis was also focused on bone structure and specific markers of bone remodeling, not covering other regulatory metabolic pathways that could also influence bone health. Another important aspect to consider is that bone is a dynamic tissue, and the increased impact on the bone due to body weight can trigger an adaptive response to increase bone mass. However, the literature shows that these changes in body composition can harm bone health. Therefore, it would be necessary to assess bone quality in more depth, using analyzes of bone stiffness or bone matrix composition. Finally, to expand the knowledge obtained in this study, future research could explore other approaches, such as combining CR with physical exercise or the use of nutritional supplements. These combined interventions could reveal more effective approaches for managing bone health in the context of obesity.

5. Conclusion

The results of this study showed that the HF diet led to an increase in trabecular bone mass, an effect that can be understood as an adaptation of the body to excess weight. However, this effect does not seem beneficial due to the adverse consequences on metabolic health and the increase in adiposity induced by the HF diet. In contrast, CR proved to be a valid treatment strategy for obesity, completely reversing the increases in adiposity and the changes in glycemic metabolism induced by the HF diet. However, in the bone context, CR induced a return to baseline parameters, which can be suggested as a reduction proportional to weight loss. Nevertheless, it is crucial to further investigate this CR-induced bone reversal to determine its real impact on bone health. Thus, despite the benefits of CR practice, its effects on bone tissue must be carefully considered, which may indicate the need for complementary interventions in clinical practice, especially in individuals with bone alterations resulting from obesity.

Acknowledgments

The authors acknowledge CNPq, CAPES, and FAPEMIG for financial support.

REFERENCES

- Acosta-Rodríguez, V.A., Rijo-Ferreira, F., Green, C.B., Takahashi, J.S., 2021. Importance of circadian timing for aging and longevity. *Nat Commun* 12, 2862. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22922-6>
- Ansari, M., 2019. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Prog Biomater* 8, 223–237. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z>
- Aslam, M.N., Jepsen, K.J., Khoury, B., Graf, K.H., Varani, J., 2016. Bone structure and function in male C57BL/6 mice: Effects of a high-fat Western-style diet with or without trace minerals. *Bone Reports* 5, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2016.05.002>
- Behrendt, A.-K., Kuhla, A., Osterberg, A., Polley, C., Herlyn, P., Fischer, D.-C., Scotland, M., Wree, A., Histing, T., Menger, M.D., Müller-Hilke, B., Mittlmeier, T., Vollmar, B., 2016. Dietary Restriction-Induced Alterations in Bone Phenotype: Effects of Lifelong Versus Short-Term Caloric Restriction on Femoral and Vertebral Bone in C57BL/6 Mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 31, 852–863. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2745>
- Benova, A., Tencerova, M., 2020. Obesity-Induced Changes in Bone Marrow Homeostasis. *Front. Endocrinol.* 11, 294. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00294>
- Cao, J.J., Gregoire, B.R., Gao, H., 2009. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. *Bone* 44, 1097–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.02.017>
- Cavagni, J., De Macedo, I.C., Gaio, E.J., Souza, A., De Molon, R.S., Cirelli, J.A., Hoefel, A.L., Kucharski, L.C., Torres, I.L.D.S., Rösing, C.K., 2016. Obesity and Hyperlipidemia Modulate Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *Journal of Periodontology* 87. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150330>
- Cheng, M., Li, T., Li, W., Chen, Y., Xu, W., Xu, L., 2018. Leptin can promote mineralization and up-regulate RANKL mRNA expression in osteoblasts from adult female SD rats. *Int J Clin Exp Pathol* 11, 9.
- Devlin, M.J., Cloutier, A.M., Thomas, N.A., Panus, D.A., Lotinun, S., Pinz, I., Baron, R., Rosen, C.J., Bouxsein, M.L., 2010. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J of Bone & Mineral Res* 25, 2078–2088. <https://doi.org/10.1002/jbmr.82>
- Devlin, M.J., Rosen, C.J., 2015. The bone–fat interface: basic and clinical implications of marrow adiposity. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 3, 141–147. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70007-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70007-5)
- Duque, G., Al Saedi, A., Rivas, D., Miard, S., Ferland, G., Picard, F., Gaudreau, P., 2020. Differential Effects of Long-Term Caloric Restriction and Dietary Protein Source on Bone and Marrow Fat of the Aging Rat. *The Journals of Gerontology: Series A* 75, 2031–2036. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa093>
- Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., Anderson, J.J., 1993. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: The framingham study. *Journal of Bone and Mineral Research* 8, 567–573. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650080507>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R.D.S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S., 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>

- Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, H.-J.A., Duarte, J.A., 2014. Bone Quality: The Determinants of Bone Strength and Fragility. *Sports Med* 44, 37–53. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0100-7>
- Fuglsang-Nielsen, R., Rakvaag, E., Vestergaard, P., Hartmann, B., Holst, J.J., Hermansen, K., Gregersen, S., Starup-Linde, J., 2020. Consumption of nutrients and insulin resistance suppress markers of bone turnover in subjects with abdominal obesity. *Bone* 133, 115230. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115230>
- Gao, M., Ma, Y., Liu, D., 2015. High-Fat Diet-Induced Adiposity, Adipose Inflammation, Hepatic Steatosis and Hyperinsulinemia in Outbred CD-1 Mice. *PLoS ONE* 10, e0119784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119784>
- Halade, G.V., Rahman, M.M., Williams, P.J., Fernandes, G., 2010. High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21, 1162–1169. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.10.002>
- Hao, Z., Ma, Y., Wu, J., Li, X., Chen, H., Shen, J., Wang, H., 2017. Osteocytes regulate osteoblast differentiation and osteoclast activity through Interleukin-6 under mechanical loading. *RSC Adv.* 7, 50200–50209. <https://doi.org/10.1039/C7RA09308J>
- Hardouin, P., Rharass, T., Lucas, S., 2016. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front. Endocrinol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00085>
- Heymsfield, S.B., Wadden, T.A., 2017. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N Engl J Med* 376, 254–266. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1514009>
- Hofer, S.J., Davinelli, S., Bergmann, M., Scapagnini, G., Madeo, F., 2021. Caloric Restriction Mimetics in Nutrition and Clinical Trials. *Front. Nutr.* 8, 717343. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.717343>
- Hwangbo, D.-S., Lee, H.-Y., Abozaid, L.S., Min, K.-J., 2020. Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. *Nutrients* 12, 1194. <https://doi.org/10.3390/nu12041194>
- Ilchovska, D. (Daisy), Barrow, D.M., 2021. An Overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions. *Autoimmunity Reviews* 20, 102741. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102741>
- Kim, J.-M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M.B., Shim, J.-H., 2020. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 9, 2073. <https://doi.org/10.3390/cells9092073>
- Lewis, J.W., Edwards, J.R., Naylor, A.J., McGettrick, H.M., 2021. Adiponectin signalling in bone homeostasis, with age and in disease. *Bone Res* 9, 1. <https://doi.org/10.1038/s41413-020-00122-0>
- Li, Y., 2022. Association between obesity and bone mineral density in middle-aged adults. *J Orthop Surg Res* 17, 268. <https://doi.org/10.1186/s13018-022-03161-x>
- Liu, L., Rosen, C.J., 2023. New Insights into Calorie Restriction Induced Bone Loss. *Endocrinol Metab* 38, 203–213. <https://doi.org/10.3803/EnM.2023.1673>
- Liu, L., Shen, W., Zhang, Z.H., Wang, L.J., Kraemer, F.B., 2010. Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: Roles of PPAR γ and adiponectin. *Journal Cellular Physiology* 225, 837–845. <https://doi.org/10.1002/jcp.22291>

- Liu, X., Liang, Y., Xia, N., Liu, W., Yang, Q., Wang, C., 2021. Decrease in leptin mediates rat bone metabolism impairments during high-fat diet-induced catch-up growth by modulating the OPG/RANKL balance. *3 Biotech* 11, 103. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02658-2>
- Montalvany-Antonucci, Carina Cristina, Zicker, M.C., Ferreira, A.V.M., Macari, S., Ramos-Junior, E.S., Gomez, R.S., Pereira, T.S.F., Madeira, M.F.M., Fukada, S.Y., Andrade, I., Silva, T.A., 2018. High-fat diet disrupts bone remodeling by inducing local and systemic alterations. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 59, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.006>
- Montalvany-Antonucci, C.C., Zicker, M.C., Macari, S., Pereira, T.S.F., Diniz, I.M.A., Andrade, I., Ferreira, A.V.M., Silva, T.A., 2018. High-refined carbohydrate diet promotes detrimental effects on alveolar bone and femur microarchitecture. *Archives of Oral Biology* 86, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.11.013>
- Most, J., Tosti, V., Redman, L.M., Fontana, L., 2017. Calorie restriction in humans: An update. *Ageing Research Reviews* 39, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.005>
- Rinonapoli, G., Pace, V., Ruggiero, C., Ceccarini, P., Bisaccia, M., Meccariello, L., Caraffa, A., 2021. Obesity and Bone: A Complex Relationship. *IJMS* 22, 13662. <https://doi.org/10.3390/ijms222413662>
- Schafer, A.L., 2016. Decline in Bone Mass During Weight Loss: A Cause for Concern? *Journal of Bone and Mineral Research* 31, 36–39. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2754>
- Shen, C.-L., Zhu, W., Gao, W., Wang, S., Chen, L., Chyu, M.-C., 2013. Energy-restricted diet benefits body composition but degrades bone integrity in middle-aged obese female rats. *Nutrition Research* 33, 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.05.008>
- Stechschulte, L.A., Czernik, P.J., Rotter, Z.C., Tausif, F.N., Corzo, C.A., Marciano, D.P., Asteian, A., Zheng, J., Bruning, J.B., Kamenecka, T.M., Rosen, C.J., Griffin, P.R., Lecka-Czernik, B., 2016. PPAR γ Post-translational Modifications Regulate Bone Formation and Bone Resorption. *eBioMedicine* 10, 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.040>
- Suchacki, K.J., Thomas, B.J., Ikushima, Y.M., Chen, K.-C., Fyfe, C., Tavares, A.A., Sulston, R.J., Lovdel, A., Woodward, H.J., Han, X., Mattiucci, D., Brain, E.J., Alcaide-Corral, C.J., Kobayashi, H., Gray, G.A., Whitfield, P.D., Stimson, R.H., Morton, N.M., Johnstone, A.M., Cawthorn, W.P., 2023. The effects of caloric restriction on adipose tissue and metabolic health are sex- and age-dependent. *eLife* 12, e88080. <https://doi.org/10.7554/eLife.88080>
- Tian, L., Wang, C., Xie, Y., Wan, S., Zhang, K., Yu, X., 2018. High Fructose and High Fat Exert Different Effects on Changes in Trabecular Bone Micro-structure. *The Journal of nutrition, health and aging* 22, 361–370. <https://doi.org/10.1007/s12603-017-0933-0>
- Upadhyay, J., Farr, O.M., Mantzoros, C.S., 2015. The role of leptin in regulating bone metabolism. *Metabolism* 64, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.021>
- Veis, D.J., O'Brien, C.A., 2023. Osteoclasts, Master Sculptors of Bone. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 18, 257–281. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031521-040919>
- Villareal, D.T., Fontana, L., Das, S.K., Redman, L., Smith, S.R., Saltzman, E., Bales, C., Rochon, J., Pieper, C., Huang, M., Lewis, M., Schwartz, A.V., for the CALERIE Study Group, 2016. Effect of Two-Year Caloric Restriction on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in Non-Obese Younger Adults: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Bone and Mineral Research* 31, 40–51. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2701>

- Weir, J., Ferron, M., Clarke, C.J., Hannun, Y.A., Jiang, H., Blarer, W.S., Karsenty, G., 2014. Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation. *J. Clin. Invest.* 124, 1781–1793. <https://doi.org/10.1172/JCI72323>
- Wen, X., Zhang, B., Wu, B., Xiao, H., Li, Z., Li, R., Xu, X., Li, T., 2022. Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. *Sig Transduct Target Ther* 7, 298. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01149-x>
- Xu, J., Yu, L., Liu, F., Wan, L., Deng, Z., 2023. The effect of cytokines on osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling in osteoporosis: a review. *Front. Immunol.* 14, 1222129. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1222129>
- Yanagihara, G.R., Shimano, R.C., Atsuko Tida, J., Suzuki Yamanaka, J., Yasuyo Fukada, S., Issa, J.P.M., Shimano, A.C., Tavares, J.M.R.S., 2017. Influence of high-fat diet on bone tissue: An experimental study in growing rats. *The Journal of nutrition, health and aging* 21, 1337–1343. <https://doi.org/10.1007/s12603-017-0871-x>
- Zhang, Y., Wu, H., Li, C., Liu, C., Liu, M., Liu, X., Yin, Q., Li, X., Xie, R., 2023. Associations between weight-adjusted waist index and bone mineral density: results of a nationwide survey. *BMC Endocr Disord* 23, 162. <https://doi.org/10.1186/s12902-023-01418-y>
- Zhou, R., Guo, Qiaoyue, Xiao, Y., Guo, Qi, Huang, Y., Li, C., Luo, X., 2021. Endocrine role of bone in the regulation of energy metabolism. *Bone Res* 9, 25. <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00142-4>
- Zhu, R., Wang, Z., Xu, Y., Wan, H., Zhang, X., Song, M., Yang, H., Chai, Y., Yu, B., 2022. High-Fat Diet Increases Bone Loss by Inducing Ferroptosis in Osteoblasts. *Stem Cells International* 2022, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2022/9359429>