



**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO
JEQUITINHONHA E MUCURI**
**Programa de Pós-Graduação em Reabilitação
e Desempenho Funcional**



Fernanda Batista De Souza

**ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOMECÂNICOS, HISTOMORFOMÉTRICOS E
PERFIL DE MICROMINERAIS DA TÍBIA DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS
SUPLEMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA E CAFÉINA PURA**

**Diamantina
Minas Gerais - Brasil
2019**

Fernanda Batista De Souza

**ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOMECÂNICOS, HISTOMORFOMÉTRICOS E
PERFIL DE MICROMINERAIS DA TÍBIA DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS
SUPLEMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA E CAFÉINA PURA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Professora. Dra. Eliziária Cardoso dos Santos.

Coorientador: M.S Felipe Couto dos Santos

**Diamantina
Minas Gerais - Brasil
2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729a	<p>Souza, Fernanda Batista de Análise de parâmetros biomecânicos, histomorfométricos e perfil de microminerais da tíbia de animais experimentais suplementados com dieta de cafeteria e cafeína pura / Fernanda Batista de Souza, 2019. 49 p. : il.</p> <p>Orientadora: Eliziária Cardoso dos Santos Coorientador: Felipe Couto dos Santos</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.</p> <p>1. Tecido ósseo. 2. Cafeína. 3. Dieta de cafeteria. I. Santos, Eliziária Cardoso dos. II. Santos, Felipe Couto dos. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;">CDD 611.71</p>
-------	---

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa – CRB6/3468.

FERNANDA BATISTA DE SOUZA

Análise de parâmetros biomecânicos, histomorfométricos e perfil de microminerais da tíbia de animais experimentais suplementados com dieta de cafeteria e cafeína pura

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM REABILITAÇÃO E
DESEMPENHO FUNCIONAL, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRA
EM REABILITAÇÃO E DESEMPENHO
FUNCIONAL

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Eliziária
Cardoso Dos Santos

Data da aprovação : 15/03/2019

Eliziária Cardoso dos Santos
Prof.Dr.^a ELIZIÁRIA CARDOSO DOS SANTOS - UFVJM

Alessandra de Carvalho Bastone
Prof.Dr.^a ALESSANDRA DE CARVALHO BASTONE - UFVJM

Cynthia Fernandes Ferreira Santos
Prof.Dr.^a CYNTHIA FERNANDES FERREIRA SANTOS - UFVJM

DIAMANTINA

*À minha família por todo incentivo, em especial à
minha mãe “Dona Zilda”, pelos ensinamentos e,
principalmente, pelo exemplo de vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial:

Aos meus pais por me mostrarem o valor do conhecimento, a minha mãe Zilda, por todo suporte e paciência mesmo em momentos de grande dificuldade;

Agradeço aos meus irmãos por todo apoio, aos quais sempre me trataram como filha me dando todo apoio, carinho e incentivo em todos os momentos;

À minha orientadora, Lisa pelo conhecimento transmitido, pelas inúmeras reuniões e discussões, sem as quais este trabalho não seria possível, e ainda pelo incentivo e amizade;

Ao meu coorientador Felipe pelo seus ensinamentos valiosos para o desenvolvimento do trabalho;

À Fran, pelo companheirismo pela imensa contribuição no projeto, com um profundo senso de humanidade que conquistou minha admiração, respeito e amizade.

À Professora Cynthia, os mais simples detalhes em alguém faz você admirá-la, pois é o que os torna especial;

À equipe do Laboratório de Nutrição Experimental da UVFJM, pela disponibilidade do espaço e cooperação na realização de parte do experimento;

À equipe da Universidade Federal de Viçosa, pela disponibilidade nos laboratórios, principalmente Daniel, Ana e Luiz pela parceria e colaboração;

Ao Professor Rômulo Dias Novaes, por toda contribuição no desenvolvimento deste trabalho, nos laboratórios da Universidade Federal de Alfenas;

Aos professores do mestrado, da banca de qualificação e da defesa, sou grata pelas valiosas dicas e correções;

Aos meus amigos por todo incentivo e motivação;

À CAPES pelo fomento da bolsa de mestrado.

RESUMO

Reconhecidamente, de forma isolada, tanto alimentos ricos em lipídeos, quanto uso excessivo de bebidas com perfil termogênico, como a cafeína, tem sido associados a distúrbios no tecido ósseo. Apesar desse fato, o efeito conjunto dessas substâncias, usado de forma crônica, sobre o metabolismo desse tecido tem sido pobremente compreendido. Nesse contexto, o presente estudo propôs investigar a relação do uso de dieta de cafeteria associada a administração crônica de cafeína sobre parâmetros bioquímicos séricos, biomecânicos, histomorfométricos e perfil de microminerais da tíbia de animais experimentais. Para tal, foram usados sessenta camundongos fêmeas C57-BL6, 6 semanas de vida, Os animais receberam dieta para camundongos padrão (DP) ou dieta de cafeteria (DCf) contendo patê de presunto, batatas palha, chocolate branco, gordura de bacon, biscoito recheado e ração convencional para camundongo nas seguintes proporções: 2:1:1:1:1:1 e receberam cafeína nas doses de 10 ou 50 mg\ Kg. Os animais foram randomizados em seis grupos experimentais de dez animais em cada, como segue: **G1**: DP; **G2**: DP + 10mg/Kg de cafeína; **G3**: DP + 50mg/Kg de cafeína; **G4**: DCf; **G5**: DCf + 10mg\Kg de cafeína; **G6**: DCf + 50mg\Kg de cafeína. As dietas e a cafeína foram administradas diariamente por dezessete semanas, e após esse período, os animais foram eutanasiados. O soro foi usado para realizar as análises bioquímicas, a tíbia direita para realização das análises de propriedades biomecânicas estruturais e materiais e a esquerda foi utilizada para proceder análises histomorfométricas. Em geral, nos animais que receberam DCf, a cafeína na dose de 50 mg/kg, favoreceu diminuição do ganho de peso de forma mais acentuada comparado aos animais que receberam DP na mesma dose de cafeína. Os níveis triacilglicerol, colesterol total e LDL foram mais acentuados nos grupos de DCf associado a menor dose de cafeína. Apesar desse fato, com exceção do grupo controle da DP isoladamente e associado a cafeína na dose de 10 mg/kg, a relação do LDL/HDL tendeu para manter os níveis de HDL mais elevados em todos os grupos experimentais. A associação da DCf e cafeína, nas duas doses, parece ter favorecido um mecanismo de proteção ao aumento da carga máxima imposta ao osso e maior rigidez a ação de forças externas, superando as mudanças internas em relação a carga imposta. Em relação ao balanço de elementos químicos no osso, 10 mg/kg de cafeína + DCf contribuíram para redução drástica do percentual de Ca^{+2} e P, comparado aos demais grupos de estudo, além de causar diminuição dos elementos manganês, cobre e zinco. Perfil diferencial foi observado em relação a biodisponibilidade do elemento enxofre que, com exceção de G1 e G2, aumentou em todos os demais grupos experimentais. Apesar de mínimas as mudanças macroscópicas na morfometria das tíbias, nos

diferentes grupos, alterações histomorfométricas na microestrutura do tecido ósseo foram sistematicamente alterados nos grupos que receberam 10 mg/kg de cafeína, independente da dieta e naqueles que receberam DCf + 50 mg/kg de cafeína. Conjuntamente, apesar da cafeína associada a Dcf ter favorecido a alterações mais expressivas nas análises ósseas realizadas, comparado a sua associação com a DP, a dose de 10 mg/kg mostrou um perfil mais danoso, em todas as análises, sugerindo um efeito modulatório dessa substância sobre esse tecido que não foi dose-dependente.

Palavras-chave: Tecido ósseo. Cafeína. Dieta de cafeteria.

ABSTRACT

Admittedly, in isolation, both lipid-rich foods and excessive use of thermogenic profile beverages, such as caffeine, have been associated with disturbances in bone tissue. Despite this fact, the joint effect of these substances, used in a chronic way, on the metabolism of this tissue has been poorly understood. In this context, the present study proposed to investigate the relationship between the use of cafeteria diet associated with chronic caffeine administration on serum biochemical, biomechanical, histomorphometric and tibial micromineral profile of experimental animals. For this, sixty female C57-BL6 mice, 6 weeks of age, were used. Animals received standard mouse (DP) or cafeteria diet (DCf) diet containing ham pate, straw potatoes, white chocolate, bacon fat, biscuit and conventional ration for mice in the following proportions: 2: 1: 1: 1: 1: 1 and received caffeine at doses of 10 or 50 mg / kg. The animals were randomized into six experimental groups of ten animals each, as follows: G1: DP; G2: DP + 10mg / kg caffeine; G3: DP + 50mg / kg caffeine; G4: DCf; G5: DCf + 10mg / kg caffeine; G6: DCf + 50mg / kg caffeine. Diets and caffeine were administered daily for seventeen weeks, and after that period, the animals were euthanized. The serum was used to perform the biochemical analyzes, the right tibia to perform the analysis of structural and material biomechanical properties and the left was used to perform histomorphometric analysis. In general, in animals receiving DCf, caffeine at a dose of 50 mg / kg favored a more pronounced decrease in weight gain compared to animals receiving PD at the same dose of caffeine. The levels of triacylglycerol, total cholesterol and LDL were more accentuated in the DCf groups associated with lower caffeine dose. Despite this fact, with the exception of the PD control group alone and associated with caffeine at a dose of 10 mg / kg, the LDL / HDL ratio tended to maintain higher HDL levels in all experimental groups. The association of DCf and caffeine in both doses seems to have favored a mechanism of protection to the increase of the maximum load imposed to the bone and greater rigidity to the action of external forces, surpassing the internal changes in relation to the imposed load. In relation to the balance of chemical elements in the bone, 10 mg / kg of caffeine + DCf contributed to a drastic reduction in the percentage of Ca + 2 and P, compared to the other study groups, in addition to reducing the manganese, copper and zinc elements. Differential profile was observed in relation to the bioavailability of the sulfur element, which, except for G1 and G2, increased in all other experimental groups. Although minimal macroscopic changes in tibial morphometry in the different groups, histomorphometric changes in bone tissue microstructure were systematically altered in groups receiving 10 mg / kg caffeine,

regardless of diet and in those receiving DCf + 50 mg / kg caffeine. Together, although caffeine associated with DCf favored more significant changes in the bone analysis performed, compared to its association with PD, the 10 mg / kg dose showed a more damaging profile in all analyzes, suggesting a modulatory effect of this substance that was not dose-dependent.

Key Words: Tissue bone. Caffeine. Cafeteria diet.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Níveis plasmáticos de triglicerídeos (mg\dl), colesterol total (mg\dl), Lipoproteína de alta densidade (HDL) (mg\dl), e Lipoproteína de baixa densidade (LDL) (mg\dl) de camundongos do grupo controle e tratados ou não com dieta hipercolesterolêmica e suplementados ou não com cafeína pura.....	27
Figura 2: Testes de Carga máxima (N), Deslocamento (mm) e Rigidez (N/mm) da tíbia de camundongos do grupo controle e tratados ou não com dieta hipercolesterolêmica e suplementados ou não com cafeína pura.....	28
Figura 3: Conteúdo mineral ósseo em porcentagem (%) de Ca (cálcio) e P (fósforo) no osso compacto da tíbia.....	29
Figura 4: Análise quantitativa do conteúdo mineral ósseo da tíbia de camundongos, em porcentagem (%). Manganês (Mg), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Selênio (Se), Magnésio (Mg), Enxofre (S).....	30
Figura 5: Análise morfométrica da tíbia de camundongos, em milímetros (mm).....	31
Figura 6: imagem em 3 D representativa da morfometria do tecido ósseo de tíbia de camundongos dos diferentes grupos experimentais.....	33
Figura 7: Método 3D para cálculo da espessura e separação trabecular. B: Diferentes cores representam a sobreposição de esferas posicionadas sobre os espaços entre as trabéculas. Análise estereológica dos seguintes parâmetros: Separação Trabecular (Tb Sp), Densidade Volumétrica da Medula (V*), Densidade Superficial Trabecular (Sv), Volume da Medula Óssea (Vv marrow), Densidade Volumétrica do Osso (Vv bone), Largura Trabecular (Tb.Wi)	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Composição nutricional e conteúdo energético da dieta padrão (Nuvilab Cr-1®, São Paulo, SP, Brasil) e da dieta de cafeteria.....	18
TABELA 2: Parâmetros biométricos e ingestão de dieta em camundongos do grupo controle e dos grupos tratados ou não com dieta de cafeteria e suplementados ou não com cafeína pura.....	25

LISTA DE SIGLAS

Cbfa 1 - Fator de Ligação a1

CEA- Coeficiente de Eficiência Alimentar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

M-CST - Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos

NF- KB - Fator Nuclear Kappa B

PTH - Hormônio da Paratireoide

RANKL - Ligante de Proteína Transmembrana Expresso em Osteoblasto

RANK - Receptor Transmembrana para Ativação do Fator nuclear Kappa B

TEP -Taxa Específica de Ganho de Peso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Tecido ósseo e células.....	12
2.2 Metabolismo ósseo e cafeína.....	13
2.3 Lipídeos da dieta e tecido ósseo.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
4. METODOLOGIA.....	17
4.1 Grupos Experimentais e Aspectos Éticos.....	17
4.2 Protocolo Experimental e Eutanásia.....	17
4.3 Análise de Eficiência Alimentar e Biometria.....	19
4.4 Análises Bioquímicas.....	19
4.5 Testes Biomecânicos	19
4.6 Análise dos Microminerais	19
4.7 Morfometria da Tíbia.....	20
4.8 Análise Histomorfométrica da Tíbia	20
4.9 Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Análise da eficiência alimentar e biometria.....	24
5.2 Análises bioquímicas das concentrações lipídicas plasmáticas.....	26
5.3 Teste biomecânico da tíbia.....	27
5.4 Análise da biodisponibilidade de microminerais/elementos químicos da tíbia de animais dos grupos controle e experimentais.....	28
5.5 Análise morfológica da tíbia de animais dos grupos controle e experimental...	30
5. DISCUSSÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os hábitos de vida da sociedade moderna têm favorecido a mudanças no perfil nutricional da população (REYES *et al.*, 2015). Esse perfil associa-se ao aumento do consumo de alimentos processados, ricos em gorduras saturadas, que juntamente com o estresse diário e à inatividade física predispõem ao surgimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (RUESTEN *et al.*, 2013).

Alinhado a esse contexto, estudos tem evidenciado que o perfil dietético apresenta uma notável capacidade de modificar o metabolismo celular, podendo levar a uma profunda reprogramação molecular, que inclui a modulação dos genes que regulam a estrutura, a função, o crescimento e a sobrevivência celular (CERVATO *et al.*, 1997; SCHWENK *et al.*, 2013). Estas características têm sido provadas para dietas hipercalóricas ricas em carboidratos e lipídios, como a dieta de cafeteria, que tem sido amplamente aplicada como um modelo clássico de dislipidemia e obesidade em modelos animais por simular um padrão de alimentação cada vez mais comum em populações humanas e em diferentes faixas etárias (CERVATO *et al.*, 1997). Além disso, essa dieta apresenta potencial utilidade para investigar o efeito do perfil dietético sobre o metabolismo e estrutura de múltiplos órgãos e tecidos (ROSINI *et al.*, 2012, SAMPEY *et al.*, 2011).

No tecido ósseo, tem sido evidenciado que o aumento e acúmulo de lipídeos séricos desempenham um papel crítico na homeostase tecidual predispondo a um quadro de aterosclerose oclusiva com consequente quadro de isquemia (TINTUT *et al.* 2014). Segundo Choi *et al.*(2015) essa isquemia óssea, ao reduzir o aporte nutricional, proveniente das artérias responsáveis pela nutrição do periósteo e endósteo, impacta negativamente na homeostase do microambiente medular e consequentemente na osteogênese. Associado a esse fato, Makovey *et al.* (2008) apontaram que o excesso de lipídeos plasmáticos e em região da medula óssea predispõe a ocorrência de um processo de peroxidação lipídica, interferindo no desenvolvimento e diferenciação de células responsáveis pelo remodelamento ósseo, como osteoblastos e osteoclastos, favorecendo maior amplitude dos espaços de tecido esponjoso e consequentemente menor densidade das trabéculas ósseas. Essas características, além de predispor a alterações no processo de remodelamento ósseo, impacta nos níveis de densidade mineral, favorecendo o desenvolvimento de um quadro de osteoporose, e consequentemente maior risco de fraturas (LANGE *et al.*, 2017; RAMOS-JUNIOR *et al.*, 2017; WONG *et al.*, 2018).

Além da ingestão de alimentos com alto teor de gorduras saturadas e desenvolvimento de dislipidemias e aterosclerose, com impacto sobre a homeostase do tecido

ósseo, o consumo de bebidas com o potencial modulatório sobre o metabolismo energético celular, tem sido sistematicamente explorado (BARONE, 1996). A cafeína, amplamente consumida no mundo inteiro, é um exemplo consolidado e está presente em uma diversidade de bebidas, dentre essas, café, chás, refrigerantes, chocolates, medicamentos dentre outros (ZHANG 2015; WU *et al.*, 2017). Os efeitos termogênicos da cafeína têm sido demonstrados na redução e prevenção do aumento da gordura corporal LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Um dos mecanismos que justifica tal efeito é o seu perfil antagonico aos receptores da adenosina resultando na inibição da enzima adenilciclase, elevação dos níveis de monofosfato cíclico AMPc, desencadeando respostas, como lipólise, aumento das catecolaminas circulantes, diurese e conseqüentemente aumento do metabolismo energético (PASMAN *et al.*, 1995; COSO *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2017).

O papel da cafeína sobre a homeostase do tecido ósseo também tem sido evidenciado em estudos prévios (TSUANG *et al.* 2006; OLCHOWIK *et al.* 2011; KWAK *et al.* 2017). Kwak e colaboradores (2017) ao analisarem o perfil de resposta de ratos machos, suplementados com cafeína na dose 120 e 180 mg/kg/dia durante 63 dias mostraram ativação lipogênica com redução do ganho de peso corporal, redução dos níveis do conteúdo mineral do tecido ósseo, maior excreção de cálcio renal associado ao aumento do peso das glândulas supra-renais comparado aos animais do grupo controle. Associado a esse perfil de resposta Olchowik *et al.* (2011) afirmaram que a cafeína na dose 30 mg/kg/dia por 21 dias foi capaz alterar negativamente os parâmetros biomecânicos com mudanças significativas do tecido ósseo, mostrando redução da matriz mineral e orgânica associado a menor densidade mineral do tecido ósseo, um fator determinante para quantificar o risco de fraturas (LEE *et al.*, 2007; CLEMENS *et al.*, 2011).

Reconhecidamente, apesar do perfil lipídico e do uso da cafeína apresentar efeito negativo sobre as células ósseas, a associação destes constituintes, usados de forma crônica, sobre a homeostase do tecido ósseo tem sido pobremente compreendida. Nesse contexto, o presente estudo propõe investigar a relação do uso de dieta de cafeteria associada a administração de cafeína sobre parâmetros bioquímicos séricos, biomecânicos, histomorfométricos e perfil de microminerais da tíbia de animais experimentais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo: estrutura geral e células

Consiste em um tecido conjuntivo especializado, essencial para conferir suporte e proteção a órgãos vitais. Representa um importante reservatório de íons cálcio e fosfato no organismo, os quais são fundamentais para manutenção do processo de homeostase corporal. Além disso, é um órgão metabolicamente ativo, o qual se encontra em contínuo processo de remodelamento, composto por uma matriz orgânica e inorgânica (KNESER *et al.*, 2006).

A matriz óssea inorgânica é formada principalmente por cálcio e fosfato, na forma de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), além de outros íons em menor quantidade como, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio, zinco, enxofre, manganês, cobre e citrato. Em conjunto, esses íons conferem as propriedades de rigidez aos ossos, além de contribuírem para manutenção das células deste tecido metabolicamente ativas. A união do fosfato e do cálcio formam cristais com estrutura de hidroxiapatita que, associados às fibras de colágeno, fornecem resistência e dureza característicos do tecido ósseo (CUI *et al.*, 2016). Já a matriz orgânica é composta pelas proteínas colagenosas do tipo I, fundamentais para a deposição mineral de hidroxiapatita e pela substância fundamental amorfa (glicoproteínas e proteoglicanas), secretadas pelos osteoblastos, responsáveis pelas características biomecânicas do osso, como mecanismo de tração, dissipação de energia e compressão óssea (POUNDARIK *et al.*, 2009)

O tecido ósseo em nível macroscópico divide-se em duas formas distintas, o osso cortical e o esponjoso. No osso cortical, a constituição colagenosa forma lamelas concêntricas dando origem ao canal de Havers, rico em vasos sanguíneos e nervos. Entre dois ou mais canais de Havers encontram-se os canais Volkmann, responsáveis pela comunicação entre estes canais e com a medula óssea. Esse rearranjo tecidual de colágeno associado aos microminerais são responsáveis pela resistência e elasticidade tecidual óssea (FULSELE *et al.*, 2018). Por outro lado, o osso esponjoso apresenta poros em sua matriz, denominadas trabéculas ósseas, preenchidas pela medula óssea vermelha, um órgão hematopoiético, que confere ao tecido ósseo esponjoso um metabolismo intenso associado ao processo de diferenciação celular (KIM *et al.*, 2017).

Internamente o tecido ósseo é revestido pelo endóstio e externamente pelo perióstio ricos em células osteoprogenitoras, vasos e nervos, proporcionando nutrição, trocas metabólicas e importantes sítios de recepção e dissipação de sinais entre o tecido ósseo e outros sistemas (BAHNEY *et al.*, 2018).

A integridade óssea, desde seu processo de desenvolvimento embrionário até o processo de remodelamento, é regulada pela homeostase entre a deposição de matriz óssea, realizada por células denominadas osteoblastos, e pelo processo de reabsorção, característico do remodelamento através das células osteoclásticas (KNOWLES *et al.*, 2015). Os osteoblastos são provenientes das células mesenquimais não diferenciadas, responsáveis pela produção da matriz orgânica do osso, bem como pelo processo de mineralização. Essas células funcionam como transmissoras e receptoras de sinais, além de participarem do processo de remodelamento ósseo, não apenas produzindo matriz óssea, mas também controlando a atividade dos osteoclastos (ZHANG *et al.*, 2009). Os osteoclastos, por sua vez, são derivados de células hematopoiéticas monócitos / macrófagos, multinucleadas, possui um citoplasma rico em lisossomos, além de apresentarem numerosas mitocôndrias e um complexo de Golgi altamente desenvolvido, uma borda em escova constituída por vilosidade, que liberam ácido clorídrico (HCl) para dissolverem a hidroxiapatita, durante o processo de reabsorção óssea, e secretam collagenases e outras proteases que degradam a matriz orgânica óssea. Dessa forma, os osteoclastos estão envolvidos no processo de reabsorção e remodelamento do tecido ósseo (SANTOS *et al.*, 2007).

O remodelamento ósseo é iniciado pelo recrutamento e ativação de osteoclastos, que reabsorvem o tecido ósseo formando a lacuna de Howship, sendo preenchida por uma nova matriz pelos osteoblastos (QIAN *et al.*, 2009). A reabsorção óssea é realizada pela via da osteoclastogênese, pelo sistema RANK (receptor ativador de fator nuclear) e RANKL (receptor ativador fator nuclear NF-KB ligante) / osteoprogesterina (OPG) (TEITELBAUM *et al.*, 2003). O remodelamento ósseo está diretamente relacionado à necessidade corporal de manter uma concentração fisiológica de cálcio sérico no meio intracelular e, especialmente, à necessidade de manter a integridade estrutural do esqueleto (GORI *et al.*, 2000).

2.2 Metabolismo Ósseo e Cafeína

O remodelamento tecidual ósseo é influenciado pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático, o qual pode impactar de forma negativa para o processo de densidade mineral óssea (LI *et al.*, 2012). A estimulação simpática ativa a produção de noradrenalina e catecolaminas pela medula da supra renal, que através dos seus receptores acoplados a proteína G, efetuam ações específicas sobre as células alvo (ADICOTT *et al.*, 2009). Reyes *et al.*, (2018) ressaltaram que o uso da cafeína, encontrada em diversos produtos da dieta habitual, como em bebidas energéticas e medicamentos, tem o potencial de interferir na homeostase tecidual óssea.

A cafeína é considerada uma metilxantina, antagonista que atua como competidores dos receptores de adenosina *A1*, *A2*, *A2B* e *A3*, a nível do sistema nervoso central. A adenosina atua como neurotransmissor inibitório da noradrenalina e dopamina (DUARTE *et al.* 2009). Os efeitos da cafeína têm sido estudados em humanos e em modelos animais, pelos malefícios correlacionados como a osteoporose (CHOUDHURY *et al.*, 2004). Além disso, essa substância apresenta o potencial de aumentar a excreção urinária de cálcio, ou atuar diretamente ou indiretamente em osteoblastos e osteoclastos (CANALIS *et al.*, 2003; LOVALLO *et al.*, 2005). Estudo de cultura de osteoblastos *in vitro* demonstrou que a cafeína diminui a viabilidade da síntese celular com conseqüente redução da atividade mitocondrial em osteoblastos e osteoclastos (LOU *et al.*, 2010). A cafeína atua diretamente inativando e ativando células osteoprogenitoras, impactando negativamente na densidade mineral óssea contribuindo, dessa forma, para maior predisposição a ocorrência do aumento de fraturas (LIU *et al.*, 2011). Além disso, tem ação excitatória sobre os canais de rianodina, que são mediadores dos canais de cálcio, liberando o cálcio a partir do retículo sarcoplasmático. Os níveis intracelulares de cálcio são fundamentais para o equilíbrio da osteogênese (PRAKRIYA *et al.*, 2015).

A cafeína ao estimular o sistema nervoso simpático, predispõe ao aumento das catecolaminas, estimula o organismo a fornecer de forma rápida grande quantidade de energia, através da lipólise, degradando os lipídeos e ácidos graxos e glicerol como fonte de energética, além disso, estimula a secreção de glucagon pelas células B pancreáticas, que é um antagonista da insulina, ativando a glicogenólise muscular e hepática (MOTYL *et al.*, 2010). A insulina, devido aos seus receptores em células osteoblásticas, estimula sua atividade e inibe a osteoprogesterina (OPG) um importante mediador da atividade da osteoclastogênese (FERRON *et al.*, 2010; POLLOCK *et al.*, 2011). Tsuang *et al.* (2006) comprovou *in vitro*, que o uso da cafeína, levou a apoptose celular de osteoblastos, fundamental na integridade tecidual óssea.

2.3 Lipídeos da dieta e tecido ósseo

O metabolismo lipídico pode sofrer alterações devido a ingestão de alimentos ricos em gorduras saturadas (HELAHI *et al.*, 2009). Em geral, a dieta de cafeteria é constantemente utilizada em pesquisas experimentais, devido a sua similaridade com a dieta ocidental, rica em gorduras saturadas, baixo teor de fibras e minerais, sendo constituída por alimentos altamente palatáveis, como bacon, patês, biscoitos e chocolates. Esses alimentos, em conjunto, proporcionam uma maior ingestão calórica, sendo capaz de influenciar o

metabolismo lipídico, além de induzir obesidade, resistência à insulina, hiperfagia e dislipidemia (BAYLO *et al.*, 2010).

O consumo desse tipo de dieta, favorece aumento expressivo dos índices plasmáticos de colesterol, triglicerídeos e principalmente de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Conjuntamente, o elevado perfil lipídico sérico representa um sério fator de risco que predispõem ao surgimento da aterosclerose. No processo aterogênico, a lesão endotelial favorece ao aumento de permeabilidade vascular e o consequente acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade, principalmente LDL, na camada subendotelial. Essa, por sua vez, ao sofrer um processo oxidativo, pelas espécies reativas de oxigênio, estimulam a ativação das células de defesa a produzirem citocinas pro-inflamatórias, favorecendo processo inflamatório crônico, ocasionando oclusão total ou parcial dos vasos sanguíneos (ANGELANTONIO *et al.*, 2009; ANEMMA *et al.*, 2012, WIHASTUTI *et al.*, 2017). Uma consequência direta desse processo de oclusão, reflete sobre a redução da vascularização em artérias responsáveis pela nutrição óssea, intervindo negativamente no processo de remodelamento ósseo, mostrando o papel patológico da dislipidemia na redução da densidade mineral (TINTUT *et al.*, 2014). Knowles *et al.* (2015) ressaltaram que a hipóxia, causada pela aterosclerose, estimula a osteoclastogênese, devido ativação de receptores de fator nuclear Kappa B, ligados a (RANKL), ativação dos osteoclastos e consequente inativação dos osteoblastos, células responsáveis pela deposição de matriz óssea. Esse processo, contribui para perturbação da homeostase do tecido ósseo, favorecendo o desencadeamento de fragilidade óssea.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar parâmetros biomecânicos, histomorfométricos e biodisponibilidade de microminerais da tíbia associado ao perfil lipídico sérico de animais experimentais suplementados com dieta de cafeteria e cafeína pura.

3.2 Objetivos Específicos

- Mensurar a eficiência alimentar e parâmetros biométricos dos animais dos grupos controle e experimental, tratados ou não com dieta de cafeteria e suplementados ou não com cafeína pura;
- Analisar o perfil lipídico sérico dos animais dos grupos controle e experimental, tratados ou não com dieta de cafeteria e suplementados ou não com cafeína pura;
- Investigar as propriedades biomecânicas estruturais (força máxima de ruptura, deslocamento na força máxima e rigidez extrínseca) e materiais (módulo elasticidade, tensão máxima e deformação da tensão máxima) da tíbia em animais dos grupos controle e experimental, tratados ou não com dieta de cafeteria e suplementados ou não com cafeína pura;
- Quantificar as concentrações de microminerais (cálcio, fósforo, Manganês, Cobre, Zinco, Selênio, Magnésio, Enxofre) no osso cortical da tíbia de animais dos grupos controle e experimental, tratados ou não com dieta de cafeteria e suplementados ou não com cafeína pura;
- Analisar os parâmetros histomorfométricos do osso cortical e trabecular da tíbia em animais dos grupos controle e experimental, tratados ou não com dieta de cafeteria e suplementados ou não com cafeína pura.

4 METODOLOGIA

4.1 Grupos experimentais e aspectos éticos

Sessenta camundongos fêmeas C57-BL6 com 6 semanas de vida, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foram mantidos no biotério de experimentação animal do Departamento de Nutrição da UFVJM. Os animais foram mantidos em temperatura controlada ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) com umidade relativa do ar (60-70%) e ciclos com 12/12 (luz/escuridão) e ficaram acondicionados em caixas de polipropileno ($n=5$ por caixa) nas dimensões 24,5 cm x 30 cm x 13 cm (largura x comprimento x profundidade) com cama de maravalha autoclavada/seca e receberam água e dieta (ração comercial ou dieta hipercolesterolêmica) *ad libitum*.

Os animais foram igualmente randomizados em seis grupos com 10 animais em cada grupo, de acordo com o tratamento recebido, como segue: **Grupo 1:** (Dieta padrão sem cafeína); **Grupo 2:** (Dieta padrão + cafeína dose 1 (10mg\Kg)); **Grupo3:** (Dieta padrão + cafeína dose 2 (50mg\Kg)); **Grupo 4:** (Dieta de cafeteria sem cafeína); **Grupo 5:** (Dieta de cafeteria + cafeína dose 1 (10mg\Kg)); **Grupo 6:** (Dieta de cafeteria + cafeína dose 2 (50mg\Kg)).

O cálculo do tamanho amostral ($n=10$ por grupo) foi baseado no desvio padrão, nível de significância de 5% e poder do teste de 95%, admitindo-se que as variáveis são quantitativas e instáveis. Além disso, foi considerada a razão de sobrevivência e mortalidade de 1:1 com probabilidade de $P= \frac{1}{2}$ para ambos os casos, bem como para aumentar ou diminuir as variáveis de interesse (ARMITAGE; BERRY, 1994). Assim, considerando o nível de significância $\alpha = 5\%$, o número mínimo significativo de animais utilizados na análise estatística foi de $p = (1/2)$ eventos. Nesse caso, admitindo-se 50% de mortalidade a confiabilidade dos testes estatísticos ainda pode ser mantida uma vez que, se $n = 5$, $P = (1/2)^5$ ou $P = 0,03$; assim, $P < 0,05$. Por esses motivos, o número de repetições é necessário, para que os resultados obtidos fossem adequadamente analisados e interpretados (NOVAES *et al.*, 2013).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o uso de animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (CEUA/UFVJM, protocolo 047/2016). Todo protocolo experimental foi realizado de acordo com orientações do CEUA.

4.2 Protocolo experimental e eutanásia

O protocolo experimental teve duração de 17 semanas e neste período, conforme os grupos experimentais, os animais receberam dieta convencional (padrão) para

camundongos ou dieta de cafeteria (hipercolesterolêmica/hipercalórica). A dieta padrão utilizada apresentou a seguinte composição nutricional: *Proteína Bruta*: 22 a 22,5%, *Lipídeos*: 4,4 a 4,6% e *Carboidratos*: 53 a 55% (Nuvilab Cr-1®, São Paulo, SP, Brasil). A dieta de cafeteria, produzida manualmente, foi constituída pelos seguintes ingredientes: patê de presunto, batatas palha, chocolate branco, gordura de bacon, biscoito recheado e ração convencional para camundongo nas seguintes proporções: 2:1:1:1:1:1 (BERRAONDO; MARTINEZ, 2000). A composição nutricional das dietas está detalhada abaixo na **Tabela 1**.

Tabela 1: Composição nutricional e conteúdo energético da dieta padrão (Nuvilab Cr-1®, São Paulo, SP, Brasil) e da dieta de cafeteria.

Composição	Dieta Padrão	Dieta de cafeteria
Proteínas (100g)	20,73	60,15
Carboidratos (100g)	54,68	166,88
Gorduras Totais (100g)	7,17	192,41
Energia Proteica (Kcal.100-1)	82,92	240,6
Energia de Carboidratos (Kcal/100g)	218,72	667,72
Energia dos lipídeos (Kcal/100g)	64,53	1731,69
Energia Total (Kcal/100g)	366,2	2640,01

Associado a dieta, neste mesmo período do protocolo experimental, os animais receberam injeção intraperitoneal de água mais cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) ou cafeína pura (Sigma- Aldrich) diluída em salina 0,9% (grupos experimentais) nas doses de 10mg/kg ou 50mg/kg por peso corporal diariamente com intervalo mínimo de 24 horas entre cada aplicação (NEHLIG, 1999).

Após as 17 semanas, da realização do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados por punção cardíaca para exsanguinação, após anestesia com administração intraperitoneal de tribromoetanol (250 mg/kg). O sangue foi coletado em tubos contendo heparina e em seguida centrifugado para obtenção do plasma utilizado em análises bioquímicas. Os músculos das patas direita e esquerda foram dissecados, para exposição da tíbia, e as mesmas foram coletadas em tubo eppendorfs de 2ml. A tíbia direita foi armazenada em ultrafreezer a -80°C para análises biomecânicas e quantificação microminerais e a tíbia esquerda imersa em solução fixadora de formaldeído 10% tamponado (10% w/v de formaldeído em tampão fosfato 0,1M pH 7,2) à temperatura ambiente para subsequentes análises histomorfométricas (NOVAES *et al.*, 2013; PASURAMAN *et al.*, 1991).

4.3 Análise da eficiência alimentar e biometria

A eficiência alimentar foi avaliada no início e ao término do experimento obtendo parâmetros como: consumo alimentar (g/g massa/dia), consumo energético (kJ/ g massa/dia), coeficiente de eficiência alimentar (FEC %) e massa corporal (g). A ingestão dietética e massa corporal foram registrados semanalmente. O consumo energético foi estimado com base na ingestão alimentar utilizando-se os valores fornecidos por cada componente químico da dieta (ou seja, kJ/g de carboidratos, kJ/g de proteínas e kJ/g de gorduras) (CARPENTER 1953; CAMPBELL 1963; NOVELLI *et al.*, 2007).

4.4 Análises bioquímicas

O perfil lipídico foi avaliado por meio da quantificação dos níveis plasmáticos de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicerídeos. As análises bioquímicas foram realizadas por meio de espectrofotometria, utilizando kits comerciais e de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

4.5 Teste biomecânico

A tíbia direita de cada animal, dos diferentes grupos experimentais, removida e armazenada a -80°C, foi utilizada para análise de propriedades biomecânicas estruturais e materiais. Essas análises foram realizadas por meio do teste de flexão de três pontos até a fratura completa a uma velocidade de 1mm/min utilizando o equipamento biomecânico *3367 Dual Column Tabletop Model* (Grove City, PA, USA) com célula de carga de 500 N e tempo de acomodação de 30s. A distância considerada no teste, entre os dois pontos superior e inferior, foi de 10mm (TREVISAN *et al.*, 2013 e HESSLE *et al.*, 2013) e cada tíbia foi posicionada no plano anteroposterior com o lado anterior do osso voltado para cima.

Os dados de força máxima de ruptura e deslocamento da força máxima foram obtidos por meio do equipamento servo-hidráulica MTS modelo 810/TestStar II, disponível no Laboratório de Propriedades Mecânicas no Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa – UFV, e gravados em um computador acoplado a máquina. Os dados obtidos foram utilizados para proceder os cálculos das propriedades estruturais do osso (i.e. carga/força máxima, deslocamento e rigidez). A rigidez extrínseca foi calculada por meio da inclinação da porção mais linear da região elástica da curva carga x deslocamento (AKHTER *et al.*, 2001).

Subsequentemente a realização do teste de três pontos, as extremidades consistentes com o local de ruptura do osso foram fotografadas, juntamente com o padrão de medida adotado, por uma câmara digital de alta resolução a uma distância padronizada

(TURNER *et al.*, 1992; HUANG *et al.*, 2003). Os parâmetros da área de secção transversal da diáfise do osso foram mensurados através das imagens realizadas usando o software Image-ProPlus4. O momento de inércia da área da diáfise no ponto de ruptura foi calculado utilizando o método de Turner (TURNER *et al.*, 1992) por meio da seguinte equação:

$$I = \frac{\pi}{64} [ab^3 - (a - 2t)(b - 2t)^3]$$

I: momento de inércia da área; *a*: largura da área de secção transversal na direção mediolateral; *b*: largura da área da secção transversal na direção anteroposterior; *t*: espessura média do osso cortical

As propriedades do material avaliadas foram: tensão/força máxima, deformação/deslocamento e módulo elástico/rigidez. Os parâmetros foram calculados a partir das seguintes equações:

$$\sigma = \frac{\text{força} \times L \times c}{4l} \quad \varepsilon = \frac{12 \times c \times d}{L^2} \quad E = \frac{\text{rigidez} \times l^2}{48l}$$

σ : é a tensão; *L*: distância entre os dois suportes inferiores; *C*: é igual à metade de *b* (descrito anteriormente); ε : deformação; *d*: deslocamento; *E*: módulo elástico.

4.6 Análise dos microminerais

O conteúdo mineral ósseo foi analisado através de espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS) usando um sistema detector de raio x (Tracor TN 5502, Middleton, WI, EVA) e um elétron de varredura (Leão 1430 VP, Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha) (NOVAES *et al.*, 2013). Para esse processo, os fragmentos foram desidratados utilizando sequência de banho em etanol (80-100%) e secagem até pontos críticos (CPD 030, Bal – tec, Witten, Renânia do norte - Vestfália, Alemanha). Subsequentemente, as amostras foram revestidas por carbono evaporado (Quorum Q 150T, East Grinstead, West Sussex, Inglaterra, Reino Unido). Para análise foram realizadas uma aplicação de raio de 150 x, com uma aceleração de 20 KV a uma distância 10 mm (SOUZA *et al.*, 2017). Os microminerais analisados foram cálcio (Ca), fósforo (P), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn), selênio (Se), Magnésio (Mg) e enxofre (S), foram quantificados por EDS e expressos em valores médios.

4.7 Morfometria da tíbia

Após a completa remoção do tecido mole da tíbia esquerda dos animais experimentais, as dimensões anatômicas do osso foram mensuradas utilizando um paquímetro universal analógico (Vonder, 150 mm, graduação 0,05mm, Brasil) de acordo com a técnica descrita por LAMMERS *et al.*, (1998). Para cada medida foi considerado uma distância mínima entre dois pontos de referência no próprio osso. As seguintes medidas foram obtidas: *Comprimento da tíbia (CT)*: distância entre o ponto mais proximal da tíbia (epífise proximal) até o ponto mais distal na extremidade oposta do osso (epífise distal); *Largura da diáfise da tíbia (LD)*: Largura localizada na metade do comprimento do osso, ou seja, entre a epífise distal e a epífise próxima; *Largura da tíbia proximal (LP)*: medida localizada entre os côndilo lateral e medial no sentido anteroposterior; *Largura da tíbia distal (LD)*: localizada entre as faces lateral e medial do osso no sentido anteroposterior, perpendicular ao comprimento da tíbia.

4.8 Análise histomorfométrica da tíbia

A tíbia esquerda dos animais dos diferentes grupos experimentais foi fixada em formalina a 10% em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7, por um período de 72 horas à temperatura ambiente. Subsequentemente, os ossos foram colocados em diferentes cubas descalcificadoras, de acordo com os grupos de estudo, contendo solução de ácido fórmico (20% diluído em água destilada) por um período mínimo de 30 dias e ou até a completa descalcificação do material. Finalizado esse processo, foram realizados cortes transversais e longitudinais dos ossos descalcificados para remoção da epífise proximal das tíbias. As amostras foram lavadas com água destilada e desidratadas em gradiente de álcool (70, 80, 90 e 100%), diafanizados em xilol e embebidas em parafina líquida a 60°C para confecção de blocos e parafina.

Secções de 4µm de espessura foram obtidas utilizando micrótomo rotativo (Spencer, modelo 19459, USA), e corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Para evitar a repetição das análises na mesma área histológica, os cortes foram feitos de modo semi-seriado usando 1 a cada 20 secções. Seis cortes histológicos foram preparados para cada tíbia e dois campos de cada corte foram capturados usando a objetiva de 40x. As imagens foram digitalizadas por meio de um fotomicroscópio (Olympus AX70[®]; Tóquio, Japão) conectado a câmera digital (Olympus QColor-3[®]; Tóquio, Japão) (NOVAES *et al.*, 2013).

A densidade volumétrica trabecular (Vv [osso] %) e a medula óssea (Vv [medula]) foram estabelecidas pela contagem de pontos de acordo com a fórmula Vv [trabecular ou

medula óssea] ΣP_P [trabécula ou medula óssea] e os números de pontos que totalizar as trabéculas óssea ou medula óssea ΣP_T é o número total de pontos do teste (SEQUETTO *et al.*, 2017). Setenta campos microscópicos aleatoriamente (amplificação x 400) e uma área óssea total de $96,6 \times 104 \mu\text{m}^2$ foram analisados para cada grupo. A área trabecular largura separação foram estimados através do método de ajuste de esfera do software de análise de imagem (SCHNEIDER *et al.*, 2012) com o plugin Bone J (BOUXSEIN *et al.*, 2010) selecionados e digitalizados aleatoriamente 10 regiões de interesse (ROI) de cada animal usando uma lente objetiva 40 x em fotomicroscópio cada ROI representou uma área de $12 \times 104 \mu\text{m}^2$ de osso trabecular. Para estimar área óssea (B.Ar), cada ROI foi segmentado em uma imagem preto e branco e sua área coberta por trabéculas foi calculada automaticamente (EGAN *et al.*, 2012). As mesmas imagens foram usadas para estimar a largura trabecular (Tb.Wi) e a separação trabecular (Tb.Sp). Abordagem básica foi determinar o diâmetro do maior círculo possível que pode ser ajustado enquanto completamente contido dentro da trabécula óssea e, em seguida, a média desses diâmetros (HILDEBRAND; RUEGSEGGER 1997; BROUXSEIN *et al.*, 2010). A conectividade trabecular foi estimada em imagens 2D da deconvolução 3D realizadas no software ImageJ (SCHNEIDER *et al.*, 2012). A partir dessas imagens, aplicou-se o princípio de Marrow Star Volume (V^* medula), que é definido como, volume médio de todas as partes de um objeto quando visto desobstruído ao longo de linhas retas ininterruptas em todas as direções a partir de pontos aleatórios dentro do objeto. No osso esponjoso, a medula V^* fornece uma estimativa do tamanho médio do espaço medular em três dimensões e reflete a conectividade. A medula V^* foi calculada: $V^* \text{ medula} = (\pi / 3) \ell^3 \times 3$ (equação 3), onde ℓ é o comprimento médio de um intercepto com orientação aleatória através de um ponto aleatório (CRUZ-ORIVE *et al.*, 1992). A densidade superficial das trabéculas ósseas foi estimada de acordo com a seguinte fórmula $S_v [bt] = (2 \times \Sigma I [bt]) / L_T$ (equação 4), onde $\Sigma I [bt]$ representa o número total de intersecções entre os arcos ciclóides (ou seja, 12) e a superfície das trabéculas ósseas, e L_T é o comprimento total do sistema de arcos ciclóides (ou seja, $1220 \mu\text{m}$) (SEQUETTO *et al.*, 2017).

4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism (versão 5.0). A normalidade da distribuição dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição paramétrica foram expressos como média e desvio padrão (média \pm DP) e analisados usando análise de variância unidirecional (one-way ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Student-Newman-Keuls. Os dados com distribuição não

paramétrica foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Todos os resultados com $p < 0,05$ foram estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da eficiência alimentar e biometria

Tanto a ingesta alimentar diária quanto o consumo energético diário dos animais dos diferentes grupos mantiveram valores similares durante as 17 semanas de aplicação do protocolo experimental. Por outro lado, quando analisado a quantidade total de ingestão dietética em Kg e o consumo total de energia em Kcal, ao término deste mesmo período, observou-se diferença significativa destes parâmetros em todos grupos experimentais quando comparado ao controle G1, no entanto valores significativamente mais elevados foram observados nos grupos que receberam dieta de cafeteria associados ou não a cafeína. A massa corporal inicial foi semelhante em todos os grupos ($P > 0,05$); no entanto, a massa final foi aumentada nos animais dos grupos que receberam apenas a dieta de cafeteria (G4) e nos animais com dieta de cafeteria associado a menor dose de cafeína (G5) ($P < 0,05$). Já o ganho de peso, apesar de ter mostrado aumento significativo no grupo que recebeu dieta padrão associado a 50mg/Kg de cafeína (G3) e nos grupos que receberam dieta de cafeteria associado ou não a cafeína (G4, G5 e G6) valores mais expressivos foram observados em G4 (controle da dieta de cafeteria) e G5 (Dieta de cafeteria + cafeína 10mg/Kg). (Tabela 2)

Tabela 2: Parâmetros biométricos e ingestão de dieta em camundongos do grupo controle e dos grupos tratados ou não com dieta de cafeteria e suplementados ou não com cafeína pura.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Ingestão da dieta (g/d)	21.21 ± 4.94	22.51 ± 7.53	20.10 ± 3.39	16.51 ± 6.82	17.12 ± 7.59	17.77 ± 5.78
Ingestão total da dieta (kg)	2.38 ± 0.35 ^a	2.52 ± 0.53 ^b	2.25 ± 0.23 ^c	1.85 ± 0.48 ^d	1.92 ± 0.53 ^{d,e}	1.99 ± 0.41 ^e
Consumo de energia (kcal/d)	16,7258	16,115	15,5425	18,9217	21,1831	19,581
Consumo total de energia (kcal)	1990,37 ^a	1917,69 ^b	1849,56 ^c	2251,68 ^d	2520,79 ^{d,e}	2375,01 ^e
Peso corporal inicial (g)	18.39 ± 1.21 ^a	18.88 ± 1.64 ^a	17.78 ± 1.59 ^a	17.58 ± 1.74 ^a	18.7 ± 1.52 ^a	18.86 ± 1.58 ^a
Peso corporal final (g)	21.32 ± 0.62 ^a	21.65 ± 1.01 ^a	22.63 ± 0.83 ^a	28.60 ± 3.67 ^b	26.20 ± 4.10 ^b	22.51 ± 1.27 ^a
Ganho de peso (g)	2.94 ± 0.77 ^a	2.77 ± 1.13 ^a	4.86 ± 1.10 ^{b,c}	11.02 ± 3.68 ^d	7.50 ± 3.31 ^{b,d}	3.65 ± 1.06 ^{a,b}

G1: Dieta padrão sem cafeína; **G2:** Dieta padrão + cafeína dose 1 (10mg\Kg); **G3:** Dieta padrão + cafeína dose 2 (50mg\Kg); **G4:** Dieta de cafeteria sem cafeína; **G5:** Dieta de cafeteria + cafeína dose 1 (10mg\Kg); **G6:** Dieta de cafeteria + cafeína dose 2 (50mg\Kg). ^{a,b,c,d} Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística (P<0.05) entre os grupos. Grupos com a mesma letra não apresentaram diferença estatística (P>0,05).

5.2 Análises bioquímicas das concentrações lipídicas plasmáticas

As concentrações plasmáticas de triacilglicerol dos camundongos do grupo de animais que recebeu dieta de cafeteria associado a dose de 10mg\Kg de cafeína pura (G5) mostraram níveis significativamente mais elevados comparado ao grupo controle da dieta padrão isoladamente (G1) e aquele associado a menor dose de cafeína pura (G2), enquanto que os demais grupos não mostraram qualquer diferença estatística entre eles. Em relação ao colesterol total, apesar de nenhuma diferença significativa ter ocorrido entre os grupos de animais que receberam dieta padrão associado a 50mg\Kg de cafeína (G3) e naqueles que receberam a dieta de cafeteria associado ou não das diferentes doses de cafeína (G4, G5 e G6), esses mesmos grupos quando comparado a G1 (controle da dieta padrão) e G2 (dieta padrão + 10mg\Kg de cafeína pura) mostraram valores significativamente mais elevados ($P < 0.05$). Os níveis de HDL nos grupos de G2 a G6 mostraram aumento significativo quando comparado ao grupo controle (G1). Valores mais elevados, encontrados para esta variável, foram evidenciados no grupo que recebeu dieta padrão associado a menor dose de cafeína (G2) e no grupo controle da dieta de cafeteria (G4). Entre os grupos G3 a G6 nenhuma mudança significativa nos níveis de HDL foi observada. A lipoproteína de baixa densidade apresentou valores plasmáticos mais elevados quando os animais receberam dieta de cafeteria isoladamente (G4) ou quando a dose de 10mg\Kg de cafeína pura foi associada (G5) comparada ao grupo de animais que receberam dieta padrão (G1) associado a diferentes doses de cafeína (G3 e G4). Entre os grupos que receberam dieta de cafeteria associado a cafeína (G5 e G6) os níveis de LDL foram significativamente mais elevados quando a menor dose (10mg\Kg) foi administrada. (Figura 1).

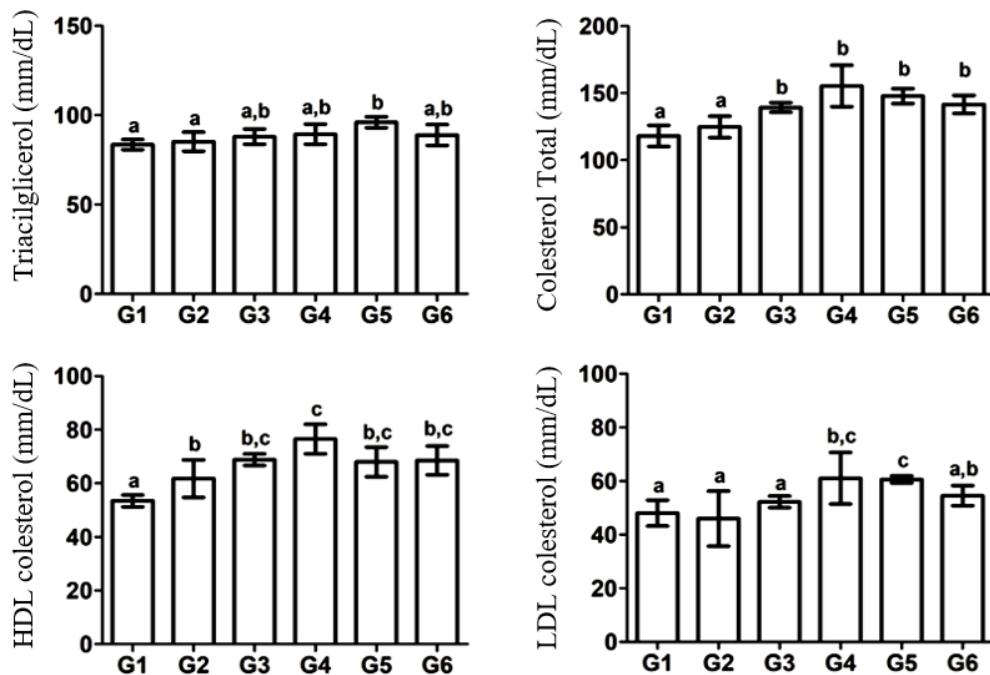


Figura 1: Níveis plasmáticos de triglicerídeos (mg/dl), colesterol total (mg/dl), Lipoproteína de alta densidade (HDL) (mg/dl), e Lipoproteína de baixa densidade (LDL) (mg/dl) de camundongos do grupo controle e tratados ou não com dieta hipercolesterolêmica e suplementados ou não com cafeína pura. G1: Dieta padrão sem cafeína; G2: Dieta padrão + cafeína dose 1 (10mg/Kg); G3: Dieta padrão + cafeína dose 2 (50mg/Kg); G4: Dieta de cafeteria sem cafeína; G5: Dieta de cafeteria + cafeína dose 1 (10mg/Kg); G6: Dieta de cafeteria + cafeína dose 2 (50mg/Kg). ^{a,b,c} Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos. Grupos com a mesma letra não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$).

5.3 Teste biomecânico da tibia

A carga máxima, necessária para causar fratura óssea completa, foi proporcionalmente maior nas tíbias dos animais que receberam dieta de cafeteria independente da dose de cafeína administrada (Grupos G5 e G6), comparada aos demais grupos, controle e experimental (G1 a G4). Esses últimos, por sua vez, quando comparados entre si não apresentaram nenhuma diferença ($P > 0,05$) para essa mesma variável. Nenhuma diferença significativa foi observada também em relação ao deslocamento, consistente com o módulo de deformação óssea entre os grupos de estudo. Por outro lado, alinhado ao perfil da carga máxima suportada até o ponto de fratura para os grupos G5 e G6 (dieta de cafeteria + 10 ou 50 mg/Kg respectivamente), esses animais também apresentaram valores significativamente maiores para o módulo elástico ou rigidez comparado aos demais grupos experimentais. Menor módulo de rigidez foi apresentado pelos animais do grupo G3 (Dieta padrão associada a maior dose de cafeína). (Figura 2).

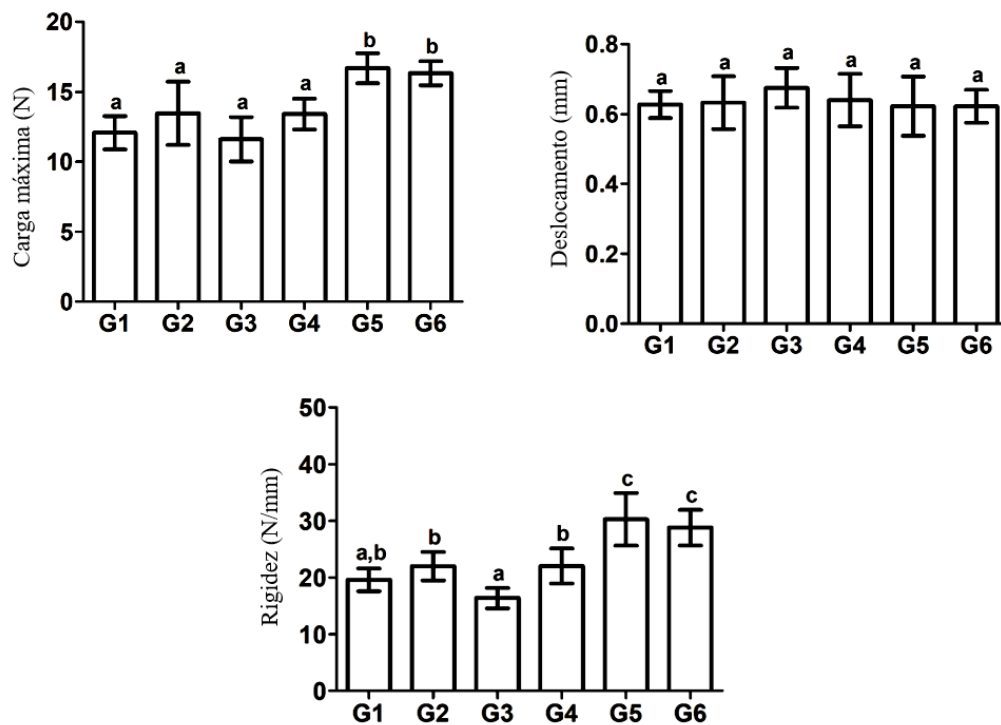


Figura 2: Testes de Carga máxima (N), Deslocamento (mm) e Rigidez (N/mm) da tíbia de camundongos do grupo controle e tratados ou não com dieta hipercolesterolêmica e suplementados ou não com cafeína pura. G1: Dieta padrão sem cafeína; G2: Dieta padrão + cafeína dose 1 (10mg\Kg); G3: Dieta padrão + cafeína dose 2 (50mg\Kg); G4: Dieta de cafeteria sem cafeína; G5: Dieta de cafeteria + cafeína dose 1 (10mg\Kg); G6: Dieta de cafeteria + cafeína dose 2 (50mg\Kg). ^{a,b,c} Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística ($P < 0.05$) entre os grupos. Grupos com a mesma letra não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$).

5.4 Análise da biodisponibilidade de microminerais/elementos químicos da tíbia de animais dos grupos controle e experimentais

O percentual de biodisponibilidade de Cálcio (Ca) e Fósforo (P) da tíbia dos animais experimentais está representado na Figura 3. A biodisponibilidade dos íons cálcio, nos grupos que receberam dieta padrão associado à maior dose de cafeína (G3), foi significativamente diminuído em relação aos animais que receberam apenas a dieta padrão com ou sem cafeína (G1 e G2). Entre os animais dos grupos que receberam dieta de cafeteria suplementados ou não com cafeína (G4, G5 e G6), o grupo que recebeu a menor dose (G5) mostrou drástica diminuição dos níveis de cálcio comparado ao grupo que recebeu apenas a dieta de cafeteria ou dieta associado a cafeína na maior dose (G4 e G6). Em relação aos níveis percentuais de fósforo, diminuição significativa foi evidenciada tanto entre os animais que receberam dieta padrão em ambas as doses de cafeína (G2 e G3), quanto aos que receberam

apenas dieta de cafeteria ou dieta associada à menor dose de cafeína (G4 e G5) comparado ao controle G1. Para maior dose de cafeína (50 mg/kg) associado ou não a dieta de cafeteria (G3 e G6) o percentual de fósforo não diferiu entre eles.

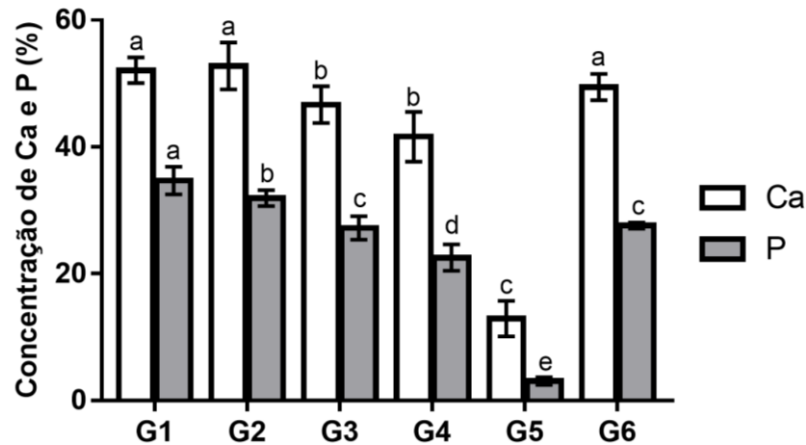


Figura 3: Conteúdo mineral ósseo em porcentagem (%) de Ca (cálcio) e P (fósforo) no osso compacto da tibia. G1: Dieta padrão sem cafeína; G2: Dieta padrão + cafeína dose 1 (10mg/Kg); G3: Dieta padrão + cafeína dose 2 (50mg/Kg); G4: Dieta de cafeteria sem cafeína; G5: Dieta de cafeteria + cafeína dose 1 (10mg/Kg); G6: Dieta de cafeteria + cafeína dose 2 (50mg/Kg). ^{a,b,c} Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística ($P < 0.05$) entre os grupos. Grupos com a mesma letra não apresentaram diferença estatística ($P > 0.05$).

A análise quantitativa dos minerais manganês, cobre, zinco, selênio, magnésio e enxofre nos ossos dos diferentes grupos experimentais estão representados na Figura 4. A associação da dieta de cafeteria com a menor dose de cafeína (G5) contribuiu para reduzir significativamente os níveis de manganês, cobre e zinco comparados aos demais grupos controle e experimentais. Nenhuma diferença estatística entre os grupos foi encontrada para os minerais selênio e magnésio. Comparados ao grupo controle (G1) os níveis de enxofre foram significativamente aumentados em todos os demais grupos, no entanto nenhuma diferença estatística para esse elemento químico foi observada entre os grupos G3 e G6.

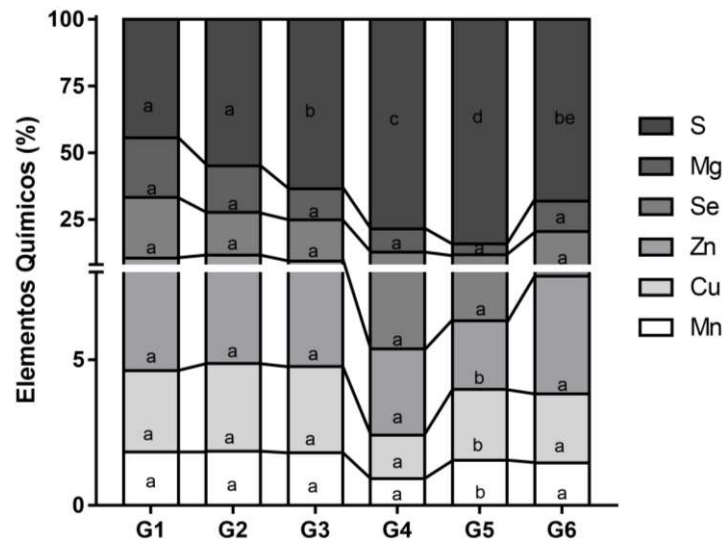


Figura 4: Análise quantitativa do conteúdo mineral ósseo da tíbia de camundongos, em porcentagem (%). Manganês (Mg), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Selênio (Se), Magnésio (Mg), Enxofre (S). G1: Dieta padrão sem cafeína; G2: Dieta padrão + cafeína dose 1 (10mg\Kg); G3: Dieta padrão + cafeína dose 2 (50mg\Kg); G4: Dieta de cafeteria sem cafeína; G5: Dieta de cafeteria + cafeína dose 1 (10mg\Kg); G6: Dieta de cafeteria + cafeína dose 2 (50mg\Kg). ^{a,b,c,d} Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística ($P < 0.05$) entre os grupos. Grupos com a mesma letra não apresentaram diferença estatística ($P > 0.05$).

5.5 Análise morfológica da tíbia de animais dos grupos controle e experimental

Os parâmetros morfométricos como largura da tíbia proximal (mm), comprimento da tíbia (mm), largura da diáfise da tíbia (mm) e peso seco (g) mantiveram as mesmas características métricas independente da ingestão alimentar, (dieta padrão ou cafeteria) e dose de cafeína. Ao analisar a medida da largura da tíbia distal (mm) dos animais que receberam dieta de cafeteria, associados ou não a cafeína (G4, G5 e G6), valores significativamente menores foram observados comparado aos grupos que receberam dieta padrão e cafeína nas duas doses testadas (G1, G2 e G3). No entanto, isoladamente, os grupos de dieta padrão e os grupos de dieta de cafeteria mantiveram valores similares para essa mesma variável entre si. Figura 5.

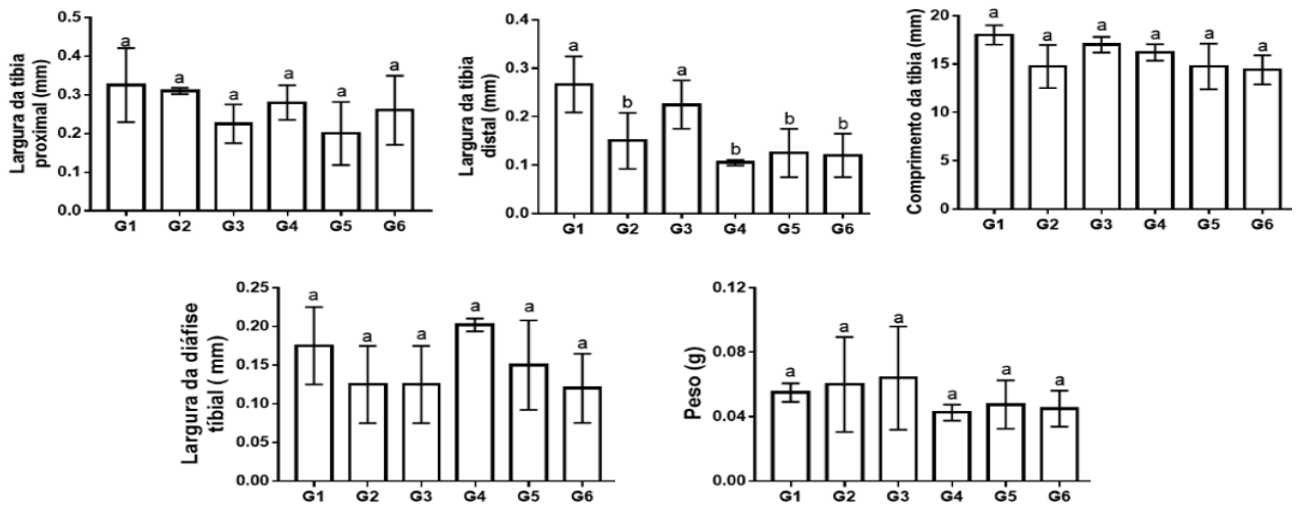


Figura 5: análise morfométrica da tíbia de camundongos, em milímetros (mm). G1: Dieta padrão sem cafeína; G2: Dieta padrão + cafeína dose 1 (10mg/Kg); G3: Dieta padrão + cafeína dose 2 (50mg/Kg); G4: Dieta de cafeteria sem cafeína; G5: Dieta de cafeteria + cafeína dose 1 (10mg/Kg); G6: Dieta de cafeteria + cafeína dose 2 (50mg/Kg). ^{a,b} Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística ($P < 0.05$) entre os grupos. Grupos com a mesma letra não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$).

5.6 Análise Histomorfométrica da Tíbia

As figuras 6 e 7 evidenciam o padrão histomorfométrico e a análise estereológica da tíbia dos animais dos diferentes grupos de estudo. Representativamente, nos grupos de dieta padrão (G1, G2 e G3) a dose de cafeína de 10 mg/kg (G2) mostrou maior impacto para diminuição dos espaços trabeculares. Para essa mesma dose, nos grupos que receberam dieta de cafeteria (G4, G5 e G6), o grupo G3 mostrou um perfil de resposta similar, no entanto em menor intensidade. Comparados entre si, os grupos de dieta de cafeteria tanto na dose de 10 mg/kg quanto de 50 mg/kg mostraram diminuição dos espaços trabeculares comparado ao grupo da dieta de cafeteria. Comparando todos os grupos entre si o grupo G2 apresentou os piores resultados para essa variável. (Figura 6).

A associação da dieta de cafeteria e cafeína independente da dose (G5 e G6) e a dieta padrão associada à menor dose de cafeína (G2) contribuíram para diminuição significativa dos parâmetros estereológicos separação trabecular (Tb.Sp), densidade volumétrica da medula (V^*), volume da medula óssea (Vv) e Densidade superficial das trabéculas (Sv) comparado aos demais grupos de estudo. No grupo G3 a cafeína não mostrou impacto negativo em relação a esses mesmos parâmetros avaliados mantendo o mesmo perfil de resposta do grupo controle (G1) e o controle da dieta de cafeteria (G4).

Já em relação aos parâmetros consistentes com a densidade volumétrica do osso trabecular (Vv) ou seja, proporção de trabéculas por área, e largura trabecular (Tb.Wi) a cafeína na menor dose associado a dieta padrão e em ambas as doses associadas a dieta de cafeteria contribuíram para piora significativa desses parâmetros em relação aos demais grupos experimentais (Figura 7).

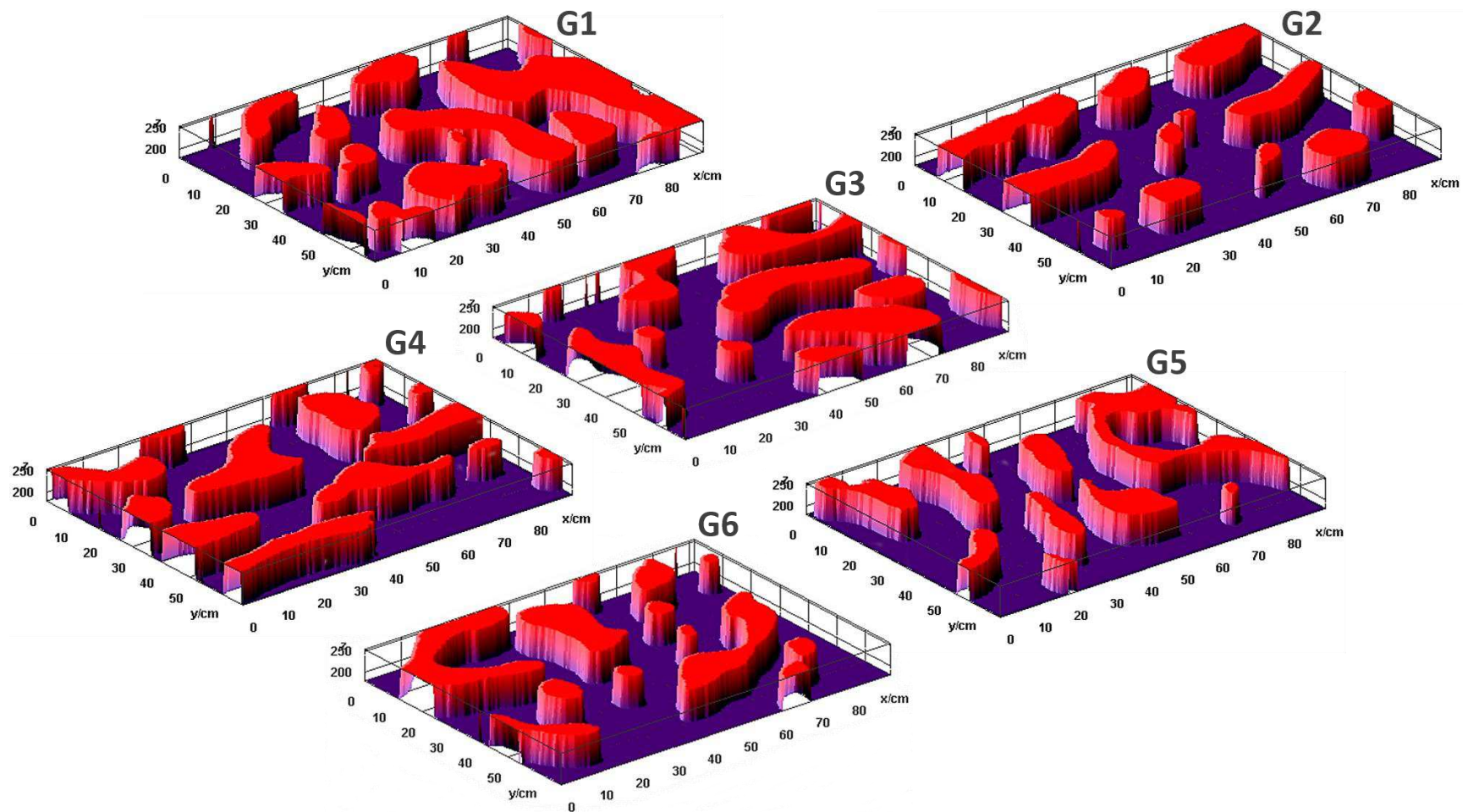
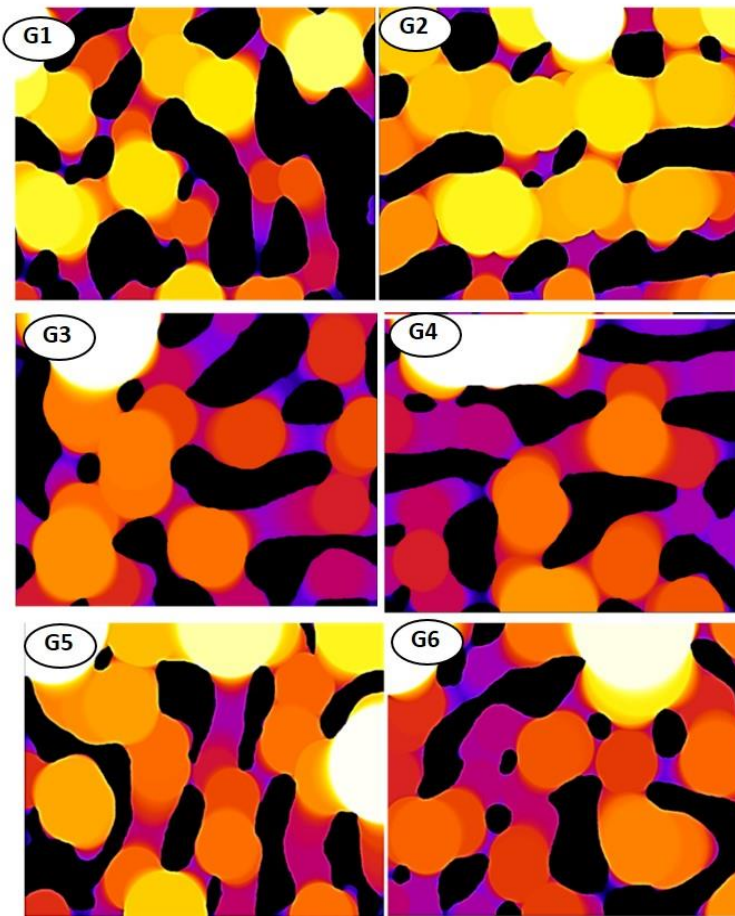


Figura 6: imagem em 3 D representativa da morfometria do espaço medular e trabecular do tecido ósseo de tíbia de camundongos dos diferentes grupos experimentais. Cor vermelha: espaço trabecular; Cor roxa: espaço medular ósseo. G1: Dieta padrão sem cafeína; G2: Dieta padrão + cafeína dose 1 (10mg\Kg); G3: Dieta padrão + cafeína dose 2 (50mg\Kg); G4: Dieta de cafeteria sem cafeína; G5: Dieta de cafeteria + cafeína dose 1 (10mg\Kg); G6: Dieta de cafeteria + cafeína dose 2 (50mg\Kg).

A



B

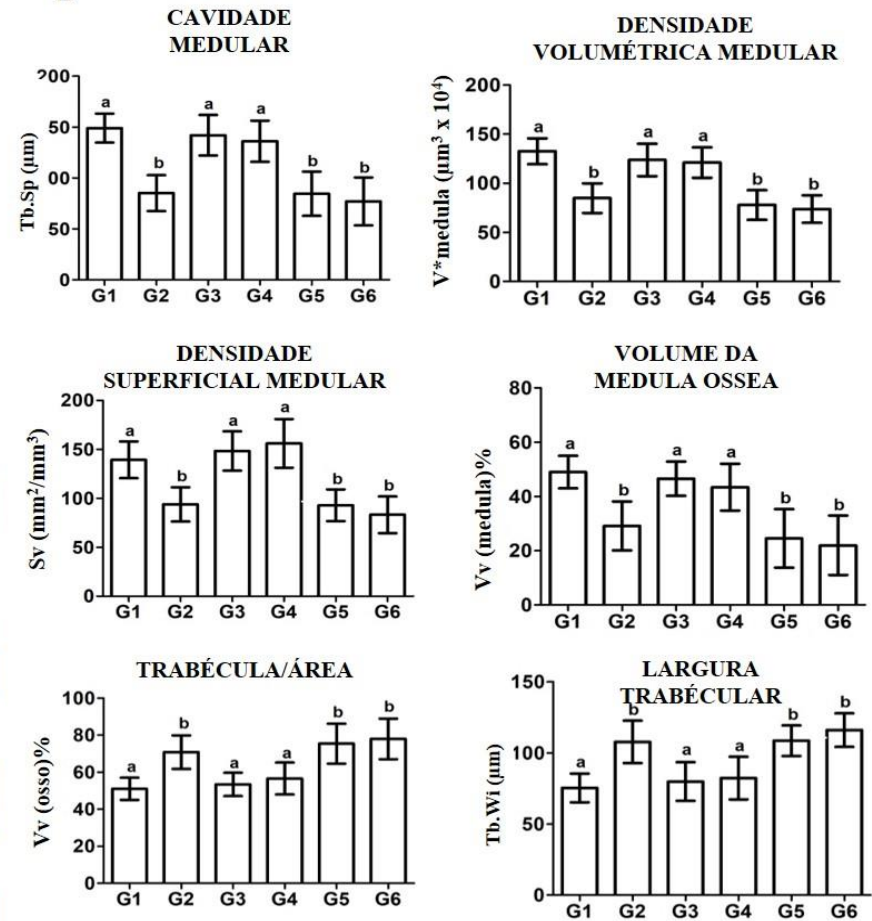


Figura 7: Método 3D para cálculo da espessura e separação trabecular. **A:** Diferentes cores representam a sobreposição de esferas posicionadas sobre os espaços entre as trabéculas. **B:** Análise estereológica dos seguintes parâmetros: Separação Trabecular (TbSp), Densidade Volumétrica da Medula (V*), Densidade Superficial Trabecular (Sv), Volume da Medula Óssea (Vv marrow), Densidade Volumétrica do Osso (Vv bone), Largura Trabecular (Tb.Wi). G1: Dieta padrão sem cafeína; G2: Dieta padrão + cafeína dose 1 (10mg\Kg); G3: Dieta padrão + cafeína dose 2 (50mg\Kg); G4: Dieta de cafeteria sem cafeína; G5: Dieta de cafeteria + cafeína dose 1 (10mg\Kg); G6: Dieta de cafeteria + cafeína dose 2 (50mg\Kg). ^{a,b,c,d} Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística (P<0.05) entre os grupos. Grupos com a mesma letra não apresentaram diferença estatística (P>0,05).

6 DISCUSSÃO

Tem sido sistematicamente preconizado que fatores extrínsecos, como hábitos alimentares, tem o potencial de modificar o metabolismo e a integridade de células do tecido ósseo (REIS *et al.*, 2015; SHAMSUZZAMAN *et al.*, 2017; RAJAMANNAN *et al.*, 2018). Nessa perspectiva, a presente investigação, ao avaliar o perfil de resposta da associação da dieta de cafeteria e cafeína pura, nas doses de 10 e 50 mg/kg sobre a integridade da tíbia de animais experimentais, encontrou um padrão diferencial de resposta em relação ao ganho de peso e perfil lipídico sérico, a carga máxima e rigidez imposta ao osso, percentual de cálcio, fósforo, manganês, cobre e zinco, além de piora nos parâmetros da arquitetura microscópica das trabéculas ósseas.

Estudos tem apontado o potencial efeito modulatório da cafeína sobre o sistema nervoso central, com impacto sobre o perfil de ingestão alimentar, peso corporal e metabolismo lipídico (SWEENEY *et al.*, 2016; ACEVEDO *et al.*, 2016; KOPPELSTAETTER *et al.*, 2010). Em nossa investigação, apesar do excesso de lipídeo na dieta de cafeteria, independente da dose de cafeína, ter contribuído para menor ingestão total de dieta, durante as dezessete semanas, a cafeína nas duas doses contribuiu para aumentar o consumo energético e conseqüentemente diminuição do ganho de peso dos animais (principalmente na dose de 50 mg/kg). Por outro lado, ao analisar o grupo de animais que recebeu a dieta padrão, apesar da ingesta total nesse mesmo período ter aumentado, esses animais apresentaram menor gasto energético e menor ganho de peso, comparado aos demais grupos de estudo. Esses achados apontam o potencial termogênico da cafeína sobre o metabolismo dos lipídeos. Alinhado a esse perfil de resposta, Jeffrey *et al.*, (2017) ressaltaram que a cafeína, ao favorecer o catabolismo de ácidos graxos como substrato energético, predispõe ao aumento do dispêndio energético (BOOZER *et al.*, 2002; JEFFREY *et al.*, 2017). De acordo com Harpaz *et al.*, (2017), um dos mecanismos que justificam essa ação da cafeína é seu antagonismo por receptores da molécula de adenosina. A cafeína compete pelo sitio ativo dessa molécula e, uma vez que ela se liga a esses receptores desencadeia uma cascata de reações cujo produto final é a liberação de catecolaminas, um dos principais moduladores internos da lipólise. Nesse processo ocorre o aumento de AMP cíclico intracelular com ativação da enzima lipase lipoprotéica, proporcionando hidrólise do triacilglicerol em ácidos graxos armazenado nos adipócitos (DIEPVENS *et al.*, 2007).

Uma consequência direta do processo de hidrólise do triacilglicerol é a liberação de lipoproteínas para corrente sanguínea, causando um desequilíbrio da concentração plasmática desses lipídeos (triglicerídeos, colesterol total, LDL e HDL) (PANCHAL *et al.*,

2012; HARPAZ *et al.*, 2017). De acordo com Harpaz *et al.*, (2017), esse processo pode ser desencadeado pela ação neuroendócrina devido ao uso crônico da cafeína. Em nossa investigação, apesar da cafeína em ambas as doses não ter contribuído para aumento de LDL e do triacilglicerol, no grupo que recebeu dieta padrão, os níveis de colesterol total, na maior dose, foram significativamente aumentados, comprovando o efeito da lipólise da cafeína sobre esse lipídeo. Li *et al.*, (2015) ao evidenciam aumento dos níveis de colesterol, além de triglicerídeos e LDL séricos no soro de ratos Wistar tratados com dieta padrão e cafeína na dose de 120 mg/kg durante o período pré-natal, justificou que essa substância foi capaz de influenciar a homeostase do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal com consequente aumento da liberação de lipídeos para a corrente sanguínea. Apesar desse achado, vimos que nenhuma das doses de cafeína foram eficazes em causar esse mesmo efeito, principalmente nos animais que receberam a dieta de cafeteria rica em lipídeos. Contrariamente, os níveis de LDL foram significativamente diminuídos na maior dose de cafeína (50 mg/kg) comparado a menor dose (10 mg/kg). Esse resultado pode ser sugestivo de uma ação protetora da associação da dieta de cafeteria e cafeína. Apesar da escassez de estudos, com abordagem metodológica similar a presente investigação que comprove tal hipótese, LIU *et al.*, (2017) evidenciou efeito inibitório da cafeína, associado ao uso de catequina (fitonutriente da família dos polifenóis com efeito antioxidante) sobre a evolução da aterosclerose, com consequente inativação do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), liberado durante a aterogênese e supressão da expressão de receptor de macrófago endotelial vascular (LOX-1) reduzindo a inflamação no endotélio e consequentemente a formação de placa aterogênica.

Em relação aos níveis séricos de colesterol HDL, apesar da cafeína em ambas as doses e independente da dieta ter contribuído para elevação dessa lipoproteína, comparado ao controle da dieta padrão, a relação LDL/HDL em todos os grupos experimentais tendeu para prevenir a queda do HDL. De fato, estudos tem apontado uma complexidade no perfil de resposta da relação LDL/HDL em modelo experimental (Li *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2017). Surpreendentemente, na presente investigação, os animais do grupo controle da dieta de cafeteria apresentaram níveis elevados de HDL, comparado aos animais do grupo controle da dieta padrão. Corroborando com esse achado, Higa *et al.*, (2014) apontou que apesar da dieta de cafeteria predispor ao aumento do perfil lipídico sérico, nem sempre isso ocorre em detrimento da queda dos níveis de HDL. Somado a esse fato, devido ao excesso de lipídeos predispor agressão ao organismo (ZEENI *et al.*, 2013), acredita-se que a quantidade de gordura consumida, pelos animais na presente investigação, não foi suficiente para vencer a

capacidade homeostática destes, apesar do ganho de peso em todos os grupos experimentais, e assim alterando o balanço da relação LDL/HDL em favor do LDL.

Isoladamente, o excesso de lipídeos séricos e uso de cafeína tem sido relacionado com o comprometimento da homeostase de células do tecido ósseo, com impacto negativo para organização da arquitetura celular e conseqüentemente para o perfil de resposta das propriedades de carga máxima, deslocamento e rigidez do osso (HE *et al.*, 2012; GUAN *et al.*, 2018). Considerando esses achados, acreditávamos que a associação da dieta rica em lipídeos e cafeína fosse potencialmente danosa para manutenção da integridade desse tecido. Curiosamente, essa hipótese não foi confirmada e a associação da dieta de cafeteria, em ambas as doses de cafeína, parece ter favorecido um mecanismo de proteção em relação ao aumento da carga máxima imposta ao osso e maior rigidez a ação de forças externas, superando as mudanças internas em relação a carga imposta. Corroborando com esses achados, Brun *et al.* (2015), ao avaliar o efeito da administração de erva mate (contendo 50 mg/kg/ cafeína) a ratas Wistar durante a gestação, observou intensa atividade das células osteoprogenitoras de sua prole relacionado ao aumento da fosfatase alcalina, enzima fundamental para ativação dos osteoblastos, que resulta em uma maior síntese de colágeno tipo I, aumento da osteocalcina, sialoproteínas, osteopontina, fundamentais na mineralização da matriz óssea. Apesar de não termos quantificado as proteínas colagenosas das tíbias dos animais experimentais, elas estão diretamente relacionadas ao módulo rigidez e carga máxima podendo ter contribuído para maior resistência óssea, evidenciada em nossa investigação. Associado a esse fato, Morgan *et al.*, (2014), afirma que o tecido ósseo é formado principalmente por fosfato de cálcio, sendo dependente da matriz orgânica de colágeno que constitui um molde de deposição de conteúdo mineral ósseo formando uma malha tridimensional e organizada, que confere ao tecido propriedades de resistência as solicitações mecânicas impostas. Outro fator que pode ter contribuído para maior rigidez e resistência óssea foram os níveis de HDL. De fato, Soares *et al.* (2012) ressaltou que altos níveis dessa lipoproteína têm sido associados a um dos possíveis mecanismos de proteção das células do tecido ósseo com impacto para a manutenção da integridade de propriedades mecânicas e morfométricas.

Outro fato que contribui para integridade da matriz orgânica óssea e conseqüentemente para melhora do módulo rigidez é o equilíbrio da biodisponibilidade de íons Ca^{+2} e P, elementos essenciais para manutenção da mineralização do tecido ósseo. A homeostase desses íons é realizada por estímulo hormonal (ex: paratormônio (PTH) e calcitrol) que pode ser influenciada pela ação isolada da cafeína e ou dos lipídeos

predispondo, dessa forma, ao desencadeamento de doenças ósseas, como a osteoporose (ZHAO *et al.*, 2017; SHANGGUAN *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019). Na presente investigação, o uso crônico da cafeína, na dose de 10mg/kg, associado a ingestão da dieta rica em lipídeos, contribuíram para redução drástica do percentual de Ca^{+2} e P nos ossos dos animais experimentais, comparado aos demais grupos de estudo. No entanto, para essa mesma dose de cafeína, associada a dieta padrão, os níveis desses minerais mantiveram valores significativamente elevados. Esse perfil de resposta aponta a contribuição danosa dos lipídeos, além da cafeína na dose de 10mg/kg, sobre a biodisponibilidade desses minerais nas tíbias desses animais. Um padrão diferencial de resposta, em nossa investigação, foi observado em relação ao P, o qual mostrou uma queda significativa, dependente da dose associado a dieta padrão e na menor dose de cafeína associado a dieta de cafeteria. Curiosamente, a associação de 50 mg/kg de cafeína e dieta de cafeteria contribuiu para o reestabelecimento do percentual de Ca^{+2} , comparado ao controle G1, além de favorecer elevação significativa dos níveis de P. Acredita-se que esse perfil de resposta, para essa dose de cafeína, tenha refletido um mecanismo de proteção das células do tecido ósseo para minimizar a perda da densidade mineral. Apesar de não termos quantificado os hormônios relacionados a homeostase de Ca^{+2} e P em nível plasmático, LU, *et al.* (2013) apontou que a cafeína pode interagir no equilíbrio mineral ósseo através da excitabilidade do sistema nervoso autônomo simpático, exacerbando as respostas do PTH em células ósseas com consequente degradação da matriz. Associado a esse fato, o PTH age no sistema renal e intestinal limitando a absorção de cálcio e fósforo e consequentemente reduzindo a deposição desses minerais no tecido ósseo. Adicionalmente, Song, *et al.* (2015) ao analisarem o impacto da dieta rica em lipídeos sobre os níveis de PTH séricos, em ratos alimentados com dita hiperlipídica por 10 semanas, constatou que a elevação desse hormônio foi preponderante em reduzir os níveis plasmáticos de calcitrol (1,2 (OH) 2 D3), um dos principais responsáveis pela manutenção do equilíbrio do conteúdo mineral de cálcio e fósforo no tecido ósseo. Esses autores ressaltaram ainda que a insuficiência dos níveis plasmáticos de calcitrol, contribui para reduzir a absorção intestinal e renal de cálcio, predispondo a maior ativação das células osteoclásticas, com consequente redução tanto do Conteúdo Mineral Ósseo (CMO) de cálcio e fósforo quanto da Densidade Mineral Óssea (DMO).

Além da relevância da biodisponibilidade dos íons Ca^{+2} e P para homeostase do tecido ósseo, tem sido sugerido que outros oligoelementos como Mn, Cu, Zn, Se, Mg e S são primordiais para manutenção da atividade metabólica das células e consequentemente auxiliam na preservação da integridade do tecido ósseo (ODABASI *et al.* 2008). Apesar desse

fato, a dinâmica da interação desses oligoelementos e o mecanismo através do qual eles mantem esse perfil de resposta, no tecido ósseo, são pobremente compreendidos. Em nossa investigação, a cafeína na dose de 10 mg/kg, associado a dieta de cafeteria, contribuiu para diminuição significativa dos elementos químicos Mn, Cu e Zn, comparado ao grupo que recebeu a mesma dose de cafeína associado a dieta padrão e aos demais grupos experimentais, sugerindo a contribuição dos lipídeos da dieta para esse perfil de resposta. Corroborando com esses achados, Aslam *et al.* (2016) ao analisarem o perfil de reabsorção óssea em camundongo machos C57BL/6, alimentados com dieta high fat ou dieta padrão e suplementados com um mix de microminerais, por um período de 18 semanas, mostrou que aqueles animais que receberam a dieta rica em lipídeos apresentaram uma perda mais acelerada dos elementos químicos Se, B, Zn, Mn e Mg com impacto negativo para densidade mineral óssea da tíbia e fêmur, comparado aos animais que receberam dieta padrão. Os mecanismos por meio do qual essa interação ocorreu não foram discutidos.

Apesar dos lipídeos da dieta ter contribuído para perturbação da dinâmica desses elementos químicos no tecido ósseo, o percentual de enxofre foi proporcionalmente aumentado nos grupos de dieta padrão associado a maior dose de cafeína (G3), no controle da dieta de cafeteria isoladamente e associado a menor dose de cafeína (G4 e G5). Em geral, esse elemento químico tem sido positivamente relacionado com o processo de crescimento animal, sendo essencial para composição de aminoácidos sulfurados, manutenção da funcionalidade dos grupos SH durante o processo de respiração celular e como componente da biotina, tiamina, coenzima A e insulina (DONKELAAF *et al.*, 2007). Esses autores levantam ainda a hipótese da relevância do enxofre em áreas hipertróficas de cartilagens e no processo de maturação dos condrócitos nos discos epifisários durante o processo de crescimento. Não foram encontrados nenhum estudo relacionando diretamente o percentual desse elemento químico com o metabolismo das células ósseas.

O distúrbio na dinâmica dos elementos químicos, também pode refletir negativamente para manutenção das dimensões estruturais dos ossos longos. Tan *et al.*, (2012) ao administrar 120 mg/kg de cafeína por via intragástrica em ratas durante o período gestacional e analisar a prole, detectou toxicidade do crescimento ósseo com inibição da síntese da matriz extracelular em placas de crescimento e consequentemente alteração na largura distal, proximal, comprimento e peso dos ossos longos. Apesar desse achado, em nosso estudo nenhuma das doses de cafeína proporcionaram alteração morfométrica para esses parâmetros macroscopicamente, no entanto, a relação da densidade óssea/medular e a

microestrutura do tecido ósseo foram sistematicamente alterados entre os diferentes grupos de estudo.

Tem sido preconizado que tanto as dietas de cafeteria quando uso de cafeína, isoladamente, podem ser prejudiciais à microestrutura das trabéculas ósseas, alterando parâmetros estereológicos consistentes com separação trabecular (Tb.Sp), densidade volumétrica da medula (V^*), volume da medula (Vv), densidade superficial das trabéculas (Sv), volume da medula óssea (Vv medula), densidade volumétrica do osso (Vv osso), largura trabecular (Tb. Wi) (PATSCH *et al.*, 2011; FUJITA *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2013; YAN *et al.*, 2015; CHOI *et al.* 2016).

Considerando o efeito isolado sobre o tecido ósseo, relatado com o uso dessas substâncias, esperávamos que quando associadas o mecanismo de reabsorção óssea fosse potencializado. Curiosamente, a dose de 10 mg/kg de cafeína independente da dieta e a dose de 50 mg/kg associada a dieta rica em gordura, apesar de terem contribuído para alteração significativa desses parâmetros, esses grupos de estudo apresentaram perfil de resposta similar. De acordo com Choi *et al.* (2015), o excesso e conseqüentemente o acúmulo de lipídeos relaciona-se a um mediador da perda óssea favorecendo a redução da qualidade medular e trabecular. Isso ocorre devido ao processo de oxidação lipídica, no microambiente medular, com conseqüente efeito lipotóxico favorecendo redução da troca de metabolitos com aumento de citocinas inflamatórias e distúrbio do balanço de osteoblasto/osteoclasto. Esse efeito danoso do lipídeo parece ter sido contornado com o uso da cafeína, principalmente na maior dose. De acordo com Karts *et al.*, (2011) esse fato pode ser justificado devido a ação da cafeína sobre ativação de receptores de adenosina em osteoblastos (A1R) com conseqüente ativação de células osteoprogenitoras minimizando a intensificação do processo de reabsorção óssea

Conclusão:

Os principais achados da investigação, evidenciaram que a associação da dieta de cafeteria e a cafeína em ambas as doses, foram capazes de alterar os parâmetros da arquitetura trabecular e medular óssea, no entanto, a associação nas análises biomecânicas da tíbia, foram benéficas, evidenciando um tecido ósseo, mais resistente a fraturas. Contudo, a quantificação dos elementos químicos ou microminerais na associação da dieta de cafeteria na menor dose de cafeína, demonstrou redução significativa. A menor dose da cafeína associada ou não a dieta de cafeteria evidenciou ter ações malélicas no tecido ósseo. Além disso, a cafeína teve seu efeito termogênico e lisogênico nas análises bioquímicas e ganho de peso. Os resultados

encontrado foram conflituosos sendo necessário mais estudos sobre a associação da dieta de cafeteria em doses diferentes de cafeína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, J. *et al.* Caffeine stimulates locomotor activity in the mammalian spinal cord via an A1/D1 receptor and PKA-dependent mechanisms. **Neuropharmacology**, v.101, p. 490-505, 2016.
- ADDICOTT, M7. A. A. Comparison of the effects of caffeine following abstinence and normal caffeine use. **Psychopharmacology**, v. 207, n. 3, p. 423-31, 2009.
- ANGELANTONIO, D. *et al.* Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. **JAMA**, v.11, n. 302, p.193-2000, 2009.
- ANNEMA W, TIETGE, E, J. Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies. **Nutrition Metabolism**, v.9, n.25, 2012.
- AKHTER, M, P. *et al.* Bone biomechanical properties in prostaglandin EP1 and EP2 knockout mice. **Bone**, v. 29, p.121-125, 2001.
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. *Statistical Methods in Medical Research*. Oxford: **Blackwell Science**. 3^a ed., 1994.
- ASLAN, M.N. *et al.* Bone structure and function in male C57BL/6 mice: Effects of a high-fat. **Bone Reports**, v. 5, 141-149, 2016.
- BAHNEY, C. S. *et al.* Cellular biology of fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v.37, n.1 p.35-50, 2018.
- BARONE, J. J. *et al.* Caffeine consumption. **Food and chemical toxicology**, v. 34, p. 119-129, 1996.
- BAYOL, A. S. *et al.* A maternal "Junk Food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat Offspring. **Endocrinology**, v.151, p.1451-146, 2010.
- BERRAONDO, B MARTINEZ, J. A. Free fatty acids are involved in the inverse relationship between hormone-sensitive lipase (HSL) activity and expression in adipose tissue after high-fat feeding or beta3-adrenergic stimulation. **Obesity Research**, v.3, n.8, p.255-261, 2000.
- BOOZER, C. N. *et al.* Herbal ephedra caffeine for weight loss: a 6-month randomized safety and efficacy trial. **International Journal of Obesity**, v. 26, p.593-604, 2002.
- BOUXSEIN, M.L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, n.25, p. 1468-1486, 2010.
- BRUN, L. R. *et al.* Effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on histomorphometry, biomechanics, and densitometry on bones in the rat. **Calcified Tissue International**, n.97, v.5, p. 527-34, 2015.
- CANALIS, E. *et al.* Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. **Endocrine reviews**, n.24, v.2, p.218-35, 2003.

CAMPBELL, D.T. STANLEY, J.C. Experimental and quasi-experimental designs for research. **Published by Rand McNally & Company**, 1963.

CARPENTER, K. J. The concept of an “appetite quotient” for the interpretation of ad libitum feeding experiments. **The Journal of Nutrition**, v.51, p.435-440, 1953.

CERVATO, A. M. *et al.* Habitual diet and cardiovascular disease risk factors. **Revista de Saúde Pública**, v.31, p. 227-235,1997.

CHOI, H. *et al.* The effects of a high fat diet containing diacylglycerol on bone in C57BL/6J mice. **Yonsei Medical Journal**, v. 56, n. 4, p. 951-960, 2015.

CHOI. Y, Y. *et al.* Peripubertal caffeine exposure impairs longitudinal bone growth in immature male rats in a dose- and time-dependent manner. **Journal of Medicinal Food**, v.19, n. 13, p. 73-84, 2016.

CHOU DHURY, R. C.; PALO, A. K. Modulatory effects of caffeine on methotrexate-induced cytogenotoxicity in mouse bone marrow. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v.15, p.79-85, 2004.

CLEMENS, T. *et al.* The Osteoblast: An insulin target cell controlling glucose homeostasis. **Journal Bone and Mineral Research**, v. 26, n.4, p. 677-680, 2010.

CRUZ-ORIVE, L.M. *et al.* Estimating neuron dendritic length in 3D from total vertical projections and from vertical slices. **Acta Neurologica Scandinavica-Suppl**, v. 137, p.14-19, 1992.

CUI, L. *et al.* Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. **Bone**, v.87, p.147-58, 2016.

DIEPVENS, K. *et al.* Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.292. p. 77-85, 2007.

DONKELAAR. C. C. Distinct developmental changes in the distribution of calcium, phosphorus and sulphur during fetal growth-plate development. **Journal of Anatomy**. v. 210, n. 2, p. 186–194, 2007.

DUARTE, P. M. *et al.* The effects of caffeine administration on the early stage of bone healing and bone density. A histometric study in rats. **Archives of Oral Biology**, v.54, p.717-722, 2009.

EGAN, K. P. *et al.* Bone histomorphometry using free and commonly available software. **Histopathology**, n.61, p.1168-1173, 2012.

FERRON, M. *et al.* Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy metabolism, **Cell**, n.142, n.2, p. 296-308, 2010.

FUITA, Y. *et al.* Serum leptin levels negatively correlate with trabecular bone mineral density in high-fat diet-induced obesity mice. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 12, p.84-94, 2012.

FULZELE, K. *et al.* Loss of Gsa in osteocytes leads to osteopenia due to sclerostin induced suppression of osteoblast activity. **Bone**, v.117, p.138-148, 2018.

GORI, F. *et al.* The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. **Endocrinology**, v. 141, n. 12, p. 4768-4776, 2000.

GUAN, D. *et al.* Diet-Induced Circadian Enhancer Remodeling Synchronizes Opposing Hepatic Lipid Metabolic Processes, **cell**, v.174, n.4, p.831-842, 2018.

HARPAZ, E. *et al.* The effect of caffeine on energy balance. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 28, p. 1, p. 1-10, 2017.

HE, W.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine A1 receptor regulates osteoclast formation by altering TRAF6/TAK1 signaling. **Purinergic Signal**, v.8, n.2, p. 327-337, 2002.

HELAHI, M. M. *et al.* Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. **British Journal of Nutrition**, v.102, p.514-519, 2009.

HESSLE, L, *et al.* The Skeletal Phenotype of Chondroadherin Deficient Mice. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-11, 2013.

HILDEBRAND, A. *et al.* New method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. **Journal of Microscopy**, v. 185, p.67-75, 1997.

HUANG, T. H. *et al.* Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, p.300-307, 2003.

JEFFREY, M. *et al.* An Adipokine With Central Importance in the Global Obesity Problem. **Review**, v.13, p.113-127, 2018.

JUNQUEIRA, U. L. C.; JUNQUEIRA, S. M. M. L. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia – **São Paulo Editora Santos**, 1983.

KATZ, S. *et al.* Activation of the PI3K/Akt signaling pathway through P2Y2 receptors by extracellular ATP is involved in osteoblastic cell proliferation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n.51, v. 3, p.144-152, 2011.

KIM, Y. K. *et al.* Capturing microscopic features of bone remodeling into a macroscopic model based on biological rationales of bone adaptation. **Biomech Model Mechanobiol**, v.16, n.5, p.1697-1708, 2017.

KNESER, U. *et al.* Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.10, n.1, p.7-19, 2006.

KNOWLES, H. J. Hypoxic regulation of osteoclast differentiation and bone resorption activity. *Collection*, v.11, n.3, p.73-82, 2015.

KOPPELSTAETTER, F. *et al.* Caffeine and cognition in functional magnetic resonance imaging. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.20, p.71-84, 2010.

KWAK, Y. *et al.* The Effects of Caffeine on the Long Bones and Testes in Immature and Young Adult Rats. **Toxicological Research**, v. 33, n. 2, p. 157-164, 2017.

LAMMERS, A. R. *et al.* The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. **Acta Anatomica**, v.4, n.162, p.199-208, 1998.

LANGE, V. *et al.* The Association between Bone Quality and Atherosclerosis: Results from Two Large Population-Based Studies International. **International Journal of Endocrinology**, p. 1-9, 2017.

LEE, N. K. *et al.* Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v. 10, n.3, p. 456-469, 2007.

LI, J. *et al.* Gender-specific increase in susceptibility to metabolic syndrome of offspring rats after prenatal caffeine exposure with post-weaning high-fat diet. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 284, n.3, p.345-53, 2015.

LI, D. L. Abnormal intracellular calcium homeostasis in sympathetic neurons from young prehypertensive rats. *Hypertension*, v. 59, n.3, p. 642-649, 2012.

LIU, L. *et al.* Effects of catechins and caffeine on the development of atherosclerosis in mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.81, n.10, p.1948-1955, 2017.

LIU, S. H. *et al.* Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. **Journal Orthopedic Research**, n.122, v.29, p.954-960, 2011.

LÓPEZ-GONZÁLES, L. M. *et al.* Acute caffeine supplementation in combat sports: a systematic review. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v.15, n. 60, p. 1-11, 2018.

LOU, Y. *et al.* Oral administration of caffeine during voluntary exercise markedly decrease tissue fat and stimulates apoptosis and cyclin B1 in UVB treated skin of hairless p53-knockout mice. *Carcinogenesis*, v. 31, p.671-678, 2010.

LOVALLO, W. R. Caffeine stimulation of cortisol secretion across the waking hours in relation to caffeine intake levels. **Psychosomatic Medicine**, n. 67, v.5, p.734-9, 2005.

LU, P. Z. *et al.* Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. **International Journal Molecular**, v. 9, p.698-718, 2008.

LU, M. *et al.* Inhibition of Parathyroid Hormone Secretion by Caffeine in Human Parathyroid Cells. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, n. 98, v. 8, p.1345-1135, 2013.

- MAKOVEY, J. *et al.* Association between serum cholesterol and bone mineral density, **Bone**, v. 44, p. 208-213, 2009.
- MOTLY, K. *et al.* Bone and glucose metabolism: a two-way street. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 503, p. 2-10, 2010.
- MORGAN E, F. Vascular development during distraction osteogenesis proceeds by sequential intramuscular arteriogenesis followed by intraosteal angiogenesis. **Bone**, v.51, n.3, p.535-545, 2012.
- NEHLIG, A. *et al.* Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n.4, p.563-76, 1999.
- NOVAES, R. D, *et al.* Trypanosoma cruzi infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovascular Pathology**, v.22, n.4, p.270-279, 2013.
- NOVELLI, E. L. B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v.1, n.41, p.111-119, 2007.
- ODABASI, E. *et al.* Magnesium, zinc, copper, manganese and selenium levels in postmenopausal women with osteoporosis: can magnesium play a key role in osteoporosis? **Annals Academy of Medicine Singapore**, v. 37, p. 564–567, 2008.
- OLCHOWIK, G. *et al.* The influence of caffeine on the biomechanical properties of bone tissue during pregnancy in a population of rats. **Folia Histochemica et cytobiologica**, v. 49, n. 3, p. 504-511, 2011.
- PANCHAL, S. K. *et al.* Quercetin Ameliorates Cardiovascular, Hepatic, and Metabolic Changes in Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **The Journal of Nutrition**, v.142, n.6, p.1026-1032, 2012.
- PASMAN, W. *et al.* The effect of different dosages of caffeine on endurance performance time. **International Journal of Sports Medicine**, v. 16 p. 225-230, 1995.
- PARASURAMAN, A. *et al.* Perceived service quality as a customer- based performance measure: An empirical examination of organizational barriers using an extended service quality model. Human Resource Management. **Special Issue: Performance Measurement and Management**, v. 30, n.3, 1991.
- PATSCH, J. M. *et al.* Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity. **Metabolism**, v. 60, n. 2, p. 243-249, 2011.
- POLLOCK, N. K. *et al.* Lower uncarboxylated osteocalcin concentrations in children with prediabetes is associated with beta-cell function. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 96, e1092-e1099, 2011.
- POUNDARIK, A. A. *et al.* Biomolecular regulation, composition and nanoarchitecture of bone mineral. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1191-1198, 2018.

QIAN, Y. *et al.* Natural bone collagen scaffold combined with OP-1 for bone formation induction in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.90, p.778-788, 2009.

RAMOS-JUNIOR, E. S. *et al.* Adipokine Chemerin Bridges Metabolic Dyslipidemia and Alveolar Bone Loss in Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.32, n.5, p. 974-984, 2017.

RAYAMAMAN, N. M. *et al.* TIEG1 is upregulated in Lrp5/6- mediated valve osteogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, p.1-5, 2018.

REIS, A. M. S. *et al.* Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 16, n.10, p. 1-11, 2015.

HIGA, T. S. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology**, v.6, n.1, p.47-54, 2014.

REYES, D *et al.* Interaction of dietary fat intake with APOA2, APOA5 and LEPR polymorphisms and its relationship with obesity and dyslipidemia in young subjects. **Lipids in Health and Disease**, v.14, n. 106, p. 1-10, 2015.

REYES, A. The Clinical Pathophysiology of chronic systemic sclerosis. **Federal Practitioner**, v. 35, n.5, p.36-43, 2018.

ROSINI, T. C. *et al.* Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.58, p. 383-387, 2012.

PRAKRIYA, M. *et al.* Store-Operated Calcium Channels. **Physiological Reviews**. v. 95, n. 4, p. 1383–1436, 2015.

RUESTEN, A. V. Diet and risk of chronic diseases: results from the first 8 years of follow-up in the EPIC-Potsdam study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.67, p. 412-419, 2013.

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, p. 1109-1117, 2011.

SANTOS, R. D. *et al.* Clinical and molecular aspects of familial hypercholesterolemia in Ibero-American countries. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 1, n.11, p.160-166, 2017.

SCHNEIDER, C. A. *et al.* NIH Image to Image J: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, n.9, p.671-675, 2012.

SCHWENK, R. W. *et al.* Genetic and epigenetic control of metabolic health. **Molecular Metabolism**, v.2, p. 337-347, 2013.

SEQUETTO, P. L. *et al.* Low Doses of Simvastatin Potentiate the Effect of Sodium Alendronate in Inhibiting Bone Resorption and Restore Microstructural and Mechanical Bone

Properties in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. **Microscopy and Microanalysis**, n.23, p. 989-1001, 2017.

SHAMSUZZAMAN, S. *et al.* Deletion of a distal RANKL gene enhancer delays progression of atherosclerotic plaque calcification in hypercholesterolemic mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.118, n.12, p.4240-4253, 2017.

SHANGGUAN, Y. *et al.* Intrauterine programming of Glucocorticoid–Insulin-Like Growth Factor 1 axis– mediated developmental origin of osteoporosis susceptibility in female offspring rats of prenatal caffeine exposure. **The American Journal of Pathology**, n.17, v.31, p.122-127, 2018.

SHEM, C-L., *et al.* Green Tea Polyphenols Improve Bone Microarchitecture in High-Fat-Diet–Induced Obese Female Rats Through Suppressing Bone Formation and Erosion Chwan-Li Shen. **Journal of medicinal food**, v. 16, n. 5, 421-427, 2013.

SILVA, M. J. *et al.* Effects of high-fat diet and body mass on bone morphology and mechanical properties in 1100 advanced intercross mice. **Journal Bone Mineral Research**, n. xx, v. 32, p.1-16, 2019.

SOARES. E, A. *et al.* Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in low-density lipoprotein receptor gene knockout mice. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 30 p,419-425, 2012.

SONG, Q. *et al.* High vitamin D and calcium intakes increase bone mineral (Ca and P) content in high-fat diet-induced obese mice. **Nutrition Research**, n.35, n.2, p.146-154, 2014.

SU, P. Z. *et al.* Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 4, p.429-436, 2013.

SWEENEY, P. *et al.* Caffeine increases food intake while reducing anxiety-related behavior. **Appetite**, v. 101, p. 171-177, 2016.

TAN, Y. *et al.* Caffeine-induced fetal rat overexposure to maternal glucocorticoid and histone methylation of liver IGF-1 might cause skeletal growth retardation. **Toxicology Letter**, v.204, p.279-287, 2012.

TEILELBAUM, L. S. *et al.* Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature**, v.4, p. 638-649, 2003.

TINTUT, Y. *et al.* Effects of bioactive lipids and lipoproteins on bone. **Trends Endocrinology Metabolism**, v.25, n. 2, p. 53-59, 2007.

TREVISAN, F. T. T. *et al.* Biomechanical adaptations of mice cortical bone submitted to three different exercise modalities. **Acta Ortopédica Brasileira**, n.6, p. 328-332, 2013.

TSUANG, Y. H. *et al.* Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 1, n. 7, p. 1-7, 2006.

TURNER, C. H. *et al.* The effects of fluoridated water on bone strength. **Journal Orthopedic Research**, v. 10, p. 581-587, 1992.

WIHASTUTI, T. A. *et al.* Effect in lowering insulin resistance and aortic tissue inflammation at type 2 diabetes mellitus journal of applied pharmaceutical. **Science**, v. 7 n.12, p. 110-115, 2017.

WONG, S. K. *et al.* Osteoporosis is associated with metabolic syndrome induced by highcarbohydrate high-fat diet in a rat model. **Biomedicina & Pharmacotherapy**, v. 98 p. 191-200, 2018.

WU, L. *et al.* Caffeine inhibits hypothalamic A1R to excite oxytocin neuron and ameliorate dietary obesity in mice. **Nature Communications**, 8:15904, p. 1-16, 2017.

YAN, L. *et al.* Effects of voluntary running and soy supplementation on diet-induced metabolic disturbances and inflammation in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.9373-9379, 2013.

ZANG, Q. *et al.* Fibroin based porous materilas. **Materials**, v. 2, p. 2276-2295, 2009.

ZEENI, N. *et al.* A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. **Stress**, v. 16, n. 2, p. 211-219, 2013.

ZHANG, Y. Caffeine and diuresis during rest and exercise: A meta-analysis. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v.18, n.5, p. 569-574, 2015.

ZHAO, J. G. *et al.* Association between calcium or vitamin D supplementation and fracture incidence in community-dwelling older adults. **JAMA**, v.318, n.24, p.2466-2482, 2017.