

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Enfermagem
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde

Bruna Caroline de Oliveira

**EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE NA SAÚDE ÓSSEA EM CAMUNDONGOS
COM OBESIDADE**

Belo Horizonte

2024

Bruna Caroline de Oliveira

**EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE NA SAÚDE ÓSSEA EM CAMUNDONGOS
COM OBESIDADE**

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

Linha de pesquisa: Nutrição Clínica e Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Chaves de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos
Ferreira

Belo Horizonte

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

OL48e Oliveira, Bruna Caroline de.
Efeito do jejum intermitente na saúde óssea em camundongos com obesidade [recurso eletrônico]. / Bruna Caroline de Oliveira. - - Belo Horizonte: 2024.
86f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

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

1. Jejum Intermitente. 2. Dieta Hiperlipídica. 3. Obesidade. 4. Remodelação Óssea. 5. Dissertação Acadêmica. I. Oliveira, Marina Chaves de. II. Ferreira, Adaliene Versiani Matos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: QT 235

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ENFERMAGEM - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO SAÚDE

ATA DE NÚMERO 109 (CENTO E NOVE) DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA BRUNA CAROLINE DE OLIVEIRA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.

Aos 28 (vinte e oito) dias do mês de agosto de dois mil e vinte e quatro, às 14:00 horas, realizou-se por meio de videoconferência, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação "**EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE NA SAÚDE ÓSSEA EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE**", da aluna **Bruna Caroline de Oliveira**, 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, Mila Fernandes Moreira Madeira e Gabriela Barbosa Pires Fagundes, 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:

☒ 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, 28 de agosto de 2024.

Profa. Dra. Marina Chaves de Oliveira

Orientadora (UFMG)

Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira

Membro Titular (UFMG)

Profa. Dra. Gabriela Barbosa Pires Fagundes

Membro Titular (UFMG)



Documento assinado eletronicamente por **Marina Chaves de Oliveira**, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 30/08/2024, às 08:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

05/09/2024 09:38

SEI/UFMG - 3504919 - Ata de defesa de Dissertação/Tese



Documento assinado eletronicamente por **Mila Fernandes Moreira Madeira, Professora do Magistério Superior**, em 30/08/2024, às 13:42, 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 **Gabriela Barbosa Pires Fagundes, Usuária Externa**, em 02/09/2024, às 09:57, 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 **3504919** e o código CRC **1B88C929**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha família. Aos meus pais e à minha irmã, um obrigado enorme por todo o amor, apoio incondicional e paciência durante essa jornada. Vocês foram a minha base e fonte de inspiração, e sem o apoio de vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus amigos, agradeço por estarem sempre presentes, oferecendo palavras de encorajamento e momentos de distração que foram essenciais para manter o equilíbrio. Um agradecimento especial à Ana que dividiu comigo os primeiros e últimos dias dessa jornada desafiadora e, celebraremos juntas essa conquista.

Agradeço também ao grupo de pesquisa Imunometabolismo, que foi fundamental para o meu desenvolvimento em meio a ciência há tantos anos. Em especial a minha Orientadora Marina e às meninas do nosso “grupinho do osso”: Fran, Joyce e Yas. A colaboração, o entusiasmo e as discussões produtivas foram cruciais para a conclusão deste trabalho.

Não posso deixar de mencionar as instituições financiadoras que tornaram este projeto possível.

A todos que contribuíram de alguma forma para esta jornada, meu sincero agradecimento.

RESUMO

O tecido ósseo desempenha funções essenciais como suporte mecânico, locomoção, proteção e armazenamento de minerais e gordura e, está intimamente ligado ao metabolismo e à regulação hormonal. A obesidade, caracterizada pelo excesso de tecido adiposo e inflamação crônica de baixo grau, pode influenciar negativamente a saúde óssea, aumentando a fragilidade dos ossos devido a respostas inflamatórias e redução na formação de osteoblastos. O jejum intermitente tem surgido como uma estratégia potencial para reduzir a gordura corporal e melhorar a saúde metabólica, mas seus efeitos na saúde óssea, ainda são escassos e controversos. Assim, este estudo teve como objetivo investigar o efeito do jejum intermitente como estratégia terapêutica para a saúde óssea em camundongos com obesidade. Para isso, camundongos C57BL/6 foram divididos em três grupos experimentais: (i) camundongos alimentados com dieta padrão LABINA® (controle) (C); (ii) camundongos alimentados com dieta rica em gordura a 45% (HF); e (iii) camundongos alimentados com dieta HF e submetidos ao jejum intermitente (IF). A intervenção com jejum intermitente foi iniciada após os animais do grupo (iii) atingirem 40 g, e consistiu em 35 dias de tratamento experimental, intercalando 24 horas de jejum com 24 horas em estado alimentado com a dieta HF. Camundongos alimentados com dieta HF apresentaram aumento da massa óssea associada com aumento de peso, adiposidade e alterações metabólicas. A intervenção com jejum intermitente não reverteu as alterações na microarquitetura óssea do fêmur de camundongos obesos, embora tenha aumentado a presença de osteoblastos, não afetou os marcadores sistêmicos de remodelamento ósseo nem alterou a expressão dos genes relacionados à remodelação e manutenção óssea na tíbia. Apesar da redução de peso, os camundongos submetidos ao jejum intermitente apresentaram apenas uma reversão parcial da adiposidade, sem melhorias significativas nas alterações metabólicas associadas à obesidade. Assim, o jejum intermitente não parece ser eficaz na reversão das alterações ósseas associadas à obesidade ou na melhoria das condições metabólicas adversas causadas por dietas ricas em gordura.

Palavras-chave: saúde óssea; jejum intermitente; dieta rica em gordura; obesidade; remodelamento ósseo.

ABSTRACT

Bone tissue performs essential functions such as mechanical support, locomotion, protection and storage of minerals and fat and is closely linked to metabolism and hormonal regulation. Obesity, characterized by excess adipose tissue and chronic low-grade inflammation, can negatively influence bone health by increasing bone fragility due to inflammatory responses and reduced osteoblast formation. Intermittent fasting has emerged as a potential strategy for reducing body fat and improving metabolic health, but its effects on bone health are still scarce and controversial. Therefore, this study aimed to investigate the effect of intermittent fasting as a therapeutic strategy for bone health in mice with obesity. For this, C57BL/6 mice were divided into three experimental groups: (i) mice fed a standard laboratory diet (LABINA®) (C); (ii) mice fed at 45% high-fat diet (HF); and (iii) mice fed an HF diet and subjected to intermittent fasting (IF). The intervention with intermittent fasting was started after the animals in group (iii) reached 40 g, and consisted of 35 days of experimental treatment, interspersing 24 hours of fasting with 24 hours in a state fed with the HF diet. The intervention with intermittent fasting did not reverse the changes in the bone microarchitecture of the femur of obese mice, although it increased the presence of osteoblasts. Intermittent fasting did not affect systemic markers of bone remodeling, nor did it alter the expression of genes related to bone remodeling and maintenance in the tibia. Despite weight reduction, mice subjected to intermittent fasting showed only a partial reversal of adiposity, without significant improvements in the metabolic changes associated with obesity. Thus, intermittent fasting does not appear to have substantial impacts on bone and metabolic health in obese mice.

Keywords: bone health; intermittent fasting; high-fat diet; obesity; bone remodeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Sistema RANK/RANKL/OPG.....	16
Figura 2.Hipertrofia do tecido adiposo e produção das citocinas pró-inflamatórias..	18
Figura 3.Comunicação do tecido adiposo e tecido ósseo.. ..	20
Figura 4. Delineamento experimental.....	25
Figura 5.Análise da região trabecular de fêmur de camundongos por MicroCT.....	32
Figura 6. Análise da região cortical de fêmur de camundongos por MicroCT.	33
Figura 7. Análise histológica do fêmur de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos..	34
Figura 8. Dosagens de marcadores sistêmicos de remodelamento ósseo.....	35
Figura 9. Análise da expressão gênica de marcadores de formação e reabsorção óssea na tíbia de camundongos por RT-PCR.....	35
Figura 10. Análise da expressão gênica de marcadores de diferenciação de osteoblastos e diferenciação de adipócitos na tíbia de camundongos por RT-PCR..	36
Figura 11. Análise da expressão gênica de marcadores de mineralização, adesão celular, atividade de reabsorção óssea e inflamação.. ..	37
Figura 12. Alterações no peso corporal e na adiposidade.....	38
Figura 13. Alterações no metabolismo glicêmico.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes da dieta rica em gordura saturada 45% (HF).	26
Tabela 2. Sequência dos primers utilizados no RT- qPCR.	30

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

BMD – *Bone mineral density* – Densidade mineral óssea

BV/TV – *Bone volume fraction* – Volume ósseo/Volume total

C – Controle – dieta LABINA®

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Ct.Th – *Cortical thickness* – Espessura cortical

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

H&E – Hematoxilina-Eosina

HF – *High Fat* - Dieta rica em gordura

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IGF-1 – *Insulin-like growth factor-1* – Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1

IF – *Intermittent Fasting* - Jejum intermitente

IL – Interleucina

IMC – Índice de Massa Corporal

M-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos

Micro-CT – *Micro-computed microtomography* – Microtomografia computadorizada
mL – Mililitro

OCN – Osteocalcina

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPG – Osteoprotegerina

OPN – Osteopontina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RANK – *Receptor activator of nuclear factor kappa B* – Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL – *Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand* – Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

RNA – *Ribonucleic acid* – Ácido ribonucleico

RUNX2 – Fator de transcrição ligado ao domínio Runt-2

SMI – *Structure model index* – Índice de modelo de estrutura

SOST – Esclerostina

TAE – Tecido Adiposo Epididimal

TAM – Tecido Adiposo Mesentérico

TAR – Tecido Adiposo Retroperitoneal

TAS – Tecido Adiposo Subcutâneo

Tb.N – *Trabecular number* – Número de trabéculas¹³

Tb.Th – *Trabecular thickness* – Espessura trabecular

Tb.Sp – *Trabecular separation* – Separação trabecular

TNF – *Tumor necrosis factor* – Fator de necrose tumoral

TRAP – *Tartrate-resistant acid phosphatase* – Fosfatase ácida tartarato-resistente

TTOG – Teste de Tolerância Oral à Glicose

Tt.Ar – Área total

VEGF – *Vascular endothelial growth factor* – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Biologia do tecido ósseo	14
2.2. Obesidade	17
2.3. Obesidade e as suas implicações na saúde óssea	19
2.4. Jejum, obesidade e metabolismo ósseo	21
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. METODOLOGIA	25
4.1. Delineamento experimental	25
4.2. Composição das dietas	26
4.3. Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)	26
4.4. Coleta de amostras	26
4.5. Microtomografia computadorizada (Micro-Ct)	27
4.6. Histomorfometria do fêmur	28
4.8. Avaliações sorológicas de marcadores de células ósseas e glicose	29
4.9. Reação em cadeia pela polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)	29
4.10. Análise estatística	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Jejum intermitente não reverteu as alterações na microarquitetura óssea no fêmur de camundongos com obesidade	32
5.2. Atividade das células ósseas: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos no fêmur	33
5.3. A intervenção com jejum intermitente não alterou marcadores de remodelamento ósseo	34
5.5.1. Jejum intermitente não melhora alterações metabólicas em camundongos alimentados com dieta HF.	38
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO A – Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA)	61
APÊNDICE A – ARTIGO	62

1. INTRODUÇÃO

O esqueleto humano é composto por peças ósseas que apresentam um tecido dinâmico, o qual desempenha funções cruciais, como suporte mecânico, locomoção corporal, fixação de músculos, proteção de órgãos, produção de células sanguíneas na medula óssea vermelha, depósito de gordura na medula óssea amarela, e reserva de minerais essenciais (1–3). Esse tecido participa ativamente no metabolismo de micronutrientes como cálcio e fósforo, e contribui para o controle de hormônios como calcitonina, paratormônio e vitamina D (4). Sua composição consiste em tecido conjuntivo e matriz óssea, o que garante a estabilidade do tecido (5,6), e diversas células, como osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, participando do constante processo de remodelação tecidual (7,8). Essas células desempenham papéis na produção, manutenção e reabsorção da matriz óssea, garantindo a estabilidade do tecido. Os osteoblastos depositam a matriz óssea, diferenciando-se em osteócitos que, ao amadurecer, se comunicam e sustentam os ossos (9–11). Por outro lado, osteoclastos são responsáveis por digerir a matriz óssea, desempenhando um papel fundamental no processo de reabsorção do tecido (1,12). Dessa forma, os ossos são capazes de manter sua integridade de maneira contínua. Fatores de crescimento, hormônios, nutrientes, medicamentos e moléculas inflamatórias, dentre outros, podem influenciar a regulação, síntese e reabsorção óssea (8,13). Sendo assim, condições como a obesidade podem ter influência na saúde óssea.

O padrão atual de consumo alimentar da população, caracterizado pelo consumo de alimentos ricos em carboidratos refinados, gordura saturada e excessivo em calorias, tem contribuído para o aumento significativo na prevalência da obesidade (14,15). Essa condição de saúde é marcada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo, o qual está relacionado a uma inflamação crônica de baixo grau e alterações metabólicas locais e sistêmicas (16,17). Anteriormente acreditava-se que o excesso de tecido adiposo na obesidade poderia exercer uma carga mecânica adicional sobre os ossos, o que em teoria poderia ser benéfico ao estimular a formação óssea por meio de processos de adaptação e remodelação (18–20). Em seguida, começaram a surgir estudos nos quais a relação entre o Índice de Massa Corporal (IMC) elevado e a adiposidade com a redução no risco de fraturas não era tão evidente, havendo controvérsias nos resultados (21–23). Em contrapartida, estudos mais recentes

revelaram ligações entre o excesso de gordura e aumento da fragilidade óssea. Essas respostas inflamatórias podem afetar o processo de remodelamento ósseo, contribuindo para o desenvolvimento de doenças ósseas (24–26), o que torna o osso mais frágil e susceptível a fraturas.

Diferentes hipóteses são discutidas sobre como a obesidade influencia o processo de remodelamento ósseo. Evidências sugerem que, devido ao fato de adipócitos e osteoblastos derivarem de uma célula progenitora comum, o desenvolvimento da obesidade pode estimular a formação de adipócitos na medula óssea e, ao mesmo tempo, reduzir a formação de osteoblastos (27). Outra hipótese é que durante a obesidade, por ser uma doença inflamatória crônica de baixo grau, há liberação de citocinas pró-inflamatórias que estimulariam o processo de desmineralização óssea (28). A busca por diversos tratamentos com a finalidade de evitar a progressão de doenças ósseas e melhorar a obesidade, têm sido estudados (29) dentre eles, estratégias nutricionais para o tratamento da obesidade, como o jejum. Existem várias formas de praticar o jejum descritas na literatura, sendo os protocolos mais utilizados: (i) alimentação com tempo restrito (definida janela de ingestão alimentar, de 12 a 20 horas), (ii) jejum intermitente (incluindo jejum em dias alternados ou jejum de 2 dias por semana, por exemplo) e (iii) jejum periódico (com duração de três dias ou mais a cada 2 ou mais semanas) (30,31). Estudos indicam que adotar o jejum pode ser uma estratégia eficaz para diminuir a gordura corporal e o tamanho das células de gordura, conhecidas como adipócitos. Além disso, o jejum desencadeia respostas adaptativas nas células, contribuindo para a redução do estresse celular, a modificação na secreção de substâncias adiposas e o aumento da quebra de gordura por meio da ativação da lipólise (32–36). Por esses motivos, o jejum pode desempenhar um papel significativo no tratamento da obesidade e de distúrbios metabólicos e consequentemente auxiliar no tratamento de alterações ósseas (2).

Nesse contexto, o jejum intermitente tem ganhado popularidade como uma estratégia potencial para controle de peso e melhoria da saúde metabólica. No entanto, existem preocupações sobre os efeitos dessa estratégia na saúde óssea, especialmente em populações com obesidade, onde a densidade mineral óssea já pode estar comprometida. Portanto, o presente estudo propõe investigar o efeito do

jejum intermitente como estratégia terapêutica na saúde óssea em camundongos com obesidade, visando entender se seus benefícios metabólicos compensam potenciais impactos na densidade óssea. Essa pesquisa é crucial para fornecer evidências robustas que orientem práticas clínicas e recomendações dietéticas adequadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biologia do tecido ósseo

O esqueleto humano é composto por ossos e cartilagens que se conectam por meio de ligamentos e tendões. Os ossos são estruturas complexas e dinâmicas, fundamentais para o suporte físico, proteção de órgãos vitais, movimento e homeostase mineral (1,2,37). Eles apresentam diferentes formas e funções dependendo de sua localização e sua classificação é baseada em sua forma (3,38). Por exemplo, o fêmur é considerado um osso longo devido ao seu comprimento maior que a largura e espessura. Sua principal função é fornecer suporte ao esqueleto, sendo afetado diretamente pela carga mecânica e, portanto, mais suscetível a fraturas (39,40).

Os ossos são compostos pelo perióstio, endóstio, matriz óssea e orgânica. O perióstio é a membrana responsável por revestir a superfície externa do osso e possui potencial osteogênico, permitindo crescimento ósseo, já o endóstio é encontrado na superfície interna dos ossos, local onde se encontra o canal medular (41). A matriz desempenha um papel fundamental no tecido ósseo, sendo constituída pela matriz óssea (inorgânica), composta de cristais de hidroxiapatita, fosfato de cálcio e íons associados que possuem função de conferir ao osso maior rigidez e resistência; e pela parte orgânica, composta por colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas, que contribuem para a manutenção da matriz inorgânica (42,43).

Os ossos podem ser divididos em dois tipos, compacto (ou cortical) e esponjoso (ou trabecular). O cortical é responsável por fornecer suporte e proteção e representa cerca de 80% da massa óssea total, enquanto o trabecular, por ser mais poroso e menos denso, compõe aproximadamente 20% da massa óssea e possui maior capacidade de adaptação a cargas mecânicas (2). Dentro dos ossos, encontra-se a medula óssea, que se subdivide em medula óssea vermelha, responsável pela produção de células sanguíneas e medula óssea amarela, onde adipócitos estão presentes (2,44).

Apesar de sua estrutura rígida, o tecido ósseo é considerado dinâmico devido à presença de diferentes células que participam do seu processo de remodelamento.

Esse processo inclui formação, reabsorção, reparação e manutenção do osso. (45). As células especializadas envolvidas são os osteoblastos, responsáveis pela síntese e mineralização do osso, os osteócitos, formados a partir do aprisionamento dos osteoblastos dentro da matriz óssea, e os osteoclastos, que desempenham um papel crucial na reabsorção óssea (7).

O osteoide é a matriz nova, não mineralizada produzida pelos osteoblastos durante a formação óssea. O osteoide proporciona suporte estrutural e flexibilidade ao osso em desenvolvimento (38,46). Por não conter minerais, o osteoide não é rígido o suficiente para suportar cargas mecânicas intensas, mas serve como base para a mineralização subsequente, transformando-se em osso duro e resistente (46). É composta principalmente por colágeno tipo I e proteínas como osteocalcina (OCN) que é uma proteína que se liga ao cálcio e desempenha um papel essencial na mineralização óssea, atuando como um marcador para a atividade dos osteoblastos(47). A osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea, também são importantes na regulação da mineralização e na adesão celular(48).

A manutenção da homeostase óssea é realizada principalmente pelo sistema RANK/RANKL/OPG. A célula pré-osteoclástica expressa em sua superfície o receptor do ativador do fator nuclear kappa B (RANK) e o receptor para o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (1). O RANK é um receptor localizado na superfície dos osteoclastos. Quando o RANKL, uma proteína produzida pelos osteoblastos, se liga ao RANK, essa ligação ativa uma cascata de sinalização que promove a maturação dos osteoclastos, as células responsáveis pela reabsorção óssea. Esse processo inclui a ativação do fator nuclear de células T ativadas (NFATc1) (1,49). Simultaneamente, os osteoblastos produzem a OPG, uma proteína que atua como um bloqueador ao se ligar ao RANKL, impedindo sua interação com o RANK e, assim, bloqueando a diferenciação e a atividade dos osteoclastos (1,8,49). (Figura 1).

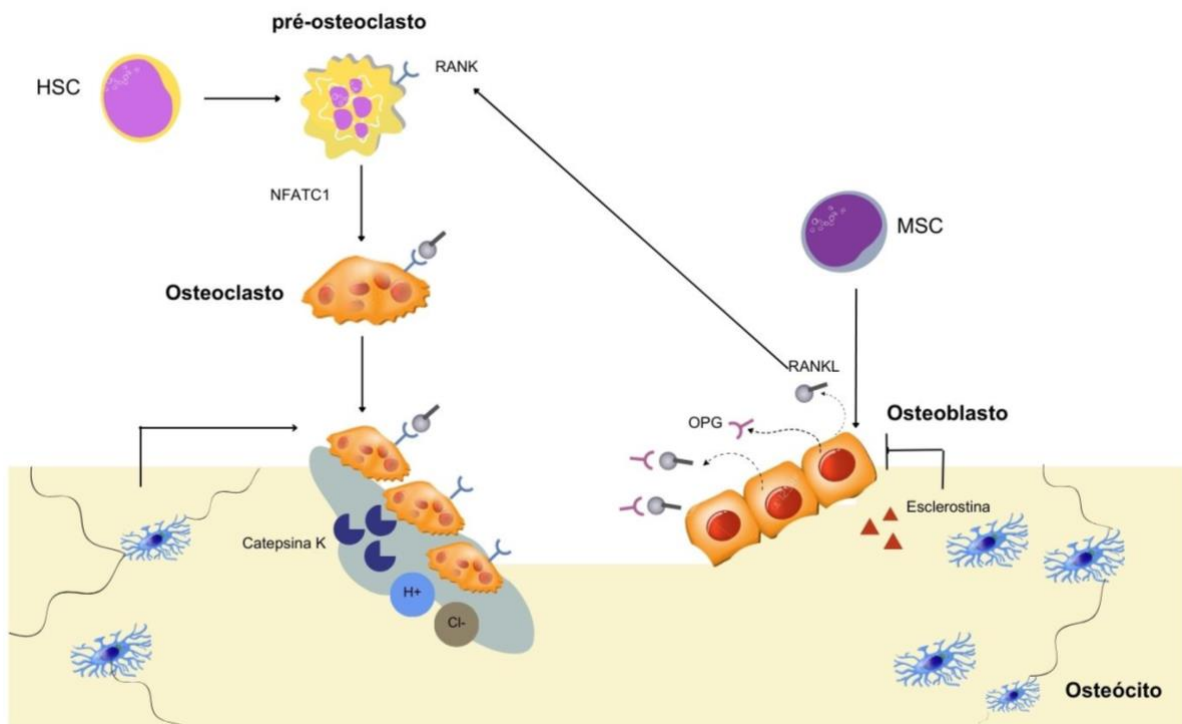


Figura 1. Sistema RANK/RANKL/OPG. Os pré-osteoclastos derivados das células-tronco hematopoiéticas (HSC) são ativados por meio da ligação do RANKL, produzido pelos osteoblastos, no receptor RANK. Após a ligação, ocorre a transcrição gênica de NFATC1 que estimula a diferenciação dos osteoclastos em células maduras, que iniciam a reabsorção óssea por meio da liberação de enzimas hidrolíticas, incluindo a catipsina K, e produção de ácido clorídrico (HCl). A catipsina K é uma enzima proteolítica fundamental para a degradação da matriz óssea, facilitando a reabsorção. Os osteoblastos são formados a partir da diferenciação de células-tronco mesenquimatosas (MSC) e produzem RANKL e OPG. A OPG cessa a reabsorção ao se ligar ao RANKL, impedindo a ativação dos osteoclastos para iniciar sua diferenciação e deposição óssea. Os osteócitos atuam na ativação dos osteoclastos e na produção de esclerostina, o que inibe a ação dos osteoblastos. Imagem criada utilizando mix de figuras do CANVA (<https://www.canva.com/>).

Doenças autoimunes e inflamatórias podem interferir no processo de remodelamento dos ossos, resultando no desenvolvimento de doenças ósseas, pois a inflamação leva ao aumento da síntese de mediadores pró-inflamatórios, que estimulam a ação dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea (50–52). A osteopenia é caracterizada pela redução da massa óssea e desmineralização, o que pode progredir para osteoporose (53). Nessa condição, o tecido ósseo sofre deterioração microarquitetural, aumentando o risco de fraturas devido à fragilidade óssea, especialmente no quadril, fêmur, coluna vertebral, antebraço distal e úmero proximal (53). Portanto, doenças crônicas como a obesidade, que apresentam produção anormal de mediadores pró-inflamatórios, podem contribuir diretamente para o desequilíbrio da homeostase óssea (54). Sendo assim, é importante aprofundar o conhecimento sobre o impacto dessa condição na saúde dos ossos.

2.2. Obesidade

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que representa um risco para a saúde (55). Ela é classificada utilizando-se o índice de massa corporal (IMC), considerando que um $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ indica sobrepeso, enquanto um $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ indica obesidade (55). O atual perfil dietético caracteriza-se por um aumento no consumo de alimentos industrializados, processados e ultraprocessados. Esses produtos são frequentemente ricos em carboidratos refinados, gorduras saturadas e trans, sódio, e pobres em micronutrientes, o que pode levar a deficiências nutricionais e aumento da gordura corporal (56). O excesso de gordura no corpo está associado ao aumento do risco de várias doenças crônicas, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer (57).

A obesidade resulta em um estado inflamatório crônico de baixa intensidade que desencadeia vias de sinalização inflamatórias no organismo (16,58,59). Esta condição é decorrente do aumento do tamanho (hipertrofia) e/ou do número (hiperplasia) dos adipócitos. A expansão dos adipócitos por hipertrofia é mais prejudicial, pois diminui a vascularização do tecido, podendo levar à hipóxia celular e ao aumento da liberação de substâncias pró-inflamatórias (60). O acúmulo de macrófagos no tecido adiposo contribui significativamente para a inflamação devido a uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (61). Dentre as citocinas, cita-se a leptina, uma das mais abundantes produzidas por adipócitos, que além de pró-inflamatória, reflete diretamente o conteúdo de massa adiposa, estando aumentada na obesidade (62). De forma concomitante, há uma redução na produção de citocinas anti-inflamatórias, como adiponectina, que também é sensibilizadora de insulina, ocasionando uma menor captação de glicose nos adipócitos, com consequente desenvolvimento da resistência à insulina (63) (Figura 2).

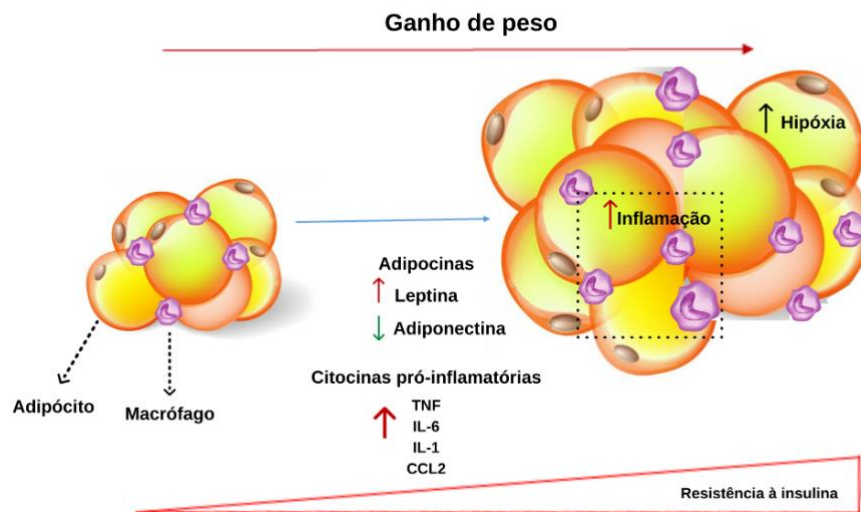


Figura 2. Hipertrofia do tecido adiposo e produção das citocinas pró-inflamatórias. A expansão do tecido adiposo durante o ganho de peso na obesidade leva a uma diminuição de sua vascularização, podendo ocasionar a hipóxia tecidual. Além disso, ocorre o recrutamento de macrófagos por meio da produção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

A resistência à insulina pode ser desencadeada a partir do aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-6, que estimulam a lipólise nos adipócitos, favorecendo a liberação de ácidos graxos livres (63). Além disso, a fosforilação errônea do substrato do receptor de insulina (IRS), em serina em vez de tirosina, prejudica a funcionalidade do receptor de insulina e, conseqüentemente, a sinalização da insulina, levando a hiperglicemia, hiperinsulinemia e deposição ectópica de gordura em órgãos como fígado e músculo (64). Embora o tecido adiposo e outros órgãos metabólicos sejam amplamente reconhecidos por sua associação com a obesidade (65), outros tecidos também podem ser afetados por essa condição, como é o caso dos ossos. O impacto nos ossos está principalmente relacionado ao desenvolvimento e/ou progressão de doenças ósseas (66).

2.3. Obesidade e as suas implicações na saúde óssea

A relação entre obesidade e perda óssea tem sido objeto de intensa investigação, revelando uma interação entre fatores metabólicos, hormonais e mecânicos (24,25). Anteriormente, foi descrito na literatura que a obesidade beneficiaria a saúde dos ossos, mas novas evidências contestam essa ideia ao indicar um maior risco de fraturas em áreas específicas do corpo. Alguns estudos sugeriram que o excesso de tecido adiposo na obesidade poderia exercer uma carga mecânica adicional sobre os ossos, o que poderia ser benéfico ao estimular a formação óssea por meio de processos de adaptação e remodelação (20,67). Outros demonstraram que um IMC mais alto determina um maior conteúdo mineral ósseo no colo do fêmur e coluna lombar, mas não do rádio (68). Em contrapartida, autores relataram uma correlação positiva entre o IMC e a densidade mineral óssea (BMD) também na diáfise radial e no rádio ultradistal (69). Embora haja estudos que indicam que um IMC mais alto está associado a uma maior densidade mineral óssea, esse fato não impede que haja um aumento no risco de fraturas e fragilidade óssea (70).

Uma vez que a expansão do tecido adiposo leva ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, o tecido ósseo é particularmente afetado na condição de obesidade (26,71). Citocinas, como TNF, IL-1 β e IL-6 liberadas pelo tecido adiposo hipertrófico podem interferir no equilíbrio dinâmico das células ósseas (26,72). A exemplo, a exposição simultânea a IL-1 β , TNF e IL-6 em fragmentos de osso resultou em um aumento na produção de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF, fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23), a SOST, que estimula a produção de esclerostina e OPG por células ósseas (71). Assim, é possível notar que, agindo isoladamente ou em conjunto, essas substâncias iniciam caminhos de sinalização dentro das células que podem resultar na degradação do tecido ósseo, pois pode ativar os osteoclastos e suprimir a formação de osteoblastos (73,74). Enquanto outras citocinas, como a IL-4 e IFN- γ , inibem a formação de osteoclastos (75), levando a um desequilíbrio no processo de remodelação óssea em favor da reabsorção (Figura 3), assim como outras doenças inflamatórias. Portanto, evidências demonstram que o ambiente imunológico e metabólico alterado na obesidade pode comprometer a saúde óssea.

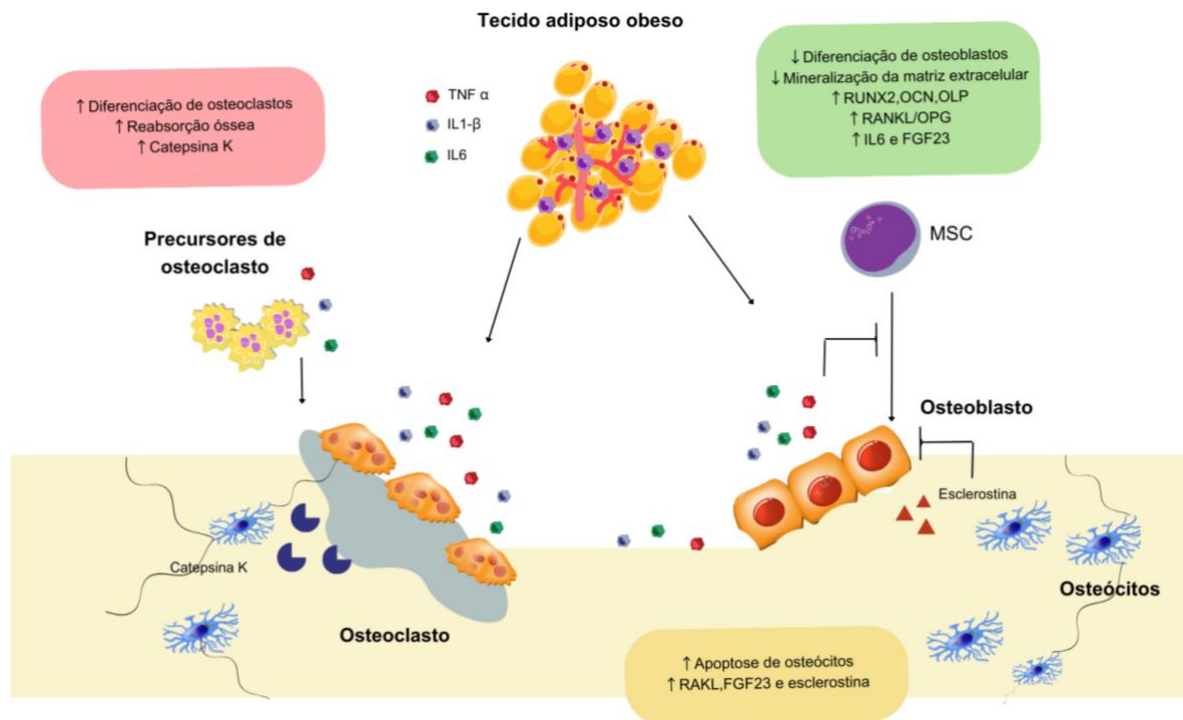


Figura 3. Comunicação do tecido adiposo e tecido ósseo. Citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo tecido adiposo obeso, como TNF , IL-6 e $\text{IL-1}\beta$, desempenham um papel significativo na remodelação óssea. Elas aumentam a diferenciação e atividade dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. Além disso, essas citocinas inibem a diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos, prejudicando a formação de osso novo. TNF , IL-6 e $\text{IL-1}\beta$ também promovem a apoptose e estimulam a produção de fatores que ativam os osteoclastos pelos osteócitos. O desequilíbrio resultante entre osteoblastos e osteoclastos é um fator contribuinte para o desenvolvimento de perda óssea. Imagem criada utilizando mix de figuras do CANVA (<https://www.canva.com/>).

Para além da inflamação, é importante destacar que os osteoblastos e adipócitos têm as células tronco mesenquimais (MSCs) como progenitor em comum. Uma hipótese é que a diferenciação das MSCs em direção à linhagem osteoblastogênica é reduzida durante a obesidade, enquanto a diferenciação adipogênica é aumentada (26). As células-tronco mesenquimais estão presentes na medula óssea e em outros tecidos, onde desempenham um papel crucial na regeneração e reparo tecidual (1,12). Quando estimuladas por sinais adequados do ambiente, como fatores de crescimento e citocinas, as MSCs podem se diferenciar em osteoblastos. Isso envolve a ativação de fatores de transcrição, como o Fator de transcrição 2 relacionado ao Runt (RUNX2) e osterix, que regulam a expressão de genes específicos necessários para a formação óssea (8). O RUNX2 desempenha um papel fundamental na diferenciação inicial de células mesenquimais em osteoblastos, sendo crucial para o amadurecimento dessas células em osteócitos aprisionados na matriz óssea (76). O osterix é essencial na fase de maturação dos osteoblastos, promovendo sua transformação em osteócitos funcionais (8,77). A presença

adequada e a funcionalidade desses fatores são essenciais para assegurar a formação óssea adequada e a manutenção da integridade do esqueleto (8). Por outro lado, a ativação do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR γ) promove a diferenciação das MSCs em células adipogênicas. Várias evidências sugerem que o PPAR γ desempenha um papel crucial na homeostase esquelética (24,28). O PPAR γ regula o metabolismo lipídico, sendo que o acúmulo e a subsequente oxidação de lipídios são conhecidos por ativar este receptor. Estudos experimentais e clínicos adicionais têm corroborado uma ligação entre a produção aumentada de adipócitos e a redução da densidade mineral óssea (DMO) (78).

Sendo assim, compreender os mecanismos pelos quais a obesidade influencia a saúde óssea é essencial para desenvolver estratégias de prevenção e intervenção eficazes, visando preservar a densidade mineral óssea e a integridade estrutural dos ossos em indivíduos afetados por essa condição complexa (24,26,68). Para isso, estratégias nutricionais desempenham um papel crucial na gestão da obesidade e na promoção da saúde óssea. Dentre as estratégias, os protocolos de jejum têm sido explorados como uma possível ferramenta para redução de peso e adiposidade que poderia indiretamente beneficiar a saúde óssea (79).

2.4. Jejum, obesidade e metabolismo ósseo

O jejum é uma prática antiga adotada por várias comunidades religiosas, como muçulmanos, cristãos, judeus, budistas, entre outros. Nas últimas décadas, o jejum tem sido estudado como uma abordagem terapêutica para a redução de peso. Essa prática envolve voluntariamente a abstinência de alimentos por um período determinado, alternando entre períodos de não ingestão alimentar e realimentação (80,81). Em 1956, Andres e colaboradores, estabeleceram a técnica de calorimetria indireta, na qual é possível medir a oxidação da glicose e dos ácidos graxos por meio do quociente respiratório (RQ) (82). Por meio desse método, foi possível demonstrar que a transição do estado de jejum para o estado alimentado é marcada por mudanças na seleção de substrato energético, ou seja, ocorre uma mudança da oxidação de ácidos graxos para a oxidação de glicose (83). Durante o período de jejum, ocorre um balanço energético negativo, o que leva a uma redução nas concentrações de glicose no sangue e estimula as células alfa do pâncreas a secretarem glucagon. O glucagon ativa uma cascata de eventos que resultam na inibição da síntese de glicogênio no

fígado, levando à liberação de glicose na corrente sanguínea (83). Conforme o período sem alimentação aumenta, as reservas de glicogênio no fígado são usadas completamente, e a gordura armazenada nos adipócitos é decomposta em ácidos graxos livres, que são usados como energia (79). Assim, o jejum é uma prática que desencadeia uma série de respostas fisiológicas que podem ser benéficas para a saúde, incluindo a redução de peso e a melhoria do metabolismo.

A escolha do protocolo de jejum pode variar com base no protocolo da dieta alimentar seguida na população clínica-alvo. Existem várias formas de praticar o jejum descritas na literatura, sendo os protocolos mais utilizados: (i) alimentação com tempo restrito (definida janela de ingestão alimentar, de 12 a 20 horas), (ii) jejum intermitente (incluindo jejum em dias alternados ou jejum de 2 dias por semana, por exemplo) e (iii) jejum periódico (com duração de três dias ou mais a cada 2 ou mais semanas) (30,31). Diferentes estudos sugerem que o jejum pode ser uma estratégia eficaz para reduzir a gordura corporal e o tamanho das células de gordura (84–86). Além disso, o jejum desencadeia respostas celulares adaptativas que ajudam a reduzir o estresse celular, modificar a secreção de substâncias adiposas e aumentar a quebra de gordura por meio de sinalização beta-adrenérgica. Por essas razões, o jejum pode desempenhar um papel importante no tratamento da obesidade e distúrbios metabólicos (87–89).

O jejum intermitente também tem sido explorado como uma possível ferramenta para a melhoria da sensibilidade à insulina, o que poderia indiretamente beneficiar a saúde óssea (90). Contudo, alguns estudos sugerem que períodos prolongados de jejum podem resultar em perda de massa óssea, especialmente se não houver compensação adequada de nutrientes durante os períodos de alimentação, como cálcio e vitamina D, que são fundamentais para a saúde dos ossos (91). No estudo de BAE e colaboradores, a alimentação com restrição de tempo (3 h de alimentação por dia durante 4 semanas) juntamente com uma dieta rica em gordura (gordura alimentar fornecida ~46% da energia total) reduziu a Densidade Mineral Óssea (BMD) femoral em comparação com um grupo de alimentação rica em gordura *ad libitum*, em ratos com deficiência de estrogênio e com doença de Alzheimer induzida (92). Por outro lado, Clayton et al. examinaram como o jejum por 24 horas afeta os marcadores de turnover ósseo em seres humanos durante o período de

realimentação e não encontraram impacto nesses marcadores entre os indivíduos em jejum e controle (93). Em contraste, Bahijri et al. (2015) examinaram os efeitos do jejum intermitente em marcadores ósseos durante o Ramadã, no qual os indivíduos jejuavam do nascer ao pôr do sol e encontraram concentrações de PTH noturnos diminuídos após duas semanas de jejum. Este estudo não avaliou a densidade mineral óssea, e não está claro se os efeitos observados são atribuídos à restrição calórica, distúrbios do sono ou a outros fatores, como o aumento significativo do cálcio sérico noturno durante o Ramadã (94).

Contudo, apesar de o jejum ter demonstrado uma variedade de benefícios à saúde, há dados limitados relacionados ao impacto em outros sistemas corporais, incluindo o sistema esquelético. Isso apresenta uma lacuna significativa em nosso conhecimento atual sobre o impacto de longo prazo do jejum na saúde óssea. Existem preocupações sobre os efeitos dessa estratégia, especialmente em populações com obesidade, onde a densidade mineral óssea já pode estar comprometida. Portanto, o presente estudo propõe avaliar efeitos da intervenção do jejum intermitente na saúde óssea de camundongos alimentados com dieta rica em gorduras, visando entender se seus benefícios metabólicos compensam potenciais impactos na densidade óssea. A hipótese é que o jejum intermitente possa funcionar como uma estratégia nutricional eficaz e eficiente no tratamento da obesidade, capaz de influenciar positivamente o metabolismo e reduzir a inflamação crônica característica dessa condição, trazendo benefícios adicionais para a saúde dos ossos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o efeito do jejum intermitente como estratégia terapêutica na saúde óssea em camundongos com obesidade.

3.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar os efeitos do jejum intermitente na microarquitetura óssea em camundongos com obesidade;
- II. Analisar o perfil das células ósseas no osso de camundongos com obesidade tratados com jejum intermitente;
- III. Determinar as modificações em marcadores sistêmicos de remodelamento ósseo decorrente do tratamento com jejum intermitente;
- IV. Analisar as alterações na expressão gênica de fatores reguladores da formação e reabsorção óssea em resposta ao jejum intermitente na obesidade;
- V. Verificar o efeito do jejum intermitente nas alterações metabólicas decorrentes da obesidade;

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento experimental

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo 245/2022 (Anexo A). Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 12 semanas de vida provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e alojados em um biotério no Instituto de Ciência Biológicas (ICB) – UFMG, em grupos de aproximadamente 8 animais em gaiolas convencionais forradas com maravalha. Os animais foram divididos em três grupos experimentais (i) camundongos alimentados com dieta padrão do laboratório (LABINA®), (ii) camundongos alimentados com dieta rica em gordura 45% (HF), (iii) camundongos também alimentados com dieta rica em gordura 45% (HF). A intervenção dietética com o jejum intermitente foi iniciada após os animais do grupo iii atingirem 40g, sendo submetidos a 35 dias (5 semanas) de tratamento experimental. Esse protocolo consistia em intercalar 24 horas de jejum e 24 horas em estado alimentado com a dieta HF (Figura 4).

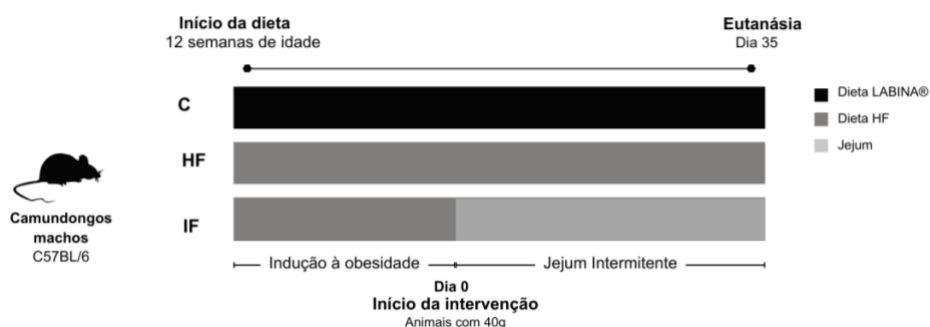


Figura 4. Delineamento experimental. Camundongos C57BL/6 com 12 semanas de idade foram alimentados com dieta padrão (LABINA®) ou rica em gordura saturada (HF), até atingirem 40g. No protocolo de jejum intermitente, os animais foram divididos em grupos: LABINA® (C), dieta *High-fat* (HF) e High-Fat com protocolo de jejum intermitente (IF).

Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ($25,4^{\circ}\text{C} \pm 3,4^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro-escuro de 12h (luz acesa às 7h = ZT 0; luz apagada às 19h = ZT 12) e foram alimentados com a dieta estabelecida e água *ad libitum*. O peso corporal foi mensurado semanalmente e o consumo alimentar foi mesurado duas vezes por semana para posterior cálculo da ingestão alimentar e consumo energético (kcal) durante o experimento.

4.2. Composição das dietas

A composição da dieta LABINA® é de 65,8% carboidrato, 3,1% lipídeo e 31,1% proteína (4,15 kcal/g). A dieta HF é composta por 39% de carboidratos, $\pm$ 44% de gordura e 17% de proteína e densidade energética igual à 6,20kcal/g. Os ingredientes dessa dieta podem ser observados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Ingredientes da dieta rica em gordura saturada 45% (HF).

Dieta HF 45%	
Composição	g/Kg
Amido de milho	253,00
Caseína	241,00
Óleo de soja	60,00
Fibra (celulose microfina)	60,00
Mistura de minerais	42,00
Mistura de vitaminas	12,00
Bitartarato de colina	2,00
Tetrabutyl-hidroquinona	0,04
Groselha	181,00
Banha	145,00

4.3. Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)

O TTOG foi realizado na quarta semana de intervenção dietética. Para o teste, os animais foram submetidos ao jejum de 6 horas e receberam, por gavagem, D-glicose na dose de 0,2g/100g de peso corporal. A concentração de glicose foi mensurada nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após gavagem. Foi avaliada no sangue obtido por meio de um corte na cauda dos animais e avaliado pelo glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA).

4.4. Coleta de amostras

A eutanásia aconteceu ao final da quinta semana da intervenção dietética. Para isso, os camundongos permaneceram em jejum por 6 horas e após anestesia por injeção intraperitoneal (cetamina 80 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, diluídos em NaCl

0,9%), os animais foram eutanasiados pelo método de exsanguinação. Foi coletado o sangue, para obtenção do soro; dos tecidos ósseos - foi feito um corte transversal no fêmur direito proximal para análises histológicas e do lado esquerdo foi realizada a coleta do fêmur e da tíbia para demais análises; e o tecidos adiposo epididimal (TAE) e subcutâneo (TAS), mesentérico (TAM) e retroperitonal (TAR) retirados e pesados, sendo que TAM e TAS foram descartados e TAE e TAM armazenados para posteriores análises. As amostras de soro, tecidos adiposos e tíbia foram conservadas em freezer a temperatura de -80°C até o momento das análises metabólicas e inflamatórias. O corte transversal do fêmur direito foi fixado em formol 4% por, no máximo, 48 horas, descalcificado em EDTA 14% durante 28 dias e conservadas em álcool 70% para posterior análise histológica. As amostras do fêmur esquerdo foram fixadas em formol 4% durante no máximo 48 horas e conservadas em álcool 70% para análise de microtomografia computadorizada.

4.5. Microtomografia computadorizada (Micro-Ct)

As amostras de fêmur foram escaneadas utilizando um tomógrafo microcomputadorizado de alta resolução (micro-CT) e foram alinhadas com o eixo vertical do scanner (Skyscan 1172 X-Ray microtomograph, 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, Belgium) e para as análises morfológicas do osso trabecular e cortical o programa utilizado foi O CTAnalyzer (Bruker, Kontich, Belgium), sendo realizado de forma longitudinal, na região proximal do fêmur, considerados 135 cortes a partir do disco epifisário. O tecido foi analisado para determinar a densidade mineral óssea (BMD), percentual volume ósseo / volume de tecido (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), separação trabecular (Tb.Sp) e índice de modelo de estrutura (SMI). Também foi analisada a região cortical, em que foi avaliado o volume ósseo/volume do tecido (BV/TV) e a espessura transversal (Ct.Th), sendo considerados 135 cortes a partir do disco epifisário.

4.6. Histomorfometria do fêmur

As amostras de fêmur foram fixadas com solução de formalina tamponada a 4% para processamento histológico. Após o período de fixação de no máximo 48 horas, os tecidos foram preservados em álcool 70%. As amostras passaram pelo processo de descalcificação com EDTA 14% e pH: 7,2 por 28 dias com trocas da solução a cada 3-4 dias. Em seguida, as peças foram lavadas em água corrente para a realização do processamento histológico. Nos tecidos foram realizados cortes com 5 µm por meio da microtomia no sentido pósterio-anterior. A técnica Hematoxilina-Eosina (H&E) foi utilizada para coloração dos cortes histológicos para avaliação de número de osteócitos no tecido. A coloração por meio da técnica de Tricômio de Masson foi utilizada para avaliação do número de osteoblasto. A atividade de osteoclastos foi avaliada por coloração para TRAP. As lâminas obtidas foram avaliadas em microscópio de luz (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça) com câmera digital acoplada (Flexacam i5 Compound, Leica Microsystems, Suíça).

4.7. Contagem de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos no fêmur

Após as respectivas colorações para a identificação e contagem de osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, foram obtidas imagens do fêmur, com a utilização de um microscópio com câmera digital acoplada nas objetivas de 10x e 40x. A densidade de osteócitos por área óssea foi determinada na região do osso trabecular usando o *ImageJ software (NIH Image, Bethesda, MD, Estados Unidos)*. Os números de osteócitos e osteoblastos foram avaliados a partir de cinco fotos feitas em uma área padronizada da diáfise proximal, abaixo do disco epifisário. Os osteócitos foram normalizados pela área do osso trabecular avaliada e os osteoblastos foram normalizados pelo perímetro ósseo avaliado. Para a contagem dos osteoclastos foi padronizada a região da metáfise e o número de osteoclastos foi normalizado pelo perímetro do disco epifisário. As contagens foram realizadas em dois cortes por animal e em seguida realizada a média de valores para a obtenção do número de médio de células por área ou perímetro.

4.8. Área de adipócitos

Os tecidos adiposos epididimal e subcutâneo foram armazenados na temperatura de -80°C e fixados em formaldeído 4% por um período de 24 horas. Em seguida, procederam-se etapas de desidratação em série crescente de álcoois (70°, 85°, 90°, 95°, 100°), diafanização com xilol, e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5µm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina, para serem avaliadas e fotografadas por 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 as áreas de pelo menos 100 adipócitos presentes em até 5 imagens (objetiva de 40x) para cada animal.

4.9. Avaliações sorológicas de marcadores de células ósseas e glicose

Foram dosados pelo ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked ImmuneSorbent Assay*) os marcadores de células ósseas do RANKL e OPG determinadas, segundo as instruções do fabricante (*R&D System, Inc., Minneapolis, USA*). A glicose foi quantificada no soro por *kit* enzimático (Bioclin, Belo Horizonte, MG) conforme instruções do fabricante.

4.10. Reação em cadeia pela polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT- qPCR)

Para realizar a análise por meio de RT- qPCR as amostras de tíbia foram armazenadas a -80°C até a realização da análise. Para a extração do RNA, foi utilizado o kit Invitrogen PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies Corp, North America), conforme instruções do fabricante. Em resumo, as amostras foram tratadas com tampão de lise contendo 2-mercaptoetanol e posteriormente homogeneizadas usando um homogeneizador rotor-estator (IKA, Staufen, Alemanha). Após a adição de etanol ao lisado, a mistura foi transferida para uma coluna de extração. Após a centrifugação, o RNA foi lavado várias vezes com tampão específico para lavagem. Finalmente, o RNA foi eluído utilizando água livre de RNase. 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 SuperScript VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). O sistema StepOnePlus Real-Time PCR (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: marcadores de osteoclastos e reguladores negativos de reabsorção óssea - RANKL, OPG e proporção (RANKL/OPG), bem como RUNX2, PPAR γ e a proporção RUNX2/PPAR γ ; TNF, osteocalcina (OCN), Osteopontina (OPN) e catepsina K. Como controle foi utilizada expressão do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (**Tabela 2**).

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 grupos.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados no RT- qPCR.

Genes	Sequência do primer (5'-3')	
	Forward	Reverse
RANKL	<i>Cgt gca gaa gga act gca aca c</i>	<i>tgg tga ggt gtg caa atg gct</i>
OPG	<i>Tca tcc aag aca ttg acc tct gtg a</i>	<i>Gct gct cgc tcg att tgc ag</i>
RUNX2	<i>Ggc cgg gaa tga tga gaa cta</i>	<i>Cag atc gtt gaa cct ggc tac tt</i>
PPARY	<i>Atc tcc gcc aac agc ttc t</i>	<i>Taa ctg ccg gat cca caa a</i>
TNF	<i>Acg gca tgg atc tca aag ac</i>	<i>Aga tag caa atc ggc tga cg</i>
OCN	<i>Aag cct tca tgt cca agc agg</i>	<i>Ttt gta ggc ggt ctt caa gcc</i>
OPN	<i>Cca atg aaa gcc atg acc ac</i>	<i>Cgt cag att cat ccg agt cca</i>

CATEPSINA K	<i>Ctc cct ctc gat cct aca gta atg a</i>	<i>Tca gag tca atg cct ccg ttc</i>
GAPDH	<i>Acg gcc gca tct tct tgt gca</i>	<i>Cgc cca aat ccg ttc aca ccg a</i>

4.11. Análise estatística

O banco de dados foi montado no EXCEL. Para a realização de todas as análises foi utilizado o *software* GraphPad PRISM, (*GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA, versão 8.0*). Após ser realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Sminov e verificado que as amostras apresentam distribuição Gaussiana, as comparações estatísticas entre os vários grupos foram realizadas por *one-way ANOVA*, para os grupos com distribuição normal, ou *Kruskal-Wallis*, quando a distribuição se apresentava não normal, seguido de 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. Jejum intermitente não reverteu as alterações na microarquitetura óssea no fêmur de camundongos com obesidade

Foi realizada a avaliação da microarquitetura óssea trabecular por meio de microtomografia computadorizada no fêmur. Pelas das análises foi possível observar que não houve uma diferença significativa na BMD entre os grupos avaliados (Figura 5A e 5B). Por outro lado, o volume ósseo (BV/TV) do grupo HF apresentou-se aumentado quando comparado ao grupo controle (Figura 5C), assim como o número de trabéculas (Tb.N) (Figura 5D), mas sem alterações significativas no grupo IF. As demais avaliações do osso trabecular, incluindo a separação trabecular (Tb.Sp) (Figura 5E), espessura trabecular (Tb.Th) (Figuras 5F e 5G) e índice de modelo de estrutura (SMI) (Figura 5H) não se mostraram diferentes entre os grupos avaliados.

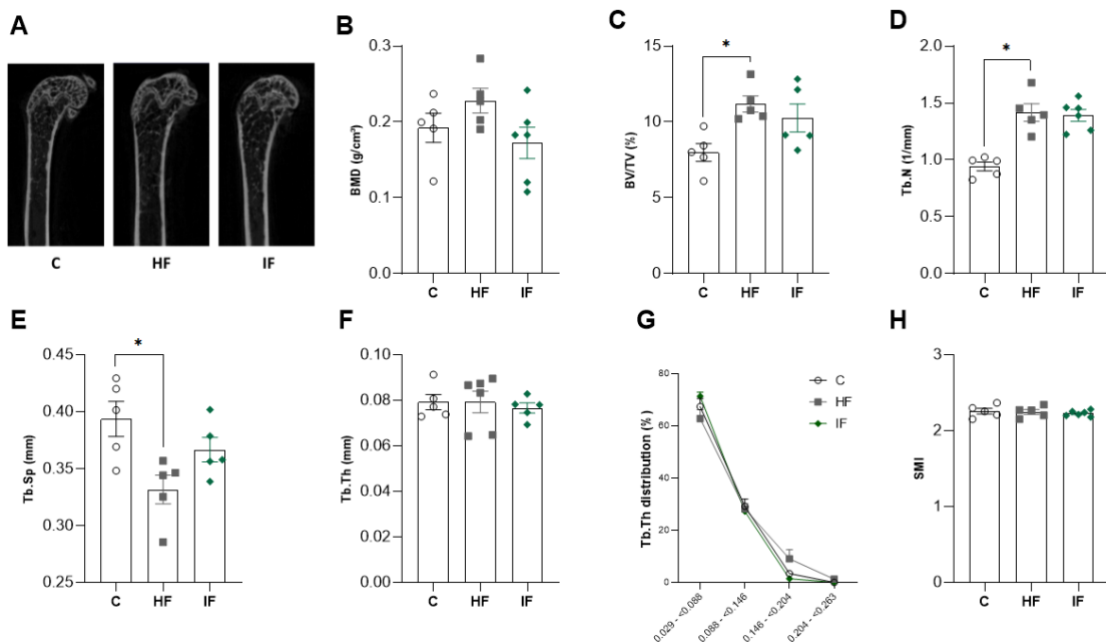


Figura 5. Análise da região trabecular de fêmur de camundongos por MicroCT. (A) Imagens representativas da seção da porção sagital do fêmur, (B) Densidade mineral óssea (BMD), (C) Volume ósseo/fração de volume do tecido (BV/TV), (D) Número trabecular (Tb.N), (E) Separação trabecular (Tb.Sp), (F) Espessura trabecular (Tb.Th), (G), Distribuição percentual da espessura trabecular (Tb.Th distribution), (G) Separação trabecular (Tb.Sp) (H) Índice do modelo de estrutura (SMI). Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta rica em gordura (HF) e jejum intermitente (IF) por 35 dias. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 5-6 animais por grupo. Análises realizadas por meio do teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. IF.

Também foi realizada a análise da microarquitetura óssea cortical por micro-CT no fêmur dos camundongos. A partir dessa avaliação não foram encontradas

diferenças significativas entre os grupos avaliados para área total (Tt.Ar), área cortical (Ct.Ar), proporção da área cortical em relação à área total (Ct.Ar/Tt.Ar) e espessura cortical (Ct.Th) (Figura 6A-E) .

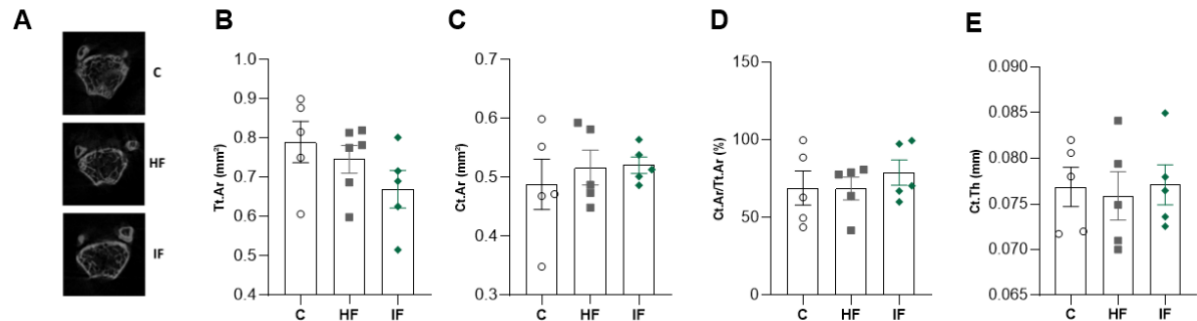


Figura 6. Análise da região cortical de fêmur de camundongos por MicroCT. (A) Imagens representativas da seção da porção axial do fêmur, (B) Área total (Tt.Ar), (C) Área cortical (Ct.Ar), (D) Proporção da área cortical em relação à área total (Ct.Ar/Tt.Ar), (E) Espessura cortical (Ct.Th). Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta rica em gordura (HF) e jejum intermitente (IF) por 35 dias. Os dados representam a média ± erro padrão da média de 5 animais por grupo. Análises realizadas por meio do teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. IF.

5.2. Atividade das células ósseas: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos no fêmur

Nas análises histológicas do fêmur, foram quantificadas as principais células em atividade no remodelamento ósseo. Os osteoblastos mostraram-se em menor número no grupo HF comparado com os animais controle, sendo essa quantidade aumentada naqueles tratados com IF (Figura 7A e 7B). Já os osteoclastos apresentaram-se em menor número no grupo HF em relação ao controle, enquanto o grupo IF se mostrou semelhante ao grupo HF (Figura 7C e 7D). Por fim, não foram apresentadas diferenças significativas entre os grupos na avaliação dos osteócitos (Figura 7E e 7F).

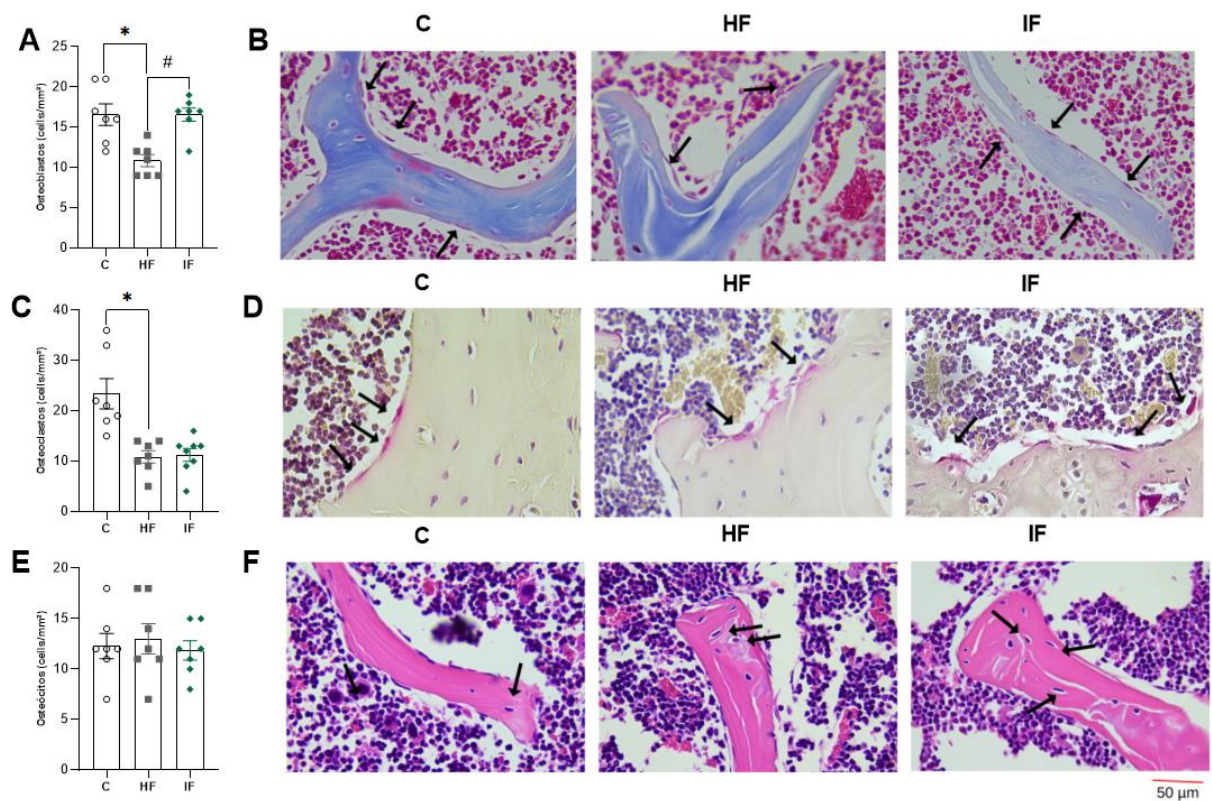


Figura 7. Análise histológica do fêmur de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. (A) Contagem do número de osteoblastos na diáfise proximal do fêmur, abaixo do disco epifisário, (B) Imagens representativas de osteoblastos (40x), (C) Contagem de osteoclastos na metáfise femoral, (D) Imagens representativas de osteoclastos (40x), (E) Contagem de osteócitos na diáfise proximal, abaixo do disco epifisário, (F) Imagens representativas de osteócitos (40x). Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta rica em gordura (HF) ou jejum intermitente (IF) por 35 dias. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 7 animais por grupo. Análises realizadas por meio do teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. IF.

5.3. A intervenção com jejum intermitente não alterou marcadores séricos de remodelamento ósseo

O RANKL é uma proteína chave envolvida na regulação da reabsorção óssea e na formação dos osteoclastos, sendo um dos principais marcadores de metabolismo ósseo. Por outro lado, a OPG atua na inibição da ação do RANKL. Não foram observadas alterações séricas significativas para RANKL (Figura 8A), OPG (Figura 8B) ou na relação RANKL/OPG (Figura 8C) entre os grupos.

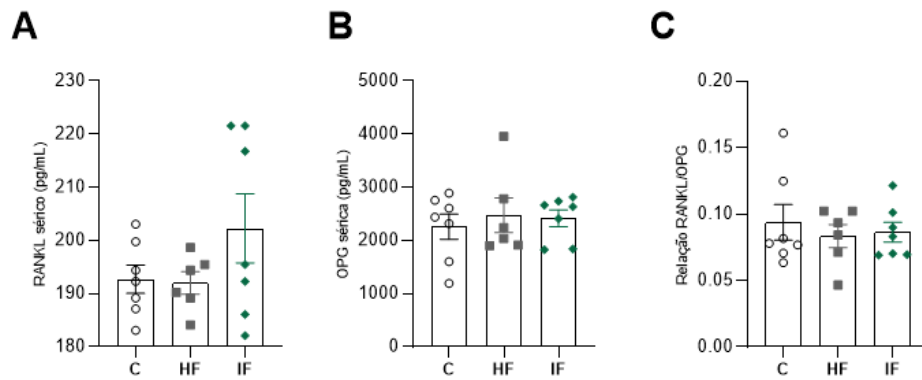


Figura 8. Dosagens de marcadores sistêmicos de remodelamento ósseo. (A) RANKL sérico, (J) OPG sérico, (K) Razão RANKL/OPG. Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta rica em gordura (HF) e jejum intermitente (IF) por 35 dias. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 5-7 animais por grupo. Análises realizadas por meio do teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. IF.

De forma similar, a investigação da expressão gênica por PCR em tempo real na tíbia indicou que não houve diferenças significativas na expressão de RANKL e OPG, nem na relação RANKL/OPG em nenhum dos grupos avaliados (Figuras 9A, 9B e 9C).

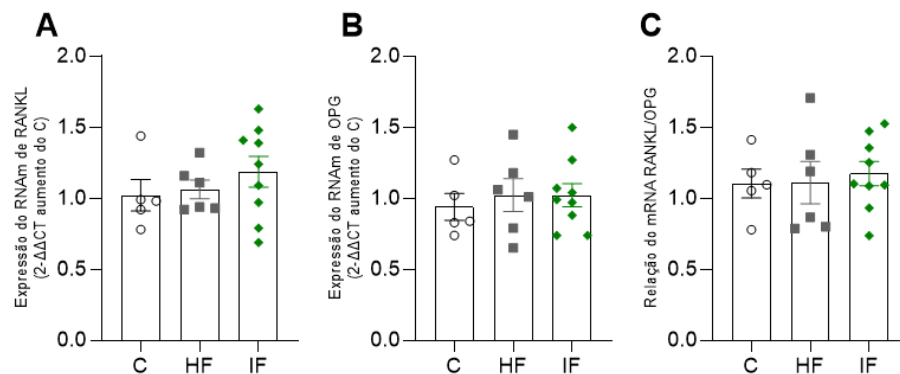


Figura 9. Análise da expressão gênica de marcadores de formação e reabsorção óssea na tíbia de camundongos por RT-PCR. Análise da expressão de (A) RANKL, (B) OPG, (C) Relação RANKL/OPG (D). Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta rica em gordura (HF) e jejum intermitente (IF) por 35 dias. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média de 5-8 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. IF.

5.4. O jejum intermitente não interferiu significativamente na expressão de genes de diferenciação e atividade óssea na tíbia

O fator de transcrição RUNX2 para a diferenciação de osteoblastos aumentou nos animais alimentados com dieta HF, mas sem alteração com a intervenção por jejum intermitente (Figura 10A). Contudo, o PPAR γ , fator de transcrição para diferenciação de adipócitos, assim como a proporção entre os dois fatores, não mostraram diferença significativa entre os grupos (Figuras 10B, 10C, 10D).

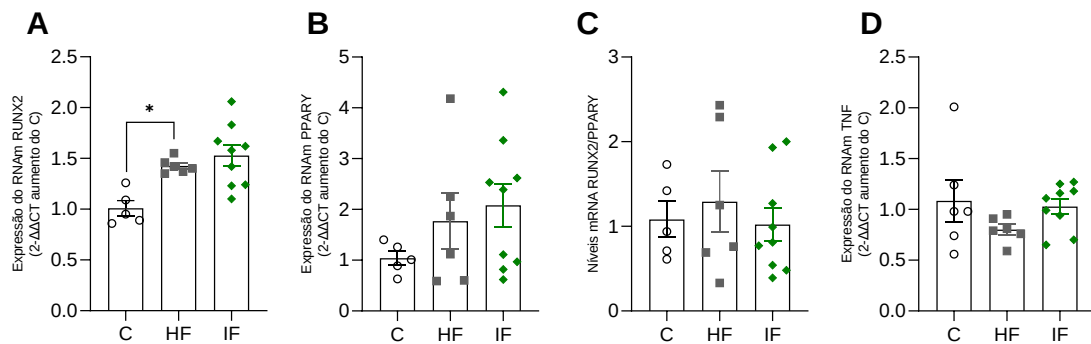


Figura 10. Análise da expressão gênica de marcadores de diferenciação de osteoblastos e diferenciação de adipócitos na tíbia de camundongos por RT-PCR. (A) RUNX2, (B) PPAR γ , (C) Relação RUNX2/PPAR γ . Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta rica em gordura (HF) e jejum intermitente (IF) por 35 dias. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média de 5-8 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. IF.

Os marcadores osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), cathepsina K, e TNF utilizados para investigar parâmetros relacionados à mineralização, adesão celular e atividade de reabsorção óssea e inflamação, respectivamente, também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figuras 11A, 11B, 10C e 11D).

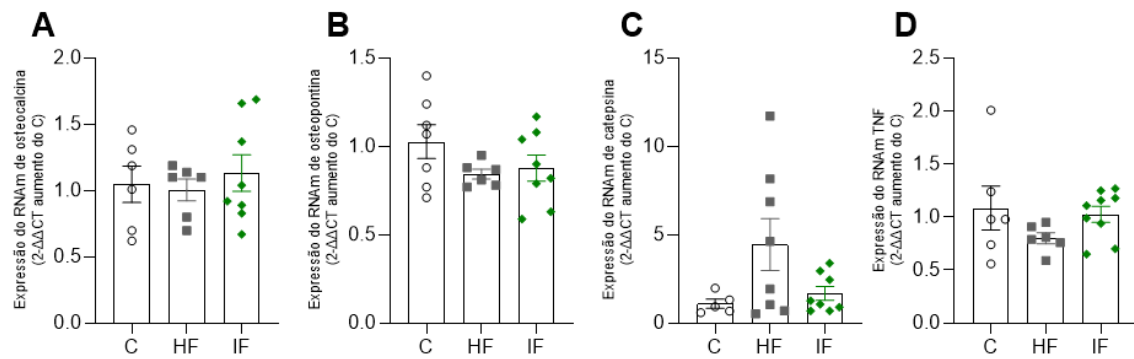


Figura 11. Análise da expressão gênica de marcadores de mineralização, adesão celular, atividade de reabsorção óssea e inflamação. Análise da expressão de (A) osteocalcina (OCN), (B) osteopontina (OPN), (C) Cathepsina K, (D) TNF. Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta rica em gordura (HF) e jejum intermitente (IF) por 35 dias. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média de 5-8 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. IF.

5.5. Apesar da perda de peso, camundongos tratados com o jejum intermitente apresentam reversão parcial da adiposidade.

A quantificação da ingestão calórica dos camundongos mostrou que o grupo que recebeu a dieta HF apresentou maior ingestão calórica quando comparado ao grupo controle, assim como em relação aos animais do grupo submetido ao jejum intermitente IF no período de intervenção (Figura 12A). Quando analisado o peso corporal ao longo do período experimental (Figura 12B), nota-se que o peso dos animais do grupo C e HF mantiveram-se inalterados, enquanto o grupo IF apresentou uma redução de peso corporal após 35 dias de intervenção. O índice de adiposidade indicou que a massa adiposa aumentou no grupo HF comparado ao grupo controle, mas sem alteração no grupo IF quando comparado com o grupo HF (Figura 12C). Contudo, ao ser avaliada a área de adipócitos, os animais alimentados com dieta HF apresentaram um aumento em sua área comparados com o grupo controle, sendo que os camundongos com IF mostraram sua redução em relação aos animais com obesidade alimentados com dieta HF, tanto para o tecido adiposo epididimal (TAE) (Figura 12D, 12E e 12F), quanto tecido adiposo subcutâneo (TAS) (Figura 12G, 12H e 12I).

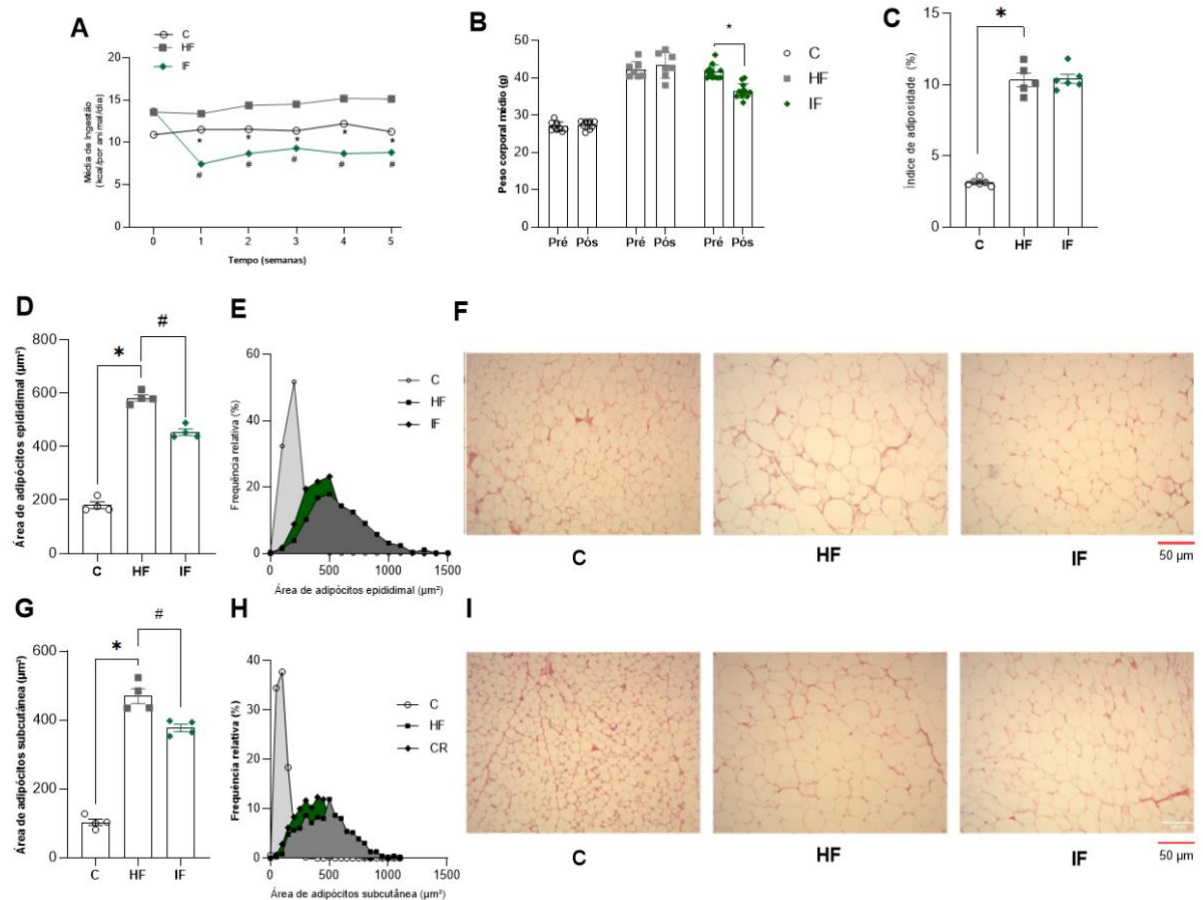


Figura 12. Alterações no peso corporal e na adiposidade. (A) Consumo energético (Kcal de dieta por animal por dia), (B) Peso corporal médio pré e pós, (C) Índice de adiposidade, (D) Área de adipócitos epididimal, (E) Distribuição percentual da área de adipócitos epididimal, (F) Imagens representativas da área de adipócitos do tecido adiposo epididimal, em coloração com hematoxilina-eosina, (G) Área de adipócitos subcutâneos, (H) Distribuição percentual da área de adipócitos subcutâneos, (I) Imagens representativas da área de adipócitos do tecido adiposo subcutâneo, na coloração com hematoxilina-eosina. Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta rica em gordura (HF) ou jejum intermitente (IF) por 35 dias. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 4 animais por grupo. Análises realizadas por meio do teste one-way ANOVA ou two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. IF

Ao avaliar alterações metabólicas, foi observado que o grupo HF apresentou intolerância à glicose quando comparado aos animais do grupo controle após a realização do TTOG e evidenciado pela análise da área sob a curva (Figura 13A e 13B), assim como maiores concentrações de glicose sérica (Figura 13C). Não houve alteração na tolerância oral a glicose ou glicemia de jejum no grupo tratado com IF quando comparado ao grupo HF (Figura 13A e 13B).

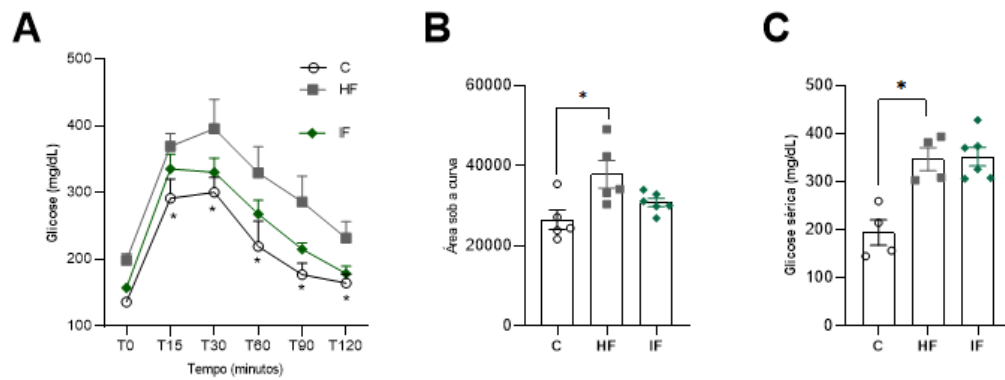


Figura 13. Alterações no metabolismo glicêmico. (A) Teste oral de tolerância à glicose (TTOG), (B) Área sob a curva TTOG, (C) Glicose sérica em jejum. Dados de camundongos controle (C), alimentados com dieta rica em gordura (HF) e jejum intermitente (JI) por 35 dias. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 4-6 animais por grupo. Análises realizadas por meio do teste one-way ANOVA ou two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnett. Diferença estatística representada por * $p < 0,05$ C vs. HF, # $p < 0,05$ HF vs. IF.

6. DISCUSSÃO

A relação entre obesidade e saúde óssea é complexa, e estudos têm consistentemente demonstrado que a obesidade está associada a uma série de alterações que podem prejudicar a saúde óssea (26,72). O jejum intermitente (IF) é uma estratégia nutricional amplamente prescrita para populações com sobrepeso e obesidade e tem sido utilizado em vários estudos clínicos e experimentais (95,96). Contudo, apesar de o jejum ter demonstrado uma variedade de benefícios à saúde, há dados limitados relacionados ao impacto em outros sistemas corporais, incluindo o sistema esquelético. O presente estudo demonstrou que o jejum intermitente não reverteu as alterações na microarquitetura óssea no fêmur de camundongos com obesidade, mas aumentou a presença de osteoblastos. A intervenção com jejum intermitente não alterou marcadores sistêmicos de remodelamento ósseo e não interferiu na expressão de genes de remodelamento e manutenção óssea na tíbia. Por fim, quando avaliados aspectos metabólicos da obesidade, apesar da perda de peso, camundongos tratados com jejum intermitente apresentaram somente uma reversão parcial da adiposidade, sem melhorar alterações metabólicas decorrentes da obesidade.

No presente estudo, a avaliação da microarquitetura óssea não mostrou diferença significativa na densidade mineral óssea (BMD) entre os grupos, o que sugere que a densidade óssea total não foi impactada pela dieta HF. Esta constatação é consistente com estudos que indicam que a BMD pode não refletir imediatamente as mudanças na microarquitetura óssea provocadas por diferentes intervenções dietéticas (97,98). Contudo, a indução de obesidade por dieta HF em animais tem se mostrado comumente associada a menor densidade óssea (13,99–102). Em um estudo em que camundongos receberam dieta HF por 12 semanas foi observado o desenvolvimento de perda óssea femoral (103). Tang e colaboradores (104) mostraram em ratos com obesidade induzida por dieta rica em gorduras por 8 semanas uma redução na BMD, número de trabéculas (Tb.N), espessura das trabéculas (Tb.Th) e relação volume ósseo/volume total (BV/TV). Além disso, observaram um aumento no espaçamento trabecular (Tb.Sp) e uma deterioração significativa das trabéculas ósseas. De forma contrária, observamos um aumento significativo no BV/TV e Tb.N no grupo HF em comparação ao grupo controle, além

de redução na Tb.Sp. Contudo, dados na literatura suportam a ideia de que dietas ricas em gordura podem afetar a dinâmica óssea, onde um fator conhecido por influenciar a massa óssea em roedores alimentados com dieta rica em gordura parece ser o peso corporal (105,106). Ionova-Martin et al. (107) relatam que a obesidade induzida em camundongos C57BL/6 por HF está associada a um aumento da quantidade óssea (maior volume ósseo e conteúdo mineral), mas também a uma diminuição na qualidade óssea, evidenciado por menores propriedades mecânicas independentes do tamanho do osso. Lecka-Czernik et al. (97) sugeriram que o aumento da massa óssea observado em camundongos C57BL/6, machos de 12 semanas de idade, com obesidade induzida por dieta de 11 semanas resulta de um processo de duas etapas. A primeira etapa envolve o impacto positivo da expansão do tecido adiposo, que pode aumentar a massa óssea por meio do aumento da carga mecânica e da produção de adipocinas que favorecem a formação óssea, ou dos efeitos nutricionais dos ácidos graxos. A segunda etapa envolve a redução da formação e renovação óssea, que ocorre devido ao desenvolvimento de comprometimento metabólico (97). Os dados acima indicaram que a exposição prolongada a uma dieta rica em gordura (HF) aumentou a formação óssea, mas pode ter reduzido a qualidade óssea, aumentando a predisposição a fraturas (106). Em seres humanos há evidências de que a obesidade pode também estar associada a um aumento da densidade mineral óssea em certos contextos. No estudo de Li Y (108) foi proposta uma associação entre IMC e BMD lombar usando modelos de regressão linear multivariável, entre adultos com obesidade de meia-idade, e como conclusão sugeriu que o aumento do IMC pode ser benéfico para promover a saúde óssea. Em contrapartida, Ya Zhang et al (109) ao usar o índice de peso ajustado pela circunferência da cintura, notou uma correlação negativa com a BMD, sugerindo que o tecido adiposo visceral pode impactar adversamente o tecido ósseo. No entanto, a depender do osso avaliado, a conexão entre BMD e obesidade abrange vários fatores, incluindo carga mecânica, concentrações de estrogênio, fatores metabólicos e diferenças de sexo e idade (108,110). De fato, dados do nosso estudo demonstraram que os camundongos alimentados com dieta HF apresentam um aumento excessivo de peso, corroborando com os estudos mencionados. De encontro a esses achados e em contexto de outras dietas obesogênicas, Lacerda et al (2018) mostrou em ratos obesos alimentados com dieta rica em carboidratos refinados (HC) uma maior massa

óssea em comparação com os ratos controle. No entanto, a maior porcentagem de osso trabecular observada em animais obesos ocorreu simultaneamente ao desenvolvimento de osteopetrose nas vértebras lombares, indicando que, nesse caso, o efeito da dieta obesogênica foi maléfico, resultando em uma qualidade óssea comprometida e potencialmente maior fragilidade óssea. Portanto, os dados indicam que, tanto em seres humanos quanto em modelos animais, a obesidade tende a causar efeitos adversos na saúde óssea, afetando não apenas a densidade óssea, mas também a qualidade e a integridade do tecido ósseo. Sendo assim, embora essa condição possa levar a um aumento na densidade mineral óssea (BMD) há indícios de que esse aumento não é necessariamente benéfico, pois pode ocorrer junto com deteriorações na microarquitetura óssea e maior fragilidade, o que compromete a saúde óssea geral.

Estudos que investiguem a relação do tratamento da obesidade com o jejum intermitente e saúde óssea são escassos e controversos, uma vez que abordam diferentes protocolos de jejum intermitente, que pode ser dividido em quatro tipos principais dependendo da duração e do grau de jejum - jejum em dias alternados, programa de jejum modificado, alimentação restrita e jejum do Ramadã (111). Em seres humanos, os impactos dos protocolos de jejum em dias alternados e da restrição calórica sobre os marcadores metabólicos ósseos em indivíduos com sobrepeso e obesidade foram investigados em um ensaio clínico randomizado controlado com duração de 6 meses. O estudo revelou uma redução significativa de peso tanto no grupo que seguiu o jejum em dias alternados quanto no grupo que adotou a restrição calórica. No entanto, não foram observados efeitos relevantes sobre o conteúdo mineral ósseo, a BMD ou os marcadores associados ao metabolismo ósseo, como o peptídeo carboxi-terminal de colágeno tipo I (CTX-1) e o OPG (112). Isso também foi encontrado no trabalho Martens et al (113) no qual demonstraram que, após 6 semanas de alimentação com restrição de tempo, não houve diferença significativa BMD total ou regional em comparação com um grupo controle, tanto em indivíduos de meia-idade quanto em idosos não obesos. Além disso, a alimentação com restrição de tempo durante esse período não causou redução na massa óssea desses grupos etários, em contraste com nossos resultados, que mostraram uma redução de peso no grupo de jejum intermitente (IF), mas não houve alterações nos parâmetros ósseos no grupo tratado. A não variação na BMD associada ao jejum intermitente pode sugerir

que, até o momento, os regimes de jejum não têm um impacto significativo sobre a saúde óssea. Em modelo animal, não foi encontrado nenhum estudo que associe de forma direta, dietas obesogênicas e densidade óssea. Contudo, Hisatomi e colaboradores (114) avaliaram alterações na densidade óssea e na qualidade óssea causadas por jejum único de 96 horas em ratos e observaram que a largura do corpo vertebral lombar e a espessura do osso cortical em ratos em jejum tendiam a diminuir em comparação com os ratos alimentados *ad libitum*. Além disso, a densidade mineral óssea do corpo vertebral lombar no grupo em jejum era significativamente inferior à do grupo *ad libitum*. Apesar dessa descoberta, esse estudo focou mais em simular os efeitos do jejum prolongado em condições extremas, e não especificamente em jejum de curto prazo, o que pode limitar a generalização dos efeitos observados para situações de jejum mais breves (114). De forma controversa, Foi descoberto que o jejum intermitente reverte a diminuição da BMD e reduz os níveis elevados do marcador sérico de reabsorção óssea TRAP, que são causados por uma dieta cetogênica. Sugerindo que o jejum intermitente pode neutralizar os efeitos negativos de outra dieta na saúde óssea (115). É importante ressaltar que os efeitos de diferentes estratégias de jejum intermitente na saúde óssea podem não ser os mesmos, considerando que os protocolos experimentais são heterogêneos e não têm durações fixas.

Na análise da microarquitetura óssea cortical do fêmur dos camundongos, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Esses resultados indicam que as intervenções dietéticas não tiveram um impacto notável na estrutura óssea cortical dos animais. Este achado é consistente com a literatura que aponta que, embora dietas e intervenções possam ter efeitos pronunciados na microarquitetura óssea trabecular, a estrutura cortical pode ser mais resistente a mudanças em resposta a variações dietéticas ou a intervenções de curto prazo (54,116). Estudos mostram que a estrutura cortical é frequentemente mais estável em comparação com a trabecular e pode exigir condições mais extremas ou prolongadas para apresentar alterações significativas (54,117). Da mesma forma, intervenções como o jejum intermitente podem ter efeitos mais significativos sobre a saúde metabólica e a remodelação óssea trabecular, sem impactar profundamente a estrutura cortical em um período relativamente curto (114).

A obesidade tem sido associada a efeitos negativos sobre a quantidade de osteoblastos, com estudos demonstrando uma redução significativa na formação óssea em resposta a essa condição (28,52). Em um estudo realizado em camundongos alimentados com dieta HF, foi identificado um aumento na reabsorção óssea. Esse aumento foi atribuído ao aumento da inflamação causada pelo acúmulo de adipócitos na medula óssea. A inflamação resultante pode, por sua vez, promover a osteoclastogênese e diminuir a formação de osteoblastos (52). Em nosso estudo alguns achados foram inesperados, uma vez que o número de osteoblastos e osteoclastos, mostraram-se reduzidos no grupo que recebeu a dieta HF em relação ao grupo controle. Além disso, observou-se um aumento na expressão de RUNX2, um fator chave para a diferenciação e função dos osteoblastos (76), mas sem alterações na expressão gênica do PPAR γ , um fator de transcrição essencial para o processo de formação de células de gordura, que promove a formação de adipócitos (118) onde esperávamos um aumento desse gene por se tratar de animais com obesidade. A relação dos dois genes influencia significativamente a regulação dos tecidos ósseo e adiposo, uma vez que a ativação do PPAR γ pode inibir a expressão de RUNX2, e consequentemente redução da osteogênese. Contudo, essa relação no presente estudo, também permaneceu sem diferenças estatísticas. Com isso, sugerimos que o aumento do RUNX2 pode indicar uma tentativa do organismo para compensar o efeito da redução do número de osteoblastos decorrentes do consumo da dieta rica em gordura, promovendo a atividade osteoblástica (76,119). Entre os mecanismos compensatórios, destacam-se a regulação hormonal, como as alterações nas concentrações de hormônio do crescimento e IGF-1, que podem estimular a atividade osteoblástica mesmo diante de uma dieta adversa (120). Além disso, outras vias metabólicas também podem afetar o fenótipo celular e a expressão gênica. Como exemplo, citocinas inflamatórias, que se elevam em situações de obesidade, exercem um efeito prejudicial na saúde óssea (75). Entretanto, no nosso estudo não foram observadas alterações na expressão de TNF, um marcador inflamatório. Adicionalmente, a catepsina K, que mostra atividade dos osteoclastos, também não apresentou diferença significativa.

Em contraste, o jejum intermitente (IF) no presente estudo, tem sido associado ao aumento no número de osteoblastos, células responsáveis pela formação dos ossos. Alinhado com estudos que indicam que o IF pode oferecer alguns benefícios

para a saúde óssea, especialmente quando a perda de peso é moderada (93,115). Contudo, o IF não parece alterar significativamente a quantidade de osteoclastos, nem impactar de forma perceptível a expressão de PPAR γ , ou o equilíbrio entre formação óssea e adipogênese. Além disso, a ausência de alterações significativas nos marcadores séricos de remodelação óssea, bem como na expressão de RANKL e osteoprotegerina (OPG), sugere que essas intervenções dietéticas e de jejum podem não ter um impacto direto ou imediato sobre a regulação do remodelamento ósseo. De forma distinta aos nossos achados Majed et al. (121) descobriram que as concentrações séricas dos biomarcadores de formação óssea como a OPG, fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina (OCN) foram significativamente aumentados, enquanto os marcadores de reabsorção óssea: fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP), telopeptídeo de ligação cruzada, amino-terminal do colágeno tipo I (NTX-1) e desoxipiridinolina (DPD), foram significativamente diminuídos, em ratos com osteoporose induzida por glicocorticoides submetidos a jejum intermitente por 16–18 h por dia durante 90 dias, sugerindo que o jejum intermitente retarda a progressão da osteoporose induzida por glicocorticoides ao inibir a atividade dos osteoclastos e promover a osteogênese dos osteoblastos. Esses achados ressaltam a complexidade da regulação do remodelamento ósseo e a variabilidade dos efeitos de diferentes intervenções dietéticas e metabólicas sobre a formação e reabsorção óssea (24,68). Desta forma, inferimos que esses resultados podem indicar que mecanismos compensatórios adicionais estão presentes ou que o impacto dessas intervenções pode não ser imediatamente perceptível em termos de remodelamento ósseo.

Durante o período experimental a análise da ingestão calórica e da composição corporal dos camundongos revelou que o grupo HF apresentou uma ingestão calórica significativamente maior em comparação com o grupo controle e o grupo IF durante o período experimental, refletindo um aumento na ingestão alimentar associado a dietas ricas em gordura. Este aumento na ingestão calórica é consistente com estudos que indicam que dietas com alto teor de gordura podem elevar o consumo calórico devido a alterações na saciedade e no apetite (28,122,123). Como já esperado, aumento na ingestão calórica favoreceu o aumento de peso no grupo HF em relação ao grupo controle. Em contraste, o grupo IF apresentou uma redução significativa no peso corporal após 35 dias de intervenção, corroborando a literatura que sugere que o jejum intermitente pode ser eficaz na redução do peso corporal por meio da melhoria da

regulação do metabolismo energético e aumento da queima de gordura (79). Além disso, nossos resultados indicam uma expansão do tecido adiposo, evidenciada pelo índice de adiposidade e pela área de adipócitos epididimais e subcutâneos dos grupos alimentados com dieta HF em comparação ao grupo controle. Esse mesmo padrão de resultados também pode ser observado na literatura para camundongos alimentados com dieta HF (122). No entanto, no grupo IF apesar de não apresentar alterações significativas no índice de adiposidade, foi demonstrada uma reversão parcial na área de adipócitos epididimal e subcutâneo. Estudos anteriores investigaram a mobilização da gordura em camundongos magros submetidos a um jejum de 24 horas, observando uma redução significativa no tecido adiposo visceral, mas sem uma redução inicial no tecido adiposo subcutâneo (124). Somente após a extensão do jejum para 48 horas foi que houve a diminuição do tecido adiposo subcutâneo (125). No entanto, pesquisas realizadas pelo nosso grupo indicaram que animais com obesidade moderada demonstraram uma perda de gordura menos significativa em resposta ao jejum (126,127). A redução na mobilização de gordura observada em animais com obesidade ou com disfunção metabólica parece estar relacionada à inflexibilidade metabólica ou imunológica. É importante notar que os efeitos do jejum variam conforme sua duração, o tipo de jejum praticado e a composição da dieta durante o período de realimentação (125). Assim, apesar da redução do peso corporal, o jejum intermitente pode não ter alterado de maneira perceptível a massa adiposa total em comparação com os animais obesos sem tratamento, apesar da reversão parcial da área de adipócitos, o que pode ser decorrente da permanência do estímulo com dieta HF presente em nosso protocolo experimental após o período de jejum.

A avaliação das alterações metabólicas nos camundongos revelou que o grupo alimentado com dieta rica em gordura (HF) apresentou intolerância à glicose. Esses resultados são indicativos de uma perda na capacidade do organismo de lidar com concentrações elevadas de glicose no sangue, um aspecto característico da resistência à insulina. Estudos anteriores têm mostrado que dietas ricas em gordura podem induzir intolerância à glicose e resistência à insulina em modelos animais devido ao acúmulo de gordura visceral e à inflamação sistêmica (58,60,128). O aumento das concentrações de glicose sérica no grupo HF é consistente com esses achados, refletindo um comprometimento na regulação glicêmica associado a dietas hipercalóricas e ricas em gordura. Em contraste, o grupo submetido ao jejum

intermitente (IF) não apresentou alterações significativas na tolerância oral à glicose ou na glicemia de jejum em comparação com o grupo controle. Estes resultados são inesperados, dado que a literatura frequentemente sugere que o jejum intermitente pode melhorar a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose, possivelmente por meio da redução da ingestão calórica total e da melhoria no metabolismo da glicose (79,126). Em seres humanos Kim et al (129) observou em uma intervenção de 4 semanas conduzida em adultos jovens saudáveis com idades entre 18 e 39 anos que a alimentação com restrição de tempo reduz o peso e melhora a resposta glicêmica. O fato de que o grupo IF não demonstrou uma melhoria significativa, em nosso estudo, pode ser atribuído a fatores como a duração da intervenção, a frequência e a duração das janelas de jejum, ou o estado metabólico inicial dos animais. Apesar de estudos escassos na literatura, entre implicações de alterações metabólicas e sua relação de interação com o jejum intermitente e saúde óssea, não podemos afirmar com certeza que o IF não é uma estratégia eficaz para reverter alterações ósseas ou metabólicas causadas pela obesidade, se for decorrente do período de jejum seguido de alimentação com dieta não saudável.

Existem algumas limitações a se considerar no presente estudo, primeiramente, a avaliação da estrutura óssea por micro-ct somente no fêmur, pode não capturar todas as mudanças na qualidade e estrutura óssea, além disso, abordagens adicionais para avaliar a resistência óssea e outras vias metabólicas regulatórias podem fornecer uma compreensão mais completa dos efeitos do jejum intermitente na saúde óssea. Em resumo, embora o jejum intermitente possa ajudar no tratamento da obesidade, seus impactos sobre a saúde óssea ainda precisam ser mais bem compreendidos a fim de contribuir com a construção de recomendações mais precisas.

7. CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo indicam que, apesar de alguns benefícios potenciais associados ao jejum intermitente, como a redução do peso corporal e o aumento na quantidade de osteoblastos, a estratégia não parece ser eficaz na reversão das alterações ósseas associadas à obesidade ou na melhoria das condições metabólicas adversas causadas por dietas ricas em gordura. Embora a condição de obesidade possa levar a um aumento na massa óssea em alguns casos, esse aumento não é necessariamente benéfico, pois pode ocorrer junto com deteriorações na microarquitetura óssea e maior fragilidade, o que compromete a saúde óssea geral. A ausência de efeitos significativos na remodelação óssea e nas alterações metabólicas decorrentes do IF pode ser atribuída a vários fatores, incluindo a duração da intervenção, o protocolo específico de jejum utilizado e o estado metabólico inicial dos animais. Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos específicos e a eficácia de diferentes protocolos de jejum intermitente em intervenções de longo prazo e para explorar de maneira mais detalhada como essas estratégias dietéticas afetam a saúde óssea e metabólica. Além disso, abordagens adicionais para avaliar a resistência óssea e outras vias metabólicas regulatórias podem fornecer uma compreensão mais completa dos efeitos do jejum intermitente e de outras estratégias dietéticas na saúde óssea.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020 Sep 10;9(9).
2. Bredella MA, Buckless C, Fazeli PK, Rosen CJ, Torriani M, Klibanski A, et al. Bone Marrow Adipose Tissue Composition Following High-Caloric Feeding and Fasting. *Bone*. 2021 Nov 1;152:116093.
3. Histologia Básica, Texto E Atlas Junqueira & Carneiro 12a Ed : Free Download, Borrow, and Streaming : Internet Archive.
4. Runyan CM, Gabrick KS. Biology of Bone Formation, Fracture Healing, and Distraction Osteogenesis. *J Craniofac Surg*. 2017 Jul 1;28(5):1380–9.
5. Ansari M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Prog Biomater*. 2019 Dec 1;8(4):223–37.
6. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007 Apr;7(4):292–304.
7. Baum R, Gravallesse EM. Impact of Inflammation on the Osteoblast in Rheumatic Diseases. *Curr Osteoporos Rep*. 2014;12(1):9.
8. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
9. Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 1;22(13).
10. Delgado-Calle J, Bellido T. THE OSTEOCYTE AS A SIGNALING CELL. *Physiol Rev*. 2022 Jan 1;102(1):379–410.
11. Zhu S, Chen W, Masson A, Li YP. Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis. *Cell Discovery* 2024 10:1. 2024 Jul 2;10(1):1–39.
12. Veis DJ, O'Brien CA. Osteoclasts, Master Sculptors of Bone. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2023 Jan 24;18:257–81.

13. Xiao Y, Cui J, Li YX, Shi YH, Wang B, Le GW, et al. Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. *Nutrition*. 2011 Feb;27(2):214–20.
14. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*. 2016 Jun 1;22(7):s176–85.
15. Fehrendt H, Linn T, Hartmann S, Szalay G, Heiss C, Schnettler R, et al. Negative Influence of a Long-Term High-Fat Diet on Murine Bone Architecture. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:1–9.
16. Castro AM, Macedo-de la Concha LE, Pantoja-Meléndez CA. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. *Revista Médica del Hospital General de México*. 2017 Apr 1;80(2):101–5.
17. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Sep 6;12.
18. 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. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1993;8(5):567–73.
19. Khosla S, Atkinson EJ, Riggs BL, Melton LJ. Relationship between body composition and bone mass in women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996;11(6):857–63.
20. Nguyen T V., Center JR, Eisman JA. Osteoporosis in elderly men and women: Effects of dietary calcium, physical activity, and body mass index. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2000;15(2):322–31.
21. De Laet C, Kanis JA, Odén A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: A meta-analysis. *Osteoporosis International*. 2005;16(11):1330–8.
22. Compston JE, Watts NB, Chapurlat R, Cooper C, Boonen S, Greenspan S, et al. Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: Glow. *American Journal of Medicine*. 2011;124(11):1043–50.
23. Prieto-Alhambra D, Premaor MO, Fina Avilés F, Hermosilla E, Martinez-Laguna D, Carbonell-Abella C, et al. The association between fracture and obesity is site-dependent: A population-based study in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2012 Feb 1;27(2):294–300.

24. Piñar-Gutierrez A, García-Fontana C, García-Fontana B, Muñoz-Torres M. Obesity and Bone Health: A Complex Relationship. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 1;23(15).
25. Mendonça F, Soares R, Carvalho D, Freitas P. The impact of obesity on bone health: an overview. *Endokrynol Pol*. 2022;73(6):954–8.
26. Forte YS, Renovato-Martins M, Barja-Fidalgo C. Cellular and Molecular Mechanisms Associating Obesity to Bone Loss. *Cells*. 2023 Feb 5 [cited 2024 Jul 25];12(4).
27. Devlin MJ, Rosen CJ. The bone-fat interface: Basic and clinical implications of marrow adiposity. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015 Feb 1;3(2):141–7.
28. Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res*. 2011;6(1):30.
29. Aron-Wisnewsky J, Warmbrunn M V., Nieuwdorp M, Clément K. Metabolism and Metabolic Disorders and the Microbiome: The Intestinal Microbiota Associated With Obesity, Lipid Metabolism, and Metabolic Health-Pathophysiology and Therapeutic Strategies. *Gastroenterology*. 2021 Jan 1;160(2):573–99.
30. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab*. 2014 Feb 4;19(2):181–92.
31. Okawa T, Nagai M, Hase K. Dietary Intervention Impacts Immune Cell Functions and Dynamics by Inducing Metabolic Rewiring. *Front Immunol*. 2021 Feb 4;11.
32. Fazeli PK, Zhang Y, O’Keefe J, Pesaresi T, Lun M, Lawney B, et al. Prolonged fasting drives a program of metabolic inflammation in human adipose tissue. *Mol Metab*. 2020 Dec 1;42.
33. Flach RJR, Matevossian A, Akie TE, Negrin KA, Paul MT, Czech MP. β 3-Adrenergic receptor stimulation induces E-selectin-mediated adipose tissue inflammation. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Jan 25 [cited 2024 Jul 25];288(4):2882–92.
34. Liu B, Page AJ, Hatzinikolas G, Chen M, Wittert GA, Heilbronn LK. Intermittent Fasting Improves Glucose Tolerance and Promotes Adipose Tissue Remodeling in Male Mice Fed a High-Fat Diet. *Endocrinology*. 2019 Jan 1;160(1):169–80.

35. Liu B, Hutchison AT, Thompson CH, Lange K, Heilbronn LK. Markers of adipose tissue inflammation are transiently elevated during intermittent fasting in women who are overweight or obese. *Obes Res Clin Pract.* 2019 Jul 1;13(4):408–15.
36. Wernstedt Asterholm I, Tao C, Morley TS, Wang QA, Delgado-Lopez F, Wang Z V., et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab.* 2014 Jul 1;20(1):103–18.
37. Srivastava RK, Sapra L, Mishra PK. Osteometabolism: Metabolic Alterations in Bone Pathologies. *Cells* 2022, Vol 11, Page 3943. 2022 Dec 6;11(23):3943.
38. Kenkre JS, Bassett JHD. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018 May 1;55(3):308–27.
39. Locke M. Structure of long bones in mammals. *J Morphol.* 2004 Nov 1;262(2):546–65.
40. Burgos-Flórez FJ, Gavilán-Alfonso ME, Garzón-Alvarado DA. Flat bones and sutures formation in the human cranial vault during prenatal development and infancy: A computational model. *J Theor Biol.* 2016 Mar 21;393:127–44.
41. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008 May;61(5):577–87.
42. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Horcajada MN. When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols. *Nutr Res Rev.* 2009 Jun;22(1):68–81.
43. Buck DW, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(6):1314–20.
44. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histologia e Biologia Celular : uma introdução à patologia.* 2012;716.
45. Oftadeh R, Perez-Viloria M, Villa-Camacho JC, Vaziri A, Nazarian A. Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review. *J Biomech Eng.* 2015 Jan 1;137(1).
46. Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front Pharmacol.* 2020 May 26;11.

47. Hargreaves M, Spriet LL. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. Vol. 2, *Nature Metabolism*. Nature Research; 2020. p. 817–28.
48. Zhou R, Guo Q, Xiao Y, Guo Q, Huang Y, Li C, et al. Endocrine role of bone in the regulation of energy metabolism. *Bone Research* 2021 9:1. 2021 May 20;9(1):1–19.
49. Saxena Y, Routh S, Mukhopadhyaya A. Immunoporosis: Role of Innate Immune Cells in Osteoporosis. *Front Immunol*. 2021 Aug 5;12.
50. Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 2017;14(2):209.
51. Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med*. 2009 Oct 1;15(10):468–77.
52. 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.
53. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY, (IOF) on behalf of the SAB of the ES for C and EA of O (ESCEO) and the C of SA and NS of the IOF. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis International*. 2019 Jan 18;30(1):3.
54. 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.
55. Health WHOrganizationD of NDiseasesP of NF and R. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation on obesity. 1998;276–276.
56. 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.
57. Alzaim I, Hammoud SH, Al-Koussa H, Ghazi A, Eid AH, El-Yazbi AF. Adipose Tissue Immunomodulation: A Novel Therapeutic Approach in

- Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2020 Jan 1;7.
58. Hotamisligil, G.; Shargill, N.; Spiegelman B. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* (1979). 1993;259(5091):87–91.
 59. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Apr 1;20(4):242–58.
 60. Engin A. The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:221–45.
 61. Dwaib HS, AlZaim I, Eid AH, Obeid O, El-Yazbi AF. Modulatory Effect of Intermittent Fasting on Adipose Tissue Inflammation: Amelioration of Cardiovascular Dysfunction in Early Metabolic Impairment. *Front Pharmacol*. 2021 Apr 9;12:626313.
 62. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct 15;6(10):772–83.
 63. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Jun 1;121(6):2094–101.
 64. Santoleri D, Titchenell PM. Resolving the Paradox of Hepatic Insulin Resistance. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019 Jan 1;7(2):447–56.
 65. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Aug;8(8):457–65.
 66. Shapses SA, Sukumar D. Bone metabolism in obesity and weight loss. *Annu Rev Nutr*. 2012 Aug 32:287–309.
 67. Fassio A, Idolazzi L, Rossini M, Gatti D, Adami G, Giollo A, et al. The obesity paradox and osteoporosis. *Eat Weight Disord*. 2018 Jun 1;23(3):293–302.
 68. Rinonapoli G, Pace V, Ruggiero C, Ceccarini P, Bisaccia M, Meccariello L, et al. Obesity and Bone: A Complex Relationship. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2021 Dec 1;22(24):22.
 69. Rexhepi S, Bahtiri E, Rexhepi M, SahatciuMeka V, Rexhepi B. Association of Body Weight and Body Mass Index with Bone Mineral Density in Women and Men from Kosovo. *Mater Sociomed*. 2015;27(4):259.

70. Sadeghi O, Saneei P, Nasiri M, Larijani B, Esmailzadeh A. Abdominal Obesity and Risk of Hip Fracture: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Advances in Nutrition*. 2017 Sep 1;8(5):728–38.
71. Pathak JL, Bakker AD, Luyten FP, Verschueren P, Lems WF, Klein-Nulend J, et al. Systemic Inflammation Affects Human Osteocyte-Specific Protein and Cytokine Expression. *Calcif Tissue Int*. 2016 Jun 1;98(6):596–608.
72. Savvidis C, Tournis S, Dede AD. Obesity and bone metabolism. *Hormones*. 2018 Jun 1;17(2):205–17.
73. McGregor NE, Murat M, Elango J, Poulton IJ, Walker EC, Crimeen-Irwin B, et al. IL-6 exhibits both cis- and trans-signaling in osteocytes and osteoblasts, but only trans-signaling promotes bone formation and osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2019 May 5;294(19):7850.
74. Marahleh A, Kitaura H, Ohori F, Kishikawa A, Ogawa S, Shen WR, et al. TNF- α Directly Enhances Osteocyte RANKL Expression and Promotes Osteoclast Formation. *Front Immunol*. 2019 Dec 13;10:491674.
75. 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. *Front Immunol*. 2023;14.
76. Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 1;20(7).
77. Kitase Y, Prideaux M. Targeting osteocytes vs osteoblasts. *Bone*. 2023 May 1 170.
78. Srivastava RK, Sapra L, Mishra PK. Osteometabolism: Metabolic Alterations in Bone Pathologies. *Cells*. 2022 Dec 1;11(23).
79. Mattson, M. P. et al. Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 19, n. 2, p. 81–94, 2018.
80. Longo, V. D.; Mattson, M. P. Fasting: Molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metabolism*, v. 19, n. 2, p. 181–192, 2014
81. Johnstone A. Fasting for weight loss: An effective strategy or latest dieting trend?. *Int J Obes*. 2015 May 8;39(5):727–33.

82. Andres R, Cader g, Zierler kl. The quantitatively minor role of carbohydrate in oxidative metabolism by skeletal muscle in intact man in the basal state. Measurements of oxygen and glucose uptake and carbon dioxide and lactate production in the forearm. *Journal of Clinical Investigation*. 1956 35(6):671.
83. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Apr 1;284(4 47-4).
84. Kim KH, Kim YH, Son JE, Lee JH, Kim S, Choe MS, et al. Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. *Cell Research* 2017 27:11. 2017 Oct 17;27(11):1309–26.
85. Park J, Seo YG, Paek YJ, Song HJ, Park KH, Noh HM. Effect of alternate-day fasting on obesity and cardiometabolic risk: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism*. 2020 Oct 1;111.
86. Patikorn C, Roubal K, Veettil SK, Chandran V, Pham T, Lee YY, et al. Intermittent Fasting and Obesity-Related Health Outcomes: An Umbrella Review of Meta-analyses of Randomized Clinical Trials. *JAMA Netw Open*. 2021;4(12):e2139558–e2139558.
87. Geisler CE, Hepler C, Higgins MR, Renquist BJ. Hepatic adaptations to maintain metabolic homeostasis in response to fasting and refeeding in mice. *Nutr Metab (Lond)*. 2016 Sep 26;13(1).
88. Anton SD, Moehl K, Donahoo WT, Marosi K, Lee SA, Mainous AG, et al. Flipping the Metabolic Switch: Understanding and Applying Health Benefits of Fasting. *Obesity (Silver Spring)*. 2018 Feb ;26(2):254.
89. Van Baak MA, Mariman ECM. Mechanisms of weight regain after weight loss - the role of adipose tissue. *Nat Rev Endocrinol*. 2019 May 1;15(5):274–87.
90. Parveen S. Impact of calorie restriction and intermittent fasting on periodontal health. *Periodontol 2000*. 2021 Oct 1;87(1):315–24.
91. Dornhoffer JR, Plitt AR, Lohse CM, Driscoll CLW, Neff BA, Saoji AA, et al. Bone health: biology and nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2024 Nov 1;27(1):29–35.
92. Shin BK, Kang S, Kim DS, Park S. Intermittent fasting protects against the deterioration of cognitive function, energy metabolism and dyslipidemia in

- Alzheimer's disease-induced estrogen deficient rats. *Exp Biol Med* (Maywood). 2018 Feb 1 243(4):334–43.
93. Clayton DJ, Varley I, Papageorgiou M. Intermittent fasting and bone health: a bone of contention? *British Journal of Nutrition*. 2023 Nov 14;130(9):1487–99.
 94. Bahijri SM, Ajabnoor GM, Borai A, Aama JY, Chrousos GP. Effect of Ramadan fasting in Saudi Arabia on serum bone profile and immunoglobulins. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2015;6(5):223–32.
 95. Parveen S. Impact of calorie restriction and intermittent fasting on periodontal health. *Periodontol 2000* [Internet]. 2021 Oct 1;87(1):315–24.
 96. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis International*. 2019 Jan 18;30(1):3–44.
 97. Lecka-Czernik B, Stechschulte LA, Czernik PJ, Dowling AR. High bone mass in adult mice with diet-induced obesity results from a combination of initial increase in bone mass followed by attenuation in bone formation; implications for high bone mass and decreased bone quality in obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Jul 15;410:35–41.
 98. 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. *J Nutr Health Aging* [Internet]. 2018 Mar 1;22(3):361–70.
 99. Lau BY, Fajardo VA, McMeekin L, Sacco SM, Ward WE, Roy BD, et al. Influence of high-fat diet from differential dietary sources on bone mineral density, bone strength, and bone fatty acid composition in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2010 Oct;35(5):598–606.
 100. Fujita Y, Maki K. High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice. *BMC Obes*. 2015 Dec 8;3(1):1.
 101. Cao JJ, Gregoire BR, Shen CL. A High-Fat Diet Decreases Bone Mass in Growing Mice with Systemic Chronic Inflammation Induced by Low-Dose, Slow-Release Lipopolysaccharide Pellets. *J Nutr*. 2017 Oct;147(10):1909–16.
 102. 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. *J Nutr Biochem*. 2018 Sep;59:93–103.
103. 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.
 104. Tang L, Yang X, Gao X, Du H, Han Y, Zhang D, et al. Inhibiting myostatin signaling prevents femoral trabecular bone loss and microarchitecture deterioration in diet-induced obese rats. 2015 Oct 5;241(3):308–16.
 105. Cherif R, Vico L, Laroche N, Sakly M, Attia N, Lavet C. Dual-energy X-ray absorptiometry underestimates in vivo lumbar spine bone mineral density in overweight rats. *J Bone Miner Metab*. 2018 Jan 1 ;36(1):31–9.
 106. Reid IR. Fat and bone. *Arch Biochem Biophys*. 2010 Nov 1;503(1):20–7.
 107. Ionova-Martin SS, Do SH, Barth HD, Szadkowska M, Porter AE, Ager JW, et al. Reduced size-independent mechanical properties of cortical bone in high-fat diet-induced obesity. *Bone*. 2010 Jan 1;46(1):217–25.
 108. Li Y. Association between obesity and bone mineral density in middle-aged adults. *J Orthop Surg Res*. 2022 Dec 1, 17(1):268.
 109. 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 7;23(1):1–10.
 110. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Association between Adiposity and Bone Mineral Density in Adults: Insights from a National Survey Analysis. *Nutrients* 2023, Vol 15, Page 3492. 2023 Aug 7;15(15):3492.
 111. Patterson RE, Laughlin GA, LaCroix AZ, Hartman SJ, Natarajan L, Senger CM, et al. INTERMITTENT FASTING AND HUMAN METABOLIC HEALTH. *J Acad Nutr Diet*. 2015 Aug 1;115(8):1203.
 112. Barnosky A, Kroeger CM, Trepanowski JF, Klempel MC, Bhutani S, Hoddy KK, et al. Effect of alternate day fasting on markers of bone metabolism: An exploratory analysis of a 6-month randomized controlled trial. *Nutr Healthy Aging*. 2017;4(3):255–63.

113. Martens CR, Rossman MJ, Mazzo MR, Jankowski LR, Nagy EE, Denman BA, et al. Short-term time-restricted feeding is safe and feasible in non-obese healthy midlife and older adults. *Geroscience*. 2020 Apr 1;42(2):667–86.
114. Hisatomi Y, Kugino K. Changes in bone density and bone quality caused by single fasting for 96 hours in rats. *PeerJ*. 2019 Jan 9 2019(1):e6161.
115. 115. Xu X, Ding J, Wu X, Huang Z, Kong G, Liu Q, et al. Bone microstructure and metabolism changes under the combined intervention of ketogenic diet with intermittent fasting: an in vivo study of rats. *Exp Anim*. 2019;68(3):371–80.
116. Devlin MJ, Robbins A, Cosman MN, Moursi CA, Cloutier AM, Louis L, et al. Differential effects of high fat diet and diet-induced obesity on skeletal acquisition in female C57BL/6J vs. FVB/NJ Mice. *Bone Rep*. 2018 Jun 1;8:204.
117. Ionova-Martin SS, Wade JM, Tang S, Shahnazari M, Ager JW, Lane NE, et al. Changes in cortical bone response to high-fat diet from adolescence to adulthood in mice. *Osteoporosis International*. 2011 Aug;22(8):2283–93.
118. 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.
119. Wu X, Zhang Y, Xing Y, Zhao B, Zhou C, Wen Y, et al. High-fat and high-glucose microenvironment decreases Runx2 and TAZ expression and inhibits bone regeneration in the mouse. *J Orthop Surg Res*. 2019 Feb 18;14(1).
120. Xue P, Wu X, Zhou L, Ma H, Wang Y, Liu Y, et al. IGF1 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow by increasing TAZ expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;433(2):226–31.
121. Alrowaili MG, Hussein AM, Eid EA, Serria MS, Abdellatif H, Sakr HF. Effect of Intermittent Fasting on Glucose Homeostasis and Bone Remodeling in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Rat Model. *J Bone Metab [Internet]*. 2021 Nov 1;28(4):307.
122. van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging*. 2015 Apr 23;7(4):256–68.

123. Poret JM, Souza-Smith F, Marcell SJ, Gaudet DA, Tzeng TH, Braymer HD, et al. High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Int J Obes*. 2018 Mar 20;42(3):535–41.
124. Ding H, Zheng S, Garcia-Ruiz D, Hou D, Wei Z, Liao Z, et al. Fasting induces a subcutaneous-to-visceral fat switch mediated by microRNA-149-3p and suppression of PRDM16. *Nat Commun*. 2016 May 31;7.
125. Tang HN, Tang CY, Man XF, Tan SW, Guo Y, Tang J, et al. Plasticity of adipose tissue in response to fasting and refeeding in male mice. *Nutr Metab (Lond)*. 2017 Jan 5.
126. Lacerda DR, Costa KA, Silveira ALM, Rodrigues DF, Silva AN, Sabino JL, et al. Role of adipose tissue inflammation in fat pad loss induced by fasting in lean and mildly obese mice. *J Nutr Biochem*. 2019 Oct 1;72.
127. Lacerda DR, Soares DD, Costa KA, Nunes-Silva A, Rodrigues DF, Sabino JL, et al. Mechanisms underlying fat pad remodeling induced by fasting: role of PAF receptor. *Nutrition*. 2020 Mar 1
128. Avtanski D, Pavlov VA, Tracey KJ, Poretsky L. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Animal Model Exp Med*. 2019 Dec 25;2(4):252–8.
129. Kim JA, Song YJ. Early Time-Restricted Eating Reduces Weight and Improves Glycemic Response in Young Adults: A Pre-Post Single-Arm Intervention Study. *Obes Facts*. 2023 Jan 1

ANEXO A – Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA)



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
Peso/Idade	17g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	8

APÊNDICE A – ARTIGO

Investigation of the effect of intermittent fasting on bone health in mice on a high-fat diet

Bruna C. Oliveira^a, Ana L. A. Leite^a, Bruna C. Oliveira^a, Joyce E. Heredia^a, Laura D. S. Fernandes^a, Adaliene V. M. Ferreira^{a, b}, Marina C. Oliveira^{a, *}

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

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

*Corresponding author: Av. Alfredo Balena, 190, Departamento de Nutrição, Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 30130–100, Brazil. Tel.: +553134098036. E-mail address: marina.cdoliveira@gmail.com

ABSTRACT

Bone tissue performs essential functions such as mechanical support, locomotion, protection and storage of minerals and fat and is closely linked to metabolism and hormonal regulation. Obesity, characterized by excess adipose tissue and chronic low-grade inflammation, can negatively influence bone health by increasing bone fragility due to inflammatory responses and reduced osteoblast formation. Intermittent fasting has emerged as a potential strategy for reducing body fat and improving metabolic health, but its effects on bone health are still scarce and controversial. Therefore, this study aimed to investigate the effect of intermittent fasting as a therapeutic strategy for bone health in mice with obesity. For this, C57BL/6 mice were divided into three experimental groups: (i) mice fed a standard laboratory diet (LABINA®) (C); (ii) mice fed at 45% high-fat diet (HF); and (iii) mice fed an HF diet and subjected to intermittent fasting (IF). The intervention with intermittent fasting was started after the animals in group (iii) reached 40 g, and consisted of 35 days of experimental treatment, interspersing 24 hours of fasting with 24 hours in a state fed with the HF diet. The intervention with intermittent fasting did not reverse the changes in the bone microarchitecture of the femur of obese mice, although it increased the presence of osteoblasts. Intermittent fasting did not affect systemic markers of bone remodeling, nor did it alter the expression of genes related to bone remodeling and

maintenance in the tibia. Despite weight reduction, mice subjected to intermittent fasting showed only a partial reversal of adiposity, without significant improvements in the metabolic changes associated with obesity. Thus, intermittent fasting does not appear to have substantial impacts on bone and metabolic health in obese mice.

Keywords: Bone health; Intermittent fasting; High-fat diet; Obesity; Bone remodeling.

1. INTRODUCTION

The human skeleton is composed of dynamic bone tissue that performs crucial functions, including mechanical support, body locomotion, muscle fixation, organ protection, blood cell production in the red bone marrow, fat storage in the yellow bone marrow, and mineral storage (1,2,130). This tissue actively participates in the metabolism of micronutrients such as calcium and phosphorus and contributes to the regulation of hormones like calcitonin, parathyroid hormone, and vitamin D (4). Its composition includes connective tissue and bone matrix, which ensure tissue stability (5,6), and various cells such as osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts that are involved in the continuous process of tissue remodeling (7,8). These cells are essential for the production, maintenance, and reabsorption of the bone matrix, which ensures tissue stability. Osteoblasts deposit the bone matrix and differentiate into osteocytes, which, upon maturation, communicate with and support the bone (9–11). Conversely, osteoclasts digest the bone matrix, playing a fundamental role in tissue resorption (1,12). This process helps bones maintain their integrity continuously. Factors such as growth factors, hormones, nutrients, medications, and inflammatory molecules can influence bone regulation, synthesis, and resorption (8,13). Therefore, conditions like obesity can impact bone health.

The current dietary patterns of the population, characterized by the consumption of refined carbohydrates, saturated fats, and excessive calories, have contributed to a significant increase in obesity prevalence (14,15). This health condition is marked by excessive adipose tissue accumulation, which is associated with chronic low-grade inflammation and systemic metabolic alterations (16,17). Previously, it was believed that excess adipose tissue in obesity could exert an additional mechanical load on bones, potentially stimulating bone formation through adaptation and remodeling processes (18–20). However, emerging studies have shown that the relationship between a high Body Mass Index (BMI) and reduced fracture risk is not straightforward, and results have been controversial (21–23). Recent research has revealed links between excess fat and increased bone fragility, suggesting that inflammatory responses may

affect bone remodeling processes and contribute to bone diseases (24–26), making bones more fragile and susceptible to fractures.

Several hypotheses discuss how obesity influences bone remodeling. Evidence suggests that, because adipocytes and osteoblasts derive from a common progenitor cell, obesity might stimulate the formation of adipocytes in the bone marrow while reducing osteoblast formation (27). Another hypothesis posits that, as a low-grade chronic inflammatory disease, obesity releases pro-inflammatory cytokines that may stimulate bone demineralization (28). Research into various treatments for preventing bone disease progression and addressing obesity has included nutritional strategies such as fasting. The literature describes several fasting protocols, including: (i) time-restricted eating (with defined food intake windows, from 12 to 20 hours), (ii) intermittent fasting (such as fasting on alternate days or 2 days per week), and (iii) periodic fasting (lasting three days or more every 2 or more weeks) (30,31). Studies indicate that fasting can effectively reduce body fat and adipocyte size. Additionally, fasting triggers adaptive cellular responses that reduce cellular stress, modify adipose secretion, and enhance fat breakdown through lipolysis activation (32–36). Consequently, fasting may play a significant role in treating obesity and metabolic disorders, potentially benefiting bone health (2). Intermittent fasting, in particular, has gained popularity as a strategy for weight control and metabolic health improvement. However, concerns exist about its effects on bone health, especially in obese populations with potentially compromised bone mineral density. Therefore, this study proposes to investigate the impact of intermittent fasting as a therapeutic strategy on bone health in obese mice, aiming to determine whether its metabolic benefits outweigh potential effects on bone density. Such research is crucial for providing robust evidence to guide clinical practices and dietary recommendations.

2. METHODS

2.1 Experimental design

Mice of 8-week-old male C57BL/6 were obtained from the animal care center of Universidade Federal de Minas Gerais (Central Bioterium-UFMG). The local Ethics Committee in Animal Experimentation has approved the experimental protocol (protocol n° 245/2022). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Mice were housed under standard conditions with a light-dark cycle of 12 h–12 h in separated and appropriate cages access to diet and water. in groups of approximately 8 animals per cage, with conventional cages lined with wood shavings. The animals were divided into three experimental

groups: (i) mice fed a standard laboratory diet (LABINA®), (ii) mice fed a high-fat diet (45% fat, HF), and (iii) mice also fed a high-fat diet (45% fat, HF). The dietary intervention with intermittent fasting began after the animals in group iii reached 40g, and they were subjected to 35 days (5 weeks) of experimental treatment. This protocol consisted of alternating 24 hours of fasting with 24 hours of feeding with the HF diet. At the end of the fifth week of dietary intervention, euthanasia was performed. Mice were fasted for 6 hours prior to being anesthetized with intraperitoneal injections of ketamine and xylazine. Euthanasia was achieved via exsanguination. Blood was collected for serum, and bone tissues were prepared: a transverse section of the right femur was used for histological analysis, while the left femur and tibia were collected for further analysis. Adipose tissues from the epididymal, subcutaneous, mesenteric, and retroperitoneal regions were removed, weighed, and processed accordingly. Serum, adipose tissue, and tibia samples were stored at -80°C for future metabolic and inflammatory analysis. The right femur section was fixed in formaldehyde, decalcified, and preserved in alcohol for histology, while the left femur was preserved in formaldehyde and alcohol for microcomputed tomography analysis.

2.2 Oral glucose tolerance test (OGTT)

OGTT was performed in the eleventh week in 6-hour fasted mice. They received D-glucose at a dose of 0.2g/100g of body weight by gavage. Glucose levels were measured at 0, 15, 30, 60, 90, and 120 minutes after gavage. Blood was obtained by cutting the animals' tails and evaluated by the Accue-Check glucometer (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA).

2.3 Micro-computed tomography analysis

Femur samples were scanned using a high-resolution micro-computed tomography (micro-CT) scanner and aligned with the vertical axis of the scanner (Skyscan 1172 X-Ray microtomograph, Aartselaar, Belgium). Calibration was performed using mouse-specific calcium hydroxyapatite phantoms of known density. Datawiew software (Bruker, Kontich, Belgium) was used to align the femur, and CTAnalyzer software (Bruker, Kontich, Belgium) was used to perform morphological analyses of the trabecular and cortical bone. The scan was performed longitudinally in the proximal region of the femur, considering 135 sections from the epiphyseal disc. The tissue was analyzed to determine bone mineral density (BMD), bone volume/tissue volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp), and structure model index (SMI). The cortical region was also analyzed, in which bone volume/tissue volume (BV/TV) and transverse thickness (Ct.Th) were evaluated, considering 135 sections from the epiphyseal disc.

2.4 Histomorphometry of the femur

The femur samples were fixed with 4% buffered formalin solution for histological processing. After a fixation period of no more than 48 hours, the tissues were preserved in 70% alcohol. The samples underwent a decalcification process with 14% EDTA and pH: 7.2 for 28 days with changes of the solution every 3-4 days. The pieces were then washed in running water for histological processing. The tissues were embedded in paraffin for 1 hour and then 5 μ m sections were cut using microtomy in the posteroanterior direction. The hematoxylin-eosin (H&E) technique was used to stain the histological sections to assess the number of osteocytes in the tissue. Staining using the Masson's Trichrome technique was used to assess the number of osteoblasts. Osteoclast activity was assessed by staining for TRAP. The slides obtained were evaluated under a light microscope (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) with a digital camera attached (Flexacam i5 Compound, Leica Microsystems, Switzerland).

2.5 Counting of osteoblasts, osteocytes and osteoclasts in the femur

After staining the respective stains for the identification and counting of osteoclasts, osteoblasts and osteocytes, images of the femur were obtained using a microscope with a digital camera attached to 10x and 40x objectives. The density of osteocytes per bone area was determined in the trabecular bone region using ImageJ software (NIH Image, Bethesda, MD, United States). The numbers of osteocytes and osteoblasts were evaluated from five photos taken in a standardized area of the proximal diaphysis, below the epiphyseal disc. Osteocytes were normalized by the area of trabecular bone evaluated and osteoblasts were normalized by the bone perimeter evaluated. For the osteoclast count, the metaphysis region was standardized and the number of osteoclasts was normalized by the perimeter of the epiphyseal disc. Counts were performed on two sections per animal and then the values were averaged to obtain the average number of cells per area or perimeter.

2.6 Adipocyte area

The epididymal and subcutaneous adipose tissues were stored at -80°C and fixed in 4% formaldehyde for a period of 24 hours. Then, dehydration steps were performed in an increasing series of alcohols (70°, 85°, 90°, 95°, 100°), diaphanization with xylol, and inclusion in paraffin. Histological sections of 5 μ m thickness were obtained using a microtome. The sections were placed on slides and stained with hematoxylin, contrasted with eosin, to be evaluated and photographed using a light microscope equipped with a digital camera. To determine the adipocyte area, the ImageJ program (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)

was used, in which the areas of at least 100 adipocytes present in up to 5 images (40x objective) for each animal were determined.

2.7 Serological assessments of bone cell markers and glucose

The bone cell markers receptor activator kappa-B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) were measured using the ELISA (Enzyme Linked ImmuneSorbent Assay) according to the manufacturer's instructions (R&D System, Inc., Minneapolis, USA). Glucose was quantified in the serum using an enzymatic kit (Bioclin, Belo Horizonte, MG) according to the manufacturer's instructions.

2.8 Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

To perform the RT-qPCR analysis, the tibia samples were stored at -80°C until analysis. The Invitrogen PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies Corp, North America) was used for RNA extraction, according to the manufacturer's instructions. Briefly, the samples were treated with lysis buffer containing 2-mercaptoethanol and subsequently homogenized using a rotor-stator homogenizer (IKA, Staufen, Germany). After adding ethanol to the lysate, the mixture was transferred to an extraction column. After centrifugation, the RNA was washed several times with specific wash buffer. Finally, the RNA was eluted using RNase-free water. The RNA was transcribed to obtain cDNA using a thermocycler (BioRad T100, Hercules, California, USA) and the SuperScript VILO Master Mix reverse transcriptase enzyme (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The StepOnePlus Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) was used for the analysis, and the SYBR® Green PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific) was used. The gene expression of the following markers was evaluated: osteoclast markers and negative regulators of bone resorption - RANKL, OPG and ratio (RANKL/OPG), as well as RUNX2, PPARY and the RUNX2/PPARY ratio; TNF, osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) and cathepsin K. As a control, the expression of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used.

Data were evaluated using the Delta-Delta CT ($\Delta\Delta CT$) method. The ΔCT of each sample was calculated, and the CT (threshold cycle) value of Gapdh was subtracted from the CT values of the genes evaluated. The $\Delta\Delta CT$ calculation was performed using the following formula [ΔCT (sample) - ΔCT (Gapdh)]. After obtaining the $\Delta\Delta CT$ value, the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ was used to compare the gene expression of the bones of the groups.

2.7 Statistical analysis

The database was assembled in EXCEL. GraphPad PRISM software (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA, version 8.0) was used to perform all analyses. After performing the Kolmogorof-Smirnoff normality test and verifying that the samples presented Gaussian distribution, statistical comparisons between the various groups were performed by one-way ANOVA for groups with normal distribution or Kruskal-Wallis when the distribution was non-normal, followed by Dunnett's post-test (3 groups). For weight gain and TTOG, two-way ANOVA was used, followed by Dunnett's post-test. The results were presented as mean $\pm$ standard error of the mean. The significance level adopted was $P < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Intermittent fasting did not reverse changes in bone microarchitecture in the femur of mice with obesity

The trabecular bone microarchitecture was assessed using microcomputed tomography on the femur. Through the analyzes it was possible to observe that there was no significant difference in bone mineral density (BMD) between the groups evaluated (Fig. 1A and 1B). On the other hand, the bone volume (BV/TV) of the HF group was increased when compared to the control group (Fig. 1C), as well as the number of trabeculae (Tb.N) (Fig. 1D), but without significant changes in the IF group. Other assessments of trabecular bone, including trabecular separation (Tb.Sp) (Fig. 1E), trabecular thickness (Tb.Th) (Fig. 1G and 1H) and structure model index (SMI) (Fig. 1F) did not prove to be different between the groups evaluated. Analysis of cortical bone microarchitecture was also carried out using micro-CT on the mouse femur. From this evaluation, no significant differences were found between the groups evaluated for total area (Tt.Ar), cortical area (Ct.Ar), proportion of cortical area in relation to total area (Ct.Ar/Tt.Ar) and thickness cortical (Ct.Th) (Fig. 1A, I-L).

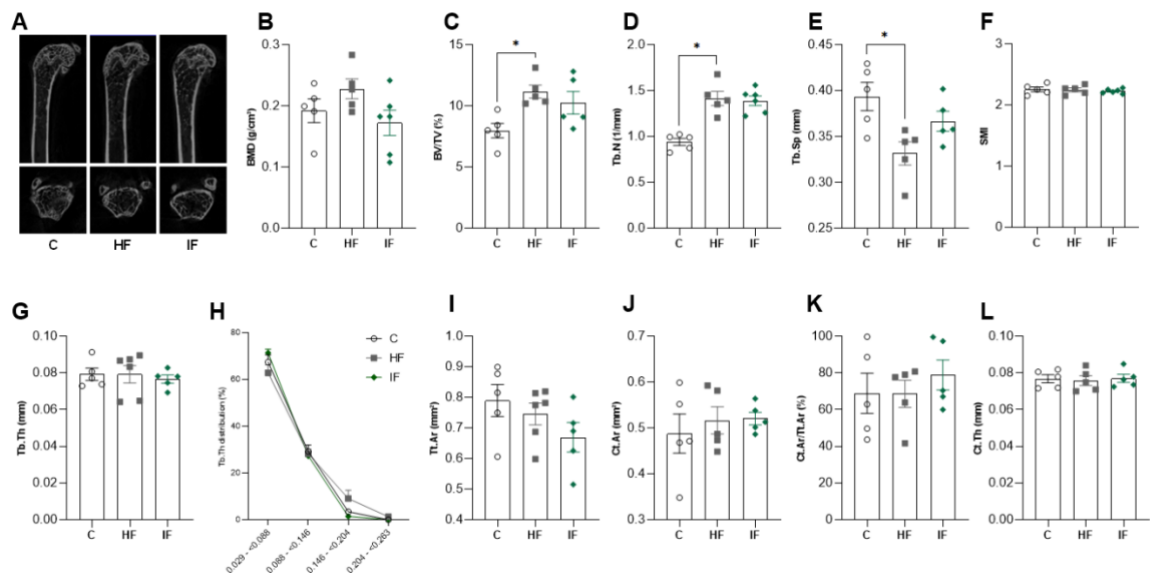


Figure 1. Analysis of the trabecular region of mouse femur using MicroCT. (A) Representative images of the section of the sagittal and the section of the axial portion of the femur, (B) Bone mineral density (BMD), (C) Bone volume/tissue volume fraction (BV/TV), (D) Trabecular number (Tb.N), (E) Trabecular separation (Tb.Sp), (F) Structure Model Index (SMI), (G) Trabecular thickness (Tb.Th), (H) Percentage distribution of trabecular thickness (Tb.Th distribution), (I) Total area (J) Cortical area (Ct.Ar), (K) Proportion of the cortical area in relation to the total area (Ct.Ar/Tl.Ar), (L) Cortical thickness (Ct.Th). Data from control mice (C), fed a high-fat diet (HF) and intermittent fasting (IF) for 35 days. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean of 5-6 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. IF.

3.2. Bone cell activity: osteoblasts, osteoclasts and osteocytes in the femur

In histological analyzes of the femur, the main cells active in bone remodeling were quantified. Osteoblasts were found to be fewer in the HF group compared to control animals, with this quantity being increased in those treated with IF (Fig. 2A and 2B). Osteoclasts were in smaller numbers in the HF group compared to the control, while the IF group was similar to the HF group (Fig. 2C and 2D). Finally, there were no significant differences between the groups in the evaluation of osteocytes (Fig. 2E and 2F).

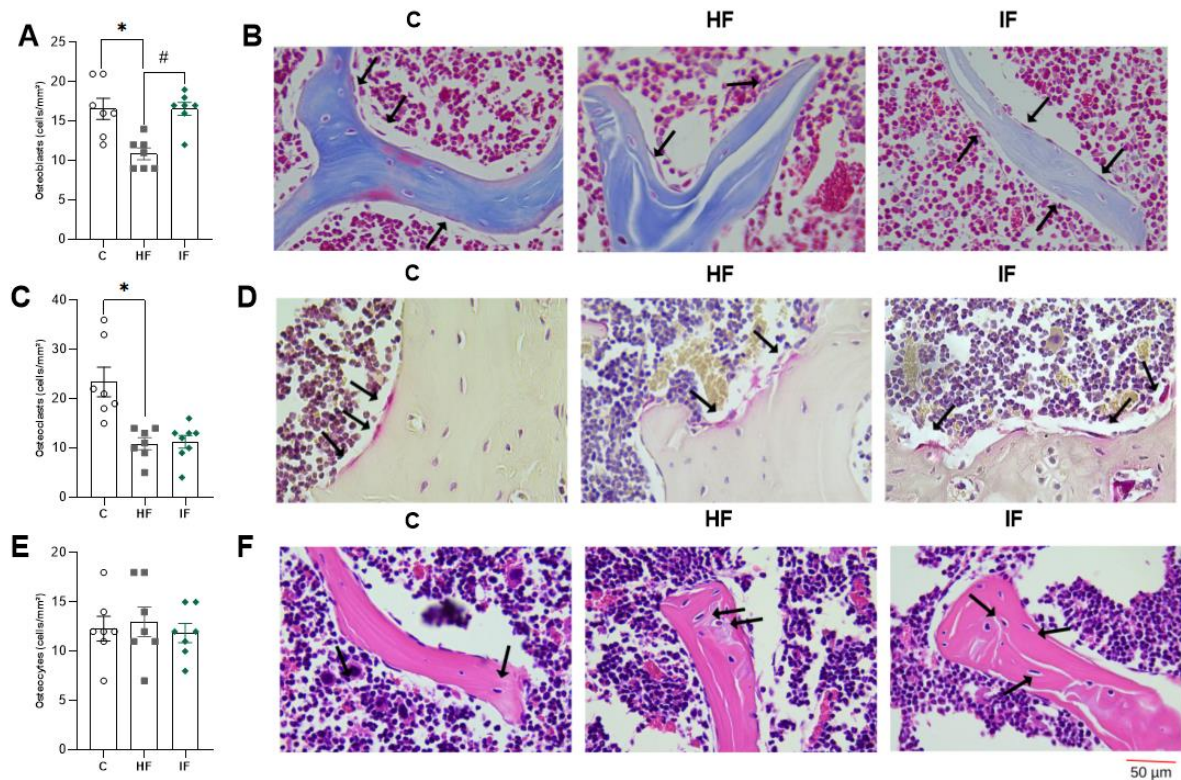


Figure 2. Histological analysis of the femur of osteoblasts, osteoclasts and osteocytes. (A) Count of the number of osteoblasts in the proximal diaphysis of the femur, below the epiphyseal disc, (B) Representative images of osteoblasts (40x), (C) Count of osteoclasts in the femoral metaphysis, (D) Representative images of osteoclasts (40x), (E) Osteocyte count in the proximal diaphysis, below the epiphyseal disc, (F) Representative images of osteocytes (40x). Data from control mice (C), fed a high-fat diet (HF) or intermittent fasting (IF) for 35 days. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean of 7 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. IF.

3.3. Intermittent fasting intervention did not change markers of bone remodeling

RANKL is a key protein involved in the regulation of bone resorption and the formation of osteoclasts, being one of the main markers of bone metabolism. On the other hand, OPG acts to inhibit the action of RANKL. No significant serum changes were observed for RANKL (Fig. 3A), OPG (Fig. 3B) or in the RANKL/OPG ratio (Fig. 3C) between the groups.

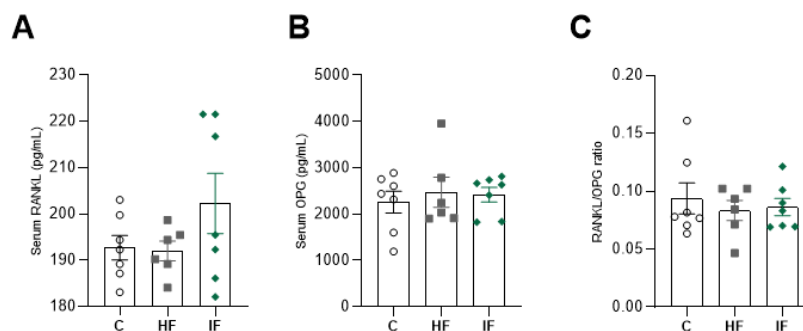


Figure 3. Dosages of systemic markers of bone remodeling. (A) Serum RANKL, (J) Serum OPG, (K) RANKL/OPG ratio. Data from control mice (C), fed a high-fat diet (HF) and intermittent fasting (IF) for 35 days. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean of 5-7 animals per group. Analyzes carried 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. IF.

Similarly, the investigation of gene expression through real-time PCR in the tibia indicated that there were no significant differences in the expression of RANKL and OPG, nor in the RANKL/OPG ratio in any of the groups evaluated (Fig. 4A, 4B and 4C).

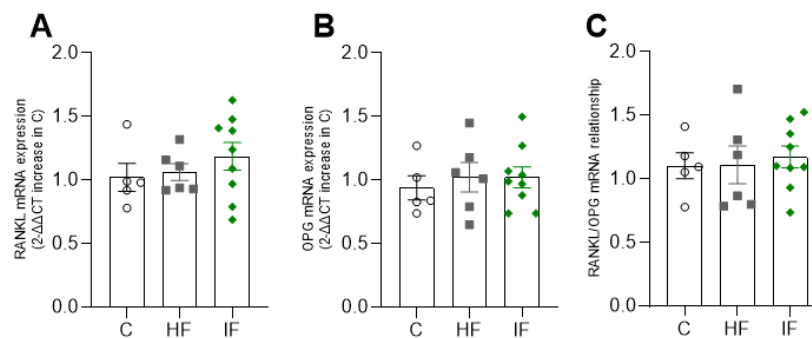


Figure 4. Analysis of gene expression of markers of bone formation and resorption in the tibia of mice by RT-PCR. Analysis of expression of (A) RANKL, (B) OPG, (C) RANKL/OPG ratio. Data from control mice (C), fed a high-fat diet (HF) and intermittent fasting (IF) for 35 days. Data represent mean $\pm$ standard error of the mean of 5-8 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. IF.

3.4. Intermittent fasting did not significantly interfere with the expression of differentiation genes and bone activity in the tibia

The RUNX2 transcription factor for osteoblast differentiation increased in animals fed the HF diet, but without change with intermittent fasting intervention (Fig. 5A). However, PPAR γ , a transcription factor for adipocyte differentiation, as well as the proportion between the two factors, did not show a significant difference between the groups (Fig. 5B and 5C). The markers TNF, osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), cathepsin K, used to investigate parameters related to inflammation, mineralization, cell adhesion and bone resorption activity respectively, also did not show significant differences between the groups (Figures 5D, 5E and 5F).

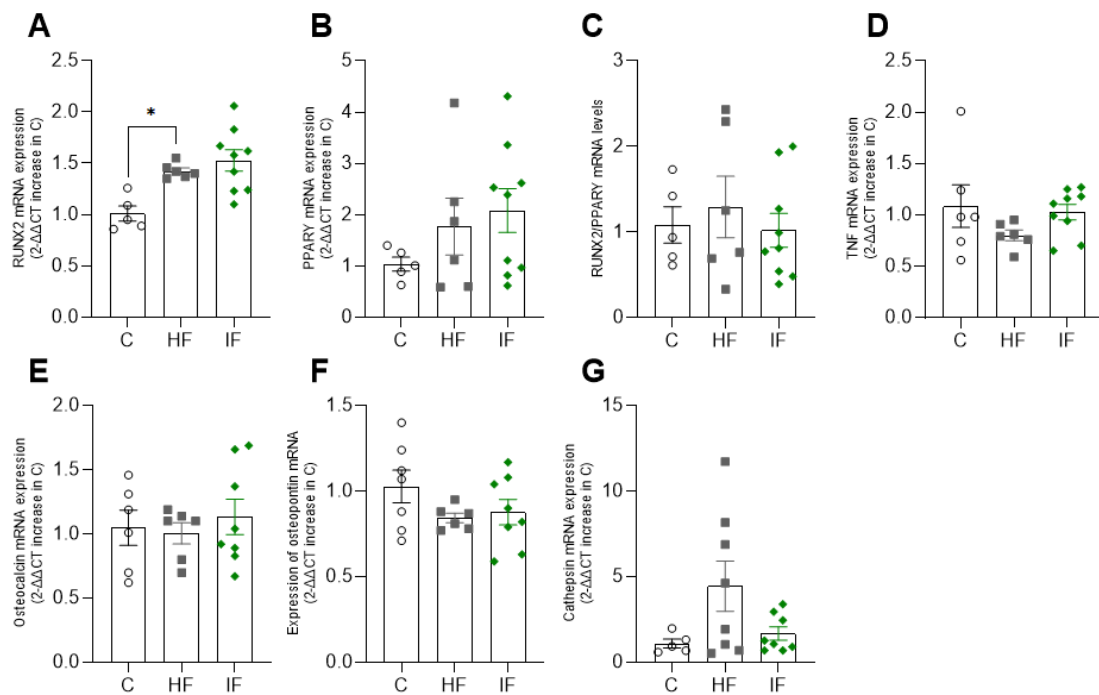


Figure 5. Analysis of gene expression of markers of osteoblast differentiation, adipocyte differentiation, inflammation, markers of mineralization, cell adhesion and bone resorption activity in the tibia of mice by RT-PCR. (A) RUNX2, (B) PPAR γ , (C) RUNX2/PPAR γ , (D) TNF relationship (E) osteocalcin (OCN), (B) osteopontin (OPN), (C) Cathepsin K,. Data from control mice (C), fed a high-fat diet (HF) and intermittent fasting (IF) for 35 days. Data represent mean $\pm$ standard error of the mean of 5-8 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. IF.

3.5. Despite weight loss, mice treated with intermittent fasting show partial reversal of adiposity.

Quantification of the mice's caloric intake showed that the group that received the HF diet had higher caloric intake when compared to the control group, as well as in relation to the animals in the group submitted to IF intermittent fasting in the intervention period (Fig. 6A). When analyzing body weight throughout the experimental period (Fig. 6B), it is noted that the weight of animals in group C and HF remained unchanged, while group IF showed a reduction in body weight after 35 days of intervention. The adiposity index indicated that adipose mass increased in the HF group compared to the control group, but without change in the IF group when compared to the HF group (Figure 6C). However, when evaluating the area of adipocytes, animals fed with HF diet showed an increase in their area compared to the control group, with mice with IF showing a reduction in relation to animals with obesity fed with HF diet, both for

epididymal adipose tissue (EAT) (Figure 6D, 6E and 6F), as well as subcutaneous adipose tissue (IAT) (Figure 6G, 6H and 6I).

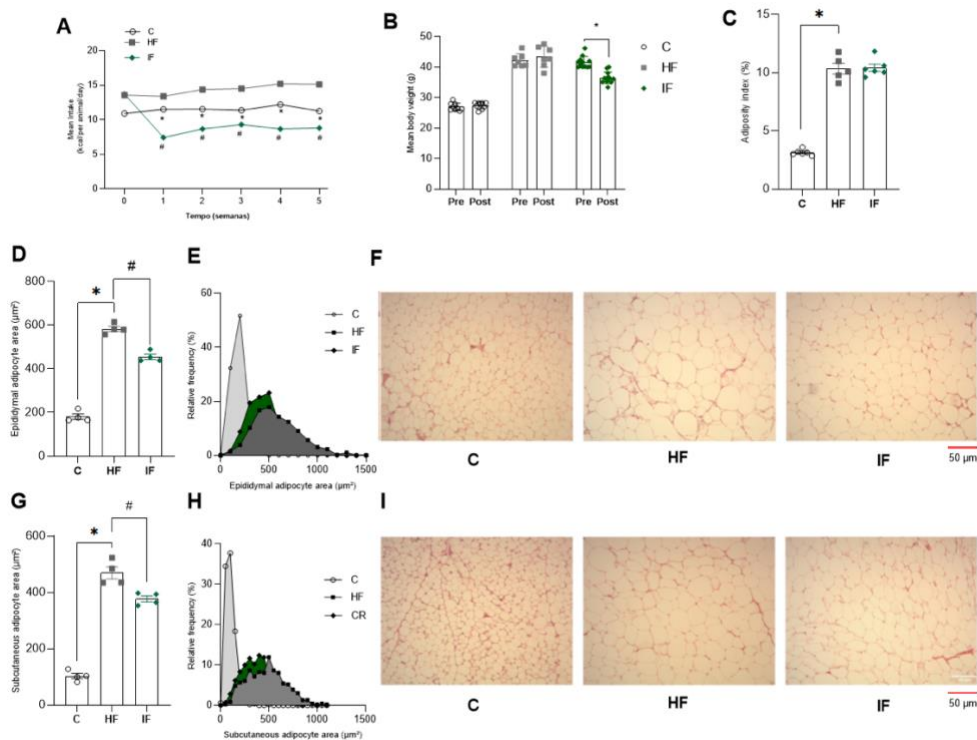


Figure 6. Changes in body weight and adiposity. (A) Energy intake (Kcal of diet per animal per day), (B) Pre and post average body weight, (C) Adiposity index, (D) Epididymal adipocyte area, (E) Percentage distribution of epididymal adipocyte area, (F) Representative images of the adipocyte area of epididymal adipose tissue, stained with hematoxylin-eosin, (G) Subcutaneous adipocyte area, (H) Percentage distribution of the subcutaneous adipocyte area, (I) Representative images of the adipocyte area of subcutaneous adipose tissue, stained with hematoxylin-eosin. Data from control mice (C), fed a high-fat diet (HF) or intermittent fasting (IF) for 35 days. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean of 4 animals per group. Analyses 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. IF

When evaluating metabolic changes, it was observed that the HF group presented glucose intolerance when compared to animals in the control group after performing the TTOG and evidenced by the analysis of the area under the curve (Figure 7A and 7B), as well as higher serum glucose levels. (Figure 7C). There was no change in oral glucose tolerance or fasting blood glucose in the group treated with IF when compared to the HF group (Figure 7A and 7B).

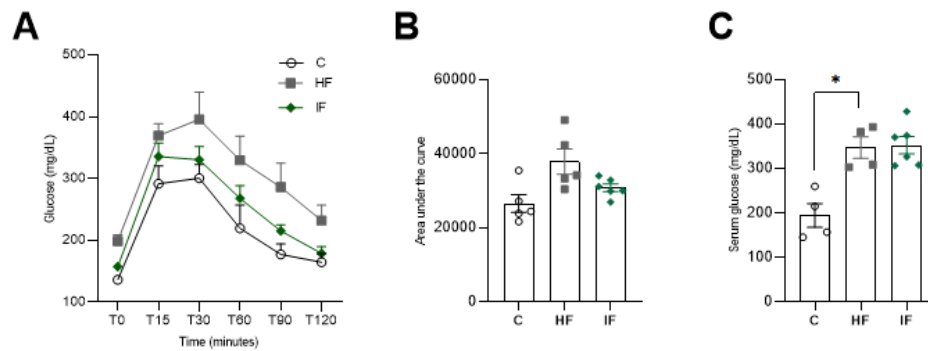


Figure 7. Changes in glycemic metabolism. (A) Oral glucose tolerance test (OGTT), (B) Area under the OGTT curve, (C) Fasting serum glucose. Data from control mice (C), fed a high-fat diet (HF) and intermittent fasting (IF) for 35 days. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean of 4-6 animals per group. Analyses 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. IF.

DISCUSSÃO

The relationship between obesity and bone health is complex, with evidence suggesting that obesity can impair bone health (26,37). Intermittent fasting (IF) is a nutritional strategy often recommended for overweight and obese individuals and has been extensively studied (38,39). However, although intermittent fasting has been shown to have several health benefits, there is limited data on its impact on the skeletal system. This study revealed that intermittent fasting did not reverse changes in bone microarchitecture in the femur in obese mice, although it did increase the presence of osteoblasts. The intervention did not alter systemic markers of bone turnover or the expression of genes related to bone maintenance in the tibia. Furthermore, despite the observed weight loss, mice treated with intermittent fasting had only a partial reversal of adiposity and did not improve metabolic changes associated with obesity.

In the present study, assessment of trabecular bone microarchitecture revealed no significant differences in bone mineral density (BMD) between groups, suggesting that total bone density was not affected by the HF diet. This is in line with studies indicating that BMD may not immediately reflect changes in bone microarchitecture brought about by dietary interventions (40,41). However, HF diet-induced obesity in animals is generally associated with lower bone density (13,42–45). For example, one study observed femoral bone loss after 12 weeks of HF diet (46), and Tang et al. (47) reported reduced BMD and significant changes in bone microarchitecture in rats with high-fat diet-induced obesity. In contrast, our study found a significant increase in bone volume/total volume (BV/TV) and trabecular number (Tb.N) in the HF group, in addition to a reduction in trabecular thickness (Tb.Sp), which may suggest changes

in bone dynamics. Literature data indicate that high-fat diets can increase bone mass, but with possible reduction in bone quality and increased predisposition to fractures (48,49). Studies such as that of Ionova-Martin et al. (50) have shown that HF-induced obesity can increase bone mass, but with compromised bone quality. Lecka-Czernik et al. (40) proposed that increased bone mass in obese mice may result from a two-step process: an initial increase in bone mass and subsequent reduction in bone formation due to metabolic impairment. In humans, there is mixed evidence regarding the relationship between obesity and BMD. Li Y (51) found a positive association between BMI and lumbar BMD in obese middle-aged adults, suggesting possible benefits for bone health. In contrast, Ya Zhang et al. noted a negative correlation between waist circumference-adjusted weight index and BMD, indicating that visceral adipose tissue may adversely affect bone tissue (52). The connection between BMD and obesity is influenced by diverse factors, such as mechanical loading, estrogen, and sex and age differences (51,53). Even though an increase in BMD is associated with BMI, this increase is not necessarily protective against fractures (54,53). Our study corroborated that the HF diet resulted in excessive weight gain, consistent with the existing literature. In contrast to previous findings and considering other obesogenic diets, Lacerda et al. (2018) showed that obese rats fed a diet rich in refined carbohydrates (HC) had greater bone mass compared to control rats. However, this higher percentage of trabecular bone was accompanied by osteopetrosis in the lumbar vertebrae, indicating that the obesogenic diet resulted in compromised bone quality and increased bone fragility. These data suggest that, in both humans and animal models, obesity may have adverse effects on bone health, affecting not only bone density but also the quality and integrity of bone tissue. Thus, although obesity may lead to an increase in bone mineral density (BMD), this increase is not necessarily beneficial and may be associated with deteriorations in bone microarchitecture and increased fragility, compromising overall bone health.

Studies on the impact of intermittent fasting on bone health are limited and have shown controversial results due to the variety of fasting protocols, such as alternate day fasting, modified fasting, restricted feeding, and Ramadan fasting (55). Human clinical trials with alternate-day fasting and calorie restriction have shown significant weight loss but did not alter bone mineral density (BMD) or bone metabolism markers, such as CTX-1 and OPG (56). Similarly, Martens et al. (57) found that time-restricted feeding did not cause significant differences in BMD after 6 weeks. Our study corroborated that intermittent fasting led to weight loss without modifying bone parameters. In animal models, studies on fasting and bone health

are scarce and do not show a direct relationship between obesogenic diets and bone density. Hisatomi et al. (58) observed that prolonged fasting (96 h) in rats resulted in decreased vertebral width and cortical bone thickness, in addition to lower bone mineral density. However, this study focused on prolonged fasting, which limits the applicability of the results to short-term fasting. Controversially, intermittent fasting was found to reverse the reduction in BMD and reduce the bone resorption marker TRAP in rats fed a ketogenic diet (59), suggesting that intermittent fasting may counteract the negative effects of certain diets on bone health. It is important to consider that the effects of intermittent fasting may vary based on the different protocols and durations applied.

In the analysis of the cortical bone microarchitecture of the femur of mice, no significant differences were found between the groups, suggesting that dietary interventions did not impact cortical bone structure. This result is consistent with the literature, which indicates that cortical structure is generally more resistant to changes in response to dietary variations or short-term interventions, unlike trabecular structure (60,61). Studies indicate that cortical structure tends to be more stable and only shows significant changes under more extreme or prolonged conditions (60,62). Similarly, intermittent fasting may influence metabolic health and trabecular bone remodeling more, without causing major changes in cortical structure over short periods (58).

Obesity has been associated with negative effects on osteoblast numbers, with studies showing a significant reduction in bone formation due to the condition (28,63). In mice fed a high-fat (HF) diet, an increase in bone resorption was observed, attributed to inflammation caused by the accumulation of adipocytes in the bone marrow, which can promote osteoclastogenesis and decrease osteoblast formation (63). However, in our study, the number of osteoblasts and osteoclasts was reduced in the HF diet group compared to the control group, although there was an increase in the expression of RUNX2, a crucial factor for osteoblast differentiation and function (64). There were no changes in the expression of PPAR γ , an essential factor for adipocyte formation (65). The relationship between RUNX2 and PPAR γ is important, since PPAR γ activation can inhibit RUNX2 and reduce osteogenesis. Despite this, in our study, this relationship showed no statistical differences. It has been suggested that the increase in RUNX2 may be an attempt to compensate for the reduction in osteoblasts induced by the HF diet by promoting osteoblastic activity (64,66). Compensatory mechanisms, such as hormonal changes in growth hormone and IGF-1, can stimulate osteoblastic activity even with an unfavorable diet (67). Furthermore, elevated inflammatory cytokines in obesity can impair bone health (68), but

in our study there were no changes in TNF expression, nor significant differences in osteoclast activity as measured by cathepsin K.

In contrast, intermittent fasting (IF) in the present study was associated with increased numbers of osteoblasts, the cells responsible for bone formation, in line with research suggesting benefits for bone health when weight loss is moderate (69,59). However, IF did not appear to significantly alter osteoclast numbers, nor did it impact PPAR γ expression or the balance between bone formation and adipogenesis. The lack of changes in serum markers of bone turnover and RANKL and OPG expression suggests that these interventions may not have a direct or immediate effect on bone turnover. Majed et al. (70) observed that intermittent fasting for 16–18 h daily for 90 days significantly increased biomarkers of bone formation (OPG, ALP, OCN) and reduced markers of bone resorption (TRAP, NTX-1, DPD) in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. These results suggest that intermittent fasting may slow the progression of osteoporosis by inhibiting osteoclast activity and promoting osteogenesis of osteoblasts. These findings highlight the complexity of bone remodeling regulation and the variability of the effects of different dietary and metabolic interventions (24,71). Thus, we infer that additional compensatory mechanisms may be present or that the impact of interventions may not be immediately apparent on bone remodeling.

During the experimental period, the high-fat (HF) diet group had a significantly higher caloric intake compared with the control and intermittent fasting (IF) groups, reflecting the increased food intake associated with high-fat diets (28,72,73). This caloric increase led to weight gain in the HF group. In contrast, the IF group showed a significant reduction in body weight after 35 days, supporting the literature suggesting that intermittent fasting may be effective in reducing body weight and improving energy metabolism (74). Despite this, IF did not significantly alter total adipose mass, although it did show a partial reversal of epididymal and subcutaneous adipocyte area. Previous studies indicate that fasting can reduce visceral adipose tissue, but reduction of subcutaneous adipose tissue may require more prolonged fasting (75,76). Furthermore, the reduction in fat mobilization in obese animals may be attributed to metabolic or immunological inflexibility (77,78). The continuation of the HF diet after the fasting period may have contributed to the lack of noticeable changes in adipose mass.

Metabolic analysis revealed that the HF group presented glucose intolerance, a sign of insulin resistance, consistent with the literature that associates high-fat diets with insulin resistance and systemic inflammation (79-81). The IF group, on the other hand, showed no significant changes in glucose tolerance or fasting glucose, contrary to the literature that suggests that intermittent

fasting improves insulin sensitivity and glucose tolerance (74,77). The lack of improvement in the IF group may be attributed to the duration of the intervention, the frequency and duration of the fasting windows, or the initial metabolic state of the animals. Limitations of the study include variations in fasting methods, which may bias results and make comparisons between studies difficult, and the ability of micro-CT to capture all changes in bone quality. Metabolic variability may also affect the response to fasting. In summary, although intermittent fasting may be helpful in the treatment of obesity, its impacts on bone health require further investigation to provide more precise recommendations.

CONCLUSION

The study reveals that despite the potential benefits of intermittent fasting, such as weight loss and increased osteoblasts, this practice is not effective in reversing obesity-related bone changes or improving adverse metabolic conditions associated with high-fat diets. Although obesity can increase bone mass, this is not necessarily positive, as it may be associated with deteriorations in bone microarchitecture and increased fragility. The lack of significant effects of intermittent fasting on bone and metabolic health may be due to the duration of the study, the specific fasting protocol, and the initial metabolic state of the animals. Future studies are needed to better understand the mechanisms involved and the efficacy of different intermittent fasting protocols, as well as to explore how these dietary strategies affect bone and metabolic health. Further evaluations of bone strength and metabolic pathways are also recommended for a more comprehensive understanding.

Acknowledgements: CAPES, CNPq and FAPEMIG

REFERENCES

1. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020 Sep 10;9(9).
2. Bredella MA, Buckless C, Fazeli PK, Rosen CJ, Torriani M, Klibanski A, et al. Bone Marrow Adipose Tissue Composition Following High-Caloric Feeding and Fasting. *Bone*. 2021 Nov 1;152:116093.
3. Histologia Básica, Texto E Atlas Junqueira & Carneiro 12a Ed : Free Download, Borrow, and Streaming : Internet Archive.
4. Runyan CM, Gabrick KS. Biology of Bone Formation, Fracture Healing, and Distraction Osteogenesis. *J Craniofac Surg*. 2017 Jul 1;28(5):1380–9.

5. Ansari M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Prog Biomater*. 2019 Dec 1;8(4):223–37.
6. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007 Apr;7(4):292–304.
7. Baum R, Gravallesse EM. Impact of Inflammation on the Osteoblast in Rheumatic Diseases. *Curr Osteoporos Rep*. 2014;12(1):9.
8. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
9. Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 1;22(13).
10. Delgado-Calle J, Bellido T. THE OSTEOCYTE AS A SIGNALING CELL. *Physiol Rev*. 2022 Jan 1;102(1):379–410.
11. Zhu S, Chen W, Masson A, Li YP. Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis. *Cell Discovery* 2024 10:1. 2024 Jul 2;10(1):1–39.
12. Veis DJ, O'Brien CA. Osteoclasts, Master Sculptors of Bone. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2023 Jan 24;18:257–81.
13. Xiao Y, Cui J, Li YX, Shi YH, Wang B, Le GW, et al. Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. *Nutrition*. 2011 Feb;27(2):214–20.
14. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*. 2016 Jun 1;22(7):s176–85.
15. Fehrendt H, Linn T, Hartmann S, Szalay G, Heiss C, Schnettler R, et al. Negative Influence of a Long-Term High-Fat Diet on Murine Bone Architecture. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:1–9.
16. Castro AM, Macedo-de la Concha LE, Pantoja-Meléndez CA. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. *Revista Médica del Hospital General de México*. 2017 Apr 1;80(2):101–5.

17. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Sep 6;12.
18. 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. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1993;8(5):567–73.
19. Khosla S, Atkinson EJ, Riggs BL, Melton LJ. Relationship between body composition and bone mass in women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996;11(6):857–63.
20. Nguyen T V., Center JR, Eisman JA. Osteoporosis in elderly men and women: Effects of dietary calcium, physical activity, and body mass index. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2000;15(2):322–31.
21. De Laet C, Kanis JA, Odén A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: A meta-analysis. *Osteoporosis International*. 2005;16(11):1330–8.
22. Compston JE, Watts NB, Chapurlat R, Cooper C, Boonen S, Greenspan S, et al. Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: Glow. *American Journal of Medicine*. 2011;124(11):1043–50.
23. Prieto-Alhambra D, Premaor MO, Fina Avilés F, Hermosilla E, Martinez-Laguna D, Carbonell-Abella C, et al. The association between fracture and obesity is site-dependent: A population-based study in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2012 Feb 1;27(2):294–300.
24. Piñar-Gutierrez A, García-Fontana C, García-Fontana B, Muñoz-Torres M. Obesity and Bone Health: A Complex Relationship. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 1;23(15).
25. Mendonça F, Soares R, Carvalho D, Freitas P. The impact of obesity on bone health: an overview. *Endokrynol Pol*. 2022;73(6):954–8.
26. Forte YS, Renovato-Martins M, Barja-Fidalgo C. Cellular and Molecular Mechanisms Associating Obesity to Bone Loss. *Cells*. 2023 Feb 5 [cited 2024 Jul 25];12(4).
27. Devlin MJ, Rosen CJ. The bone-fat interface: Basic and clinical implications of marrow adiposity. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015 Feb 1;3(2):141–7.
28. Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res*. 2011;6(1):30.

29. Aron-Wisnewsky J, Warmbrunn M V., Nieuwdorp M, Clément K. Metabolism and Metabolic Disorders and the Microbiome: The Intestinal Microbiota Associated With Obesity, Lipid Metabolism, and Metabolic Health-Pathophysiology and Therapeutic Strategies. *Gastroenterology*. 2021 Jan 1;160(2):573–99.
30. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab*. 2014 Feb 4;19(2):181–92.
31. Okawa T, Nagai M, Hase K. Dietary Intervention Impacts Immune Cell Functions and Dynamics by Inducing Metabolic Rewiring. *Front Immunol*. 2021 Feb 4;11.
32. Fazeli PK, Zhang Y, O’Keefe J, Pesaresi T, Lun M, Lawney B, et al. Prolonged fasting drives a program of metabolic inflammation in human adipose tissue. *Mol Metab*. 2020 Dec 1;42.
33. Flach RJR, Matevossian A, Akie TE, Negrin KA, Paul MT, Czech MP. β 3-Adrenergic receptor stimulation induces E-selectin-mediated adipose tissue inflammation. *J Biol Chem [Internet]*. 2013 Jan 25 [cited 2024 Jul 25];288(4):2882–92.
34. Liu B, Page AJ, Hatzinikolas G, Chen M, Wittert GA, Heilbronn LK. Intermittent Fasting Improves Glucose Tolerance and Promotes Adipose Tissue Remodeling in Male Mice Fed a High-Fat Diet. *Endocrinology*. 2019 Jan 1;160(1):169–80.
35. Liu B, Hutchison AT, Thompson CH, Lange K, Heilbronn LK. Markers of adipose tissue inflammation are transiently elevated during intermittent fasting in women who are overweight or obese. *Obes Res Clin Pract*. 2019 Jul 1;13(4):408–15.
36. Wernstedt Asterholm I, Tao C, Morley TS, Wang QA, Delgado-Lopez F, Wang Z V., et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab*. 2014 Jul 1;20(1):103–18.
37. Savvidis C, Tournis S, Dede AD. Obesity and bone metabolism. *Hormones*. 2018 Jun 1;17(2):205–17.
38. Parveen S. Impact of calorie restriction and intermittent fasting on periodontal health. *Periodontol 2000 [Internet]*. 2021 Oct 1;87(1):315–24.
39. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis International*. 2019 Jan 18;30(1):3–44.
40. Lecka-Czernik B, Stechschulte LA, Czernik PJ, Dowling AR. High bone mass in adult mice with diet-induced obesity results from a combination of initial increase in bone mass followed by attenuation in bone formation; implications for high bone

mass and decreased bone quality in obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Jul 15;410:35–41.

41. 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. *J Nutr Health Aging* [Internet]. 2018 Mar 1;22(3):361–70.
42. Lau BY, Fajardo VA, McMeekin L, Sacco SM, Ward WE, Roy BD, et al. Influence of high-fat diet from differential dietary sources on bone mineral density, bone strength, and bone fatty acid composition in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2010 Oct;35(5):598–606.
43. Fujita Y, Maki K. High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice. *BMC Obes*. 2015 Dec 8;3(1):1.
44. Cao JJ, Gregoire BR, Shen CL. A High-Fat Diet Decreases Bone Mass in Growing Mice with Systemic Chronic Inflammation Induced by Low-Dose, Slow-Release Lipopolysaccharide Pellets. *J Nutr*. 2017 Oct;147(10):1909–16.
45. 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. *J Nutr Biochem*. 2018 Sep;59:93–103.
46. 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.
47. Tang L, Yang X, Gao X, Du H, Han Y, Zhang D, et al. Inhibiting myostatin signaling prevents femoral trabecular bone loss and microarchitecture deterioration in diet-induced obese rats. 2015 Oct 5;241(3):308–16.
48. Cherif R, Vico L, Laroche N, Sakly M, Attia N, Lavet C. Dual-energy X-ray absorptiometry underestimates in vivo lumbar spine bone mineral density in overweight rats. *J Bone Miner Metab*. 2018 Jan 1 ;36(1):31–9.
49. Reid IR. Fat and bone. *Arch Biochem Biophys*. 2010 Nov 1;503(1):20–7.
50. Ionova-Martin SS, Do SH, Barth HD, Szadkowska M, Porter AE, Ager JW, et al. Reduced size-independent mechanical properties of cortical bone in high-fat diet-induced obesity. *Bone*. 2010 Jan 1;46(1):217–25.
51. Li Y. Association between obesity and bone mineral density in middle-aged adults. *J Orthop Surg Res*. 2022 Dec 1, 17(1):268.
52. 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 7;23(1):1–10.
53. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Association between Adiposity and Bone Mineral Density in Adults: Insights from

- a National Survey Analysis. *Nutrients* 2023, Vol 15, Page 3492. 2023 Aug 7;15(15):3492.
54. Fassio A, Idolazzi L, Rossini M, Gatti D, Adami G, Giollo A, et al. The obesity paradox and osteoporosis. *Eat Weight Disord.* 2018 Jun 1;23(3):293–302.
 55. Patterson RE, Laughlin GA, LaCroix AZ, Hartman SJ, Natarajan L, Senger CM, et al. INTERMITTENT FASTING AND HUMAN METABOLIC HEALTH. *J Acad Nutr Diet.* 2015 Aug 1;115(8):1203.
 56. Barnosky A, Kroeger CM, Trepanowski JF, Klempel MC, Bhutani S, Hoddy KK, et al. Effect of alternate day fasting on markers of bone metabolism: An exploratory analysis of a 6-month randomized controlled trial. *Nutr Healthy Aging.* 2017;4(3):255–63.
 57. Martens CR, Rossman MJ, Mazzo MR, Jankowski LR, Nagy EE, Denman BA, et al. Short-term time-restricted feeding is safe and feasible in non-obese healthy midlife and older adults. *Geroscience.* 2020 Apr 1;42(2):667–86.
 58. Hisatomi Y, Kugino K. Changes in bone density and bone quality caused by single fasting for 96 hours in rats. *PeerJ.* 2019 Jan 9 2019(1):e6161.
 59. Xu X, Ding J, Wu X, Huang Z, Kong G, Liu Q, et al. Bone microstructure and metabolism changes under the combined intervention of ketogenic diet with intermittent fasting: an in vivo study of rats. *Exp Anim.* 2019;68(3):371–80.
 60. 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.
 61. Devlin MJ, Robbins A, Cosman MN, Moursi CA, Cloutier AM, Louis L, et al. Differential effects of high fat diet and diet-induced obesity on skeletal acquisition in female C57BL/6J vs. FVB/NJ Mice. *Bone Rep.* 2018 Jun 1;8:204.
 62. Ionova-Martin SS, Wade JM, Tang S, Shahnazari M, Ager JW, Lane NE, et al. Changes in cortical bone response to high-fat diet from adolescence to adulthood in mice. *Osteoporosis International.* 2011 Aug;22(8):2283–93.
 63. 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.
 64. Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 1;20(7).
 65. Li Y. Association between obesity and bone mineral density in middle-aged adults. *J Orthop Surg Res.* 2022 Dec 1, 17(1):268.
 66. Wu X, Zhang Y, Xing Y, Zhao B, Zhou C, Wen Y, et al. High-fat and high-glucose microenvironment decreases Runx2 and TAZ expression and inhibits bone regeneration in the mouse. *J Orthop Surg Res.* 2019 Feb 18;14(1).

67. Xue P, Wu X, Zhou L, Ma H, Wang Y, Liu Y, et al. IGF1 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow by increasing TAZ expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;433(2):226–31.
68. 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. *Front Immunol*. 2023;14.
69. Clayton DJ, Varley I, Papageorgiou M. Intermittent fasting and bone health: a bone of contention? *British Journal of Nutrition*. 2023 Nov 14;130(9):1487–99.
70. Alrowaili MG, Hussein AM, Eid EA, Serria MS, Abdellatif H, Sakr HF. Effect of Intermittent Fasting on Glucose Homeostasis and Bone Remodeling in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Rat Model. *J Bone Metab [Internet]*. 2021 Nov 1;28(4):307.
71. Rinonapoli G, Pace V, Ruggiero C, Ceccarini P, Bisaccia M, Meccariello L, et al. Obesity and Bone: A Complex Relationship. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2021 Dec 1;22(24):22.
72. van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging*. 2015 Apr 23;7(4):256–68.
73. Poret JM, Souza-Smith F, Marcell SJ, Gaudet DA, Tzeng TH, Braymer HD, et al. High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Int J Obes*. 2018 Mar 20;42(3):535–41.
74. Mattson, M. P. et al. Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 19, n. 2, p. 81–94, 2018.
75. Ding H, Zheng S, Garcia-Ruiz D, Hou D, Wei Z, Liao Z, et al. Fasting induces a subcutaneous-to-visceral fat switch mediated by microRNA-149-3p and suppression of PRDM16. *Nat Commun*. 2016 May 31;7.
76. Tang HN, Tang CY, Man XF, Tan SW, Guo Y, Tang J, et al. Plasticity of adipose tissue in response to fasting and refeeding in male mice. *Nutr Metab (Lond)*. 2017 Jan 5.
77. Lacerda DR, Costa KA, Silveira ALM, Rodrigues DF, Silva AN, Sabino JL, et al. Role of adipose tissue inflammation in fat pad loss induced by fasting in lean and mildly obese mice. *J Nutr Biochem*. 2019 Oct 1;72.
78. Lacerda DR, Soares DD, Costa KA, Nunes-Silva A, Rodrigues DF, Sabino JL, et al. Mechanisms underlying fat pad remodeling induced by fasting: role of PAF receptor. *Nutrition*. 2020 Mar 1.

79. Hotamisligil, G.; Shargill, N.; Spiegelman B. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* (1979). 1993;259(5091):87–91.
80. Engin A. The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:221–45.
81. Avtanski D, Pavlov VA, Tracey KJ, Poretsky L. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Animal Model Exp Med.* 2019 Dec 25;2(4):252–8.