

CURSO DE NUTRIÇÃO E METABOLISMO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MARCIO KOITI SAITO

Efeitos da dieta de cafeteria no tecido ósseo de ratos em crescimento

Ribeirão Preto

2020

MARCIO KOITI SAITO

Efeitos da dieta de cafeteria no tecido ósseo de ratos em crescimento

Trabalho apresentado à disciplina de RNM4509 – Trabalho de Conclusão de Curso, para graduação no Curso de Nutrição e Metabolismo da FMRP/USP.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano. Professor Associado do Departamento de Ortopedia e Anestesiologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Coorientadora: Dra. Jéssica Suzuki Yamanaka.

Ribeirão Preto

2020

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano, que me recebeu de portas abertas no laboratório e concedeu a oportunidade de integrar ao seu grupo de pesquisa, pela amizade dentro e fora da faculdade, por todos os incentivos, conselhos e valores ensinados.

À coorientadora Dra. Jéssica Suzuki Yamanaka, que me ajudou desde o início na minha caminhada no meio científico, que foi minha companheira em todos os momentos, pela colaboração, pelas idas ao bandeirão e pela paciência de me ensinar todos os procedimentos e resultados.

À Dra. Ana Paula Macedo, pelo profissionalismo e ajuda em diversas etapas da pesquisa.

À amiga e companheira de laboratório Beatriz Kawano de Oliveira, pela colaboração, pela parceria no projeto de pesquisa e por me acompanhar em todos os congressos.

Aos meus colegas da pós-graduação Ana Clara de Oliveira, Aline de Azevedo, Bruna Leonel Carlos e Marcela Britto de Paiva, por ter tornado o convívio no laboratório mais divertido.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Francisco Carlos Mazzocato, Maria Teresinha de Moraes e Ismar Ribeiro por toda colaboração e pelo convívio agradável.

Aos meus amigos que a faculdade forneceu, aqueles que estão comigo desde o início da minha jornada em uma cidade nova e os que foram entrando depois na minha vida, pela amizade construída e por todos os momentos juntos.

Aos meus pais Elisa Saito e Kozo Saito, por me apoiarem mesmo de longe e sempre me ajudarem nas dificuldades.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2017/09348-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Às pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico.

RESUMO

SAITO, Marcio Koiti. **Efeitos da dieta de cafeteria no tecido ósseo de ratos em crescimento**. 2020. 32p. Trabalho de Conclusão de Curso (Nutrição e Metabolismo) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2020.

A obesidade é um problema de saúde pública que aumenta no decorrer dos anos, principalmente pelo consumo excessivo de alimentos hipercalóricos, típicos do padrão alimentar ocidental. O acúmulo excessivo de tecido adiposo pode causar diversas comorbidades associadas, por exemplo a resistência à insulina, diabetes mellitus tipo II e dislipidemias que prejudicam a qualidade de vida da população. A relação entre o tecido adiposo e ósseo ainda é controversa na literatura, especialmente entre as crianças. Uma nutrição adequada na infância é importante para o acúmulo da massa óssea, prevenindo futuramente fraturas decorrentes de doenças ósseas, como a osteoporose. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da dieta de cafeteria na qualidade óssea de ratos em crescimento. Para tanto, foram utilizados 18 ratos machos da linhagem *Wistar*, distribuídos em dois grupos (n=9), sendo: animais alimentados com dieta de cafeteria (DC) e animais alimentados com dieta padrão (CONT). Foram avaliados semanalmente o peso e o consumo de ração dos animais individualmente. Dois dias precedentes à eutanásia foi realizado o teste de tolerância à insulina em todos os animais. Após 10 semanas experimentais os animais foram submetidos à eutanásia. O tecido ósseo foi avaliado pela densitometria óssea, ensaio mecânico e microtomografia computadorizada (micro-CT). Foram analisadas também o índice de Lee, colesterol total e peso do tecido adiposo branco. Como resultado, a dieta de cafeteria não alterou o peso dos animais e tiveram um índice de Lee semelhante ao grupo controle, porém aumentou a quantidade do tecido adiposo e os níveis de colesterol total. Além disso, essa dieta diminuiu a sensibilidade à insulina, densidade mineral óssea (DMO), rigidez relativa e espessura trabecular. Com isso, foi possível concluir que a dieta de cafeteria apesar de não ter alterado o peso, foi capaz de provocar alterações no perfil glicídico e lipídico e na saúde óssea, prejudicando a microarquitetura e rigidez do osso.

Palavras-chave: dieta hipercalórica; obesidade; osso; osteoporose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Tecido ósseo.....	6
1.2. Dieta de cafeteria	7
1.3. Tecido adiposo e osso.....	7
1.4. Propriedades ósseas.....	8
1.4.1. Densitometria óssea.....	8
1.4.2. Análise mecânica.....	8
1.4.3. Microtomografia computadorizada (micro-CT).....	8
2. OBJETIVO.....	8
2.1. Objetivo geral.....	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1. Ética experimental.....	9
3.2. Animais experimentais	9
3.3. Grupos experimentais	9
3.4. Dietas.....	10
3.5. Controle do peso corporal.....	11
3.6. Teste de tolerância à insulina (TTI).....	11
3.7. Eutanásia e coleta do material.....	12
3.8. Dosagem de colesterol total.....	12
3.9. Tecido adiposo.....	12
3.10. Densitometria óssea	12
3.11. Ensaio mecânico.....	13
3.12. Micro-CT	13
3.13. Análise estatística.....	14
4. RESULTADOS	15

4.1.	Peso corporal.....	15
4.2.	Índice de lee.....	16
4.3.	Consumo de ração	16
4.3.1.	Consumo de ração em gramas	16
4.3.2.	Consumo de ração em kilocalorias (kcal).....	16
4.4.	Teste de tolerância à insulina	17
4.5.	Colesterol total	18
4.6.	Tecido adiposo.....	18
4.7.	Densitometria óssea	19
4.8.	Ensaio mecânico.....	20
4.9.	Micro-CT	20
5.	DISCUSSÃO	22
6.	CONCLUSÕES.....	27
	REFERÊNCIAS.....	28
	ANEXOS.....	32

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, vivemos em uma sociedade moderna, na qual as pessoas dão preferência às comidas industrializadas e aos *fast-food*, devido a praticidade destes alimentos. Esse tipo de hábito alimentar ocidental, com característica hipercalórica pode causar um desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético, e desencadear a obesidade (SEAMAN, 2013).

A obesidade é considerada uma epidemia mundial de caráter multifatorial, influenciada por fatores genéticos, ambientais, comportamentais e o estilo de vida (BARLOW, 2007). Essa doença é um sério problema de saúde pública (MONTEIRO et al., 2004), pois geralmente é associada com várias comorbidades, como a diabetes *mellitus* tipo II (DM2) e dislipidemias (NATHAN; MORAN, 2008).

Ao longo dos últimos 30 anos, a prevalência de sobrepeso e obesidade infantil dobrou ou triplicou nos países em baixa, média e alta renda (LOBSTEIN et al., 2015). De acordo com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Grupo Banco Mundial, estimativas realizadas para 2019, sugeriam a existência de cerca de 38,3 milhões de crianças abaixo de 5 anos com sobrepeso ou obesidade. É uma tendência a crescer, principalmente pelo aumento do consumo de alimentos hipercalóricos e práticas sedentárias, comprometendo o crescimento saudável durante a infância e tornando-se obesos adultos.

A obesidade infantil está associada ao risco aumentado de fraturas, devido a maior propensão a quedas, a uma alimentação desequilibrada e ao estilo de vida sedentária (DIMITRI, 2018). O consumo alimentar hipercalórico durante a infância e adolescência, pode prejudicar a aquisição de massa óssea e a estrutura do osso, sendo nesta fase constantemente remodelada em conteúdo mineral e tamanho, com o objetivo de suprir as demandas mecânicas (CRABTREE et al., 2004). Desta forma, uma alimentação adequada na infância pode proteger de doenças crônicas não transmissíveis, bem como de doenças osteometabólicas em idades mais avançadas.

1.1. Tecido ósseo

O osso é um tecido dinâmico, que tem como função a proteção, locomoção e suporte, além de ser um reservatório de cálcio, promovendo a homeostase mineral (ELIAZ; METOKI, 2017; RALSTON, 2005). O tecido ósseo tem constante atividade durante a infância com crescimento longitudinal do osso, período pelo qual ele cresce. Na fase adulta há o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, enquanto na velhice há

um predomínio da reabsorção óssea, sendo que em mulheres na pós-menopausa a perda óssea é acentuada devido à redução dos níveis de estrogênio (AIRES, 2012).

A homeostase óssea depende do equilíbrio entre a formação, promovida pelos osteoblastos, e a reabsorção, pelos osteoclastos. São controladas por fatores locais e fatores sistêmicos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

O osso é um tecido metabolicamente ativo, portanto é sensível a mudanças nutricionais, metabólicas e hormonais (BRANDÃO; VIEIRA, 1999). Por isso as alterações internas e externas ao indivíduo podem afetar tanto a aquisição da massa óssea, quanto o equilíbrio da homeostase óssea, ou ainda acelerar o processo de perda óssea natural, levando a doenças osteometabólicas e aumentando o risco de fraturas osteoporóticas.

1.2. Dieta de cafeteria

Modelos experimentais em animais são uma alternativa importante no estudo de diversas condições clínicas e seus efeitos sobre órgãos e tecidos. Neste sentido, a dieta de cafeteria é um modelo de indução a obesidade composta por alimentos de alta densidade energética e altamente palatáveis, podendo ser utilizados ingredientes como refrigerante, chocolate, biscoito, leite condensado, entre outros produtos ultraprocessados (SHAFAT; MURRAY; RUMSEY, 2009). Este tipo de dieta, diferentemente da dieta hiperlipídica, assemelha-se mais à gênese da obesidade e síndrome metabólica, pois em sua composição contém carboidratos simples e gordura saturada, provenientes dos alimentos industrializados que a população consome, típicos do padrão alimentar ocidental (BUYUKDERE; GULEC; AKYOL, 2019; SAMPEY et al., 2011).

1.3. Tecido adiposo e osso

A relação entre tecido adiposo e osso ainda é pouco esclarecida e contraditória. A obesidade foi considerada, por muito tempo, como protetora óssea, devido a sua correlação entre o peso corporal e a densidade mineral óssea (DMO), por meio do aumento da sobrecarga mecânica estática (PAULA; ROSEN, 2010). Todavia, dados mais recentes mostram que essa correlação positiva é inexistente e pode ainda representar uma correlação negativa (BARTELT et al., 2010; ZHAO et al., 2007).

A idade e a maturação esquelética e hormonal são fatores que influenciam diretamente no metabolismo ósseo, por isso os relatos na literatura envolvendo dietas hiperlipídicas ou dietas hipercalóricas são conflitantes. O processo de aquisição e

manutenção óssea se difere nos diferentes estágios da vida, por isso a importância de se investigar o efeito do consumo hipercalórico durante a infância e adolescência, período crítico para a qualidade óssea, com repercussões nas idades mais avançadas.

1.4. Propriedades ósseas

O processo de perda óssea é assintomático e pode ser influenciado pelo conteúdo e metabolismo ósseo, sendo necessárias medições para detectar possíveis alterações. Conhecer e avaliar as propriedades ósseas é de suma importância pois permite prevenir e diagnosticar a perda óssea, bem como falhas no processo de remodelação óssea.

1.4.1. Densitometria óssea

A densitometria óssea é considerada um método eficaz para medir o conteúdo mineral ósseo através da absorvometria de dupla emissão de raios-x (WHO, 2003).

1.4.2. Análise mecânica

A resistência dos ossos pode ser avaliada pelas suas propriedades mecânicas. Os ensaios mecânicos são análises que permitem avaliar o comportamento mecânico dos materiais frente a determinado carregamento (RODRIGUES, 2003; SHIMANO, VOLPON, 2009).

1.4.3. Microtomografia computadorizada (micro-CT)

As imagens tridimensionais (3D) têm sido utilizadas com o objetivo de melhor entendimento sobre a microarquitetura óssea. Nos laboratórios de pesquisa o uso da micro-CT é considerado padrão ouro para análises da microarquitetura óssea, pois os parâmetros geométricos do osso podem ser detectados com precisão e são obtidas informações detalhadas sobre o osso trabecular (PARTICELLI, 2012).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da dieta de cafeteria na qualidade óssea de ratos em crescimento, por meio da densidade mineral óssea, resistência mecânica e microarquitetura trabecular.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da dieta de cafeteria na resistência à insulina.

- Avaliar os efeitos da dieta de cafeteria sobre os níveis séricos de colesterol total.
- Avaliar os efeitos da dieta de cafeteria na quantidade de tecido adiposo branco.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Ética experimental

Este trabalho seguiu as normas descritas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal, do Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e do *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Este Projeto de Pesquisa foi aprovado para sua realização pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (FMRP/USP) protocolado com o número 061/2017 (ANEXO A).

3.2. Animais experimentais

Foram utilizados 18 ratos machos da linhagem *Wistar*, com massa corporal entre 60 e 65 gramas. Os animais foram adquiridos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da USP com 21 dias de desmame, sendo alojados durante 14 dias no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP como forma de adaptação ao biotério, e aos 35 dias de vida dos animais o experimento foi iniciado. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e permaneceram em ambiente com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de 55 – 60% e ciclo 12 h claro/escuro. A alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*.

3.3. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em 2 grupos (n=9). O quadro 1 apresenta a divisão dos grupos experimentais.

Quadro 1: Grupos experimentais.

Grupos	Sigla	Procedimentos
Dieta de cafeteria	DC	Animais livres na caixa e alimentados com dieta de cafeteria durante dez semanas
Controle	CONT	Animais livres na caixa alimentados com ração padrão durante dez semanas

3.4. Dietas

O cálculo estimado para o consumo diário foi realizado, sendo que a ração oferecida foi sempre superior ao consumo estimado para que os animais não tivessem restrição alimentar. A quantidade restante era pesada em uma balança da marca Marte®, modelo AC-2000 da FMRP/USP, e subtraída da quantidade fornecida de modo que houve o controle da quantidade de ração consumida semanalmente pelos animais.

A ração padrão utilizada foi a Nuvilab® CR-1 autoclavável (Nitrival Nutrientes, Guarani, Brazil), fornecida pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto.

Para obtenção da dieta de cafeteria, a ração padrão de biotério foi triturada, e posteriormente adicionados chocolate ao leite, amendoim torrado com sal e bolacha maisena à sua composição (ESTADELLA et al., 2004). As proporções para produção da dieta de cafeteria foram 3:2:2:1 respectivamente. Para confecção dos peletes, foi adicionada água morna à mistura dos ingredientes, somente o necessário para formar uma massa, e depois foi modelada em forma de cilindros e reservados em recipientes na estufa de aquecimento a 60°C até ficarem secos (Figura 1). A ração para dieta de cafeteria foi manipulada no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. A dieta foi administrada durante 10 semanas no grupo Dieta de Cafeteria (DC). A tabela 1 mostra a composição nutricional dos alimentos utilizados para a confecção da dieta de cafeteria e a tabela 2 mostra a diferença da composição centesimal entre as duas dietas.

Tabela 1: Composição nutricional dos alimentos utilizados na confecção da dieta de cafeteria.

	Energia Kcal/100g	Carboidratos g/100g	Proteína g/100g	Lipídios totais g/100g	Fibra g/100g	Sódio mg/100g
Chocolate fracionado ao leite (Harald)	544,4	64	2,8	30,8	2,4	31,2
Amendoim c/ sal (Vó Délia Amendoim)	630,0	20	25,0	50	7,8	370,0
Biscoito Maisena (Elbi's)	390,1	70	6,6	9,3	3,3	300,0

Fonte: Dados obtidos através das embalagens dos alimentos.

Tabela 2: Composição centesimal da dieta padrão do biotério e dieta de cafeteria.

	Energia Kcal/100g	Carboidrato g/100g	Proteína g/100g	Lipídios totais g/100g	Fibra g/100g	Sódio mg/100g
Dieta padrão	308	46 (60%)	22 (28%)	4 (12%)	7	270
Dieta de cafeteria	508	52 (41%)	18 (14%)	25 (45%)	6	265

Fonte: Dados da dieta padrão e dieta de cafeteria obtidos pela embalagem.

Figura 1: Etapas do processo de confecção dos peletes da dieta de cafeteria.



A) Proporção dos alimentos triturados 3:2:2:1 (ração padrão, amendoim, chocolate e biscoito maisena). B) Mistura dos alimentos triturados. C) Adição de água morna para formar uma massa. D) Moldar a massa em forma de peletes e deixar secar.

Fonte: arquivo próprio.

3.5. Controle do peso corporal

A mensuração do peso dos animais foi realizada uma vez por semana. A pesagem foi realizada individualmente, com os animais acomodados em uma caixa plástica e pesados em uma balança técnica (C&F Modelo P15, Ribeirão Preto, Brasil) com capacidade de até 1500g e divisão de 5g, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP.

3.6. Teste de tolerância à insulina (TTI)

O Teste de Tolerância à Insulina foi realizado em todos os animais dois dias antes da eutanásia. Para tanto, utilizou-se uma dose de 1U de insulina humana/kg de peso do animal, administrada via intraperitoneal.

As medidas de glicemia foram feitas no tempo basal, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a injeção da insulina. A coleta do sangue foi feita através de uma picada na

região distal da cauda, dosando-o imediatamente após as coletas, utilizando um aparelho de glicosimetria (Optium mini Abbott®).

A partir dos resultados foi criada uma curva glicêmica pelo tempo. A área abaixo da curva foi comparada em relação à variável.

3.7. Eutanásia e coleta do material

Após o período de 10 semanas experimentais, todos os animais foram mortos com uma dose excessiva de anestésico xilazina (30 mg/kg) e ketamina (150 mg/kg) via intramuscular. Imediatamente após a morte, foi coletado de 6 a 8ml de sangue por meio da punção cardíaca, e logo em seguida foi centrifugada para coletar a porção sérica. Em seguida, foram retirados o tecido adiposo branco (retroperitoneal) e pesadas imediatamente, a tíbia direita e o fêmur esquerdo, sendo dissecadas e limpas das partes moles e armazenadas em freezer a -20° C.

Para a obtenção do Índice de Lee dos animais, foram medidos o comprimento naso-anal e o peso total dos animais antes da eutanásia. O Índice de Lee dos animais foi calculado utilizando a fórmula $IL = (\text{peso total})^{1/3} / (\text{comprimento naso-anal})$, sendo o peso em gramas e o comprimento em centímetros (BERNARDIS, 1970).

3.8. Dosagem de colesterol total

O sangue coletado foi colocado em tubos sem a presença de anticoagulante e, posteriormente, foi centrifugado à 4°C, 2800 rpm durante 15 minutos para obtenção de sua porção sérica. As amostras de soro foram armazenadas individualmente e identificadas em microtubos do tipo eppendorf® no freezer a -70°C, até o momento da análise. As dosagens bioquímicas de colesterol total foram analisadas utilizando kits bioquímicos colorimétricos específicos (Labtest®).

3.9. Tecido adiposo

O tecido adiposo branco (retroperitoneal) foi pesado na balança de precisão da marca Marte®, modelo AC-2000, com precisão de 0,01g, para verificar alterações no peso da gordura provocadas pela dieta de cafeteria.

3.10. Densitometria óssea

A densidade mineral óssea (DMO) das tíbias direitas (n=9) foi obtida através do densitômetro *Dual-energy X-ray absorptiometry* (DEXA), modelo DPX-IQ, Lunar® com *software* adaptado para pequenos animais, com alta resolução, pertencente ao Laboratório

de Bioengenharia da FMRP/USP. Para as análises, os ossos foram descongelados com 24 horas de antecedência. Após os ossos serem submersos em um recipiente plástico contendo soro fisiológico a 2 cm de profundidade, as tíbias foram alinhadas, em seguida escaneadas, e as imagens capturadas e analisadas. A região analisada foi a região proximal das tíbias, logo abaixo da placa de crescimento.

3.11. Ensaio mecânico

Após a realização da densitometria óssea, as tíbias (n=9) foram submetidas ao ensaio de flexão de três pontos, utilizando a Máquina Universal de Ensaio (EMIC® – DL10000) do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Foi utilizado uma célula de carga com capacidade de 500 N, uma pré-carga de 5N e um tempo de acomodação de 30 segundos. A velocidade de aplicação da força foi de 1mm/min e no sentido pósterio-anterior da tíbia. As propriedades mecânicas analisadas foram força máxima (N) e rigidez relativa (N/mm).

3.12. Micro-CT

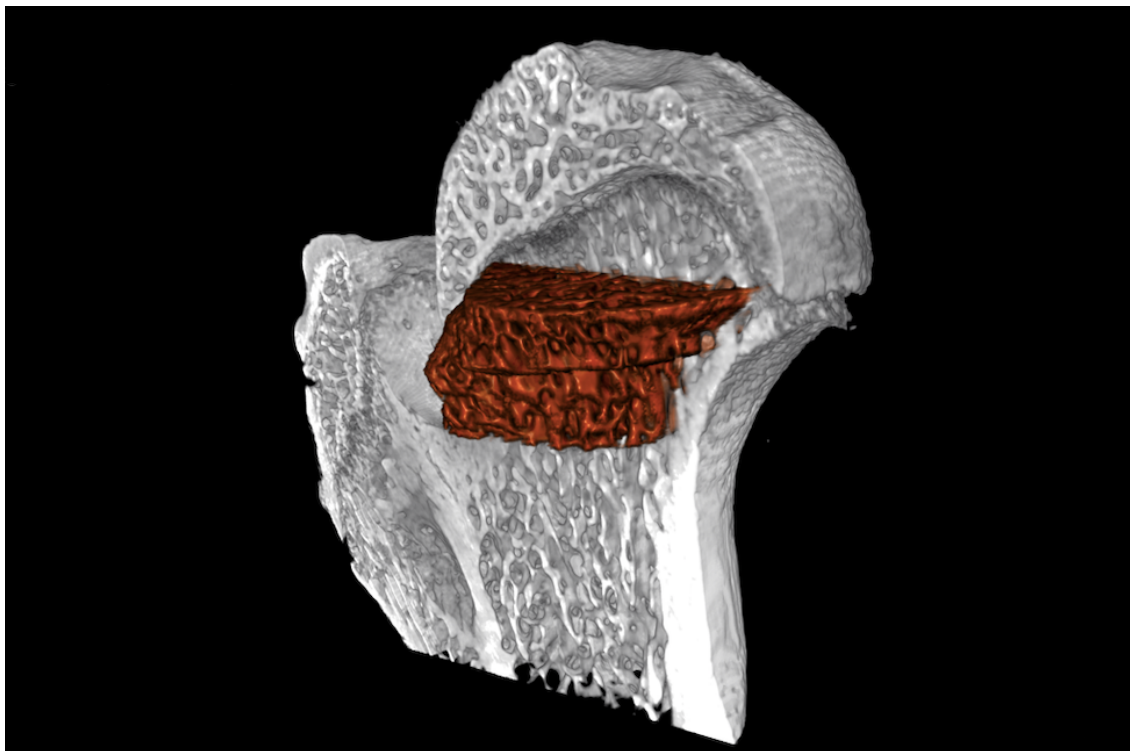
Os fêmures esquerdos (n=6) foram inicialmente armazenados em freezer -20°C e posteriormente, submetidos a 24 horas em solução de formol 10%, e então inseridos em álcool 70% para serem transportados em caixas térmicas.

A análise microtomográfica foi realizada no Laboratório de Instrumentação Nuclear, LIN, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Um sistema micro-CT de alta resolução (Vtomex M, General Electric-GE) foi utilizado para quantificar os parâmetros tridimensionais (3D) do fêmur esquerdo. Os ossos foram escaneados a 65 kVp e 318 µA, usando um filtro de alumínio de 1 mm, para otimizar o contraste, e um voxel cúbico de 18 µm³. As reconstruções de imagens 3D foram feitas usando o software NRecon® (versão 1.6.9.8, BrukerTM, Kontich, Bélgica), que forneceu secções transversais axiais das estruturas internas das amostras. A região de interesse delineada foi na metáfise proximal do fêmur, que contém principalmente osso trabecular (Figura 2).

A reconstrução da metáfise foi selecionada manualmente, começando 1,0mm após a placa de crescimento proximal por uma extensão de 1,5mm. Os ossos trabeculares foram isolados, por meio de segmentação manual. O software CTAn® (versão 1.13.11.0, BrukerTM, Kontich, Bélgica) foi utilizado para determinar o nível de limiar ideal de binarização dos histogramas da imagem. O mesmo nível limiar foi utilizado em todas as amostras para os ossos trabeculares.

A microarquitetura trabecular da metáfise proximal foi caracterizada pela determinação da fração do volume ósseo (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação trabecular (Tb.Sp). A nomenclatura seguiu as recomendações da American Society of Bone and Mineral Research (BOUXSEIN et al., 2010). O software CTVol® (versão 2.2.3.0, BrukerTM, Kontich, Bélgica) foi utilizado para a aquisição de imagens para visualização 3D.

Figura 2: Imagem 3D da região de interesse marcada em vermelho (1,5 cm) na cabeça femoral.



Fonte: arquivo próprio.

3.13. Análise estatística

Os resultados foram descritos como média \pm desvio padrão.

Os dados foram testados quanto à normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. Se a distribuição fosse normal utilizou-se o teste *T Student*. Se a distribuição não fosse normal utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS® (IBM® Statistics) versão 20.0, e foi adotado um nível de significância de 5%.

Para formatação dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism5®.

4. RESULTADOS

4.1. Peso corporal

A partir do peso corporal de cada animal, fez-se a avaliação da média do peso corporal dos grupos a cada semana (Figura 3).

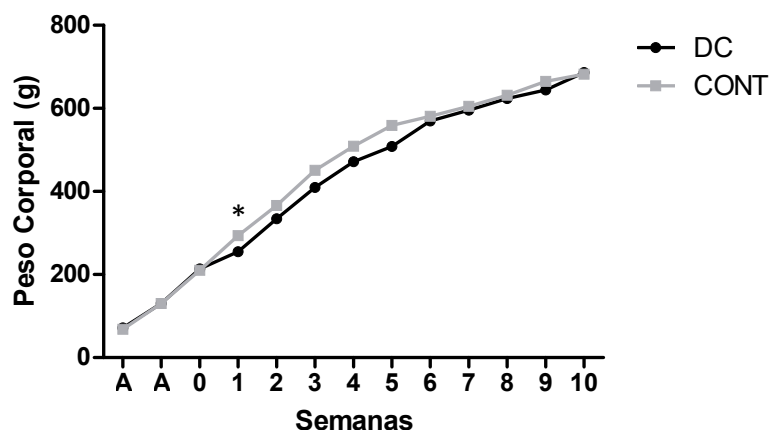
Os dados apresentaram distribuição normal no início do experimento ($p=0,103$), 1ª semana ($p=0,406$) e 2ª semana ($p=0,051$). Os dados não apresentaram distribuição normal a partir da 3ª semana ($p=0,001$), 4ª semana ($p<0,001$), 5ª semana ($p<0,001$), 6ª semana ($p=0,001$), 7ª semana ($p=0,003$), 8ª semana ($p=0,008$), 9ª semana ($p=0,001$) e 10ª semana ($p=0,001$).

Houve diferença significativa entre os grupos somente na 1ª semana do experimento ($p=0,016$), sendo que os animais do grupo CONT tiveram uma média de peso corporal maior que os animais do grupo DC.

Não houve diferença de peso corporal entre os animais no início do experimento ($p=0,184$). A comparação do peso corporal, dos animais CONT e DC, também não apresentou diferença na 2ª semana ($p=0,149$), 3ª semana ($p=0,122$), 4ª semana ($p=0,353$), 5ª semana ($p=0,170$), 6ª semana ($p=0,453$), 7ª semana ($p=0,401$), 8ª semana ($p=0,426$), 9ª semana ($p=0,658$) e 10ª semana ($p=0,965$) de experimento.

A média de peso, ao final do experimento, do grupo DC foi de $(686,11 \pm 153,08)$ g e do grupo CONT $(682,22 \pm 32,22)$ g.

Figura 3: Gráfico do peso corporal dos animais a cada semana de experimento.



(A= período de adaptação; 0= início do período experimental) (* $p<0,05$)

Fonte: autoria própria.

4.2. Índice de lee

A média dos valores estão na tabela 3. Os dados apresentaram distribuição normal ($p=0,932$) e pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,889$), ou seja, os animais apresentaram um peso e comprimento semelhantes.

Tabela 3: Índice de lee dos grupos experimentais.

	DC	CONT	p
Índice de Lee	$0,390 \pm 0,02$	$0,389 \pm 0,02$	0,889

Fonte: dados da pesquisa.

4.3. Consumo de ração

4.3.1. Consumo de ração em gramas

O consumo de ração em gramas entre os grupos experimentais está representada na figura 4A.

Os dados não apresentaram distribuição normal na 1ª semana ($p=0,006$), 2ª semana ($p=0,036$), 3ª semana ($p=0,034$), 4ª semana ($p=0,034$), 5ª semana ($p=0,046$), 6ª semana ($p=0,001$) e 7ª semana ($p=0,003$). Os dados apresentaram distribuição normal na 8ª semana ($p=0,091$), 9ª semana ($p=0,088$) e 10ª semana ($p=0,187$).

Houve diferença significativa para o consumo de ração em gramas durante todo o experimento, 1ª semana ($p=0,012$), 2ª semana ($p=0,007$), 3ª semana ($p=0,001$), 4ª semana ($p=0,024$), 5ª semana ($p=0,003$), 6ª semana ($p<0,001$) e 7ª semana ($p<0,001$), 8ª semana ($p<0,001$), 9ª semana ($p<0,001$) e 10ª semana ($p<0,001$), sendo que os animais do grupo CONT consumiram uma quantidade maior de ração em gramas durante todo o experimento em comparação com os animais do grupo DC.

4.3.2. Consumo de ração em kilocalorias (kcal)

O consumo de ração em kcal entre os grupos experimentais está representada na figura 4B.

Os dados não apresentaram distribuição normal na 1ª semana ($p=0,004$), 6ª semana ($p=0,033$), 9ª semana ($p=0,005$) e 10ª semana ($p=0,038$). Os dados apresentaram distribuição normal na 2ª semana ($p=0,139$), 3ª semana ($p=0,603$), 4ª semana ($p=0,203$), 5ª semana ($p=0,203$), 7ª semana ($p=0,190$) e 8ª semana ($p=0,116$).

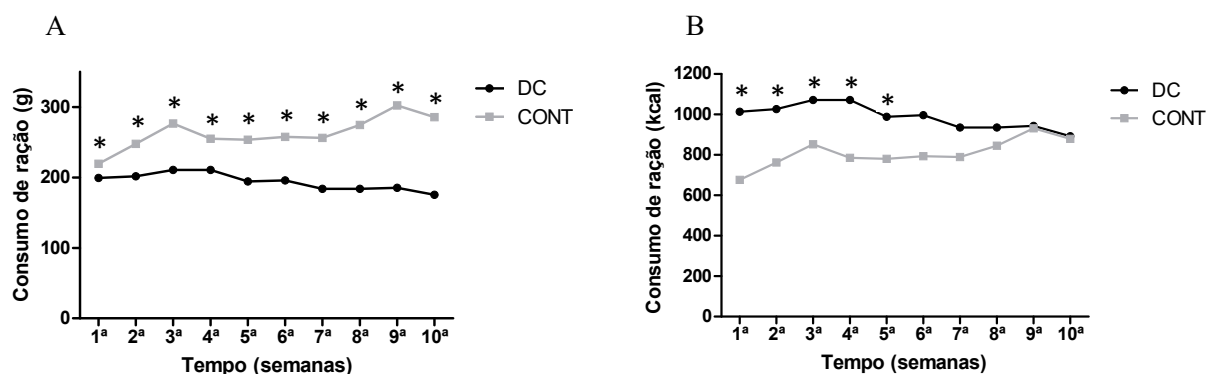
Houve diferença significativa para o consumo de ração em kcal na 1ª semana ($p=0,001$), 2ª semana ($p=0,004$), 3ª semana ($p=0,027$), 4ª semana ($p=0,009$) e 5ª semana

($p=0,041$), sendo que os animais do grupo DC consumiram uma quantidade maior de calorias quando comparado com os animais do grupo CONT.

Não houve diferença significativa a partir da 6ª semana ($p=0,070$), 7ª semana ($p=0,129$), 8ª semana ($p=0,331$), 9ª semana ($p=0,122$) e 10ª semana ($p=0,270$).

O quadro 2 apresenta o consumo total de ração entre os grupos em gramas e kcal.

Figura 4: Gráficos do consumo de ração dos animais a cada semana de experimento.



A) Consumo de ração em gramas. B) Consumo de ração em quilocalorias. (* $p<0,05$)

Fonte: autoria própria.

Quadro 2: Consumo total de ração em gramas e kcal dos grupos experimentais.

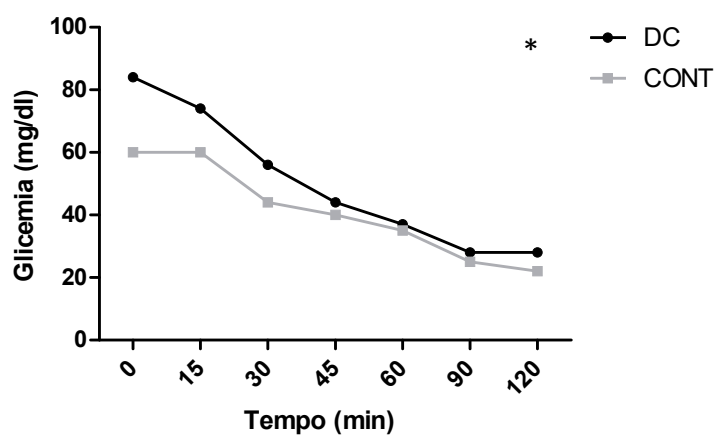
	DC	CONT
Consumo total (g)	17.472,47	24.502,25
Consumo total (kcal)	88.864,98	75.466,93

Gramas (g); quilocalorias (kcal).

4.4. Teste de tolerância à insulina

Na avaliação do teste de tolerância à insulina foi possível observar que o mais baixo nível ocorreu aos 90 minutos nos grupos DC e aos 120 minutos no grupo CONT (Figura 5). Foram avaliadas as áreas abaixo da curva para comparação entre os grupos. Os dados apresentaram distribuição normal ($p=0,099$) e apresentaram diferença significativa na resposta glicêmica em relação à insulina ($p=0,041$), sendo que os animais do grupo DC tiveram uma maior área abaixo da curva, ou seja, elevado nível glicêmico e sugestivo de menor sensibilidade à insulina, quando comparado com os animais do grupo CONT.

Figura 5: Gráfico da glicemia dos animais em relação ao tempo.



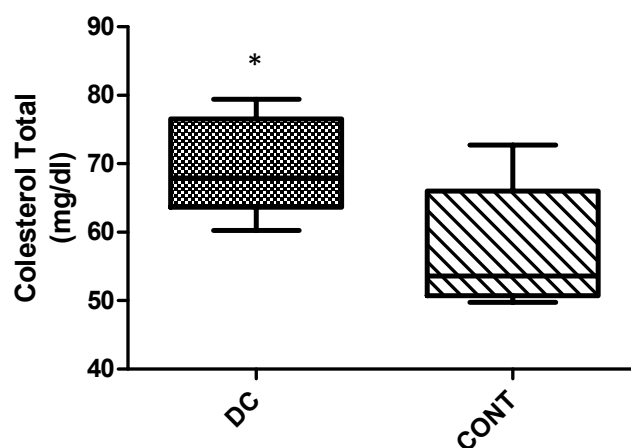
* $p < 0,05$

Fonte: autoria própria.

4.5. Colesterol total

O nível de colesterol total dos grupos está representado na Figura 6. Os dados para colesterol total apresentaram distribuição normal ($p=0,785$). A média do colesterol total do grupo DC foi de $(69,66 \pm 7,23)$ mg/dl e do grupo CONT $(57,41 \pm 9,27)$ mg/dl. Houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,048$).

Figura 6: Gráfico do colesterol total dos grupos experimentais.



* $p < 0,05$

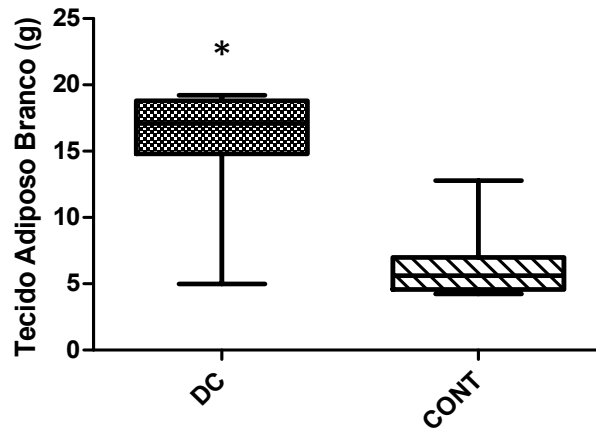
Fonte: autoria própria.

4.6. Tecido adiposo

Os dados do tecido adiposo branco (TAB) estão representados na Figura 7. Os dados apresentaram distribuição normal ($p=0,089$).

A média do TAB do grupo DC foi de $(17,94 \pm 7,73)$ g e do grupo CONT $(8,44 \pm 2,78)$ g. Houve uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,006$).

Figura 7: Gráficos do tecido adiposo dos grupos experimentais.



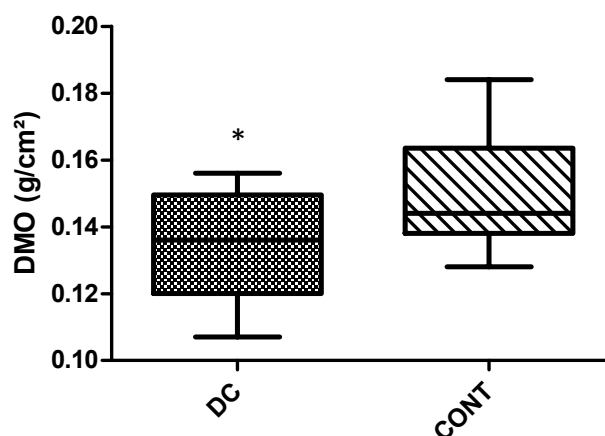
* $p<0,05$

Fonte: autoria própria.

4.7. Densitometria óssea

Com a densitometria foram obtidas a DMO da região proximal (Figura 8). Os dados apresentaram distribuição normal ($p=0,825$). A média da DMO proximal do grupo DC foi de $(0,133 \pm 0,017)$ g/cm² e do grupo CONT $(0,150 \pm 0,017)$ g/cm², apresentando diferença significativa entre os grupos ($p=0,047$).

Figura 8: Gráfico da densidade mineral óssea da região proximal.



* $p<0,05$

Fonte: autoria própria.

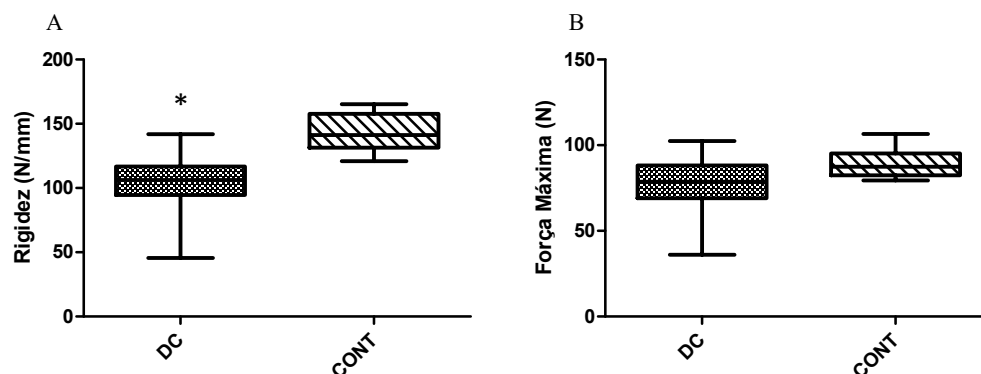
4.8. Ensaio mecânico

Os dados apresentaram distribuição normal para a rigidez ($p=0,860$) e força máxima ($p=0,949$).

A média da rigidez do grupo DC foi de $(102,62 \pm 26,15)$ N/mm e do grupo CONT $(143,59 \pm 14,65)$ N/mm, havendo diferença significativa entre os grupos ($p=0,001$) (Figura 9A).

A média da força máxima do grupo DC foi de $(76,6 \pm 18,60)$ N e do grupo CONT $(89,4 \pm 8,57)$ N. Não houve diferença significativa entre os grupos para os valores de força máxima ($p=0,079$) (Figura 9B).

Figura 9: Gráficos das propriedades mecânicas ósseas dos grupos experimentais.



A) Rigidez relativa. B) Força máxima. (* $p<0,05$)

Fonte: autoria própria.

4.9. Micro-CT

A figura 10 representa as imagens 3D da região de interesse na cabeça femoral, na qual é possível observar qualitativamente que as trabéculas do grupo DC estão mais finas do que o do grupo CONT.

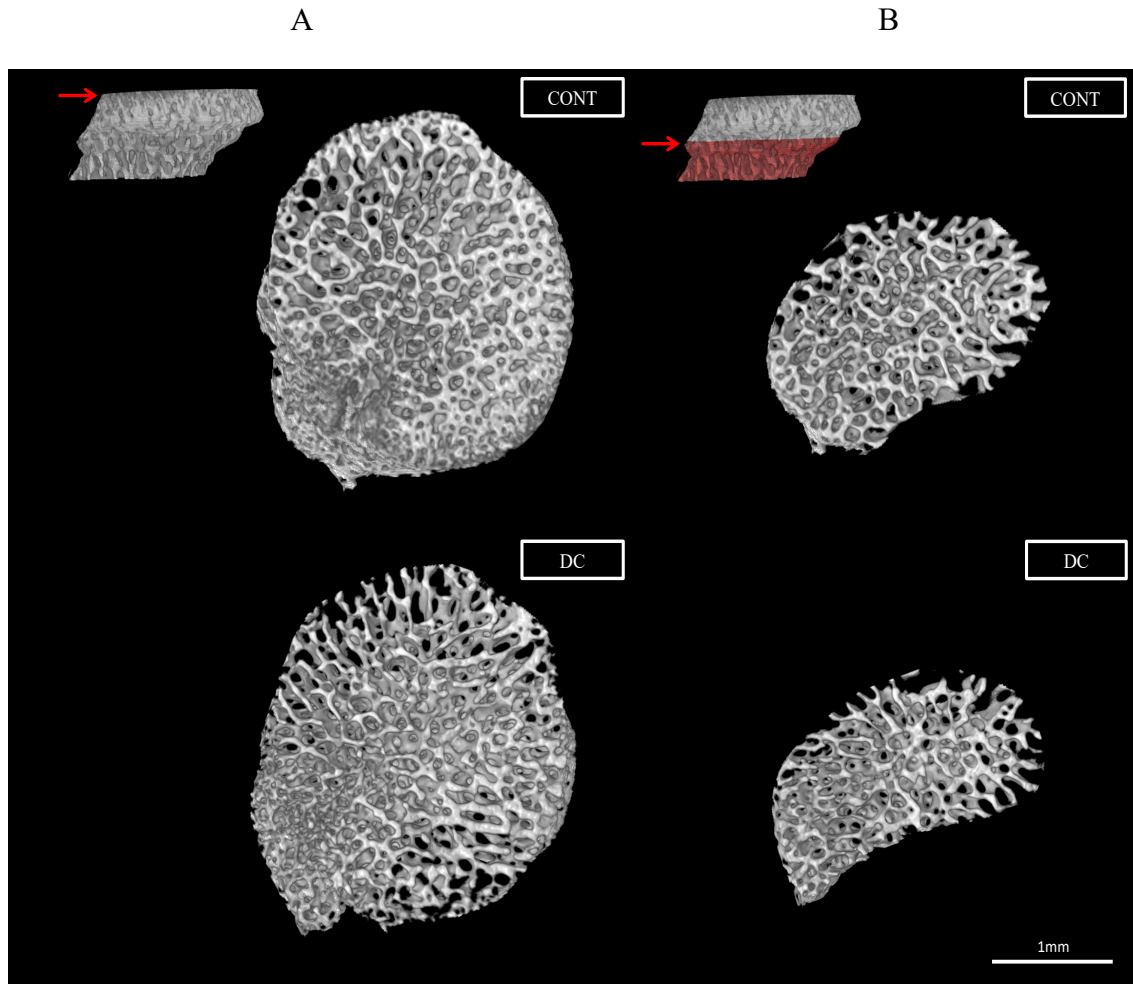
Os dados apresentaram distribuição normal para BV/TV ($p=0,736$), Tb.Th ($p=0,196$), Tb.N ($p=0,491$) e Tb.Sp ($p=0,991$).

As médias do BV/TV, Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp do grupo DC foram, respectivamente: $(17,87 \pm 3,36)$ %, $(0,084 \pm 0,006)$ mm, $(2,09 \pm 0,28)$ 1/mm, $(0,576 \pm 0,087)$ mm.

As médias do BV/TV, Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp do grupo CONT foram, respectivamente: $(17,72 \pm 1,78)$ %, $(0,095 \pm 0,005)$ mm, $(1,86 \pm 0,19)$ 1/mm, $(0,649 \pm 0,063)$ mm.

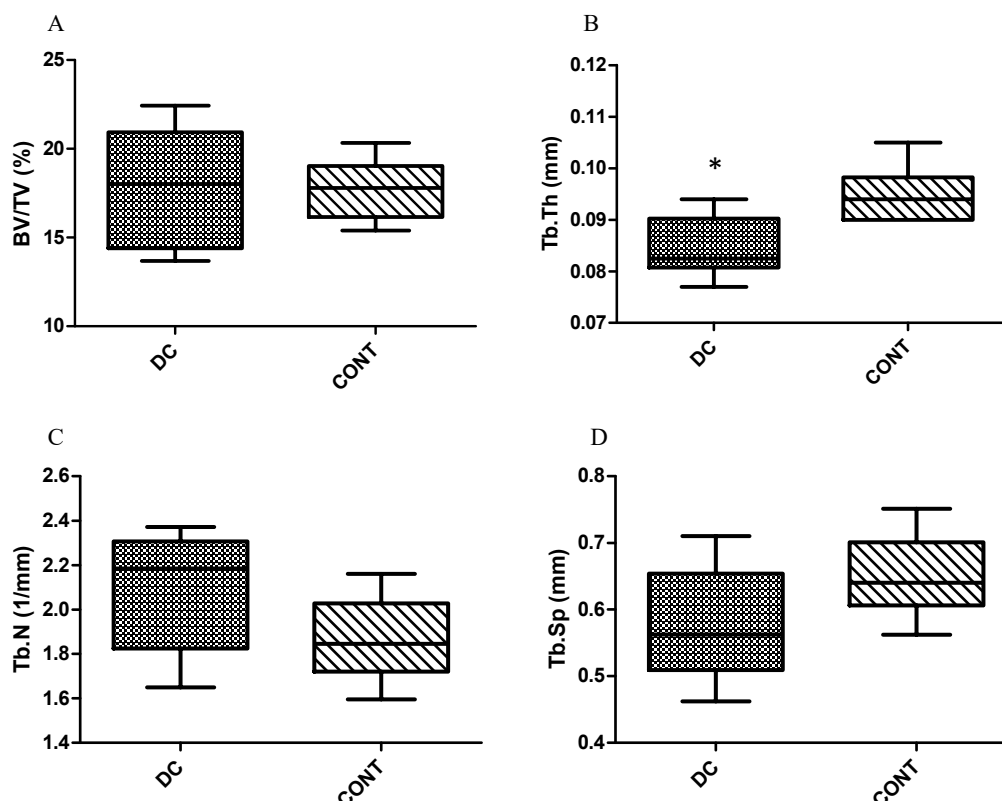
Houve diferença significativa entre os grupos para Tb.Th ($p=0,011$). Os demais parâmetros não houve diferença significativa, BV/TV ($p=0,925$), Tb.N ($p=0,131$) e Tb.Sp ($p=0,126$) (Figura 11).

Figura 10: Cortes transversais da microarquitetura trabecular da região de interesse na cabeça femoral.



A) Corte transversal da cabeça femoral no início da região de interesse. B) Corte transversal da cabeça femoral na metade da região de interesse. As setas vermelhas indicam a posição na região de interesse, das imagens do corte transversal. Analisando a imagem é possível observar que as trabéculas do grupo DC estão mais finas do que as do grupo CONT.

Figura 11: Gráficos dos parâmetros trabeculares analisados pela micro-CT.



A) Fração do volume ósseo pelo volume total (BV/TV). B) Espessura trabecular (Tb.Th). C) Número de trabéculas (Tb.N). D) Separação trabecular (Tb.Sp). (* $p < 0,05$)

Fonte: autoria própria.

5. DISCUSSÃO

O alto consumo de alimentos hipercalóricos ricos em carboidratos simples e gorduras saturadas, predominantes da sociedade ocidental, se deve pelo fato de sua praticidade e palatabilidade, e pode influenciar diversos problemas metabólicos prejudiciais à saúde, por exemplo a obesidade e suas comorbidades. Além disso, uma alimentação desequilibrada nutricionalmente pode afetar negativamente a aquisição de massa óssea máxima durante o crescimento, com repercussões osteometabólicas na fase adulta (WHO, 2003). O tecido adiposo e o osso possuem uma relação complexa. Os adipócitos e osteoblastos compartilham uma mesma célula precursora na medula óssea, e fatores que estimulam a adipogênese podem interferir na diferenciação dos osteoblastos, diminuindo a formação óssea (POLLOCK, 2015; ROSEN; BOUXSEIN, 2006). Portanto, o presente estudo teve como objetivo estudar os efeitos da alimentação hipercalórica, utilizando a dieta de cafeteria, na qualidade óssea de ratos em crescimento.

As dietas com perfil hipercalórico são produtos da utilização de ingredientes com alto teor de gorduras saturadas e carboidratos simples. No presente estudo foram adicionados à ração padrão do biotério, o chocolate ao leite, amendoim torrado com sal e biscoito maisena para a produção da dieta de cafeteria, possuindo 200 kcal a mais que a ração padrão, em 100g. Esse tipo de dieta mostra um bom desempenho em induzir quadros de obesidade e desordens metabólicas, como resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (SAMPEY et al., 2011; HIGA et al., 2014). Além disso, correspondem fielmente ao hábito alimentar de grande parte da população, caracterizada pela abundância na oferta e consumo de alimentos que apresentam esse perfil (BUYUKDERE; GULEC; AKYOL, 2019).

Os estudos experimentais são realizados com o intuito de obter uma avaliação mais específica do comportamento morfológico e mecânico dos materiais biológicos (AERSSSENS, 1998). Portanto o objetivo do estudo em animais é conhecer o impacto de uma variável, neste caso a dieta de cafeteria, no osso. Dessa forma, o estudo com animais, além do aspecto ético permitiu o controle e padronização das amostras para garantir a credibilidade do resultado.

O presente estudo avaliou ratos em crescimento para compreender os primeiros efeitos fisiológicos do consumo de alimentos hipercalóricos sobre o osso. Esse estudo é relevante, considerando a alta epidemia de obesidade infantil, uma vez que as crianças são facilmente atraídas pelos alimentos industrializados, ricos em açúcares e gorduras (DE ONIS; BLOSSNER; BORGHI, 2010). Além disso, o efeito da obesidade no esqueleto, durante o crescimento, ainda não foi totalmente explicado e compreendido. Apesar de ocorrer maiores riscos de fraturas em crianças obesas (STAGI et al., 2013), muitas vezes a DMO está aumentada nesses indivíduos. Uma vez que o consumo de dietas pode afetar a aquisição de massa óssea, o entendimento dessa relação precocemente é necessário, já que a aquisição insuficiente de massa óssea pode refletir em problemas osteometabólicos futuros (MORAIS; BURGOS, 2007).

A mineralização confere ao tecido ósseo dureza, característica essencial para o desempenho das funções estruturais de sustentação e proteção. Além disso é importante para a função metabólica do osso atuar como reservatório de cálcio e fósforo (RALSTON, 2005). A DMO fornece informações sobre a disposição de minerais em dada superfície óssea. O desequilíbrio desse fator causa alterações metabólicas com grande prejuízo estrutural e funcional. Nelson et al. (1998) demonstrou que uma dieta rica em gorduras pode interferir na absorção do cálcio intestinal, diminuindo a sua biodisponibilidade para

a formação óssea. O cálcio é um mineral importante para diversas funções orgânicas, e se o consumo de cálcio diário não é adequado e há uma diminuição da sua concentração na corrente sanguínea, o osso por meio da reabsorção, mobiliza este íon para manter a calcemia, e conseqüentemente diminui a sua DMO (RIGGS; MELTON, 1983). A dieta de cafeteria diminuiu a DMO da região proximal, ou seja, a alimentação hipercalórica foi capaz de interferir na mineralização do osso.

A densitometria óssea é considerada padrão ouro para determinar fragilidade óssea, no entanto não avalia alterações microestruturais e metabólicas (DONNELLY, 2011; JIANG; JIANG; DAI, 2007), sendo este realizado pela análise da microarquitetura trabecular pela micro-CT. As alterações no processo de remodelação óssea são mais perceptíveis no osso trabecular, visto que possui mais superfícies estruturais para a reabsorção e/ou formação. Analisando qualitativamente as imagens 3D da região trabecular, é possível observar que as trabéculas dos animais que receberam a dieta de cafeteria ficaram mais finas. Esta observação é comprovada com os parâmetros avaliados pela micro-CT, no qual os animais alimentados com a dieta de cafeteria apresentaram uma espessura trabecular menor em comparação com os animais alimentados com a dieta padrão, ou seja, as trabéculas ficaram mais finas.

O comportamento mecânico de uma estrutura é determinado pela geometria e pela composição do material. O ensaio mecânico é um dos melhores métodos para caracterizar a resposta mecânica e avaliar o efeito da alimentação na resistência óssea. Para tanto, complementar o estudo morfológico do osso ao ensaio mecânico nos permitiu ter uma visão mais abrangente dos aspectos sobre a qualidade do osso e sua capacidade para resistir a fraturas (SHARIR; BARAK; SHAHAR, 2008).

Ao submeter um material a uma tensão ele tende a sofrer deformação, até a ruptura. A rigidez é a inclinação da curva tensão x deformação e corresponde à capacidade do corpo de prova de sofrer uma deformação sob determinada carga. A carga máxima que a amostra suporta até sua ruptura é chamada de força máxima e representa a resistência do material (SHARIR; BARAK; SHAHAR, 2008). As propriedades mecânicas avaliadas em nosso trabalho foram a força máxima e a rigidez relativa, devido a irregularidade da área da secção transversal do corpo de prova avaliado.

No ensaio mecânico do presente estudo houve diferença significativa no comportamento de acordo com a variável dieta, no qual a rigidez relativa foi menor nos grupos que receberam a alimentação hipercalórica. Isto pode ser explicado pela menor DMO observada nos animais alimentados com a dieta de cafeteria, pois uma correta

mineralização confere rigidez ao osso. Existem evidências na literatura que o consumo de dietas ocidentais, que são ricas em gorduras hiperlipídicas e baixas em cálcio, reduzem a massa óssea e diminuem a resistência biomecânica dos ossos de ratos (IONOVA-MARTIN, 2010; WARD, 2003).

A alimentação hipercalórica é fator predisponente da resistência à insulina, pois há o acúmulo de lipídio no tecido, bem como a hipertrofia do tecido adiposo, e isto pode desencadear resistência à insulina (GUSTAFSON et al., 2015). A insulina está envolvida no metabolismo e, muitas vezes, sua capacidade secretora não é capaz de atender ao aumento da demanda ou há uma falha na sinalização em seus receptores. Portanto, a resistência à insulina é caracterizada pela incapacidade da insulina em otimizar a absorção de glicose (PEREIRA; FRANSISCHI; LANCHI JR, 2003). A queda de glicose após aplicação de insulina se dá pela captação de glicose pelos tecidos sensíveis à insulina e pela inibição da liberação de glicose. Sendo assim, uma maior queda de glicose sugere maior sensibilidade à insulina (GELONEZE; TAMBASCIA, 2006).

No presente estudo o grupo que recebeu a dieta de cafeteria teve uma área abaixo da curva glicêmica maior em comparação com o grupo com a dieta padrão, sendo observado uma diferença estatística significativa, corroborando com os achados de Júnior e Seraphim (2012), em que os animais alimentados com dieta de cafeteria apresentaram uma menor sensibilidade à insulina. A composição da dieta é determinante para o efeito biológico, uma vez que o teor de gordura total, o tipo e quantidade de alimento utilizado e a duração de tempo em que os animais ficam expostos a dieta são fatores que influenciam o metabolismo lipídico bem como a resistência a insulina.

A captação de glicose pelos tecidos é fundamental, e o desequilíbrio deste mecanismo pode causar DM2. Ademais, a resistência à insulina, bem como a diabetes, além de causar problemas renais e cardiovasculares, tem sido descrita como fator prejudicial para a qualidade óssea (PICKE et al., 2019). Segundo estudo de Farr e Khosla (2016), pacientes com DM2, geralmente possuem DMO normal, implicando anormalidades na força e/ou microarquitetura dos ossos. No entanto, em animais a baixa formação óssea também é uma característica da DM2, enquanto o parâmetro da reabsorção óssea está aumentado (HAMANN et al., 2014). No presente estudo, os animais alimentados com a dieta de cafeteria apresentaram uma menor sensibilidade à insulina, contribuindo para a diminuição da DMO e consequente deterioração da qualidade óssea.

A avaliação do peso corporal demonstrou que ao final do período experimental os animais não apresentaram diferença estatística. Não foi avaliado o gasto energético dos animais, mas foi possível observar uma menor ingestão em gramas da dieta de cafeteria, em comparação à dieta padrão durante todo o experimento. Esses achados sugerem que a dieta, logo após o desmame, revelou uma possível resposta adaptativa nos animais para manutenção do peso, relacionados ao consumo de energia, visto que a energia armazenada pode ter sido suficiente para suprir o gasto energético, consumindo uma menor quantidade de alimento, porém maior quantidade de calorias.

É importante avaliar o perfil lipídico, como o colesterol total, além da quantificação do tecido adiposo branco, para observar se a dieta hipercalórica alterou estes parâmetros, uma vez que neste presente estudo não houve diferença de peso entre o grupo controle que recebeu a ração padrão do biotério e o grupo que recebeu a dieta de cafeteria.

De acordo com Higa et al. (2014) não foi observado diferença no ganho de peso em camundongos alimentados com dieta de cafeteria durante 12 semanas, mas notaram aumento da gordura visceral e alterações no perfil lipídico, corroborando com os nossos achados, em que não houve diferença estatística de peso entre os animais dos grupos experimentais e sem diferença significativa na comparação do índice de Lee, considerada um índice de mensuração de obesidade (BERNARDIS, 1970). Todavia, houve um maior acúmulo de tecido adiposo branco nos ratos que consumiram a dieta de cafeteria, em comparação aos grupos que consumiram a dieta padrão, sugerindo que uma alimentação hipercalórica é capaz de induzir o acúmulo de tecido adiposo, como forma de estocagem de energia.

A obesidade pode afetar o metabolismo ósseo por diversos mecanismos, pois está associada a um estado crônico de inflamação, aumentando a liberação de citocinas pró-inflamatórias que podem estimular a atividade dos osteoclastos e consequente reabsorção óssea (CAO, 2011). Não foram dosadas adipocinas que regulam a relação entre gordura e osso, além dos marcadores do metabolismo ósseo, caracterizando uma limitação deste estudo. Entretanto, acreditamos que com nossos resultados, é possível observar um efeito local na estrutura esquelética em resposta à dieta de cafeteria.

Além disso, a dieta de cafeteria foi capaz de aumentar o nível de colesterol total dos animais. A alta ingestão lipídica promove o acúmulo de gordura no corpo, sendo promotor da hiperfagia, ganho de peso e consequente aumento do tecido adiposo (SAMPEY et al., 2011). O perfil lipídico da dieta de cafeteria utilizada no presente estudo

foi de 45% do valor calórico total (VCT). É visto na literatura que a hipercolesterolemia está relacionada com o desenvolvimento da osteoporose, por meio do aumento da atividade dos osteoclastos (PELTON et al., 2012; MANDAL, 2015; YOU et al., 2011). Este parâmetro alterado pode ter sido um dos fatores que interferiram na qualidade óssea, além das outras alterações metabólicas que os animais desenvolveram.

De maneira geral, os resultados aqui apresentados sugerem que a dieta de cafeteria, foi capaz de provocar alterações negativas ao metabolismo ósseo, lipídico e glicídico. O presente estudo é de grande relevância, devido à alta prevalência de obesidade decorrentes do alto consumo de alimentos hipercalóricos e as contradições sobre a relação do tecido adiposo e osso. Dessa forma, sugere-se realizar mais estudos sobre o tema avaliando os marcadores do metabolismo ósseo e adipocinas, para compreender melhor as alterações no padrão da remodelação óssea que este tipo de dieta pode provocar no organismo.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os nossos achados, com base nas metodologias e limitações verificadas no presente trabalho, foi possível concluir experimentalmente que durante o crescimento, a dieta de cafeteria provocou alterações no perfil lipídico e glicídico de ratos, aumentou a quantidade de tecido adiposo com peso corporal semelhante ao grupo controle, e foi capaz de diminuir a DMO, rigidez óssea e causar deterioração visível na microarquitetura trabecular.

REFERÊNCIAS

- AIRES, M. de M. **Fisiologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da Unesp**, v. 35, p. 191-98, 2006.
- AERSSSENS, J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. **Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 663–670, 1998.
- BARLOW, S. E. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. **Pediatrics**, v. 120, p.S164-S192, 2007.
- BARTELT, A. et al. Apolipoprotein E- dependent inverse regulation of vertebral bone and adipose tissue mass in C57Bl/6 mice: modulation by diet-induced obesity. **Bone**, v. 47, n. 4, p. 736-745, 2010.
- BERNARDIS L. L. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's nutritive ratio in rats with hypothalamic obesity. **Experientia**, v. 26, p. 789–790, 1970.
- BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.
- BRANDÃO, C. M. A.; VIEIRA, J. G. H. Fatores envolvidos no pico de massa óssea. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, p. 401-408, 1999.
- BUYUKDERE, Y.; GULEC, A.; AKYOL, A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. **PeerJ**, 7:e6656, 2019.
- CAO, J. J. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 6, n. 30, p. 01-07, 2011.
- CRABTREE, N. J. et al. The relationship between lean body mass and bone mineral content in paediatric health and disease. **Bone**, v. 35, n. 4, p. 965–972, 2004.
- DE ONIS, M.; BLOSSNER, M.; BORGHI, E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 92, p. 1257-1264, 2010.
- DIMITRI, P. Fat and bone in children – where we are now? **Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 2, p. 62-69, 2018.
- DONNELLY, E. Methods for assessing bone quality: A review. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 8, p. 2128–2138, 2011.
- ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. **Materials**, v. 10, n. 4, p. 334-438, 2017.
- ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, p. 218-224, 2004.
- FARR, J. N.; KHOSLA, S. Determinants of bone strength and quality in diabetes mellitus in humans. **Bone**, v. 82, p. 28-34, 2016.

- GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 208–215, 2006.
- GUSTAFSON, B. et al. Insulin resistance and impaired adipogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 193–200, 2015.
- HAMANN, C. et al., Effects of parathyroid hormone on bone mass, bone strength, and bone regeneration in male rats with type 2 diabetes mellitus. **Endocrinology**, v. 155, p. 1197-1206, 2014.
- HIGA, T. S. et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 47-54, 2014.
- IONOVA-MARTIN, S. S. et al. Reduced size-independent mechanical properties of cortical bone in high-fat diet-induced obesity. **Bone**, v. 46, p. 217–225, 2010.
- JIANG, S. D.; JIANG, L. S.; DAI, L. Y. Effects of spinal cord injury on osteoblastogenesis, osteoclastogenesis and gene expression profiling in osteoblasts in young rats. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 3, p. 339–349, 2007.
- JÚNIOR, D. A. C. P.; SERAPHIM, P. M. Cafeteria diet intake for fourteen weeks can cause obesity and insulin resistance in Wistar rats. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 313-319, 2012.
- LOBSTEIN, T. et al., Child and adolescent obesity: part of a bigger picture. **The Lancet**, v. 385, p. 2510-2520, 2015.
- MANDAL, C. C. High cholesterol deteriorates bone health: new insights into molecular mechanisms. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, p. 1-11, 2015.
- MONTEIRO, C. A. et al. Obesity and inequities in health in the developing world. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 28, p. 1181-1186, 2004.
- MORAIS, G. Q.; BURGOS, M. G. P. A. Impacto dos nutrientes na saúde óssea: novas tendências. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 42, n. 7, p. 189-94, 2007.
- NATHAN, B. M.; MORAN, A. Metabolic complications of obesity in childhood and adolescence: more than just diabetes. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 15, p.21-29, 2008.
- NELSON, S. E.; FRANTZ, J. A.; ZIEGLER, E. E. Absorption of fat and calcium by infants fed a milk-based formula containing palm olein. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 17, p. 327-332, 1998.
- PARTICELLI, F. et al. A comparison between micro-CT and histology for the evaluation of cortical bone: effect of polymethylmethacrylate embedding on structural parameters. **Journal of Microscopy**, v. 245, n. 3, p. 302-310, 2012.
- PAULA, F.; ROSEN C. Obesity, diabetes mellitus and last but not least, osteoporosis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, p. 150-157, 2010.
- PICKE, A-K. et al. Update on the impact of type 2 diabetes mellitus on bone metabolism and material properties. **Endocrine Connections**, v. 8, n. 3, p. R55-R70, 2019.

- PELTON, K. et al., Hypercholesterolemia Promotes an Osteoporotic Phenotype. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 3, p. 928-936, 2012.
- PEREIRA, L. O.; FRANSISCHI, R. P.; LANCH JR, A. H. Obesidade: Hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 2, p. 111-127, 2003.
- POLLOCK, N. K. Childhood obesity, bone development, and cardiometabolic risk factors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 410, p. 52-63, 2015.
- RALSTON, S. H. Structure and metabolism of bone. **Medicine**, v. 33, p.58-60, 2005.
- RIGGS, B. L.; MELTON, L. J. Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. **The American Journal of Medicine**, v. 75, p. 899-901, 1983.
- RODRIGUES, M. E. S. **Análise do risco de fratura óssea por ultrasonometria e ensaio mecânico de compressão** [Dissertação]. São Carlos: Escola de Bioengenharia de São Carlos, 2003.
- ROSEN, C. J.; BOUXSEIN, M. L. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, p. 35-43, 2006.
- SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome with Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. **Obesity**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.
- SEAMAN, D. R. Weight gain as a consequence of living a modern lifestyle: A discussion of barriers to effective weight control and how to overcome them. **Journal of Chiropractic Humanities**, v. 20, p. 27-35, 2013.
- SHAFAT, A.; MURRAY, B.; RUMSEY, D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. **Appetite**, v. 52, p. 34-38, 2009.
- SHARIR, A.; BARAK, M. M.; SHAHAR, R. Whole bone mechanics and mechanical testing. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 8-17, 2008.
- SHIMANO, M. M.; VOLPON, J. B. Biomechanics and structural adaptations of the rat femur after hindlimb suspension and treadmill running. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 42, n. 4, p. 330-338, 2009.
- STAGI, S. et al., Bone metabolism in children and adolescents: main characteristics of the determinants of peak bone mass. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 172-179, 2013.
- UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF), WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), INTERNATIONAL BANK FOR RECONSTRUCTION AND DEVELOPMENT/THE WORLD BANK. **Levels and trends in child malnutrition: Key Findings of the 2020 Edition of the Joint Child Malnutrition Estimates**. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WARD, W. E.; KIM, S.; BRUCE, W. R. A western-style diet reduces bone mass and biomechanical bone strength to a greater extent in male compared with female rats during development. **British Journal of Nutrition**, v. 90, p. 589-595, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention and management of osteoporosis: **Report of a WHO scientific group**, Geneva, 2003.

YOU, L. et al. High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, p. 1498-1504, 2011.

ZHAO, L. et al., Relationship of obesity with osteoporosis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 5, p. 1640-1646, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeitos da dieta hipercalórica associada ao sedentarismo em ossos de ratos*”, registrado com o número **061/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de maio de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 40 ratos Wistar machos pesando 60g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/05/2017 a 03/07/2018.

We certify that the Protocol n° 061/2017, entitled “*Effects of hypercaloric diet associated with sedentarism in rats bone*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 05/29/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 40 male Wistar rats weighing 60g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 07/03/2018.

Ribeirão Preto, 29 de maio de 2017



Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14049-900
(16) 3315-3301 / 3275 / 3256

"Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte."

"A inclusão deste trabalho foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 161ª Sessão Ordinária, realizada em 11/02/2022."