



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS AO
APARELHO LOCOMOTOR



RAPHAEL MARTINI VICENTE

**Avaliação do jejum intermitente na consolidação de fraturas em
ratos**

Ribeirão Preto

2023

RAPHAEL MARTINI VICENTE

**Avaliação do jejum intermitente na consolidação de fraturas em
ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de mestre em Ciências
junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor

Orientadora: Dra. Ariane Zamarioli

Ribeirão Preto

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vicente, Raphael Martini.

Avaliação do jejum intermitente na consolidação de fraturas em ratos. Raphael Martini Vicente; Ribeirão Preto, 2023. Orientadora: Dra. Ariane Zamarioli. Ribeirão Preto, 2023

106p.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Versão Original

1. Jejum intermitente. 2. Fraturas ósseas 3. Tecido ósseo. 4. Regeneração óssea

Esta dissertação foi redigida de acordo com as Diretrizes para a apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico impresso. Parte IV (Vancouver).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Raphael Martini Vicente

Avaliação do jejum intermitente na consolidação de fraturas em ratos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família, minha mãe Lizete, meu pai Jorge, minha irmã Larissa e meu padrasto Antônio. Obrigado por toda a formação que vocês puderam me proporcionar, somente através de muita luta.

Dedico à companheira Gislaine por todo o tempo comigo inclusive no isolamento social gerado pela pandemia de COVID-19.

Dedico aos amigos que perdi nessa pandemia. Nivaldo, Jorginho, Godoy, Sr. Nilton.

Dedico à Aisha, Ziggy e Gibinho, animais que Deus colocou no meu caminho neste período, e que me ajudaram mais do que os ajudei.

Dedico aos ratos que utilizei para a produção deste trabalho.

Agradecimientos

Agradeço a Deus pela minha vida e saúde sem as quais esse trabalho não seria possível.

À Universidade de São Paulo que tem me proporcionado a oportunidade de crescimento como homem em muitos aspectos.

À minha orientadora **Dra. Ariane Zamarioli** pelos ensinamentos, atenção, confiança, e partilha em época tão difícil e desafiadora a nós e às nossas famílias.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), e ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, em nome de seu coordenador **Prof. Dr. Luis Vicente Garcia**. Agradeço pela possibilidade de realização deste trabalho de mestrado. À **Rita de Cássia Stela Cossalter**, secretária do Programa de Pós-graduação, gratidão pela atenção, suporte e paciência.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), que através de um concurso público me abriu as portas do trabalho com ciência na Universidade de São Paulo. Agradeço também pelo apoio no incentivo à esse trabalho de mestrado.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, em especial a **Francisco Carlos Mazzocato** pela amizade e pelas conversas.

Aos colegas de pós-graduação **Roberta Shimano, Patricia San Gregório, Iara Botega, Suellen Albertini, Ana Clara Oliveira e Leonardo Rigobello**, pelas vivências e aprendizado compartilhados.

Ao professor **Dr. Adalberto Luiz Rosa** e em especial a **Adriana Luisa Gonçalves de Almeida** pela disponibilidade do Lab 3D BIO da FORP para as análises microtomográficas. Agradeço também à **Fabíola Singaretti de Oliveira** pelos ensinamentos. Gratidão a vocês pela amizade e pelo trabalho especial que fazem pela ciência, ao qual tenho muita admiração.

À professora **Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** da FORP, agradeço pela disponibilidade do laboratório de histologia e de biologia molecular. Em especial agradeço aos técnicos **Marco Antônio dos Santos, Nilza Letícia Magalhães e Arleti Aparecida Caramori**, que estiveram trabalhando comigo em uma época em que muitos laboratórios estiveram fechados devido a pandemia.

Ao professor **Dr. João Paulo Mardegan Issa** da FORP, e a **Dimitrius Leonardo Pitol** do Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), por seus ensinamentos e por cederem o microscópio para análises histológicas.

Ao professor **Dr. João Paulo Bianchi Ximenez**, pelo esclarecimento de dúvidas nas etapas de análise estatística.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"Carregamos todos, dentro de nós, as nossas masmorras, os nossos crimes e as nossas devastações. Mas nossa tarefa não é soltá-los pelo mundo, mas combatê-los em nós mesmos e nos outros." Albert Camus

RESUMO

RESUMO

Vicente, RM. **Avaliação do jejum intermitente na consolidação de fraturas em ratos.** Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023. 106p.

Com a preocupante e crescente prevalência de obesidade na população mundial, o jejum intermitente tem sido considerado como opção dietética por clínicos e pacientes. Historicamente a prática também tem sido utilizada em busca de benefícios, inclusive religiosos. Trabalhos em animais têm alegado benefícios cardiovasculares, neurológicos, entre outros. Em humanos também cresce o número de publicações relacionadas à dieta. Entretanto, há pouca informação na literatura que relacione os efeitos do jejum intermitente no tecido ósseo. Num contexto de aumento da expectativa de vida populacional, que implica importante prevalência de osteoporose e de fraturas ósseas, este trabalho avaliou em modelo animal possíveis consequências da prática de jejum intermitente na qualidade e na regeneração óssea. Em ensaio clínico randomizado, setenta e cinco ratos Wistar, de oito meses de idade, foram divididos em três grupos experimentais: (n=25/grupo): (1) Controle: ratos adultos submetidos à fratura óssea e com ração *ad libitum*; (2) Jejum intermitente em dias alternados pré-fratura: ratos submetidos ao jejum intermitente por dois meses desde antes da fratura óssea até o final do período experimental; (3) Jejum intermitente em dias alternados pós-fratura: os animais tiveram alimentação à vontade até o dia da cirurgia e começaram a fazer jejum intermitente em dias alternados no dia seguinte à fratura óssea. Ao final do experimento foram realizadas análises da arquitetura óssea, dos calos ósseos dos fêmures fraturados e dos fêmures íntegros contralaterais, por microtomografia computadorizada, densitometria óssea, histomorfometria e ensaio mecânico. Também foi avaliado o microambiente ósseo através de análises de imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase. Nossos resultados demonstraram que o jejum intermitente em dias alternados foi bastante eficiente para perda de massa corpórea dos animais que encontravam-se em sobrepeso e obesidade. As análises morfométricas puderam evidenciar que não houve prejuízos na regeneração óssea nos animais que realizaram jejum desde antes e nos que iniciaram jejum após a fratura. Contudo, o grupo que iniciou jejum pós-fratura teve prejuízo no volume cortical do osso íntegro, demonstrado em análise microtomográfica, sem piora em parâmetros como densidade mineral óssea ou rigidez no ensaio mecânico. Houve também menor expressão do gene *osterix sp7* nos grupos que jejuaram. Podemos concluir que é necessário prudência ao se considerar a adoção de uma estratégia de jejum em pacientes com fraturas ou outras condições patológicas do tecido ósseo, quando estes pacientes não praticaram a dieta anteriormente.

Palavras-chave: jejum intermitente; fratura óssea; regeneração óssea; tecido ósseo

ABSTRACT

Vicente, RM. **Intermittent fasting evaluation in rats bone healing.** Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto. University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School, 2023. 106p.

With the growing prevalence of obesity in the world population, intermittent fasting has been considered as a dietary approach option by clinicians and patients. Historically, the practice was also used to pursue benefits, including religious ones. Animal research has claimed cardiovascular and neurological benefits, among others. In humans, the number of publications related to the diet is also a growing trend, however, there is still little information in the literature relating to the influences of intermittent fasting on bone tissue. In the context of increasing life expectancy, which implies an important prevalence of osteoporosis and bone fractures, our work evaluated the possible implications of intermittent fasting on bone quality and regeneration in an animal model. In a randomized clinical trial, seventy-five eight-month-old Wistar rats were divided into three experimental groups: (n=25/group): (1) Control: adult rats subjected to bone fracture and fed *ad libitum*; (2) Each-other-day-fasting before fracture: rats underwent intermittent fasting for two months before a bone fracture; (3) Each-other-day-fasting after fracture: animals were fed *ad libitum* until the day of surgery and began intermittent fasting, with a 24-hour fasting, and 24-hour *ad libitum* food after the bone fracture. At the end of the experiment, analyses of the bone architecture of calluses of fractured femurs and intact contralateral femurs were carried out using microcomputer tomography, bone densitometry, histomorphometry, and mechanical testing. The bone microenvironment was also evaluated through immunohistochemistry and Polymerase Chain Reaction analyses. Our results demonstrated that intermittent fasting on alternate days was very efficient in losing body weight in animals that were overweight and obese. The morphometric analyses showed no losses in bone regeneration in animals that fasted before and in those that started fasting after the fracture. However, the group that started post-fracture fasting had a loss in the cortical volume of the intact bone, demonstrated in microtomographic analysis, without worsening in parameters such as bone mineral density or stiffness in the mechanical test. There was also a lower expression of the osterix sp7 gene in both groups that fasted. Prudence is necessary when considering the adoption of a fasting strategy in patients with fractures or other pathological conditions of the bone when these patients have not previously practiced the diet.

Keywords: intermittent fasting; bone fracture; bone healing; bone.

Lista de Figuras

Figura 1 - Linha do tempo experimental.	41
Figura 2 - Imagens radiográficas demonstrando a redução da fratura após cinco dias de cirurgia.	42
Figura 3. Definição da região de interesse (ROI) e diferenciação entre osso neoformado e osso cortical através de contraste (threshold 70-160).	44
Figura 4. Definição da região de interesse (ROI) para quantificação do osso trabecular (A) e osso cortical (B) no fêmur íntegro contralateral.	45
Figura 5 - Evolução da massa corporal desde o início do período experimental. A letra A indica o início do tratamento de jejum no grupo pré-fratura.	51
Figura 6 - Média de consumo diário de ração por animal.	51
Figura 7. Reconstruções tridimensionais das microtomografias dos fêmures fraturados, evidenciando a fratura na região diafisária.	53
Figura 8. Parâmetros morfométricos obtidos após análise por μ CT dos fêmures fraturados. Representação em boxplot.	54
Figura 9. Reconstruções do fêmur íntegro evidenciando osso trabecular em região metafisária distal. Corte no plano coronal.	55
Figura 10. Parâmetros morfométricos obtidos após análise por μ CT do osso trabecular dos fêmures íntegros. Representação em boxplot.	56
Figura 11. Parâmetros morfométricos obtidos após análise por μ CT do osso cortical dos fêmures íntegros. Representação em boxplot. Letras diferentes indicam diferença significativa. (ANOVA, $p < 0,05$)	57
Figura 12. Fotomicrografias de quadrantes de osso trabecular dos fêmures íntegros. Corte coronal. (Tricrômio de Masson 100x).	59
Figura 13. Fotomicrografias de luz polarizada de quadrantes do calo ósseo, evidenciando as fibras colágenas. Corte coronal. (Picro Sirius, 25x).	60
Figura 14. Fotomicrografias de coloração TRAP, evidenciando em vermelho atividade osteoclástica. Corte coronal. (TRAP, aumento de 50x).	61
Figura 15: Fotomicrografia de reações de imunohistoquímica em calo ósseo em regeneração, evidenciando marcações para OPG (aumento 100X, corte coronal). Da esquerda para a direita, grupo controle, jejum pré e jejum pós.	61
Figura 16: Fotomicrografia de reações de imunohistoquímica em calo ósseo em regeneração, evidenciando marcações para RANK (aumento 100X, corte coronal). Da esquerda para a direita, grupo controle, jejum pré e jejum pós.	62
Figura 17: Fotomicrografia de reações de imunohistoquímica em calo ósseo em regeneração, evidenciando marcações para RANK-L (aumento 100X, corte coronal). Da esquerda para a direita, grupo controle, jejum pré e jejum pós.	62
Figura 18: Quantificação de área marcada em cortes tratados com imunohistoquímica, representação em boxplot. Da esquerda para a direita OPG, RANK e RANK-L.	62
Figura 19. Expressão gênica relativa de marcadores de metabolismo ósseo nos fêmures íntegros e nos fraturados. Dados apresentados como média+desvio padrão. Marcações com nível de significância "p" representam diferença estatisticamente significativa.	63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Densitometria óssea. Dados expressos em média e desvio-padrão.	58
Tabela 2. Macroscopia óssea e ensaio mecânico.	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA: Análise de variância
ASBMR: *American Society for Bone and Mineral Research*
BV: volume ósseo total
BV/TV: Razão de volume ósseo pelo volume total de tecido
BS/BV: Razão de superfície óssea pelo volume ósseo
cDNA: DNA complementar
CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
Conn.D: Densidade das conexões intertrabeculares
Col.Ar/Tt.Ar: Razão de área de colágeno pela área total
Ct.V: Volume de osso cortical
Ct.Th: Espessura do osso cortical
Ct.Po: Porosidade do osso cortical
CMO: conteúdo mineral ósseo
Coll1a1: Gene Colágeno tipo 1, alfa 1a
Ct: *Cycle threshold*, do inglês ciclo limiar
cDNA: DNA complementar
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DXA: Densitometria óssea com dupla emissão de raios X
DMO: densidade mineral óssea
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
FORP: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Gapdh: Gene, do inglês, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
IC: *Intervalo de confiança*
Igf-1: Gene Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1
Gh: Hormônio do crescimento
JI: Jejum Intermitente
JIDA: Jejum intermitente em dias alternados
mRNA: RNA mensageiro
OPG: Osteoprotegerina
PBS: Solução salina fosfatada tamponada
PCR: Reação em cadeia da polimerase
pH: Potencial hidrogeniônico
RANK: Receptor do ativador do fator nuclear kappa-B
RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RNA: Ácido ribonucleico
Runx2: Gene do inglês, *Runt-related transcription factor 2*
SC: Subcutâneo
Sp7: Gene Fator de transcrição Sp7 ou *Osterix*.
St.N: Número de trabéculas ósseas

St.Th: Espessura das trabéculas ósseas

St.Sp: Espaçamento entre trabéculas ósseas

TGF- β : Fator transformador de crescimento beta

TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato

μ CT: Microtomografia computadorizada

USP: Universidade de São Paulo

Lista de Símbolos e Unidades

%: porcentagem

o: grau

°C: graus Celsius

μL: microlitro

μm: micrômetro

μ²: micrômetro ao quadrado

cm: centímetro

cm²: centímetro quadrado

g: grama

g/cm²: grama por centímetro quadrado

g/cm³: grama por centímetro cúbico

kV: quilovolt

mg: miligrama

mm: milímetro

mm/min: milímetro por minuto

mm²: milímetro quadrado

mm³: milímetro cúbico

n°/mm Número por milímetro

N: Newton

N/mm: Newton por milímetro

p: p-valor, nível descritivo ou probabilidade de significância estatística

rpm: rotações por minuto

x: *versus* (comparação)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	32
1.1 Jejum intermitente.	33
1.1.1 Métodos de jejum intermitente	33
1.1.2 Mecanismos metabólicos do JI e sua possível influência no tecido ósseo	34
1.1.3 Efeitos do jejum intermitente na consolidação óssea	35
2. OBJETIVO E HIPÓTESE	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. Modelo animal	40
3.2. Cirurgia	41
3.3. Eutanásia e análise osteometabólica	43
3.4. Análises macroscópicas de massa e comprimento	43
3.4.1. Microtomografia computadorizada (μ CT)	43
3.4.2. Densitometria óssea	45
3.4.3. Análise mecânica	45
3.5. Análises histológicas do microambiente ósseo	46
3.5.1 Histomorfometria	46
3.5.2 Imunohistoquímica	46
3.5.3 Expressão gênica por PCR	47
3.6. Análise estatística	48
4. RESULTADOS	50
4.1. Intercorrências	50
4.2. Evolução da massa corpórea e consumo alimentar durante o período experimental.	50
4.3. Microtomografia computadorizada (μ CT)	53
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.	81
APÊNDICE - Composição da ração comercial utilizada.	83
Manuscrito	85

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento da população mundial, doenças do aparelho locomotor como a osteoporose têm aumentado em incidência, chegando a índices de 21% de prevalência em pessoas acima dos 50 anos nos Estados Unidos (1, 2). Em pacientes idosos e com osteoporose, o risco e a incidência de fraturas ósseas também são aumentados (3).

Práticas dietéticas são classicamente propostas na prevenção e tratamento de diversas doenças. Entre estas, o jejum intermitente (JI) é uma estratégia de alimentação onde a ingestão de alimento é parcialmente ou totalmente restringida durante períodos de tempo determinados. Registros históricos que remontam a milênios, demonstram humanos realizando a prática na busca por benefícios físicos, mentais e religiosos (4). Num contexto mundial, em que estima-se a prevalência de obesidade em um bilhão de pessoas em 2030 (5), o JI tem se popularizado entre profissionais da saúde e pacientes. Além disso, é importante destacar que mais de um bilhão de pessoas praticam JI atualmente como orientação religiosa no Ramadan (6). Os estudos das implicações do JI se tornam, assim, de grande relevância em saúde pública.

Clinicamente, o uso de JI já tem sido proposto como coadjuvante no tratamento de alguns tipos de epilepsia, dano cerebral associado à convulsão e artrite reumatóide, por exemplo (7, 8, 9). Um destaque importante também, é o uso que já tem sido feito do JI como ferramenta na medicina veterinária e zootecnia, por exemplo na “muda forçada”, técnica utilizada pela indústria avícola para aumentar o período de produtividade e a qualidade de ovos de aves poedeiras. A técnica induz alterações hormonais e de metabolismo através do jejum de alimento por cinco a doze dias, produzindo melhora na produção e qualidade dos ovos de galinhas que já estavam em decadência reprodutiva (10).

Na última década houve grande repercussão com trabalhos publicados sobre JI nas revistas médicas de maior impacto no mundo. Alguns alegaram efeitos benéficos bastante impressionantes (11). Entretanto, críticas foram feitas a alguns desses trabalhos por seus métodos pouco padronizados ou resultados com evidências insuficientes (12).

Neste contexto, devido ao grande número de trabalhos e ao interesse crescente sobre o tema, meta-análises que estudam desfechos clínicos e marcadores metabólicos em humanos têm sido publicadas. Uma delas avaliou ensaios clínicos randomizados que compararam a influência da alimentação usual, dietas com jejum intermitente e dietas de restrição calórica

em desfechos de importância cardiovascular. Os autores concluíram que as dietas de jejum intermitente e de restrição calórica tradicional podem ser efetivas na redução de massa corpórea quando comparadas à alimentação *ad libitum* em humanos. Entretanto, as evidências de benefícios cardiovasculares mostraram-se insuficientes, com indicação de resultados inconclusivos e necessidade de novos estudos (12). Outra metanálise de trabalhos com jejum intermitente, associou a dieta ao tratamento de doença hepática gordurosa não alcoólica, a hepatopatia mais prevalente no mundo (13). Neste estudo, evidência de qualidade moderada a alta sugere que o JI pode melhorar desfechos substitutos relacionados ao fígado e promover perda de massa corpórea em adultos com a doença.

Apesar ainda da impossibilidade de consenso na indicação clínica de jejum intermitente, o trabalho de Wilkinson e colaboradores demonstrou melhora nos parâmetros metabólicos e cardiovasculares de pacientes com síndrome metabólica após a dieta. De forma importante, o trabalho destaca uma mudança na ingestão calórica conseguida em um grupo de indivíduos que já havia tentado sem sucesso outros tratamentos para perda de peso, como dieta tradicional de restrição calórica e prática de atividade física (14). Importante também para a medicina veterinária, com promessas para a medicina humana, são os trabalhos que indicam evidência de aumento na expectativa de vida de animais que tiveram regimes de restrição calórica em protocolos longos (15, 16, 17).

A comparação de JI com a restrição calórica clássica parece ser o foco do debate em indicação dietética para perda de massa corpórea. Apesar da metanálise de Zhang e colaboradores (18), que afirma que o JI foi superior à restrição calórica para perda de peso, a evidência de superioridade de uma dieta em relação a outra ainda é conflitante e mais estudos são necessários, principalmente para efeitos a longo prazo.

1.1 Jejum intermitente.

1.1.1 Métodos de jejum intermitente

No homem, diferentes métodos têm sido utilizados, desde jejuns curtos de doze horas, até jejuns que podem se prolongar por 40 dias com consumo mínimo de sucos ou alimentos de baixa caloria. O método mais utilizado em investigação científica tem sido o de jejum

intermitente em dias alternados (JIDA). Neste regime, os animais recebem ração à vontade durante um dia, e no próximo jejuam por 24 horas, com livre acesso à água. Este método permite um fácil manejo em situações de medicina veterinária e zootecnia, e tem sido o padrão mais utilizado para investigação de diferentes respostas em ratos e camundongos (9, 17,18). Entretanto, ainda se faz necessário avaliar a frequência e duração ideal desses regimes, tendo em vista o rápido metabolismo energético dessas espécies, o ritmo circadiano, respostas comportamentais, entre outros fatores. Apesar disso, a maioria dos estudos em animais adotam o JIDA como padrão para investigação metodológica (11).

1.1.2 Mecanismos metabólicos do JI e sua possível influência no tecido ósseo

De forma geral, em humanos, após pelo menos 10 a 14 horas de restrição energética temos a depleção das reservas de glicogênio no fígado. Inicia-se, então, nos adipócitos, a hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos livres. Estes são lançados na circulação sanguínea e chegam até os hepatócitos que produzem os corpos cetônicos acetoacetato e beta-hidroxiacetato que, em última instância, produzem energia a nível celular, na forma de adenosina trifosfato. Tanto os ácidos graxos livres, como os corpos cetônicos, são importantes moléculas de sinalização, atuando como gatilhos de respostas neuroendócrinas adaptativas e ativando fatores de transcrição que resultam na produção de proteínas com efeitos celulares em diversos órgãos do corpo. Essas mudanças promovem adaptações nas funções celulares, inclusive no metabolismo mitocondrial e nuclear. Sistemicamente, o organismo responde ao estímulo de jejum intermitente e de restrição calórica com redução dos processos anabólicos, e favorecimento dos sistemas de manutenção e reparo, ainda pouco investigados em animais e no homem (8, 11, 19, 20, 21).

Com relação aos efeitos do jejum intermitente no tecido ósseo ainda há escassez de estudos científicos, e diversas questões permanecem inconclusivas. Em estudo que avaliou a repercussão de dieta cetogênica associada ao JIDA por doze semanas, houve perda da massa óssea cortical, além de redução na resistência mecânica do tecido ósseo de membros posteriores de ratos (22). Bahijri e colaboradores (6), ao estudarem os efeitos do jejum na prática do Ramadan, hipotetizaram que o JI poderia ser benéfico à saúde do osso por modular a secreção de paratormônio em humanos. Barnosky e colaboradores, em estudo randomizado, concluíram que o jejum intermitente em dias alternados por seis meses não teve nenhum

impacto deletério nos marcadores de metabolismo ósseo em adultos obesos que tiveram moderada perda de peso (23). Em alguns poucos e limitados estudos a restrição calórica (RC), diferentemente do JI, pareceu reduzir a densidade mineral óssea (24). Com relação aos efeitos do jejum intermitente na consolidação óssea, não há publicação correlacionando a dieta à formação do calo pós-fratura.

1.1.3 Efeitos do jejum intermitente na consolidação óssea

O tecido ósseo é dinâmico e está em contínuo processo de remodelação, sendo reabsorvido por osteoclastos e neoformado por osteoblastos. A participação dos osteócitos também tem sido cada vez mais elucidada, e já é sabido que mecanismos de homeostase e remodelação óssea são orquestrados por essas células (25, 26).

A remodelação óssea é necessária também nos processos de consolidação de fraturas. É singular do processo de regeneração óssea a capacidade de reparo sem o desenvolvimento de uma cicatriz fibrosa. Isso define o processo de consolidação de fraturas como uma forma de regeneração tecidual. O tecido ósseo inicia seu processo de regeneração através de estágios e etapas complexas que incluem a atividade coordenada de diversos tipos celulares, citocinas e fatores de crescimento. Após a fratura, há formação de hematoma e o desencadeamento de resposta inflamatória, recrutamento de células-tronco mesenquimais, proliferação celular, angiogênese, condrogênese e osteogênese, no processo que dará origem ao calo ósseo. Os condrócitos produzem tecido cartilaginoso, formando o calo mole que, depois, sofre calcificação, torna-se mais resistente e protege o local fraturado. Segue-se a apoptose dos condrócitos e, simultaneamente, os osteoclastos começam a absorver tecido cartilaginoso mineralizado, desencadeando o processo de formação de tecido ósseo imaturo. Mais tarde, o processo de remodelação final trará estabilidade recuperando a anatomia e função óssea (27, 28, 29).

Autores prévios documentaram alterações na consolidação óssea de animais submetidos a restrições específicas na dieta, como por exemplo, vitamina D ou proteína (30, 31). Além disso, há evidência de que a restrição calórica seja deletéria na qualidade óssea e na regeneração óssea de ratos em crescimento. Esses resultados podem ser decorrentes da grande demanda energética e de nutrientes necessários ao processo de reparo ósseo (33). Também há

evidência que dietas com alto teor de gordura prejudiquem parâmetros de arquitetura óssea em camundongos (28).

O que diferencia o JI das dietas tradicionais de restrição calórica é o fato do JI envolver a limitação completa ou substancial de energia dentro de janelas temporais definidas, permitindo uma alimentação à vontade fora dessas janelas. Não há estudos que avaliaram especificamente o regime de jejum intermitente na consolidação óssea, já praticados antes de fratura ou iniciados após a fratura. A hipótese de benefícios do JI em outros sistemas e órgãos (34) poderia, por extrapolação, gerar a hipótese de que o JI atuaria no sistema ósseo e na regeneração óssea de forma diferenciada da RC tradicional.

Desta forma, justifica-se a execução do presente estudo para identificar os efeitos do jejum intermitente no tecido ósseo e na consolidação após fratura óssea. Especialmente, o estudo foi conduzido em ratos em senescência em decorrência da maior incidência de osteoporose e fraturas ósseas na população idosa.

*2. Objetivo e
Hipótese*

2. OBJETIVO E HIPÓTESE

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do jejum intermitente em dias alternados na regeneração óssea e na qualidade óssea em modelo animal. Optamos pelo uso de ratos com oito meses de idade, considerados na literatura como animais em início de senescência. A condição de criação dos animais em biotério faz com que estes sejam sedentários e predispostos assim à obesidade, simulando situações comumente encontradas na rotina clínica.

Hipotetizou-se, assim, que o jejum intermitente em dias alternados resultaria em alterações na regeneração óssea e nos tecidos ósseos intactos.

3. Materiais e métodos

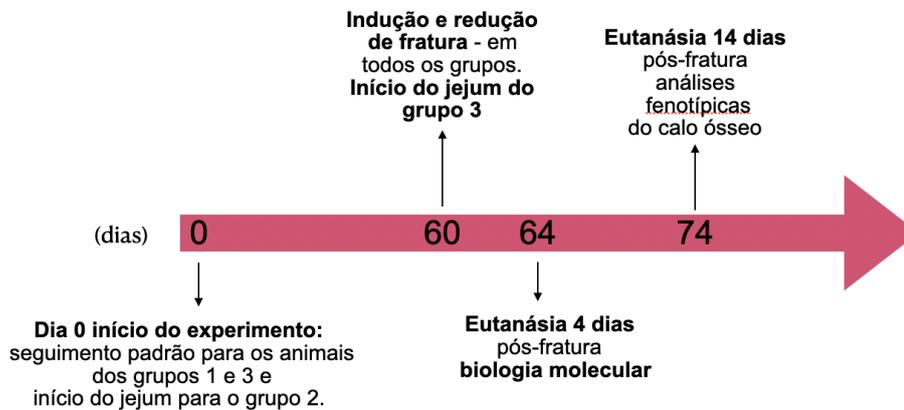
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo animal

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FORP/USP, processo número 2019.1.912.58.1. A equipe envolvida no presente projeto possui experiência e treinamento prévios em ciência de animais de laboratório, e os animais foram acompanhados por médico veterinário durante todo o período experimental.

Setenta e cinco ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Sprague Dawley) provenientes do Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da USP foram recebidos com sete semanas de idade no biotério da FORP. Estes animais foram tratados cuidadosamente por seis meses até atingirem a idade para o início dos experimentos, com oito meses, quando então iniciou-se o período experimental (Figura 1). Para o ensaio clínico randomizado, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais (n=25/grupo): (1) Controle: ratos adultos submetidos à fratura óssea e com alimentação com ração *ad libitum*; (2) Jejum intermitente em dias alternados (JIDA) pré-fratura: ratos submetidos ao jejum intermitente desde o período anterior à fratura, a partir do dia zero. O tratamento desses animais consistiu em alimentação com ração à vontade por 24 horas, seguido de 24 horas de jejum total de alimento, por um período de sessenta dias. O mesmo regime foi mantido após a cirurgia, com seguimento até a eutanásia. (3) JIDA pós-fratura: os animais tiveram alimentação à vontade até o dia da cirurgia e começaram a fazer JIDA no dia seguinte à fratura óssea.

Figura 1 - Linha do tempo experimental.



Fonte: Arquivo do autor

Os animais foram pesados semanalmente e tiveram seu consumo de ração mensurado durante todo período experimental.

3.2. Cirurgia

Após 60 dias de tratamento os animais foram submetidos ao procedimento de fratura óssea e redução cirúrgica. Inicialmente os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano (BioChimico, Brasil) em indução a 4-5% e manutenção a 1,5-2,5%, e cloridrato de morfina (Cristália, Brasil) 8 mg/kg intramuscular. Foram também medicados com flunixin meglumina, 2mg/kg via subcutâneo (SC) (Schering-Plough, Brasil) e Pentabiótico Veterinário 0,1ml/100g via intramuscular (Fort Dodge, Brasil). Em seguida, foi feita tricotomia e antisepsia de todo o membro pélvico direito com solução de iodo polivinilpirrolidona alcoólica. Foi realizada incisão para acesso lateral na coxa, pelo septo intermuscular, e exposição do terço médio da diáfise femoral. Com disco diamantado acoplado em motor de baixa rotação para uso odontológico foi realizado o corte bicortical, com irrigação contínua de solução fisiológica até a confirmação da fratura completa e transversal. Em seguida, fio cirúrgico de aço inox (Kirschner) com 1 mm de espessura foi introduzido pelo canal medular do fragmento proximal até a articulação coxo femoral. A fratura foi então reduzida sob observação direta, e o fio de Kirschner avançado pelo canal

medular do fragmento distal até que sua extremidade fosse sentida pela palpação da pele entre os côndilos do joelho. Um pequeno recuo foi realizado para evitar a presença do fio na cavidade intra-articular. Após confirmação da redução e estabilização da fratura, o excesso do fio de Kirschner foi cortado. Em seguida, o plano muscular e a incisão na região lateral da coxa foram suturados com fio nylon 4.0 e feita a limpeza final com solução de iodo PVPI tópico. Nenhum animal foi excluído do estudo no momento da cirurgia, decorrente de fraturas cominutivas, mal localizadas, incompletas, oblíquas ou fixadas inadequadamente.

Os animais ficaram em observação até o retorno rápido da anestesia inalatória. No pós-operatório imediato os animais já apoiaram o membro operado e não apresentavam sinais de dor importante. Todos os animais foram medicados com Cloridrato de Tramadol 8mg/kg (Agener, Brasil) (SC) a cada 12 horas, durante dois dias e antiinflamatório flunixin meglumina 2mg/kg a cada 12 horas (SC) por dois dias. Os animais foram diariamente monitorados para sinais de dor ou desconforto, e pesados semanalmente.

Análises radiográficas foram realizadas semanalmente para acompanhamento da consolidação óssea. Para isso, os ratos foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano e posicionados em decúbito ventral com membros posteriores em abdução e flexão de quadril e joelhos (90°) a uma distância de 105 cm do foco (Figura 2). Os parâmetros utilizados foram de 5mA e 44 kVp.

Figura 2 - Imagens radiográficas demonstrando a redução da fratura após cinco dias de cirurgia.



Fonte: Arquivo do autor

3.3. Eutanásia e análise osteometabólica

Os animais foram submetidos à eutanásia através de sobredose anestésica com isoflurano, em dois momentos: quatro dias após a fratura, para análise de expressão gênica; e duas semanas após a fratura, para avaliação fenotípica do calo ósseo e do fêmur contralateral íntegro. Os fêmures foram dissecados, e distribuídos para processamento nas diferentes análises: congelados em freezer -80°C para as análises moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR); ou congelados a -20° para as análises macroscópicas (medidas de massa e comprimento), microtomografia computadorizada (uCT), densitometria óssea e ensaio mecânico; ou fixados em solução de formalina tamponada a 4% para as análises histológicas.

3.4. Análises macroscópicas de massa e comprimento

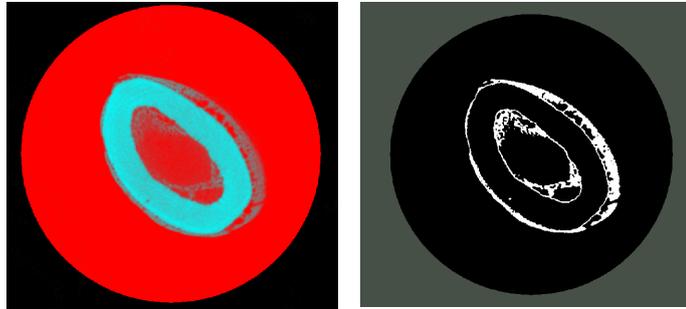
Os fêmures foram medidos com paquímetro digital no seu comprimento e pesados em balança de precisão para registro de suas massas.

3.4.1. Microtomografia computadorizada (μCT)

Para a análise os fêmures passaram por descongelamento lento e foram escaneados em microtomógrafo SkyScan1276 (Bruker, Bélgica), do Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, FORP- USP. Foi utilizado o programa CtAn (Bruker) para marcação da região de interesse e análise morfométrica do calo ósseo e do tecido ósseo trabecular e cortical contralateral. As imagens microtomográficas foram obtidas com resolução de pixel de $13\mu\text{m}$.

Para análise do calo ósseo foi delimitada região de interesse de 8 mm (600 cortes) no osso fraturado, com centro na fratura. O osso neoformado foi diferenciado do osso cortical através de contraste (threshold 70-160) conforme figura 3.

Figura 3. Definição da região de interesse (ROI) e diferenciação entre osso neoformado e osso cortical através de contraste (threshold 70-160).

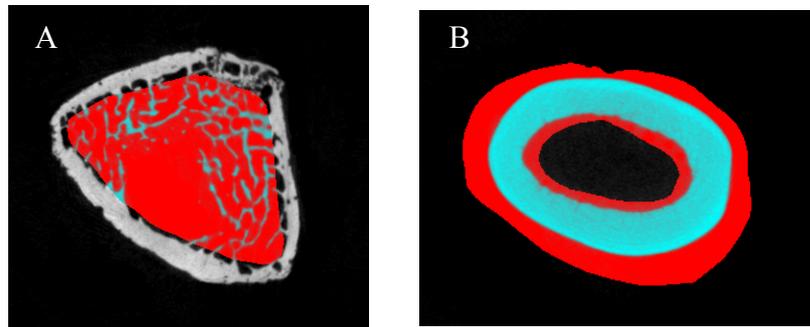


Fonte: Arquivo do autor.

As variáveis quantificadas foram: volume ósseo (BV) em mm^3 ; fração de volume ósseo pelo volume total (BV/TV) em %; superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV) em mm^2/mm^3 ; número de trabéculas (St.N) em $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$; espessura das trabéculas (St.Th) em μm ; espaçamento entre trabéculas (St.Sp) em μm ; e densidade das conexões intertrabeculares (Conn.D) em $\text{n}^\circ/\text{mm}^3$.

No fêmur contralateral, íntegro, a região trabecular da metáfise distal foi analisada a 0,5 mm proximal à cartilagem de crescimento distal, por uma extensão de três mm (230 cortes, Figura 4a). Os parâmetros analisados foram: volume total (TV), em mm^3 ; BV/TV, em %; número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido (Tb.N), em $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$; espessuras das trabéculas ósseas (Tb.Th), em μm ; espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), em μm ; e densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas (Conn.D), em mm^3 . O tecido ósseo cortical foi analisado na diáfise femoral, oito mm proximal à cartilagem de crescimento distal, por uma extensão de dois mm (Figura 4b). Os parâmetros analisados foram: volume cortical (Ct.V), em mm^3 ; espessura da cortical (Ct.Th), em μm ; e porosidade cortical (Ct.Po), em %. Todas as nomenclaturas estão de acordo com a adotada pela ASBMR (*American Society for Bone and Mineral Research*) (35).

Figura 4. Definição da região de interesse (ROI) para quantificação do osso trabecular (A) e osso cortical (B) no fêmur íntegro contralateral.



Fonte: Arquivo do autor

3.4.2. Densitometria óssea

A densitometria óssea com dupla emissão de raios X (DXA) foi realizada no densitômetro Lunar DPX-IQ (GE Health Care, Estados Unidos) do Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP. A densidade global foi analisada por meio de software específico para análise densitométrica do esqueleto apendicular de animais de pequeno porte. No fêmur sem fratura foi utilizada área de 0,09cm², localizada na metáfise distal, proximal à cartilagem de crescimento distal. Toda a região do calo ósseo foi analisada no fêmur com fratura. Os dados gerados foram densidade mineral óssea (DMO em g/cm²) e conteúdo mineral ósseo (CMO em gramas).

3.4.3. Análise mecânica

Os ossos íntegros foram submetidos ao ensaio mecânico de três pontos no Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP (EMIC® - 10000N). Os parâmetros estudados foram força máxima (N) e rigidez (N.mm), calculados a partir da curva carga x deformação. Os fêmures foram posicionados em dois suportes nas metáfises, com vão livre de 30 milímetros e a força foi aplicada na face anterior da diáfise. Foi utilizada célula de carga de 500N, pré-carga de 10N, com tempo de acomodação de 20 segundos e velocidade de aplicação de carga de 1mm/min.

3.5. Análises histológicas do microambiente ósseo

3.5.1 Histomorfometria

Os fêmures foram processados no Laboratório de Histologia do Departamento de Clínica Infantil da FORP-USP. Após fixados em paraformaldeído os ossos passaram pelo processo de descalcificação em EDTA 10%, desidratação em crescentes concentrações alcoólicas, diafanização em xilol, até a inclusão em parafina e secção para montagem das lâminas. Os cortes em plano coronal foram corados com: (1) tricrômio de Masson, para quantificação do trabeculado ósseo; (2) TRAP (do inglês, *Tetrate resistant acid phosphatase*), corante específico para marcação de atividade osteoclástica; e (3) solução picro-sirius, que permite a identificação das fibras colágenas.

Para a captura das lâminas de coloração tricrômio de Masson foram feitas fotografias com câmera digital acoplada em aumento de 100x, utilizado microscópio óptico Axioimager Z2 Zeiss (Carl Zeiss, Alemanha), software Axiovision® 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha), conectado a computador DELL Precision T3500 workstation (DELL, Brasil). A área total de tecido ósseo (μm^2) foi quantificada na região da metáfise distal dos ossos intactos. Para a coloração TRAP foi utilizado o mesmo microscópio para captura, e o *software Image J* (NIH, versão 1.52a) para quantificação da área marcada por todo o calo ósseo dos fêmures fraturados. As lâminas coradas com picro-sirius foram fotografadas em microscópio trinocular para campo claro e fluorescência modelo DMLB, marca Leica Microsystems Wetzlar GmbH (Germany) equipado com câmera DFC300FX e software de aquisição e análise de imagens LAS versão 4.1.0. Para essa coloração foi utilizada luz polarizada por birrefringência, em aumento de 25X, que possibilita a identificação e quantificação de fibras colágenas. A área marcada foi quantificada em μm^2 , e expressa pela porcentagem da área de colágeno em relação à área total (Col.Ar/Tt.Ar).

3.5.2 Imunohistoquímica

Cortes histológicos de calos ósseos femorais foram aleatoriamente selecionados para o tratamento de imunohistoquímica. Inicialmente as lâminas foram desparafinizadas através de banho em xilol, hidratadas em banhos de soluções alcoólicas e lavadas em solução salina

fosfatada tamponada (PBS). Foi realizado em seguida o processo de recuperação de antígeno, com aquecimento lento em tampão citrato pH 6,0 em microondas, até a temperatura de 73° Celsius. Foi seguido então protocolo de incubação do fabricante com anticorpos primários para OPG (A2100, anti-rabbit, Woburn, Estados Unidos, concentração 1:200), RANK (A12997, anti-rabbit, Estados Unidos, concentração 1:100), e RANKL (A2550, anti-rabbit, Estados Unidos, concentração 1:100). Ao final do processo as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris, desidratadas, diafanizadas e montadas com lamínula. Foi utilizado microscópio óptico Axioimager Z2 Zeiss (Carl Zeiss, Alemanha) acoplado à câmera digital, e computador DELL Precision T3500 workstation (DELL, Brasil). Imagens foram capturadas com o software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha) em aumento de 100X. As imagens foram analisadas pelo software Image J (NIH, versão 1.52a) para quantificação da área marcada pela coloração amarronzada, e os valores foram expressos pela área total.

3.5.3 Expressão gênica por PCR

Para as análises de PCR os seguintes genes alvos foram avaliados: *Igf-1* (do inglês, *insulin like growth factor*), *Runx2* (do inglês, *runt-related transcription factor 2*), *Sp7* (fator de transcrição *Sp7* ou *Osterix*) e *Colla1* (do inglês *collagen type 1, alpha 1 chain*).

Rapidamente após a eutanásia foram coletados os fêmures intactos e os fraturados, e imediatamente imersos em nitrogênio líquido e congelados em freezer -80 C. O isolamento de RNA total foi realizado macerando-se o tecido ósseo com auxílio de um cadinho estéril com nitrogênio líquido até a redução em pó. Foi então adicionado Trizol reagente (Life Technologies®, USA) e utilizadas centrifugações de acordo com o protocolo do fabricante. Ao final do processo foi obtida a separação da solução em três fases e a fase de interesse, com o RNA, foi armazenada. O resultado dessa extração foi analisado em sua pureza e quantidade pelo NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos). Para síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram então submetidas a ciclo de temperatura em termociclador (25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos). Após a conclusão dessas etapas, as amostras foram novamente congeladas em freezer -20°C. Os ensaios de PCR em tempo real

foram realizados utilizando kit TaqMan® e o termociclador (StepOnePlus™ Real-Time PCR System da Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os seguintes genes foram avaliados em reações por duplicatas: *Colla1* (Colagenase 1a1, identificador: Rn01463848_m1), *Osterix* (Fator de transcrição *Sp7*, identificador: Rn02769744_s1) e *Igf-1* (insulin-like growth factor, Rn00710306_m1). Os resultados foram normalizados através dos valores de amplificação do gene endógeno de referência *GaPDH*. A determinação da expressão dos genes foi calculada utilizando o valor do *threshold cycle* (Ct). O método de 2-ddCt foi utilizado para avaliação da expressão relativa dos genes (36).

3.6. Análise estatística

As análises de dados foram realizadas utilizando o software JASP (versão 0.17.3, JASP Team, Holanda). Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão. A normalidade dos dados foi testada utilizando o teste Shapiro-Wilk e a equidade de variâncias dos grupos através do teste de Levene. O teste ANOVA foi empregado para a comparação entre os grupos. Em caso de diferença foi utilizado o pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Em caso de não normalidade dos dados foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%. Também foi apresentado nos casos de diferença o tamanho de efeito segundo *d* de *Cohen*.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Intercorrências

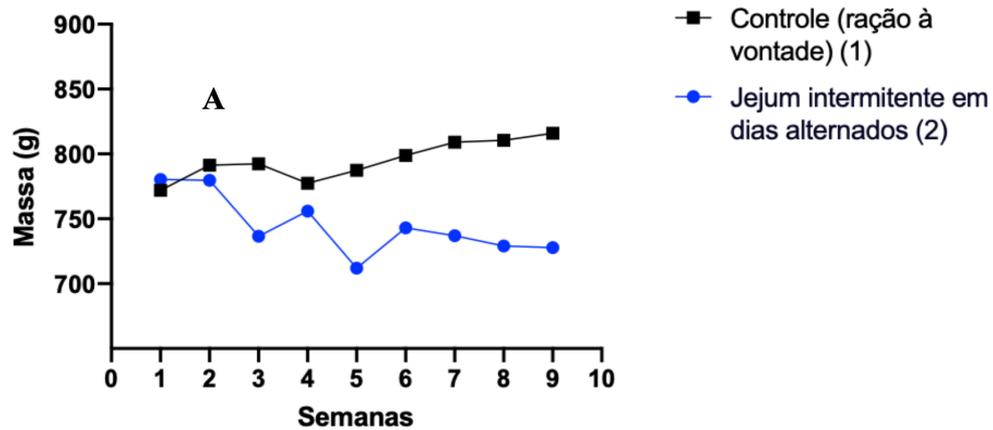
Dos setenta e cinco animais que começaram o estudo com sete semanas de idade, cinquenta e nove animais (78,7%) passaram por todo o período experimental e chegaram até o final do estudo, com sucesso também na coleta dos tecidos. Um animal desenvolveu tumor subcutâneo a esclarecer, ainda durante o período necessário para que se atingisse a idade do estudo, antes do tratamento de jejum, e foi submetido à eutanásia. Sete animais (9,5%) morreram no primeiro dia pós-cirúrgico, provavelmente devido a complicações cirúrgicas e ou anestésicas em animais em senilidade. Oito animais tiveram complicações de instabilidade na redução da fratura ou migração do fio de Kirshner e foram submetidos à eutanásia por *endpoint* humanitário (10,7%). Com as perdas ocorridas, chegou-se ao final da parte experimental com 16 animais no grupo controle, 20 animais no grupo jejum-pré e 23 animais no grupo jejum-pós.

4.2. Evolução da massa corpórea e consumo alimentar durante o período experimental.

Os animais foram acompanhados sistematicamente na sua massa corpórea desde uma semana antes do início do tratamento de jejum (Figura 3). Também foi feito o monitoramento do consumo médio de ração, apresentado na figura 4. Houve diferença no consumo diário de ração (nos dias de arraçoamento, $p < 0,001$). Houve diferença no consumo total de calorias semanal, gerando déficit calórico no grupo jejum-pré, $p < 0,001$.

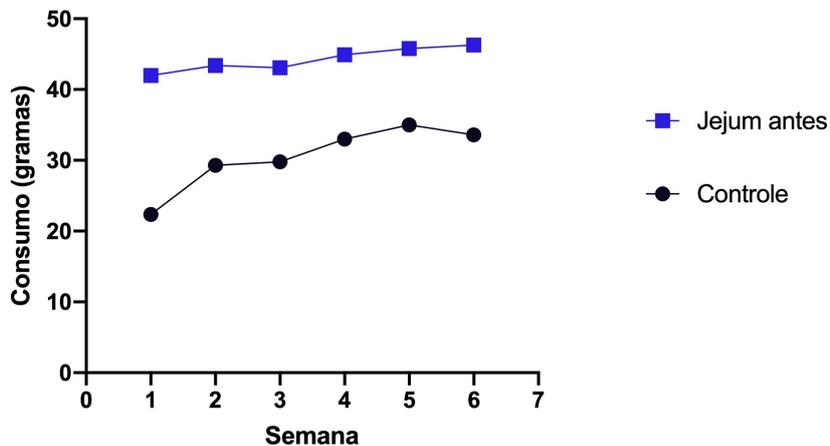
A massa corporal apresentou diferença entre o grupo jejum-pré comparado com o controle após os dois meses de tratamento $\{p < 0,001$, tamanho de efeito grande segundo d de *Cohen* = 2,87 (IC 95% 1,5 - 4,1)} (37)

Figura 5 - Evolução da massa corporal desde o início do período experimental. A letra A indica o início do tratamento de jejum no grupo pré-fratura.



Fonte:Arquivo do autor.

Figura 6 - Média de consumo diário de ração por animal.



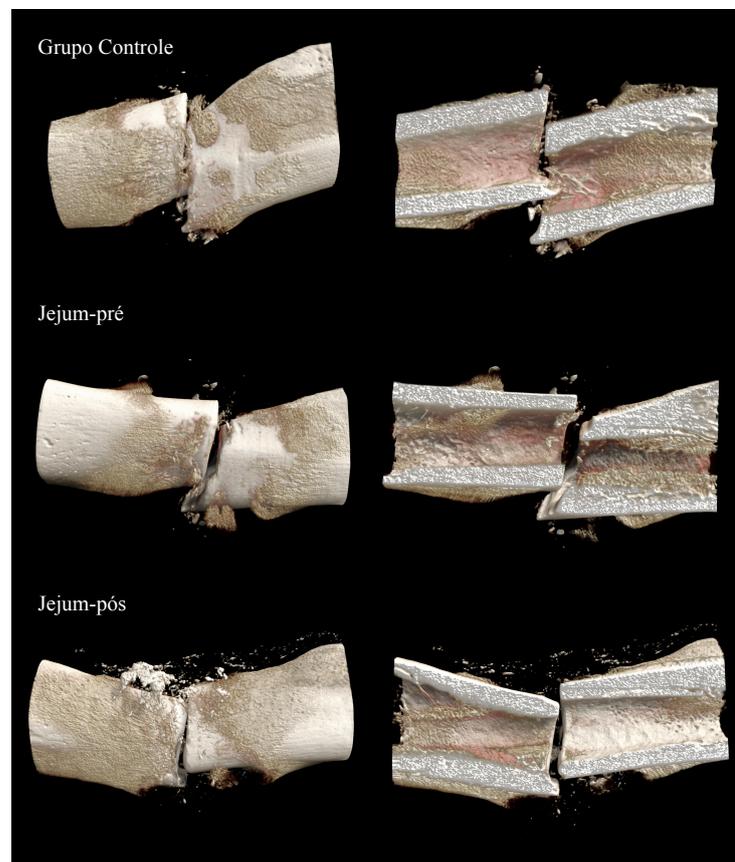
Fonte: Arquivo do autor. Observa-se que os animais que jejuam consomem uma quantidade maior de ração nos dias em que são arraçoados. No início do tratamento a média se aproxima do dobro do consumo dos animais com ração à vontade. O gráfico demonstra que os animais que jejuam buscam conseguir uma ingestão total de nutrientes parecida com os grupos que estavam com ração à vontade, através de um maior consumo nos dias em que têm alimento disponível.

Os animais também foram avaliados no seu comportamento e no escore corporal (38, 39). Através dessa avaliação clínica qualitativa foi possível perceber que os animais do grupo jejum não apresentaram sinais de apatia ou inatividade, e muitas vezes se mostraram mais ativos que os animais do grupo controle. Além disso, os escores corporais dos animais que jejuavam estiveram entre 3-4, enquanto os animais com ração à vontade estiveram entre 4-5. Dessa forma, percebe-se a clara tendência que os animais do grupo controle tiveram à obesidade. Isso se deve às condições de criação no ambiente de biotério convencional, onde os animais estão sedentários. Especialmente na senilidade esses problemas se mostram mais importantes para o estado geral de saúde.

4.3. Microtomografia computadorizada (μ CT)

Os calos ósseos femorais foram analisados 14 dias após a fratura diafisária. Na figura 5 é possível observar a presença do traço da fratura bem como a descontinuidade cortical nos três grupos experimentais, compatível com a fase de formação de calo ósseo mole em que todos os grupos se encontravam.

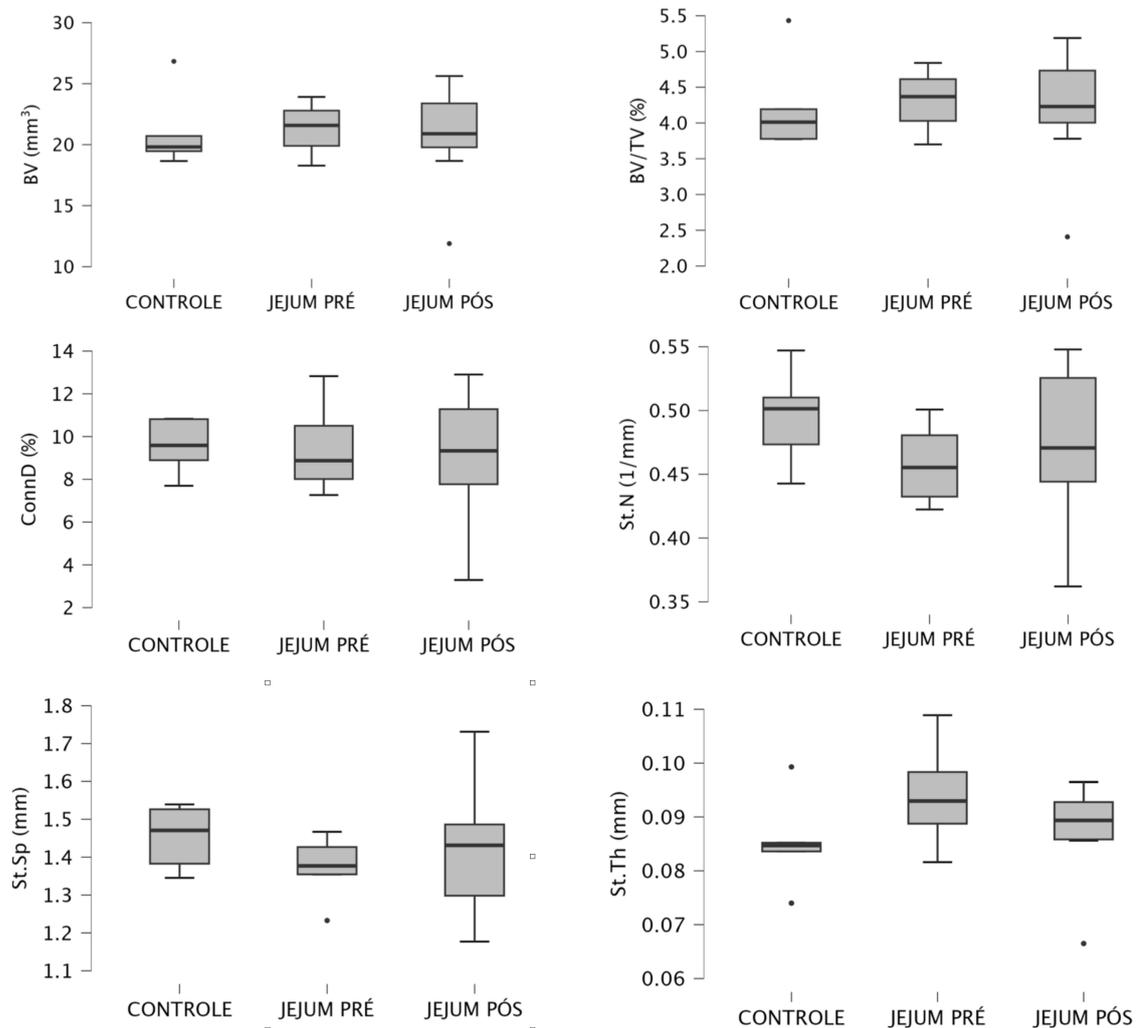
Figura 7. Reconstruções tridimensionais das microtomografias dos fêmures fraturados, evidenciando a fratura na região diafisária.



Fonte: lab 3d Bio, arquivo do autor. Nota-se que o calo ainda tem pouca mineralização óssea, sendo formado predominantemente por tecido cartilaginoso (calo mole).

Corroborando a imagem qualitativa da reconstrução microtomográfica tridimensional dos calos ósseos, a análise morfométrica também evidencia consolidação óssea semelhante entre os grupos. A figura 8 apresenta os gráficos com os parâmetros morfométricos mensurados nos calos ósseos.

Figura 8. Parâmetros morfométricos obtidos após análise por μ CT dos fêmures fraturados. Representação em boxplot.



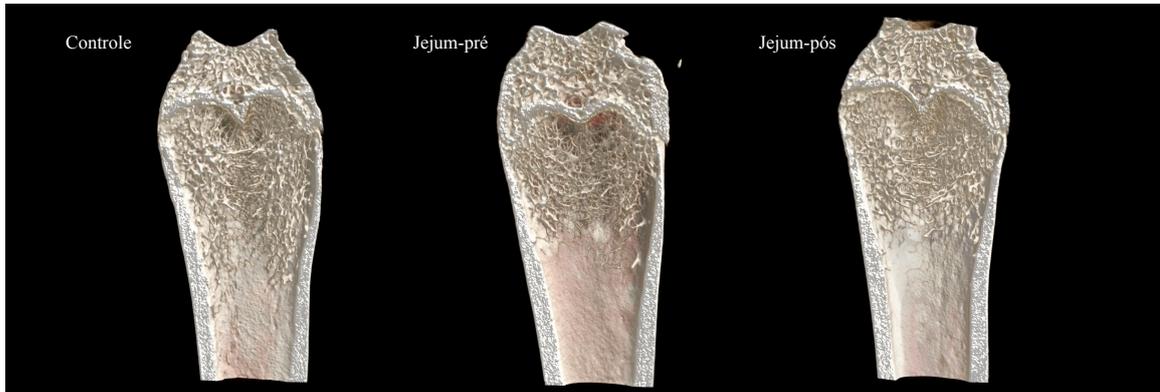
Fonte: Arquivo do autor.

Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros microtomográficos analisados.

Não houve diferença significativa entre os grupos com relação ao volume ósseo (BV), fração de volume ósseo pelo volume total (BV/TV), superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV), número de trabéculas (St.N), espessura das trabéculas (St.Th), espaçamento entre trabéculas (St.Sp) e densidade das conexões intertrabeculares (Conn.D), demonstrando que o JIDA não induziu alterações morfométricas no calo ósseo, independente se iniciado antes ou depois da fratura óssea.

A Figura 9 representa o tecido ósseo na região metafisária distal do fêmur contralateral ao submetido à fratura.

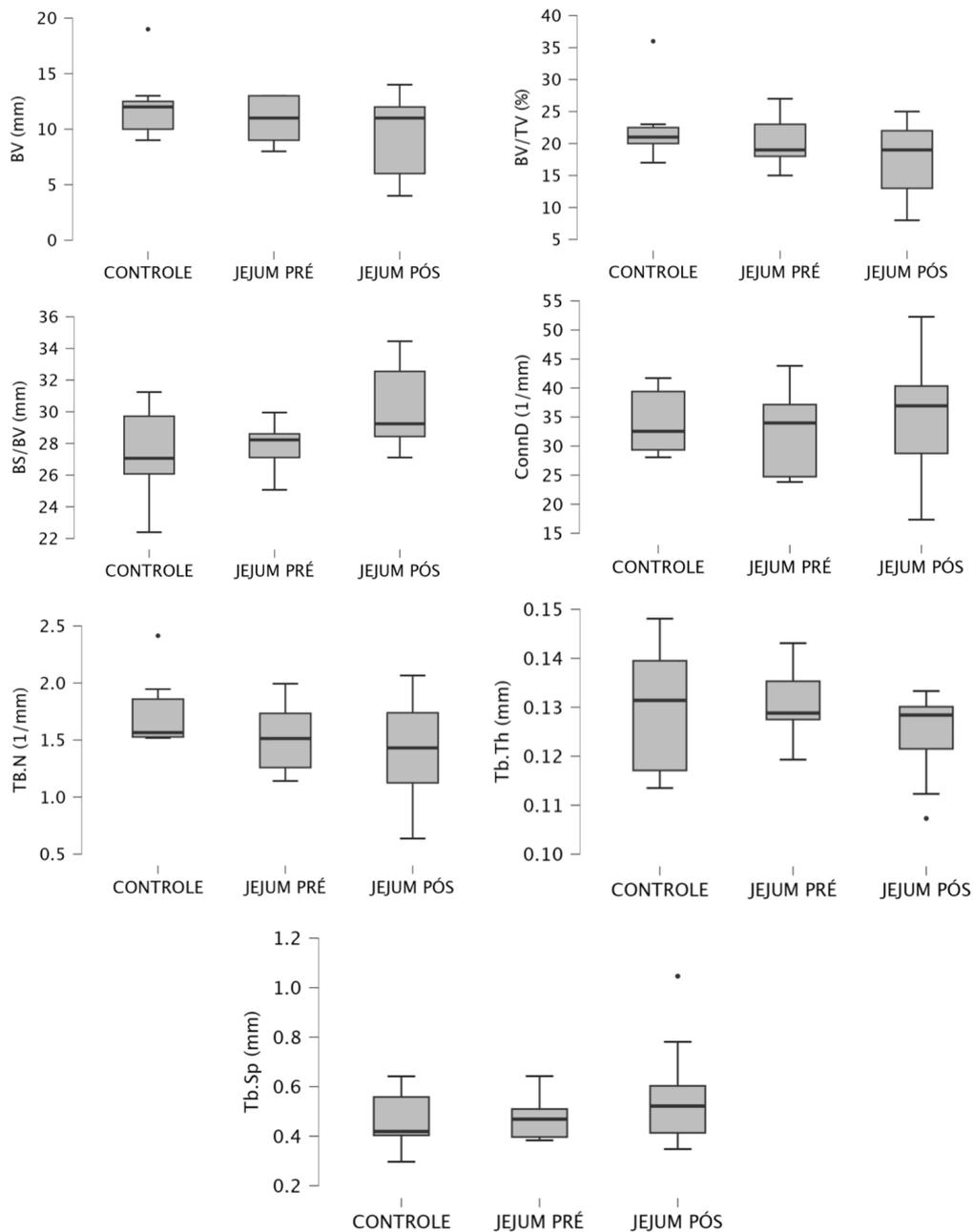
Figura 9. Reconstruções do fêmur íntegro evidenciando osso trabecular em região metafisária distal. Cortes no plano coronal.



Fonte: lab 3d Bio, arquivo do autor.

Assim como observado no calo ósseo, a análise morfométrica do tecido ósseo trabecular também evidencia microarquitetura óssea semelhante entre os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação ao volume ósseo (BV), fração de volume ósseo pelo volume total (BV/TV), número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido (Tb.N), espessuras das trabéculas ósseas (Tb.Th), espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), e densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas (Conn.D). A figura 10 apresenta os gráficos com os parâmetros morfométricos do tecido ósseo trabecular mensurados na metafise distal do fêmur.

Figura 10. Parâmetros morfométricos obtidos após análise por μ CT do osso trabecular dos fêmures íntegros. Representação em boxplot.

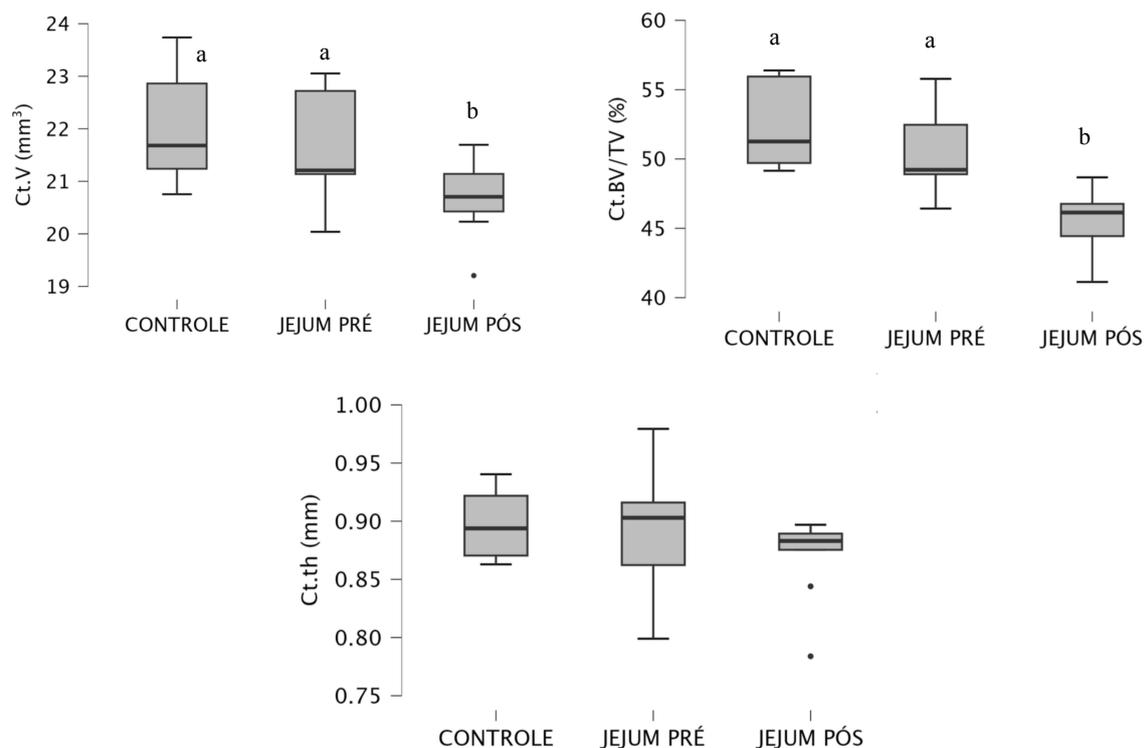


Fonte: arquivo próprio. Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros microtomográficos analisados.

Por outro lado, diferenças foram detectadas na análise morfométrica do tecido ósseo cortical. A figura 11 apresenta os gráficos com os parâmetros morfométricos mensurados na diáfise femoral. O grupo de animais submetidos ao jejum intermitente após a fratura óssea

apresentou menor volume cortical {(redução de Ct.V em 6% comparado ao controle, $p < 0,01$) controle com média 22,054 e desvio-padrão 1,22; jejum-pós média 20,73 e desvio-padrão 0,758; tamanho de efeito grande segundo d de *Cohen* = 1,27, IC 95%, -0,12 - +2,67)} e Ct.BV/TV {(redução em 12% comparado ao controle, $p < 0,01$) controle com média 52,588 e desvio padrão 3,351; jejum-pós média 45,850 e desvio padrão 2,335; tamanho de efeito grande segundo d de *Cohen* = 2,23, IC 95%, 0,67 - 3.81}. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e jejum-pré com relação a esses parâmetros.

Figura 11. Parâmetros morfométricos obtidos após análise por μ CT do osso cortical dos fêmures íntegros. Representação em boxplot. Letras diferentes indicam diferença significativa. (ANOVA, $p < 0,05$)



Fonte: Arquivo do autor. Na análise microtomográfica do osso cortical foi detectado menor volume total e menor porcentagem de volume ósseo no grupo jejum-pós em comparação aos demais grupos (controle e jejum-pré).

4.4. Densitometria óssea

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos da análise densitométrica dos fêmures submetidos à fraturas e dos ossos contralaterais íntegros. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação aos valores de densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) entre os grupos, tanto no calo ósseo femoral como no fêmur íntegro

Tabela 1. Densitometria óssea. Dados expressos em média e desvio-padrão.

	CONTROLE	JEJUM PRÉ	JEJUM PÓS
DMO calo (g/cm²)	0,219±0,015	0,194±0,033	0,207±0,033
CMO calo (g)	0,02±0,002	0,017±0,003	0,019±0,003
DMO íntegro (g/cm²)	0,162±0,038	0,155±0,023	0,148±0,025
CMO íntegro (g)	0,014±0,003	0,014±0,002	0,013±0,002

Fonte: arquivo do autor. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.5. Análise macroscópica de comprimento e massa óssea e ensaio mecânico

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos da análise macroscópica do comprimento e massa femoral, bem como dos parâmetros mecânicos de força máxima e rigidez relativa obtidas por meio do ensaio mecânico nos fêmures íntegros. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação aos valores de massa, comprimento e resistência mecânica. No entanto, há uma tendência apontando para redução nos parâmetros mecânicos nos animais que jejuaram, em especial naqueles que iniciaram o jejum após a fratura óssea em comparação ao grupo controle.

Tabela 2. Macroscopia óssea e ensaio mecânico.

	CONTROLE	JEJUM PRÉ	JEJUM PÓS
Massa (g)	1,95±0,16	2,07±0,17	2,012±0,18
Comprimento (mm)	41,46±1,27	41,59±1,23	40,29±0,95
Força Máxima (N)	226,32±30,221	213,194±35,108	201,916±19,397
Rigidez Relativa (N/mm)	328,24±92,313	299,289±66,644	279,130±68,044

Fonte: arquivo do autor. Não houve diferença significativa entre os grupos.

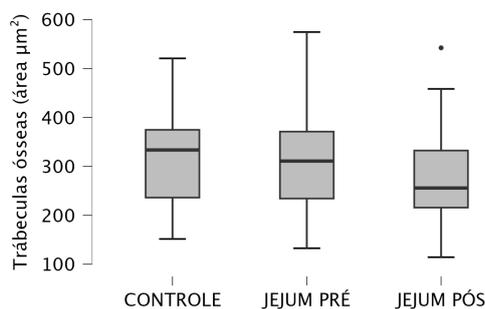
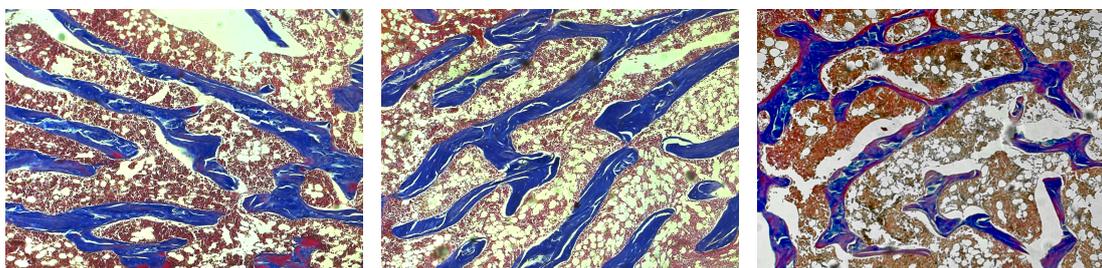
4.6. Análise do Microambiente ósseo

4.6.1 Análise Histológica

As figuras 12 a 14 apresentam fotografias das lâminas histológicas coradas com Tricrômio de Masson, PicroSirius e TRAP, respectivamente, bem como gráficos representativos das análises morfométricas correspondentes: volume do trabeculado ósseo, área de deposição de colágeno e área reabsorptiva.

Na figura 12 é possível observar as imagens qualitativas do trabeculado ósseo, bem como os gráficos apresentando os resultados quantitativos do volume trabecular. Embora não tenha sido detectada diferença entre os grupos, há uma tendência de menor volume no grupo jejum pós-fratura em comparação aos demais grupos.

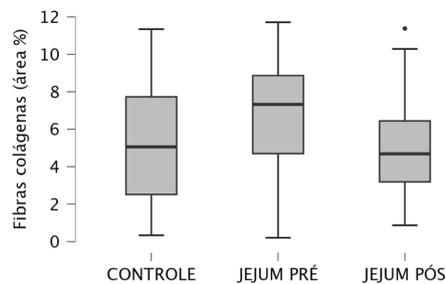
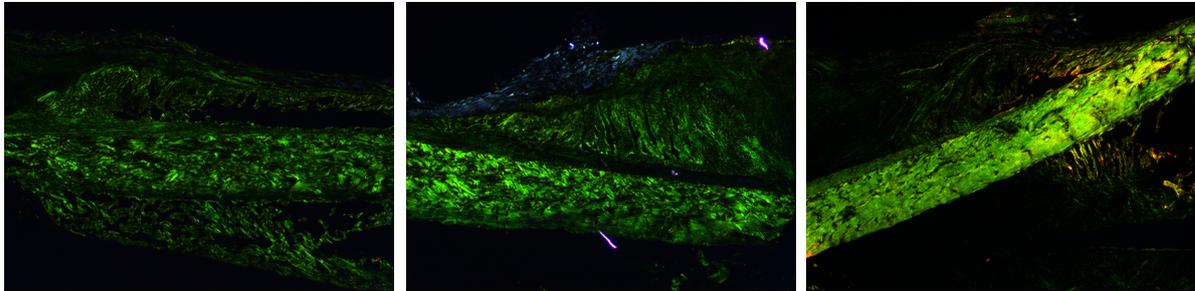
Figura 12. Fotomicrografias de quadrantes de osso trabecular dos fêmures íntegros. Corte coronal. (Tricrômio de Masson 100x).



Fonte: arquivo do autor. Não houve diferença significativa na quantificação da área de trabéculas ósseas entre os grupos.

Na figura 13 é possível observar as imagens qualitativas evidenciando a deposição de colágeno, bem como os gráficos apresentando a quantificação dessas áreas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

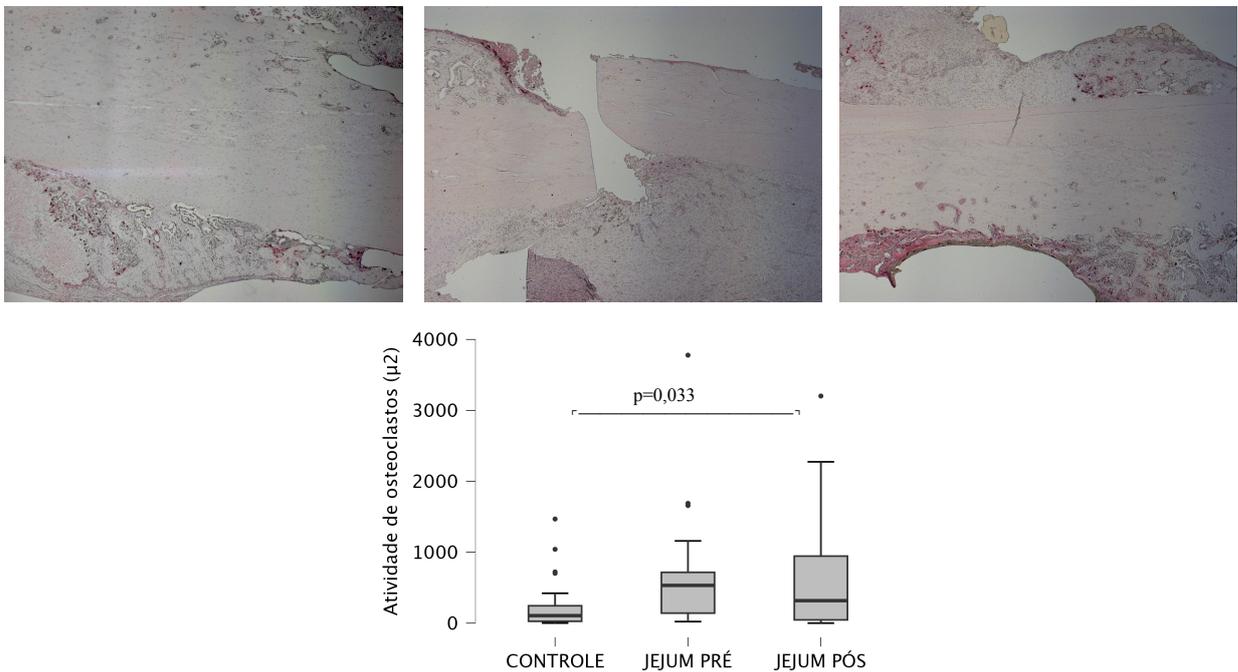
Figura 13. Fotomicrografias de luz polarizada de quadrantes do calo ósseo, evidenciando as fibras colágenas. Corte coronal. (Picro Sirius, 25x).



Fonte: arquivo do autor. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA $p=0,122$

Na figura 14 é possível observar as imagens qualitativas da área corada com TRAP, inferindo presença e atividade osteoclástica, bem como os gráficos apresentando os resultados quantitativos da área reabsortiva óssea. Foi detectada diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (não equidade das variâncias) com relação à quantificação da área de reabsorção óssea, inferindo maior atividade osteoclástica no grupo jejum pós-fratura (média $573,43\mu\text{m}$, desvio padrão $721,65\mu\text{m}$) em comparação ao grupo controle (média $223,12\mu\text{m}$, desvio padrão $330,20\mu\text{m}$). O teste de Tukey revelou diferença significativa ($p=0,033$) com tamanho do efeito, $d = -0,56$ IC 95% ($-1,09$ | $-0,017$), indicando um efeito médio.

Figura 14. Fotomicrografias de coloração TRAP, evidenciando em vermelho atividade osteoclástica. Corte coronal. (TRAP, aumento de 50x).

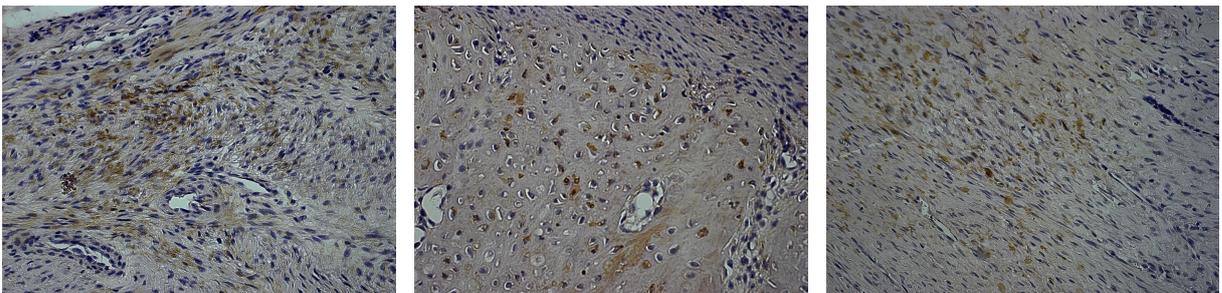


Fonte: arquivo do autor. Houve diferença significativa na quantificação da área reabsortiva. O grupo jejum pós-fratura apresentou maior área de reabsorção que o grupo controle ($p=0,033$). Não houve diferença na comparação "controle x jejum pré" ou "jejum pré x jejum pós".

4.7.1 Análise Imunoistoquímica

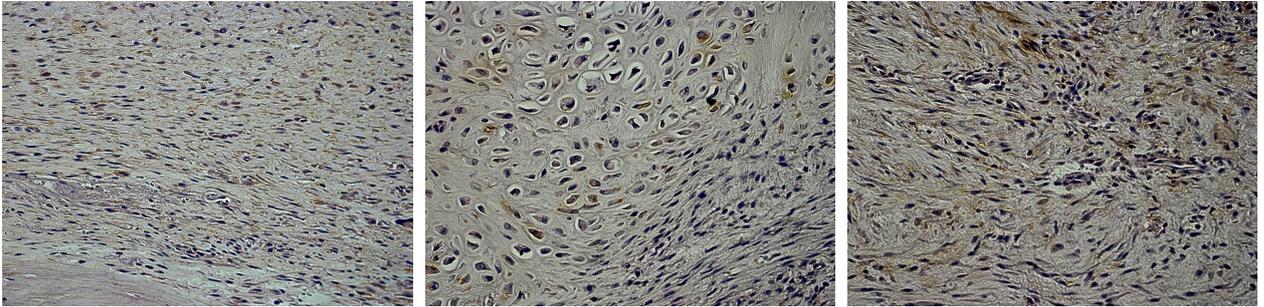
A Figura 15 apresenta imagens de lâminas histológicas demarcando áreas com presença de anticorpos para OPG, RANK e RANK-L, respectivamente. A imunoistoquímica revelou a expressão das proteínas, demarcadas pela coloração marrom, em todos os grupos.

Figura 15: Fotomicrografia de reações de imunoistoquímica em calo ósseo em regeneração, evidenciando marcações para OPG (aumento 100X, corte coronal). Da esquerda para a direita, grupo controle, jejum pré e jejum pós.



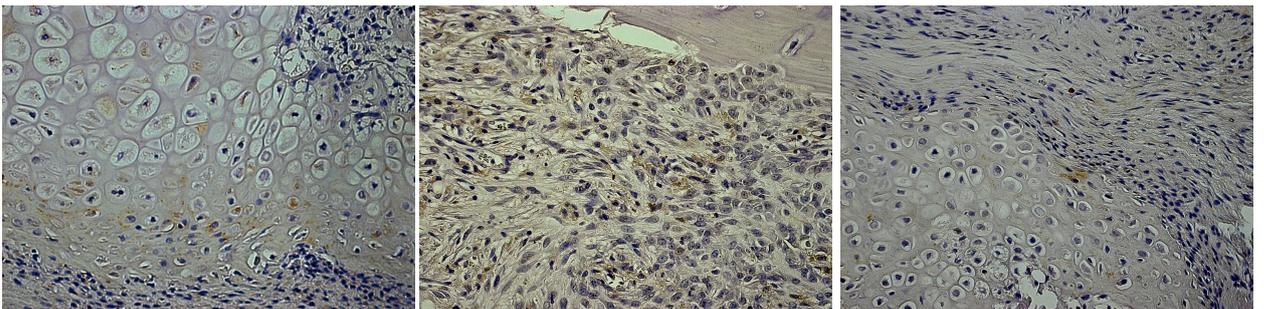
Fonte: arquivo do autor

Figura 16: Fotomicrografia de reações de imunohistoquímica em calo ósseo em regeneração, evidenciando marcações para RANK (aumento 100X, corte coronal). Da esquerda para a direita, grupo controle, jejum pré e jejum pós.



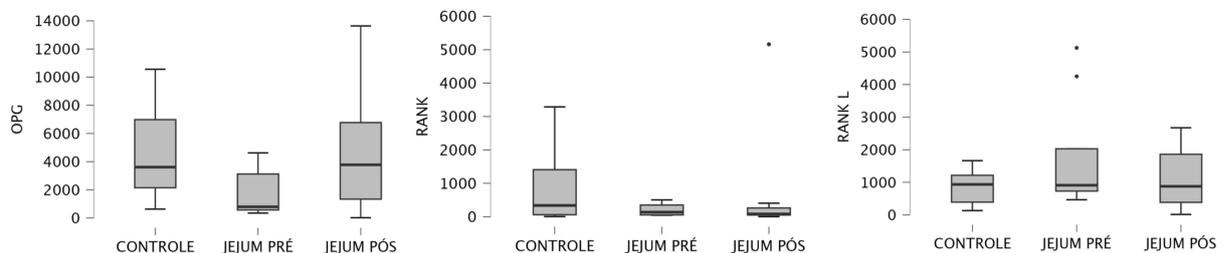
Fonte: arquivo do autor

Figura 17: Fotomicrografia de reações de imunohistoquímica em calo ósseo em regeneração, evidenciando marcações para RANK-L (aumento 100X, corte coronal). Da esquerda para a direita, grupo controle, jejum pré e jejum pós.



Fonte: arquivo do autor

Figura 18: Quantificação de área marcada em cortes tratados com imunohistoquímica, representação em boxplot. Da esquerda para a direita OPG, RANK e RANK-L.



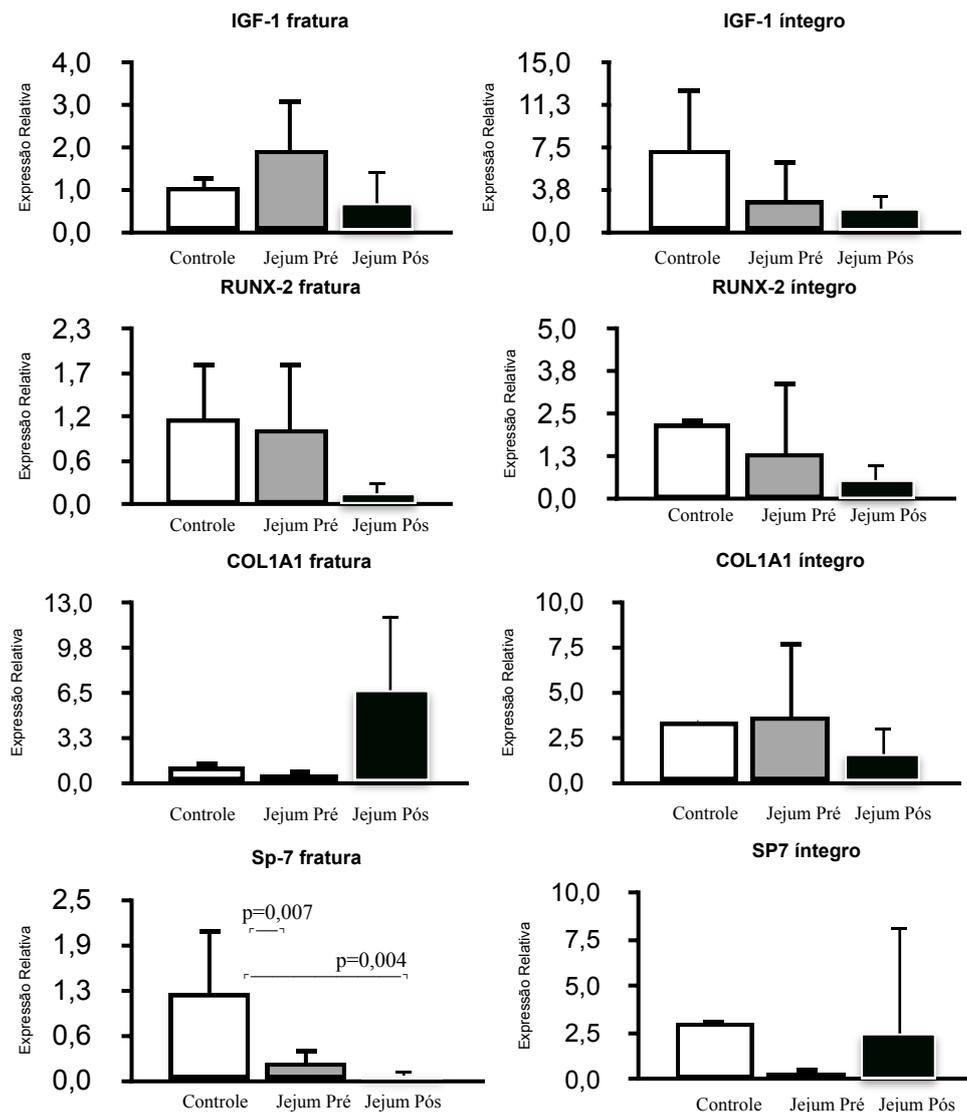
Fonte: arquivo do autor. Não houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA, OPG: $p=0,23$; RANK: $p=0,24$; RANK-L: $p=0,6$.

Corroborando as imagens qualitativas, a quantificação da área com expressão de OPG RANK e RANK L também não detectou diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$),

demonstrando que o JIDA, seja antes ou depois da fratura, não alterou a expressão *in situ* dessas proteínas durante a consolidação óssea.

4.8. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

A figura 19 apresenta a expressão relativa dos genes IGF-1, RUNX-2, COL1A1 e SP7.



Fonte: arquivo do autor.

Figura 19. Expressão gênica relativa de marcadores de metabolismo ósseo nos fêmures íntegros e nos fraturados. Dados apresentados como média+desvio padrão. Marcações com nível de significância "p" representam diferença estatisticamente significante.

Para o gene *Igf-1*, mediador de efeitos anabólicos do hormônio de crescimento (*GH*), apesar de tendência de maior expressão gênica no calo femoral do grupo jejum pré-fratura, em

comparação aos demais grupos não houve diferença estatística. Com relação ao osso íntegro, os dois grupos de jejum apresentaram tendência de menor expressão gênica de *IGF-1* que o grupo controle mas não suficientes para demonstrar diferença estatística.

Para o gene *Runx-2*, que regula diversos processos da osteoblastogênese, com atuação no processo de invasão vascular da cartilagem de um local de regeneração óssea, foi detectada tendência de supressão na expressão do gene no grupo jejum pós em comparação aos demais grupos, tanto no osso íntegro, mas principalmente no calo ósseo. Apesar da tendência, não houve diferença significativa nas comparações.

O gene *Colla1*, que codifica a formação do principal componente do colágeno tipo 1, e também está envolvido em vias de osteoblastogênese, apresentou tendência de maior expressão nos ossos fraturados do grupo Jejum-pós em comparação aos demais grupos. Apesar da tendência, não houve diferença significativa nas comparações. No osso íntegro contralateral foi observado comportamento inverso. A expressão de *Colla1* apresentou tendência de menor expressão no grupo jejum pós-fratura em comparação aos demais grupos.

Com relação ao *Osterix*, gene relacionado à osteoblastogênese e na diferenciação dos mesmos em osteócitos (40), foi observada maior expressão nos calos ósseos do grupo controle em comparação os demais grupos submetidos ao jejum ($p=0,014$ no teste de *Kruskal-Wallis* pela não normalidade das variâncias). Não houve diferença da expressão do gene no osso íntegro, contralateral.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

A obesidade em adultos e idosos é um problema de saúde pública que desafia os profissionais de saúde. Ao contrário de pacientes mais jovens, o manejo para perda de massa corpórea em indivíduos em senescência deve considerar também questões frequentemente presentes, como a dificuldade de mobilidade e de prescrição de exercícios físicos, problemas cardiovasculares, osteoporose e sarcopenia (41). Além disso, há evidência recente que dietas de restrição calórica que promovam perda de massa corpórea, principalmente quando não acompanhadas de exercícios físicos, tendem a induzir redução da densidade óssea (41, 42). Considerando a conhecida relação entre perda de massa óssea e aumento no risco de fraturas, fica clara a relevância de elucidar os mecanismos responsáveis pelas alterações ósseas decorrentes das dietas de restrição calórica.

Trabalhos recentes levantaram hipóteses em que o JI poderia trazer diversos benefícios em desfechos clínicos e desfechos substitutos em humanos (8, 9, 11). Contudo, estudos atuais mais robustos, como os baseados em metanálises, trouxeram resultados controversos. Para a perda de peso, contudo, a prática tem se mostrado eficiente e é uma opção para pessoas com dificuldade de aderência a dietas normais e à exercícios físicos (14). Nesses casos, ou em situações na medicina veterinária como cativeiros, zoológicos e biotérios, onde a restrição calórica e o exercício físico podem ser de difícil implementação, o JI surge como opção para controle do peso e tratamento de obesidade.

De modo geral, os efeitos benéficos encontrados em trabalhos que utilizaram dietas de JI parecem estar intimamente ligados à perda de peso. Mais além, evidências de benefícios adjuvantes do JI em tratamentos oncológicos e na busca do retardo do envelhecimento continuam surgindo por meio de pesquisas com células e animais mas ainda de forma insipiente. Considerando, porém, a função endócrina do tecido ósseo que atua como regulador adjuvante da sensibilidade à insulina, da homeostase do metabolismo de glicose, da produção de testosterona, pôde-se associar a hipótese de que uma estratégia dietética como a de JI, que influencia o metabolismo energético promovendo melhor resistência à insulina, poderia ter efeitos benéficos sobre o metabolismo ósseo. Neste cenário, o presente trabalho teve como objetivo compreender os efeitos potenciais do JI no tecido ósseo íntegro e em processo de consolidação de fratura (43, 44, 45).

Inicialmente, é crucial destacar que em nosso trabalho o JI foi capaz de reverter a obesidade dos animais em curto período de tempo (dois meses), promovendo importante perda de peso e melhora na qualidade clínica geral dos animais. Além da significativa e benéfica perda de peso para a saúde geral dos animais, nossas análises globais não detectaram prejuízo na consolidação óssea nos animais que jejuaram em comparação aos animais controle.

Todavia, o achado importante do nosso estudo se encontra na ação deletéria causada pelo JIDA no osso íntegro contralateral, do grupo que iniciou o jejum após a fratura. O grupo que iniciou o jejum apenas após a cirurgia apresentou prejuízo significativo no volume de osso cortical no membro contralateral, em comparação ao grupo controle e ao grupo que iniciou o jejum antes da fratura óssea. Embora os resultados densitométricos e mecânicos não tenham detectado diferença significativa entre os grupos, o grupo que iniciou o jejum após a fratura apresentou tendência para valores inferiores de força máxima e rigidez em comparação aos grupos controle e jejum pré-fratura, corroborando os achados microtomográficos corticais. As análises das trabéculas ósseas, tanto em micro-CT como em histologia pela coloração de tricrômio de Masson, não detectaram diferença significativa entre os grupos.

Nossa análise histológica com coração TRAP, que infere a atividade osteoclástica no calo ósseo, também trouxe achado importante e significativo. Foi detectado maior atividade osteoclástica nos calos ósseos do grupo que iniciou o jejum após a fratura em comparação ao grupo controle. Esse achado poderia levar à hipótese de um possível desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea neste grupo. Entretanto esse achado isoladamente não deve ser tomado como conclusivo, no calo ósseo, para um aumento da reabsorção óssea que geraria um desbalanço. Já foi demonstrada a interação osteoclastos/osteoblastos através de citocinas, contato célula a célula e através de matrix extracelular, interação complexa inclusive com vias identificadas de incremento da formação óssea decorrentes da atividade osteoclástica, como na liberação de TGF- β e IGF-1 da matrix de osso reabsorvido, e diretamente pelas ATPases de membrana, componente complemento 3a, semaforina 4D e também por microRNAs que estimulam a diferenciação e ativação de osteoblastos (46). Isto posto, nossas imagens microtomográficas e análises morfométricas dos calos ósseos não detectaram alterações microestruturais significativas entre os grupos, demonstrando que o aumento isolado da atividade osteoclástica não resultou, em tempo, alterações estruturais significativas na

regeneração óssea. Também não detectamos diferenças nas marcações por imunohistoquímica dos anticorpos OPG, RANK e RANK-L, sistema de proteínas bastante pesquisado na modulação da formação e reabsorção óssea.

Os animais que jejuaram após a fratura apresentaram menor expressão gênica de *Osterix Sp7* nos calos ósseos em comparação aos animais controle. No entanto, não foram detectadas diferenças na expressão dos demais genes analisados, que também estão envolvidos na diferenciação celular e osteogênese. Apesar do gene *Osterix* estar envolvido em vias tardias da diferenciação osteoblástica e formação óssea, as demais análises conduzidas neste estudo não sugerem qualquer atraso na consolidação óssea decorrente do jejum iniciado antes da fratura óssea. Aqui torna-se indispensável reconhecer as limitações deste estudo com relação à análise molecular. Os resultados precisam ser interpretados com cautela e estudos com maior número amostral poderiam evidenciar diferenças que se mostraram apenas como tendência em nossos resultados. Importante também ressaltar que a expressão de genes em respostas locais, e em órgãos específicos, pode ser diferente da sua expressão plasmática. Em nosso trabalho foi avaliado somente o metabolismo no microambiente ósseo e em apenas um recorte de tempo (4 dias após a fratura). Trabalhos posteriores que avaliem marcadores plasmáticos podem trazer informações adicionais sobre as respostas sistêmicas, influenciadas por jejum e relacionadas ao metabolismo ósseo.

O grupo jejum-pós foi proposto no estudo para simular uma situação de internação médica ou médico-veterinária pós trauma. Em um hospital humano, um manejo nutricional do tipo jejum poderia ser considerado em obesos graves, por exemplo. Em medicina-veterinária, de forma parecida, com animais muitas vezes necessitando de internações longas, como em casos de animais silvestres, por exemplo. No nosso estudo pode-se dizer, de forma geral, que o grupo jejum-pós teve mais dificuldade em manter uma regeneração óssea sadia, evidenciada na diminuição da sua espessura cortical do osso íntegro. Apesar disso, não houve realmente piora evidente na consolidação das fraturas desse grupo. A diminuição de espessura de osso cortical tem sido demonstrada como uma resposta rápida de adaptação em situações de estresse metabólico (47). Essa resposta pode ser utilizada de forma explicativa para os resultados de nosso estudo, considerando a não adaptação prévia desses animais ao regime de jejum, diferentemente do grupo jejum-pré que já tinha um organismo metabolicamente mais adaptado o estresse causado pela distribuição intermitente do suprimento energético. Podemos

, assim, perceber que é necessário prudência ao se considerar a adoção de uma estratégia de jejum em pacientes com fraturas ou outras condições patológicas do tecido ósseo, quando estes pacientes não praticaram a dieta anteriormente.

Cabe ressaltar que os protocolos de jejum adotados no estudos podem ser considerados bastante radicais considerando o modelo animal. Esse fato pôde ser demonstrado pela rápida e importante perda de peso que os animais apresentaram. Ratos têm comportamento alimentar bastante diversificado e comem varias vezes ao dia enquanto estão em atividade. Dessa maneira, apesar do protocolo de JIDA ser o mais estudado em ratos e camundongos historicamente, deve-se ter em mente que estamos lidando com animais de metabolismo energético bastante rápido comparado ao homem.

Nosso estudo também é um dos poucos presentes na literatura que avaliaram jejum em animais já com idade mais avançada. Mundialmente a pesquisa em modelos animais carece de estudos com animais senescentes ou idosos. Isso deixa uma lacuna importante em estudos de doenças como osteoporose, que tem sua prevalência em pessoas idosas, mas que geralmente é estudada mimetizando-se alterações osteoporóticas em animais jovens, através de ovariectomia, por exemplo. Dessa forma, nosso estudo pode ser incentivador para novas investigações em metabolismo ósseo com animais em senescência ou já idosos. O fato de não constarmos prejuízos clinicamente perceptíveis no exame físico desses animais que realizaram jejum, traz segurança para que mais estudos sejam realizados na área.

Sugere-se que trabalhos futuros em modelo animal avaliem marcadores plasmáticos, como proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo e energético. Análises de biologia molecular, como genotipagens de micro RNA's e PCR's, também podem trazer valiosas informações ao entendimento do tema. A técnica de separação celular por ativação magnética tem possibilitado o inicio do estudo de identificação de células ósseas que apresentam fenótipos senescentes, e também já são testadas intervenções farmacológicas e de genoma buscando alvos terapêuticos nessas células em camundongos (48). Estudos em humanos também têm sido publicados, trazendo mais informações que serão importantes na tomada de decisão de clínicos e pacientes para o manejo de obesidade, osteoporose, e outras condições patológicas do sistema ósseo.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

A intervenção de JIDA foi eficiente para perda de peso dos animais. As análises morfométricas puderam evidenciar que não houve prejuízos na regeneração óssea nos animais que realizaram jejum desde antes e nos que iniciaram jejum após a fratura. Contudo, o grupo que iniciou jejum pós fratura teve prejuízo no volume cortical do osso íntegro demonstrado em microCt, sem piora em parâmetros como densidade mineral óssea ou rigidez no ensaio mecânico. Nossos resultados sugerem que é necessário cautela ao se considerar a adoção de dieta de jejum intermitente em pacientes que não a realizaram previamente, caso possuam alguma condição patológica do sistema ósseo.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vicerra PMM. Population Ageing in Lower and Middle-income Countries: Policy Landscape of Southeast Asian Countries. *Curr Aging Sci.* 2023;16(3):188-193. doi: 10.2174/1874609816666230516150701. PMID: 37194225.
 2. Salari N, Ghasemi H, Mohammadi L, Behzadi MH, Rabieenia E, Shohaimi S, Mohammadi M. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2021 Oct 17;16(1):609. doi: 10.1186/s13018-021-02772-0. PMID: 34657598; PMCID: PMC8522202.
 3. Wang L, Yu W, Yin X, Cui L, Tang S, Jiang N, Cui L, Zhao N, Lin Q, Chen L, Lin H, Jin X, Dong Z, Ren Z, Hou Z, Zhang Y, Zhong J, Cai S, Liu Y, Meng R, Deng Y, Ding X, Ma J, Xie Z, Shen L, Wu W, Zhang M, Ying Q, Zeng Y, Dong J, Cummings SR, Li Z, Xia W. Prevalence of Osteoporosis and Fracture in China: The China Osteoporosis Prevalence Study. *JAMA Netw Open.* 2021 Aug 2;4(8):e2121106. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.21106. PMID: 34398202; PMCID: PMC8369359.
 4. Kerndt PR, Naughton JL, Driscoll CE, Loxterkamp DA. Fasting: the history, pathophysiology and complications. *West J Med.* 1982 Nov;137(5):379-99. PMID: 6758355; PMCID: PMC1274154.
 5. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO acceleration plan to stop obesity. Geneva, Suíça: WHO 2022. 18p. ISBN 978-92-4-007563-4 Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/370281/9789240075634-eng.pdf?sequence=1> Acesso em 26 out. 2023
 6. Bahijri SM, Ajabnoor GM, Borai A, Al-Aama JY, Chrousos GP. Effect of Ramadan fasting in Saudi Arabia on serum bone profile and immunoglobulins. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2015 Oct;6(5):223-32. doi: 10.1177/2042018815594527. PMID: 26445645; PMCID: PMC4579416.
 7. Philippou E, Petersson SD, Rodomar C, Nikiphorou E. Rheumatoid arthritis and dietary interventions: systematic review of clinical trials. *Nutr Rev.* 2021 Mar 9;79(4):410-428. doi: 10.1093/nutrit/nuaa033. PMID: 32585000.
 8. Gudden J, Arias Vasquez A, Bloemendaal M. The Effects of Intermittent Fasting on Brain and Cognitive Function. *Nutrients.* 2021 Sep 10;13(9):3166. doi: 10.3390/nu13093166. PMID: 34579042; PMCID: PMC8470960.
 9. Philippou E, Petersson SD, Rodomar C, Nikiphorou E. Rheumatoid arthritis and dietary interventions: systematic review of clinical trials. *Nutr Rev.* 2021 Mar 9;79(4):410-428. doi: 10.1093/nutrit/nuaa033. PMID: 32585000.
-

10. Alanezi, JA. Produção e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais submetidas a programas de muda forçada. 2007. ix, 59 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/104141>>.
 11. de Cabo R, Mattson MP. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *N Engl J Med*. 2019; 381:2541–51. doi:10.1056/NEJMra1905136
 12. Allaf M, Elghazaly H, Mohamed OG, Fareen MFK, Zaman S, Salmasi AM, Tsilidis K, Dehghan A. Intermittent fasting for the prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Jan 29; 1(1):CD013496. doi: 10.1002/14651858.CD013496.pub2. PMID: 33512717; PMCID: PMC8092432.
 13. Lange M, Nadkarni D, Martin L, Newberry C, Kumar S, Kushner T. Intermittent fasting improves hepatic end points in nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Hepatol Commun*. 2023 Aug 3;7(8):e0212. doi: 10.1097/HC9.0000000000000212. PMID: 37534936; PMCID: PMC10552959.
 14. Wilkinson MJ, Manoogian ENC, Zadourian A, Lo H, Fakhouri S, Shoghi A, Wang X, Fleischer JG, Navlakha S, Panda S, Taub PR. Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2020 Jan 7;31(1):92-104.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2019.11.004. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31813824; PMCID: PMC6953486.
 15. Swindell WR. Dietary restriction in rats and mice: a meta-analysis and review of the evidence for genotype-dependent effects on lifespan. *Ageing Res Rev*. 2012 Apr;11(2):254-70. doi: 10.1016/j.arr.2011.12.006. Epub 2011 Dec 23. PMID: 22210149; PMCID: PMC3299887.
 16. Ekmekcioglu C. Nutrition and longevity - From mechanisms to uncertainties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(18):3063-3082. doi: 10.1080/10408398.2019.1676698. Epub 2019 Oct 21. PMID: 31631676.
 17. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*. 2009 Jul 10;325(5937):201-4. doi: 10.1126/science.1173635. PMID: 19590001; PMCID: PMC2812811.
 18. Zhang Q, Zhang C, Wang H, Ma Z, Liu D, Guan X, Liu Y, Fu Y, Cui M, Dong J. Intermittent Fasting versus Continuous Calorie Restriction: Which Is Better for Weight Loss? *Nutrients*. 2022 Apr 24;14(9):1781. doi: 10.3390/nu14091781. PMID: 35565749; PMCID: PMC9099935.12.
-

19. Jeong MA, Plunet W, Streijger F, et al. Intermittent fasting improves functional recovery after rat thoracic contusion spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2011;28(3):479–492. doi:10.1089/neu.2010.1609.
 20. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab*. 2014 Feb 4;19(2):181-92. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.008. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24440038; PMCID: PMC3946160.
 21. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 2011;32:159- 221.
 22. Xu X, Ding J, Wu X, et al. Bone microstructure and metabolism changes under the combined intervention of ketogenic diet with intermittent fasting: an in vivo study of rats. *Exp Anim*. 2019;68(3):371– 380. doi:10.1538/expanim.18-008411
 23. Barnosky A, Kroeger CM, Trepanowski JF, et al. Effect of alternate day fasting on markers of bone metabolism: An exploratory analysis of a 6-month randomized controlled trial. *Nutr Healthy Aging*. 2017;4(3):255–263. Published 2017 Dec 7. doi:10.3233/NHA-170031
 24. Veronese, N & Reginster, JY. The effects of calorie restriction, intermittent fasting and vegetarian diets on bone health *Aging ClinExp Res* (2019) 31: 753. <https://doi.org/10.1007/s40520-019-01174-x>
 25. Karthik V, Guntur AR. Energy Metabolism of Osteocytes. *Curr Osteoporos Rep*. 2021 Aug;19(4):444-451. doi: 10.1007/s11914-021-00688-6. Epub 2021 Jun 12. PMID: 34117625; PMCID: PMC8867538.
 26. Delgado-Calle J, Bellido T. The osteocyte as a signaling cell. *Physiol Rev*. 2022 Jan 1;102(1):379-410. doi: 10.1152/physrev.00043.2020. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34337974; PMCID: PMC8858675.18.
 27. Clayton DJ, Varley I, Papageorgiou M. Intermittent fasting and bone health: a bone of contention? *Br J Nutr*. 2023 Nov 14;130(9):1487-1499. doi: 10.1017/S0007114523000545. Epub 2023 Mar 6. PMID: 36876592; PMCID: PMC10551474.15.
 28. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551– 555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031
 29. Fazzalari, N. L. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int*, v. 22, n. 6, p. 2003-2006. 2011
 30. Kelly, J., Lin, A., Wang, C. J., Park, S., Nishimura, I. Vitamin D and bone physiology: demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *J Prosthodont*, v. 18, n. 6, p. 473-478. 2009.
 31. Day, S. M., Deheer, D. H. Reversal of the detrimental effects of chronic protein malnutrition on long bone fracture healing. *J Orthop Trauma*, v. 15, n. 1, p. 47-53. 2001.
-

32. Guedes PMSG, Zamarioli A, Botega II, Silva RAB da, IssaJPM, Butzloff MM et al. Undernutrition impairs the quality of growth plate and trabecular and cortical bones in growing rats. *Acta Cir. Bras.* 2019.
 33. Zhang Z, Zhang Z, Pei L, Zhang X, Li B, Meng Y, Zhou X. How high-fat diet affects bone in mice: A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2022 Oct;23(10):e13493. doi: 10.1111/obr.13493. Epub 2022 Jul 12. PMID: 35822276.
 34. Patterson RE, Sears DD. Metabolic Effects of Intermittent Fasting. *Annu Rev Nutr.* 2017;37:371-93
 35. Bouxsein, M. L., S. K. Boyd, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*, v. 25, n. 7, p. 1468-1486. 2010.
 36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
 37. Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers. 23. Hickman DL, Swan M. Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49(2):155-159.
 38. Ullman-Cullere MH, Foltz CJ. 1999. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci* 49:319323–23.
 39. Hickman DL, Swan M. Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49(2):155-159.
 40. Chan WCW, Tan Z, To MKT, Chan D. Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021 May 21;22(11):5445. doi: 10.3390/ijms22115445. PMID: 34064134; PMCID: PMC8196788.
 41. Villareal DT, Chode S, Parimi N, Sinacore DR, Hilton T, Armamento-Villareal R, Napoli N, Qualls C, Shah K. Weight loss, exercise, or both and physical function in obese older adults. *N Engl J Med.* 2011 Mar 31;364(13):1218-29. doi:10.1056/NEJMoa1008234. PMID: 21449785; PMCID: PMC3114602.
 42. Armamento-Villareal R, Aguirre L, Waters DL, Napoli N, Qualls C, Villareal DT. Effect of Aerobic or Resistance Exercise, or Both, on Bone Mineral Density and Bone Metabolism in Obese Older Adults While Dieting: A Randomized Controlled Trial. *J Bone Miner Res.* 2020 Mar;35(3):430- 439. doi: 10.1002/jbmr.3905. Epub 2019 Dec 4. PMID: 31797417; PMCID: PMC7064383.
-

43. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*. 2016 Jan;82:42-9. doi: 10.1016/j.bone.2015.05.046. Epub 2015 Jun 6. PMID: 26055108; PMCID: PMC4670816.
 44. Cipriani C, Colangelo L, Santori R, Renella M, Mastrantonio M, Minisola S, Pepe J. The Interplay Between Bone and Glucose Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Mar 24;11:122. doi: 10.3389/fendo.2020.00122. PMID: 32265831; PMCID: PMC7105593.
 45. Tsitsou S, Zacharodimos N, Poulia KA, Karatzi K, Dimitriadis G, Papakonstantinou E. Effects of Time-Restricted Feeding and Ramadan Fasting on Body Weight, Body Composition, Glucose Responses, and Insulin Resistance: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*. 2022 Nov 11;14(22):4778. doi: 10.3390/nu14224778.
 46. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res*. 2018 Mar;59(2):99-107. doi: 10.1080/03008207.2017.1290085. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28324674; PMCID: PMC5612831.
 47. Nickolas TL, Stein EM, Dworakowski E, Nishiyama KK, Komandah-Kosseh M, Zhang CA, McMahon DJ, Liu XS, Boutroy S, Cremers S, Shane E. Rapid cortical bone loss in patients with chronic kidney disease. *J Bone Miner Res*. 2013 Aug;28(8):1811-20. doi: 10.1002/jbmr.1916. PMID: 23456850; PMCID: PMC372069
 48. Farr JN, Khosla S. Cellular senescence in bone. *Bone*. 2019 Apr;121:121-133. doi: 10.1016/j.bone.2019.01.015. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30659978; PMCID: PMC6485943.
-

ANEXO

ANEXO: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.

<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</small> CEUA <small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
--	---

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação do Jejum intermitente na consolidação de fraturas em ratos**”, Protocolo nº 2019.1.912.58.1, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 26/02/2020.

Vigência do Projeto	01/03/2020 a 01/01/2022
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Sprague Dawley
Nº de animais	75
Peso/Idade	600 g / 6 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 26 de fevereiro de 2020.


Prof. Dra. Andjara De Rossi Daldegan

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Apêndice

APÊNDICE - Composição da ração comercial utilizada.

NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DO PRODUTO (NUBILAB CR1®)	
UMIDADE (MÁX)	125g/Kg
PROTEÍNA BRUTA (MIN)	220g/Kg
EXTRATO ETÉREO (MIN)	50g/Kg
MATERIAL MINERAL (MÁX)	90g/Kg
FIBRA BRUTA (MÁX)	70g/Kg
CÁLCIO (MIN-MÁX)	10-14g/Kg
FÓSFORO	6.000 mg/Kg

MANUSCRITO

Manuscripto

Intermittent fasting preserves bone health and callus quality when initiated prior to a bone fracture in rats, but may be detrimental if initiated post-fracture.

Running title: The effects of intermittent fasting on bone quality and callus formation.

Authors

1- Raphael Martini Vicente; VMD; School of Medicine of Ribeirao Preto - University of São Paulo, Brazil. raphamv@forp.usp.br

2- Raquel Assed Bezerra Segato; PhD; School of Dentistry, University of São Paulo, Department of Children's Clinic, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. raquel@forp.usp.br

3- Nilza Leticia Magalhães; School of Dentistry, University of São Paulo, Department of Children's Clinic, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. nilza@forp.usp.br

4- Jose Batista Volpon; MD, PhD; School of Medicine of Ribeirao Preto - University of São Paulo, Brazil. hc.ortopedia@gmail.com

5- Ariane Zamarioli; PhD; School of Medicine of Ribeirao Preto - University of São Paulo, Brazil. ariane_zamarioli@hotmail.com

Corresponding Author

Ariane Zamarioli

Department of Orthopaedics and Anesthesiology

School of Medicine of Ribeirao Preto

Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900

Telephone: +55 16 33153272

E-mail: ariane_zamarioli@hotmail.com

Abstract

Background: Intermittent fasting is a growing trend as a dietary approach for weight loss, with additional health benefits, such as preventing cardiovascular disease and adjuvant cancer treatment. However, there is little information about the effects of intermittent fasting on bone microstructure and metabolism. In the context of the higher prevalence of osteoporosis due to world population aging, and scientific evidence that caloric restriction may affect bone quality, our study addressed the effects of each other-day fasting in fracture healing and bone quality in rats.

Questions/Purposes: (1) How do intermittent fasting affect fracture healing? (2) Does intermittent fasting induce any changes in the contralateral intact bone?

Methods: Seventy-five male Wistar Sprague Dawley, 8-month-old rats were randomly assigned into three groups: (1) Control: rats submitted to a femoral fracture and ad libitum feeding; (2) Pre-fracture each-other-day-fasting (Pre-EODF): rats that started fasting eight weeks before fracture and; (3) Post-EODF: rats that started fasting immediately after the injury. All animals underwent a femoral fracture, which was subsequently reduced by an open surgery and bone fragments stabilization with intramedullary Kirchner wire. Animals were euthanized on days 5 and 14 post fracture, in which bone calluses and the contralateral intact femur were analyzed by computed microcomputed tomography, dual-energy X-ray absorptiometry, histomorphometry, immunohistochemistry, mechanical testing, and PCR.

Results: EODF groups exhibited significantly lower body mass than the control rats, confirming intermittent fasting as an effective method for body weight loss. Although both EODF groups showed lower expression of osterix SP-7 than the control rats, no other osteoblastic gene expression changes were detected. Post-EODF rats exhibited fracture calluses with higher osteoclastic activity than the controls and Pre-EODF groups. Post-EODF

rats also showed lower cortical volume at the intact contralateral bone than the control and Pre-EODF groups.

Conclusions: Aside from the isolated lower expression of osterix at the calluses, EODF for two months was an efficient and safe method for weight loss in rats that drove no impairments in bone healing and bone quality. On the other hand, introducing EODF after a bone fracture caused an additional increase in osteoclastic activity and lower osterix expression at the bone calluses. Furthermore, it also induced some detrimental changes in the contralateral cortical bone by reducing its volume.

Clinical Relevance: Although we only detected punctual changes in the minority of our analysis, careful and supervised assistance should be taken in the prescription and follow-up of intermittent fasting in the elderly. When the dietary approach is already practiced, it might not cause any impairments to the bone tissue, even when a bone fracture occurs. However, the protocol should not be prescribed acutely after a bone fracture as it may be deleterious to bone healing and general bone health, mainly in the elderly population.

Introduction

With the aging of the world population, diseases of the locomotor system such as osteoporosis have increased in incidence, reaching a 21% prevalence in people over 50 years old in the United States [30, 27]. In elderly patients and those with osteoporosis, the risk and incidence of bone fractures are also increased [33].

Dietary practices are classically proposed in the prevention and treatment of various diseases. Intermittent fasting (IF) is a strategy in which food intake is partially or entirely restricted for specific hours. Historical records dating back millennia demonstrate humans carrying out the practice in search of physical, mental, and religious benefits [19]. In a global

context, where the prevalence of obesity is estimated at one billion people in 2030 [35], IF has become popular among health professionals and patients. Furthermore, it is also important to highlight that over a billion people currently practice IF as a religious orientation during Ramadan [3]. Studies of the implications of IF thus become of great relevance in public health. Clinically, the use of IF has already been proposed as an adjunct in the treatment of some types of epilepsy, brain damage associated with seizures, and rheumatoid arthritis [16, 25].

In the last decade, there was great repercussion with works published on IF in important medical journals. Some have claimed quite impressive beneficial effects [9]. However, some studies were criticized for their non-standardized methods or results with low-quality evidence [1]. In this context, due to the large number of studies and the great interest in the topic, meta-analyses that have studied clinical outcomes and metabolic markers in humans have already been published [1]. One of them associated the diet with the treatment of non-alcoholic fatty liver disease and demonstrated, with moderate to high-quality evidence, that IF can improve surrogate outcomes and promote loss of body mass in adults with the disease [20].

Despite the inconclusive consensus on the clinical indication of intermittent fasting today, published studies have shown improvements in metabolic and cardiovascular parameters in patients with metabolic syndrome who had already unsuccessfully tried other weight loss treatments [34]. Importantly for veterinary medicine, with promise for human medicine, are the works that indicate evidence of an increase in the life expectancy of animals that have undergone calorie restriction regimes in long protocols [8, 12, 25].

The comparison of IF with classic caloric restriction seems to be the focus of the debate on dietary indications for loss of body mass. Despite the meta-analysis by Zhang et al.

[37], which states that IF was superior to calorie restriction for weight loss, the evidence of the superiority of one diet over another is still conflicting, and more studies will be needed, especially for the long-term effects. Generally, after 10 to 14 hours of energy restriction in humans, the body responds to the fasting stimulus by reducing anabolic processes, favoring maintenance and repair systems. However, still little was investigated in animals and humans [9, 15, 17, 22, 26]. And little is known about the effects of intermittent fasting on bone tissue. When studying the effects of fasting in Ramadan, Bahijri and collaborators [3] hypothesized that IF could be beneficial to bone health by modulating parathyroid hormone secretion in humans. In a randomized study, Barnosky and collaborators concluded that fasting on alternate days for six months did not have any deleterious impact on markers of bone metabolism in obese adults who had moderate weight loss (23). There is still no publication related to bone consolidation and remodeling. In this way, the execution of this study is justified to identify the effects of intermittent fasting on bone tissue and healing after fractured bone.

Methods

All animal procedures were approved by the Animal Care Committee of our Institution, according to Brazilian law and following ARRIVE guidelines. The team involved in this project has previous experience and proven training in ethical and practical laboratory animal science, and a veterinarian monitored the animals throughout the experimental period. Seventy-five rats (*Rattus norvegicus*, Sprague Dawley, USP Ribeirão Preto breeding strain) were carefully treated until they reached the age to begin experiments, eight months old (Figure 1). The animals were weighed once a week and had their food intake measured during the entire experiment. Animals were randomly divided into three groups (n=25/group): (1)

Control: rats submitted to a femoral fracture and ad libitum feeding; (2) Pre-fracture each-other-day-fasting (Pre-EODF): rats that started fasting eight weeks before fracture and; (3) Post-EODF: rats that started fasting immediately after the injury.

Femoral fracture

After sixty days, all rats underwent bone fractures and surgical reduction procedures. Initially, the animals were subjected to inhalation anesthesia with isoflurane (BioChimico, Brazil), induction at 4-5% and maintenance at 1.5-2.5%, and morphine hydrochloride (Cristália, Brazil), 8 mg/kg intramuscular. They were also medicated with flunixin meglumine, 2mg/kg subcutaneously (SC) (Schering-Plough, Brazil) and antibiotics (Veterinary Pentabiotic 0.1ml/100g intramuscularly, Fort Dodge, Brazil). Trichotomy and antisepsis of the entire right pelvic limb were performed with PVPI iodine alcoholic solution. An incision was made for lateral access in the thigh through the intermuscular septum and exposure of the middle third of the femoral shaft. With a diamond disc coupled to a low rotation motor for dental use, a bicortical cut was performed, with continuous saline solution irrigation, until the complete and transverse fracture was confirmed. Surgical stainless steel (Kirschner) 1 mm thick was inserted through the medullary canal from the proximal fragment to the condylar region. The fracture was then reduced under direct observation, and the Kirschner wire advanced through the medullary canal of the distal fragment until its extremity could be felt by palpating the skin between the knee condyles. After confirmation of the reduction and stabilization of the fracture, the excess Kirschner wire was cut. The muscular plane and the incision in the lateral region of the thigh were sutured with nylon 4.0, and the skin was finally cleaned with topical PVPI iodine solution. Rats were observed until the rapid return of inhalation anesthesia. In the immediate post-operative period, they already bore their

weight on the operated leg and showed no signs of significant pain. All animals were medicated with Tramadol 8 mg/kg (Agener, Brazil) (SC) every 12 hours for two days and anti-inflammatory flunixin meglumine 2 mg/kg every 12 hours (SC) for two days. Animals were monitored daily for signs of pain or discomfort and weighed weekly. Radiological analyses were performed weekly to monitor bone consolidation. The dietary regimen continued as described.

Euthanasia and sample preparation

After 4 days (PCR) and 14 days (phenotypical analyses), rats were euthanized using an overdose dose of sodium thiopental (Thiopental® Cristália, Brazil). After dissection and macroscopic examination, fractured femurs were frozen at -20° for analysis of densitometry, microcomputed tomography, and mechanical testing. The samples were fixed in 4% paraformaldehyde for histomorphometric and immunohistochemical analysis. The specimens were immersed in liquid nitrogen for gene expression analysis and stored at -80°C until extraction.

Micro-computed tomography (μ CT)

Femurs underwent slow defrost and were scanned by SkyScan1276 (Bruker, Belgium). The CtAn software (Bruker) was used to set the region of interest and to perform morphometric quantification of the bone callus and trabecular and cortical bone from the contralateral femur. The microtomographic images were obtained with a pixel resolution of 13 μ m. An 8 mm region of interest (600 slices), centered at the fracture, was delimited in the fractured bone. The newly formed bone was differentiated from the cortical bone using image contrast (threshold 70-160). The variables quantified were: bone volume (BV) in mm³;

fraction of bone trabecular volume (BV/TV) in %; bone surface of the callus (BS/BV) in mm; number of trabeculae (Tb.N) in number/mm; thickness of callus trabeculae (Tb.Th) in μm ; spacing between trabeculae (Tb.Sp) in μm ; density of intertrabecular connections (Conn.D) in number/ mm^3 . In the contralateral, intact femur, the trabecular region of the distal metaphysis was analyzed at 0.5 mm proximal to the distal growth cartilage for a length of 3 mm (x slices). The parameters analyzed were: total volume (TV), in mm^3 ; BV/TV; Tb.N; Tb.Th; Tb.Sp and; Conn.D. Cortical bone tissue was analyzed in the femoral diaphysis, 8 mm proximal to the distal growth cartilage, by a 2 mm extension. The parameters analyzed were: cortical volume (Ct.V), in mm^3 ; cortical thickness (Ct.Th), in μm and; cortical porosity (Ct.Po), in %. All nomenclatures are in accordance with ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) (34).

Bone densitometry by Dual-energy X-ray Absorptiometry

Bone densitometry with dual emission X-rays (DXA) was performed at the Lunar DPX-IQ densitometer (GE Health Care, United States). The global density was analyzed using software specific for densitometric analysis of the appendicular skeleton of small animals. In the femur without fracture, an area of 0.09 cm^2 was used, located in the distal metaphysis, proximal to the growth cartilage. The entire region of the bone callus was analyzed in the fractured femur, in which bone mineral density (BMD in g/cm^2) and bone mineral content (BMC in grams) were measured. The scanning reproducibility demonstrated a 4% variability.

Mechanical Testing

The intact bones were subjected to three-point mechanical testing. The parameters quantified were maximum strength (N), and stiffness (N.mm), calculated from the load x deformation curve. The femurs were positioned by two supports on the metaphyses, with a free span of 30 millimeters, and the strength was applied to the anterior surface of the diaphysis. A 500N load cell was used, with a preload of 10 N, with a settling time of 20 seconds and a load application speed of 1mm/ min.

Histomorphometry

5- μ m coronal sections of the fracture callus were stained with hematoxylin-eosin (H&E), for general qualitative evaluation, Masson's trichrome for trabeculae quantification, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) for osteoclastic activity, and picosirius red for collagen quantification in the callus.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry involved the incubation of tissues with primary antibodies to OPG (A2100, anti-rabbit, Woburn, MA, USA), RANK (A12997, anti-rabbit, Woburn, MA, USA), and RANKL (A2550, anti-rabbit, Woburn, MA, USA). Positive immunostaining for OPG, RANK, and RANKL was quantified using ImageJ software (NIH, version 1.52a) and expressed into total marked area mm².

RNA extractions and gene expression by real-time PCR

For PCR analysis, the following target genes were evaluated: IGF1 (insulin-like growth factor), Runx2 (runt-related transcription factor 2), Sp7 (Sp7 or osterix transcription factor), and Colla1 (collagen type 1, alpha 1 chain). Whole and fractured femurs were

collected and immediately placed in liquid nitrogen and frozen in a -80 C freezer. Total RNA isolation was performed by macerating the bone tissue with a sterile crucible in liquid nitrogen until it was reduced to a powder. Trizol reagent (Life Technologies®, USA) was added, and centrifuges were used according to the manufacturer's protocol. At the end of the process, the solution was separated into three phases, and the phase of interest, with RNA, was stored. The result of this extraction was analyzed for its purity and quantity by NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., United States). For DNA synthesis complementary (cDNA) the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit was used (Applied Biosystems, Foster City, USA), following the manufacturer's recommendations. Real-time PCR assays were carried out using the TaqMan® kit and the thermocycler (StepOnePlus™ Real-Time PCR System from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genes were evaluated in duplicate reactions. Results were normalized using the endogenous reference gene GaPDH. The gene expression was calculated using the threshold cycle (Ct) value. The 2- $\Delta\Delta C_t$ method was used to evaluate the relative expression of genes (36).

Statistical analysis

Data was analyzed using JASP software (version 0.17.3, JASP Team, Netherlands). The results were presented as mean and standard deviation. The normal distribution was evaluated using the Shapiro-Wilk test, and the equity of variances was evaluated using Levene's test. ANOVA test was used to compare groups. In case of difference, the Tukey post-test was used for multiple comparisons. In case of non-normality of data, the Kruskal Wallis non-parametric test was used, followed by the Dunn test. The significance level was set at 5%.

Results

Experimental complications

Seventy-five animals began the study at seven weeks of age, while fifty-nine animals (78.7%) completed the study. One animal developed an unknown subcutaneous tumor before reaching the experimental age, before fasting treatment, and was euthanized. Seven animals (9.5%) died during post-operative period, probably due to surgical and anesthetic complications in senile animals. Eight animals had complications of instability during fracture reduction or migration of the Kirshner wire and were euthanized as a humane endpoint (10.7%). With the losses, we reached the end of the experimental part with 16 animals in the control group, 20 in the pre-EODF group, and 23 in the post-EODF group.

Body mass changes and food consumption throughout the experimental period

Animals were systematically monitored for their body mass, beginning one week before fasting treatment (Figure 2). At the end of two months, the pre-fracture fasting group had a body weight 7.35% lower than the control group (Cohen's $d = 2.87$ (IC 95% 1.5-4.1); $p < 0.001$). Average food consumption was also monitored, as shown in Figure 2. There was a significant difference in daily food consumption (on feeding days, $p < 0.001$) and total weekly calorie consumption, generating a calorie deficit in the fasting group of 26.5% food reduction Cohen's $d = 2.45$ (IC 95% 0.99-3.84); $p < 0.001$). Although the fasting group ate more in the feeding days than the control, the total food consumption in the period was inferior.

SP-7 gene expression was downregulated by intermittent fasting at the bone calluses

Osteoblastic-related genes were assessed by real-time PCR. Figure 3 shows the relative expression of the IGF-1, RUNX-2, COL1A1, and SP7 genes. We detected a

significant downregulation in SP-7 expression at the bone calluses in the animals submitted to intermittent fasting compared to the control ($p=0.004$ x post-EODF and $p=0.007$ x pre-EODF). Although the difference was significant for this gene, we detected no further changes at the calluses or intact bones.

Intermittent fasting seems not to impair bone healing or the intact bone when its practice begins before an osseous incident

We have assessed the calluses density by densitometry, calluses microarchitecture by microcomputed tomography, and bone cells activity by histology and immunohistochemistry. All these analyses showed no detrimental effects of the intermittent fasting protocol on the formation of fracture calluses in senile rats. There was no statistical difference in microstructural parameters (BV, BV/TV, BS/BV, Tb.N, Tb.Th, Tb.Sp, and ConnD, Figure 4A); bone mass (BMD and BMC, Figure 4B); collagen deposition area (Picro Sirius, Figure 5A); osteoclastic activity (Trap; Figure 5B); and immune markers (OPG, RANK, and RANK-L, Figure 5C) at the bone calluses.

Similarly, we assessed the contralateral and intact femur by densitometry, microcomputed tomography, histomorphometry, and bone strength by mechanical test. All these analyses showed no detrimental effects of the intermittent fasting protocol at the bone quality and quantity in senile rats. As of note, we did not detect any statistical differences between the groups with regards to both trabecular (BV, BV/TV, BS/BV, Tb.N, Tb.Th, Tb.Sp, ConnD) and cortical (Ct.V, Ct.BV/TV, Ct.Th) microstructural parameters (figure 6A); bone mass (BMD and BMC, Figure 6B); trabecular area (Masson's trichrome, Figure 6C); and mechanical resistance (Table 1) at the intact contralateral femurs.

Intermittent fasting seems to impair bone healing and intact bone in the onset of a bone fracture

Although IF exhibited no detrimental effects on bone calluses and their contralateral intact femurs when started eight weeks before a femoral fracture, it showed some detrimental evidence when it started right after the fracture.

A significant TRAP upregulation was detected in the post-EODF group compared to control ($p=0.033$) effect size $d=-0.56$ IC 95% (-1.09|-0.017).

Aside from the fracture calluses, the contralateral and intact femurs were also impaired by intermittent fasting when it began at the onset of a bone fracture. We found a significant 6% reduction in cortical bone volume in the post-EODF group compared to the control (d Cohen effect size = 1.27 (IC 95%, -0.12 - +2.67; $p<0.01$, Figure 6A). Although we did not detect significant changes at the remaining assessments, there was a trend towards a higher BS/BV ($p=0.07$) (Figure 6A).

Discussion

Obesity in older adults is a public health problem that challenges clinicians. Unlike younger patients, management for body mass loss in elderly and middle-aged individuals should also consider issues that are often present, such as difficulty with mobility and prescription of physical exercises likely due to cardiovascular diseases, osteoporosis, sarcopenia and other age-related conditions (40). Studies have also shown that diets of caloric restriction that induced body mass reduction might lead to bone loss, especially when not accompanied by physical exercise (41). In that context, it is essential to know whether IF diets also affect fracture healing so that clinicians can be alert for nutritional management recommendations, such as discontinuing an intermittent fasting regimen that a patient is

already following. Recent studies have hypothesized that IF could bring several benefits in humans' clinical and surrogate outcomes (i.e., improvement in laboratory tests) (8, 9, 11). However, newer and more standardized studies, such as those based on meta-analyses, have yielded controversial results. For weight loss, however, the practice has proven efficient and is an option for people who have difficulty adhering to regular calorie-restriction diets and physical exercise (14). In these cases, or in veterinary care such as captivity, zoos, and vivariums, where caloric restriction and physical exercise can be challenging, IF seems to be a good option for weight control and obesity treatment.

The beneficial effects found in works that used IF diets appear closely linked to weight loss. Moreover, evidence of IF as an efficient coadjutant in treating cancer and age-related diseases continues to appear in animal research. Therefore, the current work aims to understand the potential effects of IF on bone quality. It is essential to highlight that IF could reverse obesity in animals in a very short time (2 months), promoting significant weight loss. In addition, our bone architecture analyses demonstrated that IF did not affect callus formation in animals that fasted before the femoral fracture. Similarly, no further changes were detected in bone density, strength, collagen deposition, trabecular area, osteoclastic activity, and immune markers, confirming that when IF was initiated before bone fracture, it did not disrupt either intact bone health or fracture callus formation. However, in the group that started fasting after the fracture, a higher osteoclastic activity (trap staining) was detected at the callus compared to the control and pre-fracture fasting groups. Likewise, a significant loss in cortical bone volume was detected at the contralateral femur in animals that began fasting after the fracture.

We should highlight our limitations concerning our gene expression analysis. Although both EODF groups showed lower expression of osterix SP-7 than the control rats, no other

osteoblastic gene expression changes were detected. Furthermore, we have worked with a small sample size for this analysis due to tissue damage and instability during storage prior to the assays. Further studies should enlarge and confirm our molecular assessments and evaluate systemic responses to fasting (i.e. plasma markers), in addition to our local investigations at the bone tissue. We believe that when the dietary approach is already practiced, it might not cause any impairments to the bone tissue, even when a bone fracture occurs, likely due to an osteometabolic adaptation to the period and routine of fasting. However, beginning fasting after a fracture does not allow the body to adapt to the new energy intake and for the repeatedly alternating fixed periods of fasting (catabolism) and eating (anabolism), leading to some level of osteometabolic impairment. Therefore, clinicians should carefully assess fasting protocols and discontinue them if they may threaten bone healing and general bone health.

References

1. Allaf M, Elghazaly H, Mohamed OG, Faren MFK, Zaman S, Salmasi AM, Tsilidis K, Dehghan A. Intermittent fasting for the prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Jan 29; 1(1): CD013496. doi: 10.1002/14651858.CD013496.pub2. PMID: 33512717; PMCID: PMC8092432.
 2. Armamento-Villareal R, Aguirre L, Waters DL, Napoli N, Qualls C, Villareal DT. Effect of Aerobic or Resistance Exercise, or Both, on Bone Mineral Density and Bone Metabolism in Obese Older Adults While Dieting: A Randomized Controlled Trial. *J Bone Miner Res*. 2020 Mar;35(3):430-439. doi: 10.1002/jbmr.3905. Epub 2019 Dec 4. PMID: 31797417; PMCID: PMC7064383.
 3. Bahijri SM, Ajabnoor GM, Borai A, Al-Aama JY, Chrousos GP. Effect of Ramadan fasting in Saudi Arabia on serum bone profile and immunoglobulins. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2015 Oct;6(5):223-32. doi: 10.1177/2042018815594527. PMID: 26445645; PMCID: PMC4579416.
 4. Barnosky A, Kroeger CM, Trepanowski JF, et al. Effect of alternate day fasting on markers of bone metabolism: An exploratory analysis of a 6-month randomized controlled trial. *Nutr Healthy Aging*. 2017;4(3):255–263. Published 2017 Dec 7. doi:10.3233/NHA-170031
-

5. Bouxsein, M. L., S. K. Boyd, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*, v. 25, n. 7, p. 1468-1486. 2010.
 6. Chan WCW, Tan Z, To MKT, Chan D. Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021 May 21;22(11):5445. doi: 10.3390/ijms22115445. PMID: 34064134; PMCID: PMC8196788.
 7. Clayton DJ, Varley I, Papageorgiou M. Intermittent fasting and bone health: a bone of contention? *Br J Nutr*. 2023 Nov 14;130(9):1487-1499. doi: 10.1017/S0007114523000545. Epub 2023 Mar 6. PMID: 36876592; PMCID: PMC10551474.15.
 8. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*. 2009 Jul 10;325(5937):201-4. doi: 10.1126/science.1173635. PMID: 19590001; PMCID: PMC2812811.
 9. de Cabo R, Mattson MP. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *N Engl J Med*. 2019; 381:2541–51. doi:10.1056/NEJMra1905136
 10. Day, S. M., Deheer, D. H. Reversal of the detrimental effects of chronic protein malnutrition on long bone fracture healing. *J Orthop Trauma*, v. 15, n. 1, p. 47-53. 2001.
 11. Delgado-Calle J, Bellido T. The osteocyte as a signaling cell. *Physiol Rev*. 2022 Jan 1;102(1):379-410. doi: 10.1152/physrev.00043.2020. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34337974; PMCID: PMC8858675.18.
 12. Ekmekcioglu C. Nutrition and longevity - From mechanisms to uncertainties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(18):3063-3082. doi: 10.1080/10408398.2019.1676698. Epub 2019 Oct 21. PMID: 31631676.
 13. Fazzalari, N. L. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int*, v. 22, n. 6, p. 2003-2006. 2011 30. 20. Kelly, J., Lin, A., Wang, C. J., Park, S., Nishimura, I. Vitamin D and bone physiology: demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *J Prosthodont*, v. 18, n. 6, p. 473-478. 2009.
 14. Guedes PMSG, Zamarioli A, Botega II, Silva RAB da, IssaJPM, Butezloff MM et al. Undernutrition impairs the quality of growth plate and trabecular and cortical bones in growing rats. *Acta Cir. Bras*. 2019.
 15. Gudden J, Arias Vasquez A, Bloemendaal M. The Effects of Intermittent Fasting on Brain and Cognitive Function. *Nutrients*. 2021 Sep 10;13(9):3166. doi: 10.3390/nu13093166. PMID: 34579042; PMCID: PMC8470960.
 16. Hickman DL, Swan M. Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010;49(2):155-159.
 17. Jeong MA, Plunet W, Streijger F, et al. Intermittent fasting improves functional recovery after rat thoracic contusion spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2011;28(3):479–492. doi:10.1089/neu.2010.1609. 31
-

18. Karthik V, Guntur AR. Energy Metabolism of Osteocytes. *Curr Osteoporos Rep.* 2021 Aug;19(4):444-451. doi: 10.1007/s11914-021-00688-6. Epub 2021 Jun 12. PMID: 34117625; PMCID: PMC8867538.
 19. Kerndt PR, Naughton JL, Driscoll CE, Loxterkamp DA. Fasting: the history, pathophysiology and complications. *West J Med.* 1982 Nov;137(5):379-99. PMID: 6758355; PMCID: PMC1274154.
 20. Lange M, Nadkarni D, Martin L, Newberry C, Kumar S, Kushner T. Intermittent fasting improves hepatic end points in nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Hepatol Commun.* 2023 Aug 3;7(8):e0212. doi: 10.1097/H9.0000000000000212. PMID: 37534936; PMCID: PMC10552959.
 21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
 22. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab.* 2014 Feb 4;19(2):181-92. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.008. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24440038; PMCID: PMC3946160.
 23. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6):551– 555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031
 24. Philippou E, Petersson SD, Rodomar C, Nikiphorou E. Rheumatoid arthritis and dietary interventions: systematic review of clinical trials. *Nutr Rev.* 2021 Mar 9;79(4):410-428. doi: 10.1093/nutrit/nuaa033. PMID: 32585000.
 25. Swindell WR. Dietary restriction in rats and mice: a meta-analysis and review of the evidence for genotype-dependent effects on lifespan. *Ageing Res Rev.* 2012 Apr;11(2):254-70. doi: 10.1016/j.arr.2011.12.006. Epub 2011 Dec 23. PMID: 22210149; PMCID: PMC3299887.
 26. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 2011;32:159- 221.
 27. Salari N, Ghasemi H, Mohammadi L, Behzadi MH, Rabieenia E, Shohaimi S, Mohammadi M. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2021 Oct 17;16(1):609. doi: 10.1186/s13018-021-02772-0. PMID: 34657598; PMCID: PMC8522202.
 28. Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., and Underwood, L.E. (1994a). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.* 15, 80–101. 42. Nickolas TL, Stein EM, Dworakowski E, Nishiyama KK, Komandah-Kosseh M, Zhang CA, McMahon DJ, Liu XS, Boutroy S, Cremers S, Shane E. Rapid cortical bone loss in patients with chronic kidney disease. *J Bone Miner Res.* 2013 Aug;28(8):1811-20. doi: 10.1002/jbmr.1916. PMID: 23456850; PMCID: PMC372069
 29. Ullman-Cullere MH, Foltz CJ. 1999. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci* 49:319323–
 30. Vicerra PMM. Population Ageing in Lower and Middle-income Countries: Policy Landscape of Southeast Asian Countries. *Curr Aging Sci.* 2023;16(3):188-193. doi: 10.2174/1874609816666230516150701. PMID: 37194225.
-

31. Veronese, N & Reginster, JY. The effects of calorie restriction, intermittent fasting and vegetarian diets on bone health *Aging ClinExp Res* (2019) 31: 753. <https://doi.org/10.1007/s40520-019-01174-x>
 32. Villareal DT, Chode S, Parimi N, Sinacore DR, Hilton T, Armamento-Villareal R, Napoli N, Qualls C, Shah K. Weight loss, exercise, or both and physical function in obese older adults. *N Engl J Med*. 2011 Mar 31;364(13):1218-29. doi:10.1056/NEJMoa1008234. PMID: 21449785; PMCID: PMC3114602.
 33. Wang L, Yu W, Yin X, Cui L, Tang S, Jiang N, Cui L, Zhao N, Lin Q, Chen L, Lin H, Jin X, Dong Z, Ren Z, Hou Z, Zhang Y, Zhong J, Cai S, Liu Y, Meng R, Deng Y, Ding X, Ma J, Xie Z, Shen L, Wu W, Zhang M, Ying Q, Zeng Y, Dong J, Cummings SR, Li Z, Xia W. Prevalence of Osteoporosis and Fracture in China: The China Osteoporosis Prevalence Study. *JAMA Netw Open*. 2021 Aug 2;4(8):e2121106. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.21106. PMID: 34398202; PMCID: PMC8369359.
 34. Wilkinson MJ, Manoogian ENC, Zadourian A, Lo H, Fakhouri S, Shoghi A, Wang X, Fleischer JG, Navlakha S, Panda S, Taub PR. Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2020 Jan 7;31(1):92-104.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2019.11.004. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31813824; PMCID: PMC6953486.
 35. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO acceleration plan to stop obesity. Geneva, Suíça: WHO 2022. 18p. ISBN 978-92-4-007563-4 Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/370281/9789240075634-eng.pdf?sequence=1> Acesso em 26 out. 2023
 36. Xu X, Ding J, Wu X, et al. Bone microstructure and metabolism changes under the combined intervention of ketogenic diet with intermittent fasting: an in vivo study of rats. *Exp Anim*. 2019;68(3):371– 380. doi:10.1538/expanim.18-008411
 37. Zhang Q, Zhang C, Wang H, Ma Z, Liu D, Guan X, Liu Y, Fu Y, Cui M, Dong J. Intermittent Fasting versus Continuous Calorie Restriction: Which Is Better for Weight Loss? *Nutrients*. 2022 Apr 24;14(9):1781. doi: 10.3390/nu14091781. PMID: 35565749; PMCID: PMC9099935.12.
 38. Zhang Z, Zhang Z, Pei L, Zhang X, Li B, Meng Y, Zhou X. How high-fat diet affects bone in mice: A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2022 Oct;23(10):e13493. doi: 10.1111/obr.13493. Epub 2022 Jul 12. PMID: 35822276..
-

Figure legends

Figure 1. Schematic representation of the study design and timeline.

Figure 2. Body mass and food consumption compared between EODF and control groups. It shows that fasting animals consume a larger amount of food on the days they are fed despite a similar intake between the groups.

Figure 3. Osteoblastic-related genes at the non-fractured femurs and fractured femurs. EODF groups showed lower expression of osterix SP-7 than the control rats ($p < 0.05$). No further significant changes were detected.

Figure 4. Tridimensional image and bone morphometry of fracture calluses by μ CT. No significant changes were detected among the groups ($p > 0.05$).

Figure 5. Histomorphometry assessment of collagen deposition by *picrosirius* (A), osteoclastic activity by TRAP (B), and immunohistochemistry (C) at the bone calluses. Post-EODF group exhibited higher osteoclastic activity than control ($p = 0.03$). No further significant changes were detected.

Figure 6. Tridimensional image and morphometry of trabecular and cortical (A) bone at the intact femur by μ CT. Post-EODF group showed lower cortical volume (Ct.V) than control animals ($p < 0.01$). No further significant changes were detected ($p > 0.05$). Assessment of bone mineral content and density at the intact femur by DXA (B). Histological section stained with Masson's trichrome and trabecular area quantification (C). No significant changes with regards to DXA and trabecular histomorphometry were detected among the groups ($p > 0.05$).

Table.1

	CONTROL	PRE-EODF	POST-EODF
BMD intact	0.162±0.038	0.155±0.023	0.148±0.025
BMC intact	0.014±0.003	0.014±0.002	0.013±0.002
Maximum Strength (N)	226.32±30.221	213.194±35.108	201.916±19.397
Relative Thickness (N/mm)	328.24±92.313	299.289±66.644	279.130±68.044

Fig 1.

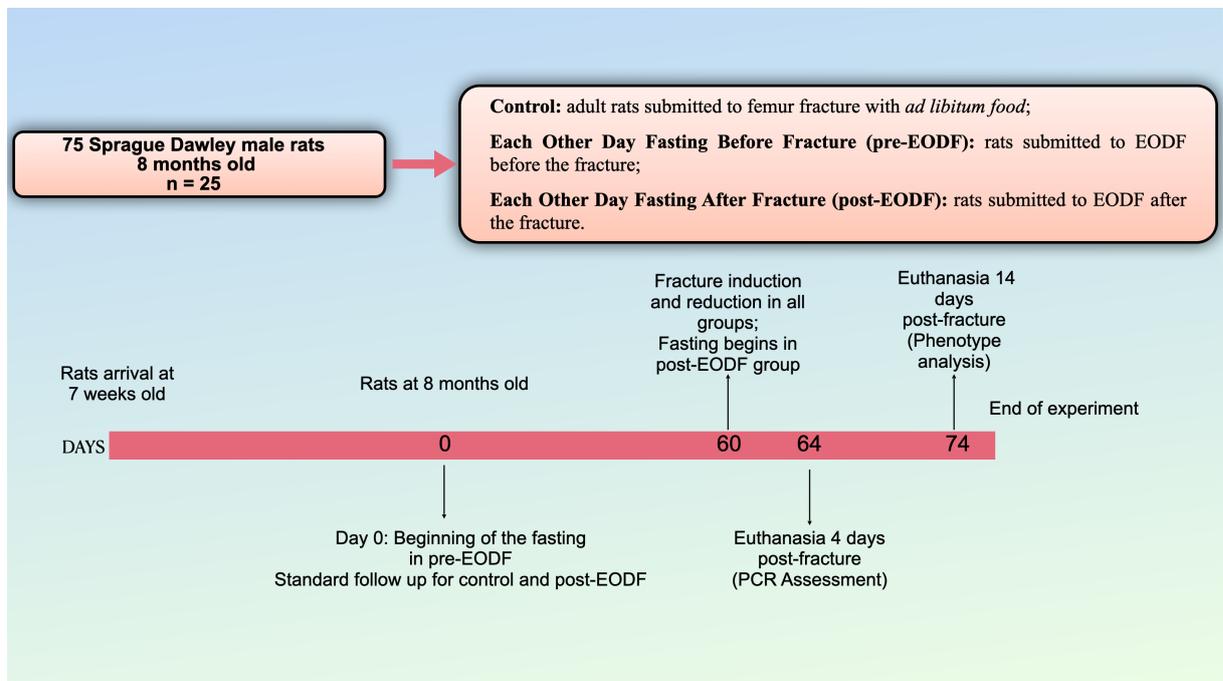


Fig 2.

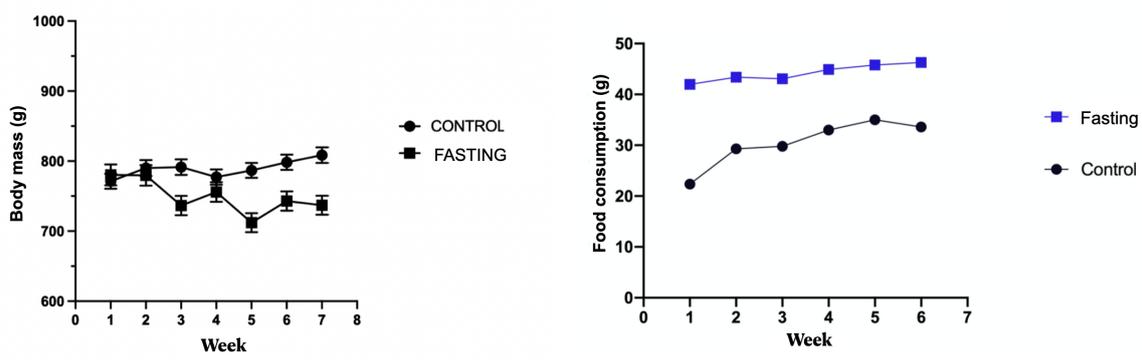


Fig 3.

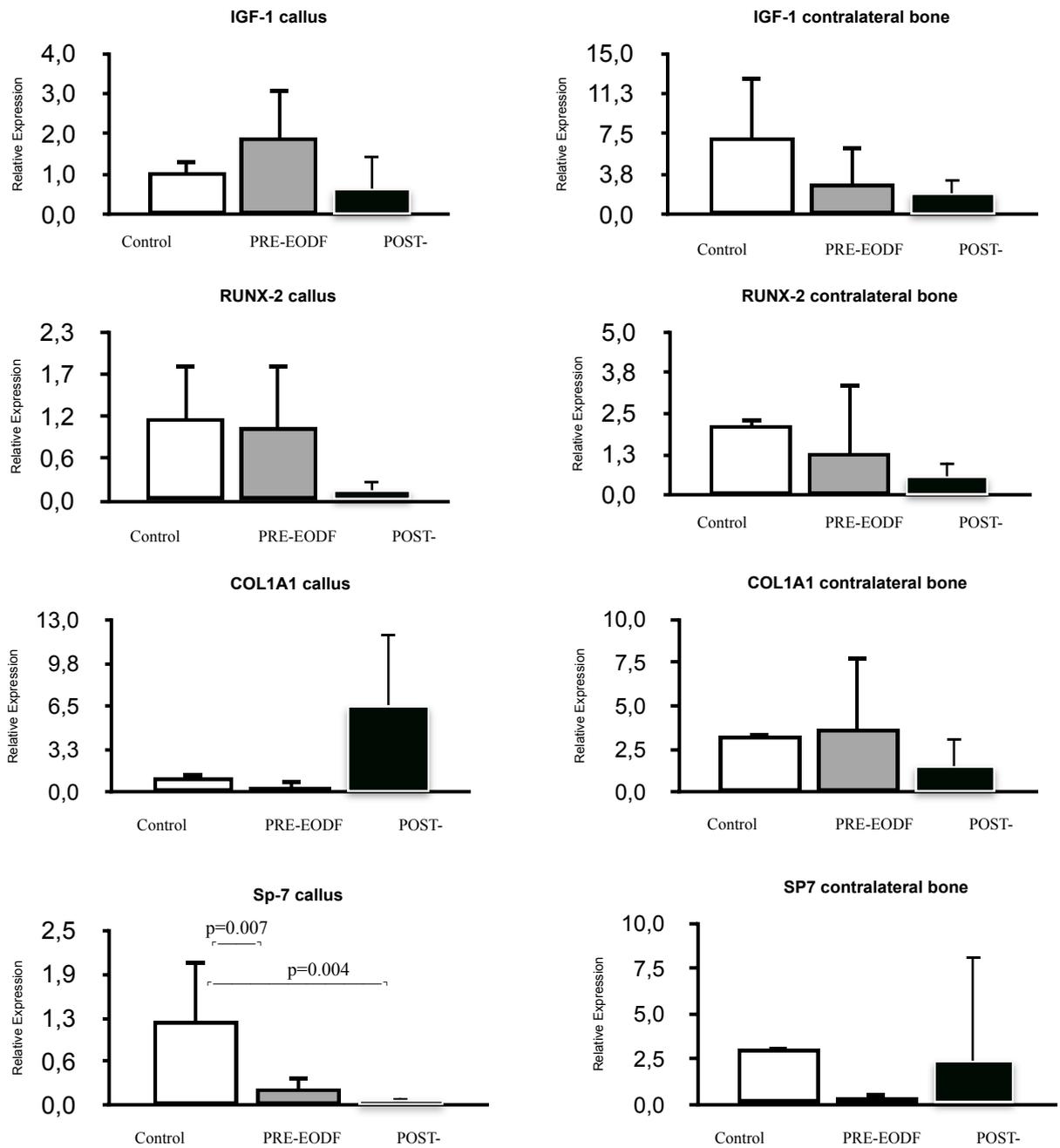


Fig 4.

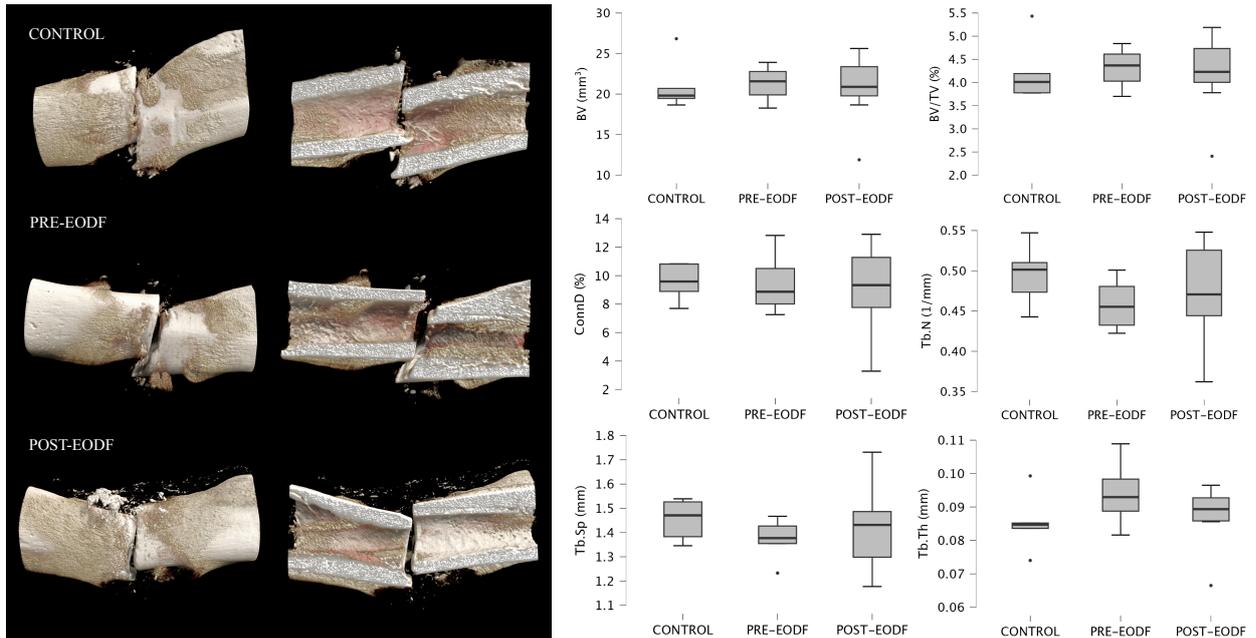


Fig 5.

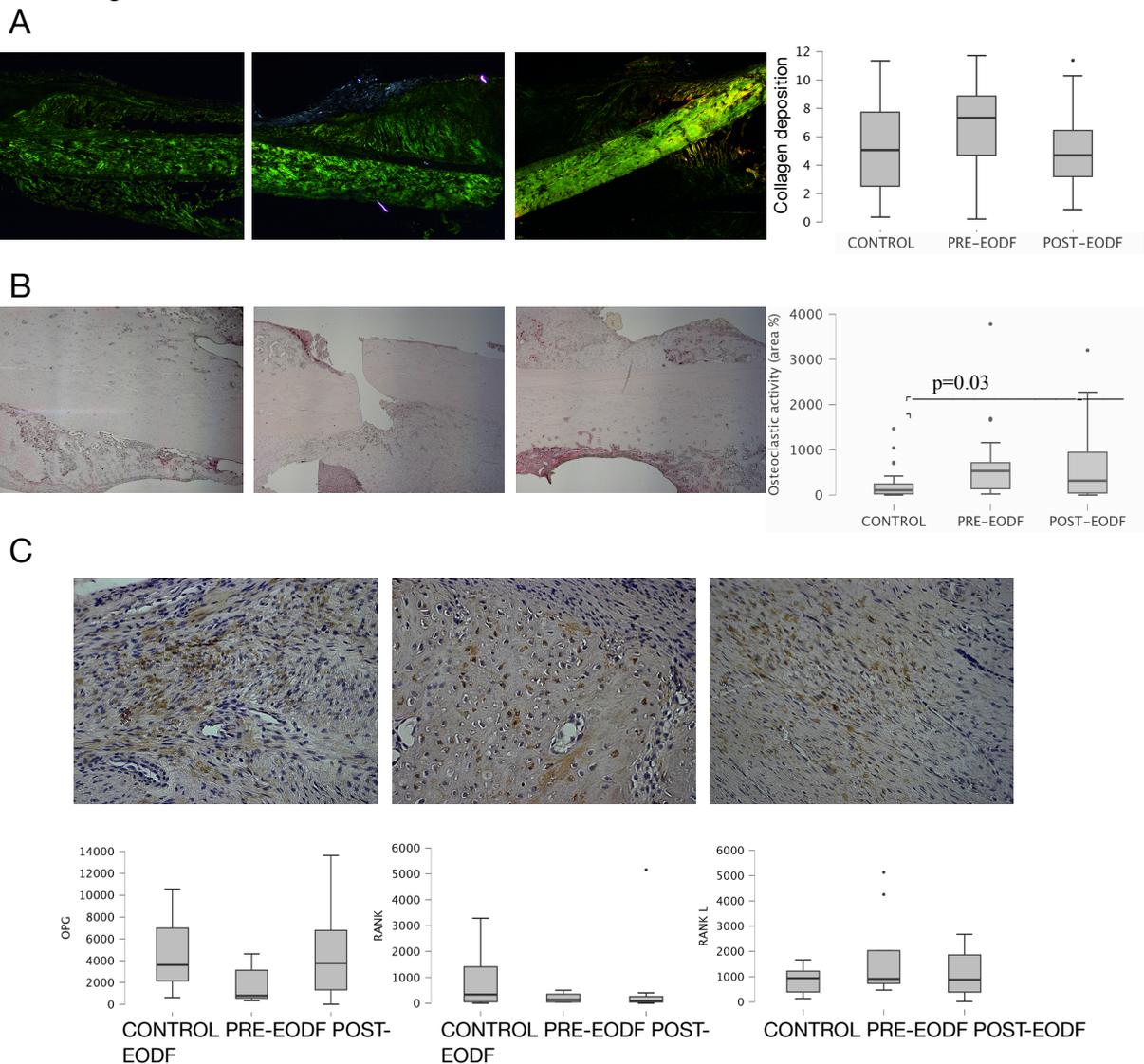


Fig 6.

