

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e
Aplicadas

AVALIAÇÃO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES PRIMÁRIOS DE RATOS
WISTAR TRATADOS COM FRUTOSE

TATIELE ESTEFÂNI SCHÖNHOLZER

BARRA DO GARÇAS-MT

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e
Aplicadas

AVALIAÇÃO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES PRIMÁRIOS DE RATOS
WISTAR TRATADOS COM FRUTOSE

TATIELE ESTEFÂNI SCHÖNHOLZER

Orientadora: Paula Cristina de Souza Souto

Co-orientador: Kleber Eduardo de Campos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia – UFMT, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas.

BARRA DO GARÇAS-MT

2016

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha família e amigos.

“Acreditávamos que a troca equivalente era a verdade do mundo, mas estávamos enganados, porém podemos conseguir qualquer coisa se dermos algo em troca, essa coisa se chama trabalho e esforço, e assim poderemos alcançar qualquer objetivo”
(Alphonse Elric)

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Paula Cristina de Souza Souto, por me dar a oportunidade de desenvolver esse trabalho, por partilhar seu imenso conhecimento e por não duvidar da minha capacidade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Kleber Eduardo de Campos, pelo tempo investido durante as explicações sobre metabolismo de frutose e pela oportunidade de trabalhar no Fisiotox.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas (PPGIP) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) por serem o exemplo de profissionais determinados, competentes e sonhadores.

Aos meus pais, Lucilda Salete Schönholzer e Valdelírio Schönholzer, pelas longas conversas ao telefone, apoio incondicional, por sempre incentivarem a busca pelos meus objetivos e não medirem esforços para que eles sejam alcançados.

Aos meus irmãos, Oto Henrique Schönholzer, por ser o melhor irmão/companheiro de quarto/tomador de tererê e amigo que eu poderia ter. A minha irmã, Tatiane Schönholzer, pelos conselhos, por sempre ficar na torcida pelos meus sonhos e por me dar (junto com seu esposo) o melhor presente de todos, meu sobrinho/afilhado, Anderson Schönholzer Lucas.

A João Pedro Maia de Oliveira por ser amigo/namorado, por dar os mais sinceros e diretos conselhos, por acreditar em mim e apesar da distância não desistir.

A Carolina Abreu Miranda e Lusnaiara Rodrigues Lima por me ajudarem intensivamente durante os experimentos.

A equipe do Fisiotox, em especial aos Professores Drs. Kleber Eduardo de Campos, Gustavo Tadeu Volpato e Madileine Francine Américo, por abrirem as portas do laboratório. As doutorandas, mestrandas e ICs que de alguma forma contribuíram tanto no experimento quanto as horas de bate papo e compras de batom e esmaltes nas revistas.

A equipe do Laboratório de Biologia Vascular, em especial a Profa. Dra. Fernanda Giachini Vitorino e Prof. Dr. Victor Vitorino, por abrirem as portas do laboratório e me auxiliarem. A Gisele Almeida Amaral e Rinaldo Rodrigues por me ajudarem na caminhada.

Aos ratos, que mesmo sendo tão pequenos, são essenciais para os estudos e sem eles não seria possível realizá-los.

Aos amigos, Eduardo Klöppel, Lucas Venturini, Oto Henrique Schönholzer, Carolina Abreu Miranda, Andrieli Hauschildt, Joelson Dantas, João Pedro Maia, Rosa Maria Jacinto Volpato, Kleber Eduardo de Campos, Gustavo Tadeu Volpato, por se tornarem família e deixarem meus dias mais alegres com almoços, viagens, jogos de RPG e festas temáticas.

Aos amigos Luhara Rodrigues, Juliana Zenaro, Karina Andrade, Bruna Schönholzer pelas mensagens de bom dia, conselhos e bate papos.

Á Deus, pelo dom da vida e sabedoria, por ser a força que me guia sempre em frente, por ser meu amparo nos dias difíceis, por ter colocado em minha vida todas as pessoas acima citadas, que hoje, fazem parte da minha história. Meu muito obrigado.

RESUMO

Em ocorrência da transição nutricional, aumento de ingesta de alimentos com alto teor energético e diminuição da prática de atividades físicas, aumentou-se a prevalência de doenças crônicas na população mundial. Muitos desses alimentos consumidos possuem grande quantidade de frutose, sendo que a mesma substituiu a sacarose, como adoçante, depois da década de 60. Sabe-se que os órgãos linfóides primários, timo e medula óssea, são responsáveis pela formação e maturação de células que atuam durante as respostas imunes. O bom funcionamento do sistema imunológico depende de vários nutrientes que têm papel chave no organismo e a má nutrição pode trazer prejuízos como a deficiência do sistema imunológico. Com isso, objetivou-se estudar a atuação da frutose sobre parâmetros fisiológicos, bioquímicos, nutricionais e em órgãos linfóides primários de ratos Wistar. Para tanto, foram utilizados ratos *Wistar*, entre 6 a 8 semanas de vida, tratados com frutose (7%), dissolvida em água, durante 12 semanas. Após esse período os animais foram eutanasiados para posterior análise de parâmetros antropométricos, bioquímicos, imunológicos e também histopatológicos do timo e da medula óssea. A ingesta de energia vinda da ração foi maior no grupo controle comparado à frutose, no entanto foi consumido, no total, maior energia pelo grupo frutose (água com frutose + ração). Os animais apresentaram maior ganho de peso nas primeiras semanas de tratamento em ambos os grupos, porém o grupo frutose apresentou maiores variações de peso. O valor glicêmico, entre os grupos, foi aumentado no grupo frutose no mês 1 e comparando dentro do mesmo grupo houve diminuição da glicemia no mês 3 vs mês 1. O lipidograma, leucograma e peso relativo do timo não apresentaram alterações significativas entre os grupos. Entretanto, houve aumento de celularidade tanto no timo quanto na medula óssea sendo confirmada pela análise dos cortes histológicos e no mielograma observou-se aumento da produção de eosinófilos e linfócitos e diminuição de rubroblastos, pró-rubrócitos, neutrófilos e bastonetes no grupo frutose. Quanto à arquitetura dos órgãos linfóides, não houve alterações na medula óssea, porém no timo, houve desarranjo medular e infiltrado de histiócitos no córtex tímico dos animais tratados com frutose. Conclui-se que o tratamento com 7% de frutose não foi suficiente para causar hiperglicemia ou dislipidemia nos animais, porém, modulou a produção de células pela medula óssea e causou modificações nas estruturas do timo.

Palavras-chave: Frutose, Timo, Medula óssea.

ABSTRACT

Because of the nutritional transition, increased intake of foods with high energy content and decreased of physical activity the prevalence of chronic diseases increased worldwide. Many of these foods contain a large amounts of fructose, that was used to replace saccharose as a sweetener after the 60s. It is well known that primary lymphoid organs, bone marrow and thymus, are responsible for the formation and maturation of cells that act during immune responses. Therefore, this study focuses on the role of fructose on physiological, biochemical, nutritional parameters and on primary lymphoid organs of Wistar rats. Male Wistar rats were used between 6 to 8 weeks of age and were treated with fructose (7%) dissolved in water for 12 weeks. After this period the animals were killed for analysis of anthropometric, biochemical, immunological and histopathological parameters. Food intake was higher in the control group compared to fructose group, however it was consumed in total more energy by the fructose group (water with fructose + food). The animals of both groups showed greater weight gain in the first weeks of treatment, but the fructose group showed more weight variations. The glycemic levels was increased in the fructose group at 1st month compared to control. When compared the fructose group with each other, the blood glucose was lower in 3th month vs 1st month. There were no significantly difference on the lipid profile, leukogram and relative weight of the thymus between groups. In contrast there was an increase on cellularity of the thymus and the bone marrow, as confirmed by the histological sections analysis. The myelogram showed an increased production of eosinophils and lymphocytes and a decreased of rubroblastos, pro-rubróctos and neutrophils in the fructose group. Regarding the architecture of the lymphoid organs, there were no changes in the bone marrow, however the thymus showed a medullary disorder and infiltration of histiocytes in thymic cortex in the fructose group. In conclusion, the treatment with 7% fructose was not sufficient to cause hyperglycemia or dyslipidemia in the animals, however it modulates the production of cells by the bone marrow and caused changes in thymic structures.

Keywords: Fructose, Thymus, Bone marrow.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Esfregaço de medula óssea de ratas com as linhagens celulares. Panótico, 250x. A) mieloblasto, B) promielócito, C) mielócito, D) metamielócito, E) basófilo, F) eosinófilo, G) neutrófilo, H) bastonete, I) rubroblasto, J) pró-rubrócito, K) rubrócito, L) metarubrócito, M) plasmócito, N) linfócito, O) monócito. *Fonte: CASTRO, R. D. et al. 2011.*..... 20
- Figura 2-** Etapas do processamento histológico. A) medula óssea em solução de Zenker. B) emblocamento do material em parafina. C) Micrótomo utilizado para realizar os cortes..... 21
- Figura 3-** (3A) Ganho de peso corpóreo semanal nos grupos Frutose e Controle. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. (3B) Linha de tendência entre os grupos Controle e Frutose. Teste de variância ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. * *Frutose vs Controle. # valor vs S1 do mesmo grupo.*..... 23
- Figura 4-** Lipidograma realizado entre os grupos Frutose e Controle. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste t de Student. * *Frutose vs Controle.* 24
- Figura 5-** Leucograma nos grupos Controle e Frutose. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste t Student. * *Frutose vs Controle. Fonte- Miranda, 2016 (dados não publicados)* 25
- Figura 6-** Relação mielóide:eritróide nos grupos Controle e Frutose. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste t Student.. * *Frutose vs Controle.*..... 26
- Figura 7-** Contagem total de células da Medula Óssea nos grupos Controle e Frutose. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste t Student.. * *Frutose vs Controle.* 27
- Figura 8-** Hipercelularidade da Medula Óssea. A microscopia optica mostra aumento na produção de células no Grupo Frutose (C e D) se comparado ao controle (A e B). HE. 400x. 27
- Figura 9-** Estrutura da medula óssea dos grupos Frutose (B) e Controle (A). Medula vermelha (*), Medula amarela (**). Tecido ósseo sem alterações, Controle (C) e Frutose (D). HE. 40x (A e B), 100x (C e D)..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10-** Peso relativo do timo entre os grupos Frutose e Controle. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste t Student.. * *Frutose vs Controle.*..... 29
- Figura 11-** Contagem total de células do Timo entre os grupos Controle e Frutose. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste t Student.. * *Frutose vs Controle.* 29
- Figura 12-** Hipercelularidade tímica. A microscopia óptica mostra aumento no número de células no córtex do timo no grupo frutose (B) se comparado ao grupo Controle (A). HE. 400x. 30
- Figura 13-** Desarranjo medular do timo. A microscopia óptica mostra um lobo do timo onde houve perda de conformação da medula no grupo Frutose (13B) comparado com o grupo Controle (13A). HE. 40x. 31
- Figura 14-** Presença de histiócitos no córtex tímico (seta) no grupo Frutose (14A) comparado ao Controle (14B). HE. 400x..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Parâmetros antropométricos e nutricionais dos animais Controle e Frutose.....	23
Tabela 2- Glicemia mensal mensurada de ratos tratados com água (Controle) e frutose na água a 7% (Frutose).....	24
Tabela 3- Contagem diferencial de células da medula óssea, linhagem eritróide, mielóide e linfóide de ratos tratados com água (Controle) e frutose na água a 7% (Frutose).	26
Tabela 4- Parâmetros histomorfométricos analisados no timo dos Grupos Controle e Frutose.	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	16
2.1 Geral:	16
2.2. Específicos	16
3 METODOLOGIA.....	17
3.1 Animais	17
3.2 Tratamento com frutose	17
3.3 Parâmetros fisiológicos, nutricionais e bioquímicos	17
3.3.1 Peso corpóreo e nutrição	17
3.3.2 Glicemia	18
3.3.3 Lipidograma	18
3.4 Análise Imunológica	18
3.4.1 Leucograma	18
3.4.2 Mielograma	19
Contagem total de células da medula óssea	19
Contagem diferencial de células da medula óssea	19
Relação mielóide: eritróide (M:E).....	20
Contagem Global de timócitos	20
3.5 Processamento histológico do material.....	20
Medula óssea e timo.....	20
3.6 Análise Estatística.....	21
4 RESULTADOS	22
Parâmetros fisiológicos, bioquímicos e nutricionais	22
Análise imunológica da Medula óssea.....	25
Análise imunológica do Timo.....	28
5 DISCUSSÃO	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
7 REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o Brasil e diversos países da América Latina estão passando por uma rápida transição epidemiológica e nutricional, caracterizada pelo aumento de ingesta calórica e sedentarismo, chamando atenção para o marcante aumento na prevalência de obesidade e doenças crônicas nas populações (KAC e MELÉNDEZ, 2003). Se de um lado houve reversão dos problemas associados à desnutrição, com o aumento da disponibilidade de calorias *per capita* e o aumento da participação de alimentos de origem animal na alimentação (IBGE, 2004), por outro lado houve aumento nos gastos do Ministério da Saúde, aproximadamente R\$ 7,5 bilhões por ano, com atendimentos em função das doenças crônicas não transmissíveis (MALTA *et al.*, 2006).

O crescimento e a melhoria da indústria de processamento e serviço alimentar tornaram disponíveis, para o consumo diário, um conjunto de alimentos com elevada palatabilidade, porém pobres em nutrientes e ricos em açúcar e/ou gordura. Tem sido sugerido que os consumidores escolhem comprar este tipo de alimento ao invés dos mais saudáveis pelo fato daqueles serem bem mais acessíveis e principalmente mais apreciados (STANHOPE e HAVEL, 2010).

A mudança nos tipos de alimentos consumidos, principalmente no ocidente, inclui elevado conteúdo energético, com maior participação de gorduras e açúcares de adição, crescimento no consumo de gordura saturada e redução no consumo de fibra dietética, frutas, hortaliças e cereais (KAC e MELÉNDEZ, 2003), ou seja, devido a uma rotina agitada o homem tem reduzido o tempo dedicado às refeições dando preferência a produtos processados e deixando de lado os naturais (FERREIRA, S.R.G, 2010). Além disso, esta transição também se mostra entre crianças e adolescentes, uma vez que nesta faixa etária há diminuição no consumo de frutas e hortaliças e também aumento da ingesta de guloseimas, refrigerantes e alimentos processados além de pouca atividade física, podendo estes hábitos repercutirem na vida adulta trazendo agravos à saúde (IBGE, 2009; BRASIL, 2013).

Segundo informação da *International Sugar Organization*, o consumo mundial médio de açúcar *per capita* aumentou de 56g/dia em 1986 para 65g/dia em 2006. Até o século XVIII o consumo de açúcar era baixo, porém aumentou devido a melhoria do processo tecnológico para extrair e refinar os açúcares. Inicialmente era consumido como

adoçante no chá e no café, mas começou a ser usado para a preparação de novos alimentos. A sacarose permaneceu como adoçante quase exclusivo até aos anos de 1960, altura em que a indústria desenvolveu tecnologias que permitiam a extração do amido de milho e a sua transformação em adoçantes, sendo a frutose utilizada em refrigerantes e geléias por ser mais doce e mais barata que a sacarose (FERREIRA, S. S, 2010).

A frutose proveniente do latim *Fructus*, teve seu nome associado ao fato de que o açúcar parecia estar mais abundante em frutas (WANG, 1981). É um monossacarídeo cuja composição química ($C_6H_{12}O_6$) é igual à da glicose, diferindo apenas no grupo funcional. A frutose é metabolizada totalmente no fígado e não precisa da mediação da insulina para entrar nos hepatócitos. Já na célula, parte dela entra na via gliconeogênica para a formação de glicose e outra parte se transforma em piruvato, gerando energia celular através do ciclo de Krebs e também uma grande quantidade de substrato, o qual é transformado em lipídios, sendo abundantemente transportados por lipoproteína de densidade muito baixa (*very-low density lipoprotein*, VLDL) e ácidos graxos livres (GUSMÃO *et al.*, 2014). A frutose ao receber a ação da enzima frutoquinase e recebe o nome de frutose 1-fosfato. Este pode sofrer a ação da enzima AMP-desaminase, sendo seu produto final o ácido úrico, que pode causar a hipertensão arterial. Além dessas vias, a frutose 1-fosfato se converte também em dihidroxiacetona fosfato que reage com o mesmo gliceraldeído formando a xilulose 5-fosfato ativando enzimas responsáveis pela lipogênese *de novo*, podendo levar a quadros de dislipidemia, resistência a insulina e hiperglicemia (FEIG *et al.*, 2008; PARKS, *et al.*, 2008; SWARBRICK, *et.al.*, 2008; TAPPY e LÊ, 2010).

Seu consumo se deu por ser substituta da glicose em dieta para pessoas com diabetes (DIPP, 2010), porém isto foi desmistificado, uma vez que já foi relatado que o consumo continuado de altas doses do nutriente acarreta dislipidemia e prejudica a sensibilidade a insulina e também traz efeitos deletérios como obesidade, aceleração do processo de envelhecimento e aumento dos triglicerídeos hepáticos, implicando também na alteração das concentrações de ácido úrico circulantes, hipercolesterolemia e dislipidemias (BASCIANO *et al.*, 2005).

A ingestão diária de frutose livre (excluindo a sacarose), nos EUA, era cerca de 16g/dia, caso haja ingestão de xaropes de milho, ricos em frutose, o consumo poderia atingir 60 a 100g/dia e até 150g/dia se somada com a frutose proveniente da sacarose (RUMESSEN, 1992). No Brasil estima-se que seu consumo médio era 27,5g/dia, provinda da sacarose, em 1996 e em 2009 o índice subiu para 54,6g/dia (IBGE, 1996 e 2011). A maioria da frutose na dieta americana não provém da fruta fresca, mas sim do xarope de

milho com alto teor de frutose (*High Fructose Corn Syrup* - HFCS) e da sacarose que se encontra nos refrigerantes e doces, os quais são praticamente desprovidos de outros nutrientes (BRAY *et al.*, 2004 e BRAY, 2008).

Ao mesmo tempo que houve aumento de obesidade e diabetes tipo 2 no século XXI, nota-se um aumento significativo na ingestão de frutose (ELLIOT *et al.*, 2002). A obesidade é um distúrbio do excesso de gordura corporal e pode causar danos em tecidos, tais como hepático, sistema vascular e músculo-esquelético. É sem dúvida um importante fator de risco para a morbidade, pois suas complicações incluem dislipidemia, *Diabetes mellitus* tipo 2, hipercolesterolemia, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares como a coronariana, dificuldades respiratórias como apneia do sono, problemas psico-sociais tais como depressão, ansiedade, distúrbios alimentares, baixo auto-estima, imagem corporal distorcida, doenças ortopédicas como osteoartrite e problemas músculo-esquelético, problemas de pele, infertilidade e diversos tipos de câncer (MUÑOZ *et al.*, 2004, LORDELO *et al.*, 2007; ZALESIN *et al.*, 2008; COUTINHO, 2014).

A mudança quanto ao tipo de alimentos consumidos e a correlação com distúrbios/doenças são mostradas em diversos estudos epidemiológicos. Além disso, os metabólitos, oriundos da alimentação, podem ser diretamente absorvidos no intestino e passam para o sangue, onde podem influenciar a medula óssea e muitos tipos de células em todo o organismo (THORBURN *et al.*, 2014).

Os órgãos linfóides primários são aqueles onde ocorrem a produção e a maturação fenotípica e funcional de linfócitos B e T (timo e a medula óssea), já os órgãos linfóides secundários (baço, linfonodos, tecido mucoso e cutâneo) compartilham funções como liberação de antígenos e linfócitos imaturos para o mesmo local e compartimentos anatômicos organizados que permitem a interação entre células B e T (ABBAS, 2008 e 2015). A medula óssea, quando em homeostase, auxilia na formação e desenvolvimento tanto da linhagem de células eritróides, mielóides quanto das linfóides, além da maturação de linfócitos B, sendo que para ocorrer normalmente há interdependência de citocinas, denominadas fatores estimuladores de colônia. Tais citocinas são produzidas normalmente por células estromais e macrófagos presentes no nicho medular e por linfócitos e macrófagos circulantes ativados, sendo este último um mecanismo de reposição de células durante reações imune inflamatórias (MORRISON e SCADDEN, 2014; ABBAS, 2015).

O timo é um órgão bilobado dividido por diversos septos e lóbulos onde possui uma zona cortical e uma medular, além de ser o local de maturação das células T. Nele, há presença de timócitos em vários níveis de maturação além de macrófagos e células

epiteliais tímicas, responsáveis pela apresentação de antígenos. A medida que os timócitos vão amadurecendo e se diferenciando, em células TCD4⁺ e TCD8⁺, vão migrando para a parte medular e depois de maduros caem na corrente sanguínea e se direcionam aos órgãos linfóides secundários (NISHINO *et al.*, 2006; TAKAHAMA, 2006; ABBAS, 2015).

Vários fatores podem influenciar os órgãos linfóides primários e consequentemente prejudicar as respostas imunes. Entre esses fatores temos a ação de agentes infecciosos e o estado nutricional do indivíduo.

Algumas alterações podem ser observadas na medula óssea quando há presença de agentes infecciosos, como o vírus de Epstein-Barr, que leva à hiperplasia medular principalmente de neutrófilos, sendo caracterizada como reação leucemoide. Já o parvovírus 19 pode levar a hipoplasia da linhagem eritróide e quadros de anemia (DE LEÓN-BOJORGE, 2010).

As alterações no timo devido a sua involução e consequente diminuição das respostas imunes é um processo natural que se inicia na adolescência e se estende até a terceira idade (APPAY *et al.*, 2010; MARSAN; DEL VALLE PEREZ, 2013). No entanto, alguns microrganismos podem intervir nos microambientes tímicos, podendo levar a um déficit das respostas imunes. Protozoários como o *Trypanossoma cruzi* e *Plasmodium berghei* e fungos como *Paracoccidioides brasiliensis* podem invadir o órgão e provocar a atrofia do mesmo, através de intensa apoptose de timócitos, favorecendo a permanência dos patógenos no organismo (SOUTO, 2002; BRITO, 2003; ROVAROTTO, 2011; DIONETE, 2012; NARDY *et al.*, 2015). Além desses fatores, uma imunodeficiência que atinge órgãos linfóides primários é a Síndrome de Good, caracterizada como uma síndrome rara que afeta células B e T deixando o organismo suscetível a infecções virais e fungos oportunistas (FAHIM *et al.*, 2011).

Sabe-se que pessoas malnutridas são mais susceptíveis a vários agentes patogênicos e a má alimentação pode acarretar doenças crônicas não transmissíveis. O bom funcionamento do sistema imunológico é dependente de vários nutrientes e entre eles estão alguns micronutrientes que têm papel chave no organismo. Sua deficiência leva ao aumento do estresse oxidativo e à depressão do sistema imunológico (OZATA *et al.*, 2002 e AL-SALEH *et al.*, 2007).

Diversos estudos experimentais comprovam a interação direta entre a alimentação e sistema imunológico como na desnutrição protéica onde há interferência na fagocitose e no metabolismo oxidativo de neutrófilos (FORTE, 1999) e macrófagos (DE LOURDES VITURI, 2008). Sabe-se que a ingesta de lipídios causa efeito moduladores em células do

sistema imune, uma vez que os ácidos graxos que compõem os linfócitos e outras células são alterados devido a qualidade destes ácidos graxos ingeridos, resultando em diminuição de linfócitos e síntese de citocinas (SANTOS, 2013). Na ingesta de açúcares, estudos realizados com ratos em estados hiperglicêmicos mostrou aumento das expressões de RNAm de interleucinas (IL) -1 β e IL-6. Subpopulações de células progenitoras da medula óssea, que são importantes para o reparo tecidual são prejudicadas de forma irreversível em um modelo de rato com *Diabetes mellitus* (JANUSZYK *et al.*, 2014). Foi constatado também que timos de ratos diabéticos apresentam mudanças notáveis, incluindo encolhimento e depleção de timócitos (BARRETO *et al.*, 2005).

Ensaio clínico em humanos são rotineiramente aplicados e de extrema importância para a ciência, no entanto, além de questões éticas, utilizar animais como modelo experimental pode facilitar as observações decorrentes do experimento uma vez que o ambiente, alimentação e tratamento podem ser bem mais controlados (FERREIRA *et al.*, 2005; SARDENBERG, 1999). O modelo animal experimental mais utilizado é roedor, pois apresenta pequeno porte, ciclo reprodutivo curto, fácil adaptação, manuseio e docilidade. Além disso, apresentam características fisiológicas, anatômicas e orgânicas semelhantes aos do ser humano (ANDRADE *et al.*, 2006; SCHANAIDER e SILVA, 2004; QUINN, 2005; FAGUNDES e TAHA, 2004).

Há diversos protocolos com modelos animais que buscam a indução da hiperglicemia e/ou a manutenção da mesma para analisar efeitos da sua cronicidade no organismo, no entanto não há um consenso quanto as concentrações de frutose (10%, 20%, 30% até 65%) e tempo de tratamento (24h até semanas) a serem utilizados (MEDEIROS *et al.*, 2014; BEIERWALTES *et al.*, 2015; BAGUL *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2015).

O sistema imune é formado por uma complexa interação entre as células e seus produtos tendo duas características únicas, especificidade e memória. Além disso, mantém uma estreita sintaxe com o sistema neuroendócrino, sendo essa relação muito importante durante a conservação da homeostasia (REICHLIN, 1993; SAVINO, 2009; ALVES e PALERMO-NETO, 2010). Desta forma, o presente estudo busca um melhor entendimento sobre as alterações que ocorrem no organismo de ratos Wistar relacionado a ingestão de frutose.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Avaliar o tratamento da frutose nas repercussões fisiológicas, bioquímicas, nutricionais e em órgãos linfóides primários de ratos *Wistar*.

2.2. Específicos:

- Avaliar parâmetros fisiológicos, bioquímicos e nutricionais:
 - ✓ Peso,
 - ✓ Ingesta calórica,
 - ✓ Glicemia,
 - ✓ Lipidograma.
- Avaliar parâmetros imunológicos como:
 - ✓ Leucograma
 - ✓ Mielograma (Contagem total, diferencial e relação mielóide:eritróide)
 - ✓ Análise histopatológica da medula óssea,
 - ✓ Determinar peso relativo do timo,
 - ✓ Celularidade do timo,
 - ✓ Análise Histopatológica do timo.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* pesando entre 180-200g (42 dias de vida). Os animais passaram por um período de adaptação no Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva (Fisiotox), Universidade Federal de Mato Grosso/Campus Universitário do Araguaia, durante sete dias. Permaneceram em caixas coletivas de polietileno em temperatura ambiente de 22 ± 3 °C, ciclo claro/escuro de 12/12 horas e umidade relativa de $60 \pm 5\%$. Todos os animais receberam ração padrão Purina® e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais utilizados seguiram fielmente o *Guia de Experimentação Animal* e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Local, protocolo nº 23108.70570213-9.

3.2 Tratamento com frutose

Similar ao proposto por Dai & Mcneill (1995), aos 42 dias de vida (6ª semana) todos os ratos machos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo Controle (C, n=7), ratos que receberam ração padrão e água filtrada *ad libitum*, sem adição de outras substâncias e Grupo Frutose (F, n=8): ratos que receberam ração padrão e água filtrada com adição de 7% de frutose *ad libitum*.

A solução de frutose foi preparada utilizando a frutose da marca Dinâmica®, em concentração de 7%, misturada em água filtrada em um béquer com auxílio de um agitador magnético.

3.3 Parâmetros fisiológicos, nutricionais e bioquímicos

3.3.1 Peso corpóreo e nutrição

A mensuração do peso corpóreo foi realizada a partir do dia 0 de tratamento, com intervalo de sete dias. Para medida dos mesmos foi utilizada uma balança eletrônica digital. O ganho de peso semanal em gramas (g) foi estimado matematicamente por: *peso final(g) - peso inicial (g)*.

A taxa de ganho de massa corpórea (g/Kg) foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: $dM/M dt$, onde dM representa o ganho de peso durante o tempo $dt=t_2-t_1$ e M é o ganho de peso inicial t_1 .

Os parâmetros nutricionais foram calculados através dos dados de ingesta alimentar e energética (dados não-publicados) (MIRANDA, 2016). A ingesta energética provinda da ração e da água com frutose foi calculada por: *ingesta energética* = $MCA \times EMD$ onde MCA é média do consumo alimentar e EMD é energia metabolizada da dieta (DINIZ, *et.al*, 2005; NOVELLI *et al.*, 2007).

3.3.2 Glicemia

Nos dias 30, 60 e 90 de tratamento, os níveis de glicemia foram monitorados por leitura de glicofita (Johnson OneTouch® Ultra2). A fita contendo sangue obtido por incisão da parte distal da cauda do rato foi introduzida no glicosímetro específico, expressando os valores da glicemia em miligramas por decilitro (mg/dL).

3.3.3 Lipidograma

O perfil lipídico foi avaliado por meio de determinação sérica dos triglicerídeos, colesterol total, lipoproteínas de densidade alta (HDL), de densidade muito baixa (VLDL) e de densidade baixa (LDL). Tais parâmetros bioquímicos foram mensurados utilizando-se um analisador bioquímico semiautomático BioPlus®. Para determinar as concentrações séricas de colesterol total (COL), triglicerídeos (TG), lipoproteína de densidade alta (HDL), foi utilizado o método enzimático (YOUNG *et al.*, 2000). Todos os parâmetros foram mensurados pelos Kits de determinação bioquímica da Wiener®, de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos mg/dL.

Os valores estimados dos níveis séricos das lipoproteínas VLDL e LDL foram determinados baseando-se em determinações das concentrações séricas de triglicerídios e colesterol total, pelos cálculos estabelecidos por Friedwald *et al* (1972), em mg/dL.

3.4 Análise Imunológica

3.4.1 Leucograma

O leucograma foi realizado através de amostras de sangue diluídas em líquido de TURK (STIBBE *et al.*, 1985) e foram contados em Câmara de Neubauer. O resultado foi obtido com a expressão: *Leucócitos x mm³ de sangue* = $(Lc. \times 20 \times 10)/4$.

O resultado foi obtido com a expressão matemática: *células x mm³ da medula óssea* = $(Lc \times 20 \times 10)/4$. Na qual: Lc = número total de células contados em 4 mm²; 4= fator de conversão para 1 mm³; 20= fator de conversão da diluição utilizada; 10= fator de conversão para 1 mm³ (profundidade da lamina).

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo e foram coradas com kit Panótico Rápido LB (Laborclin Ltda, BR). Os diferentes elementos foram determinados por contador eletrônico KACIL com teclas correspondentes a cada tipo de celular (LEANDRO *et al.*, 2006).

3.4.2 Mielograma

Contagem total de células da medula óssea

Após o sacrifício dos animais as células da medula óssea foram obtidas por meio do aspirado da cavidade femoral com solução anticoagulante EDTA 3%, adaptado de Castro *et al.* (2011). A suspensão foi colocada em tubos plásticos, cuidadosamente homogeneizada com pipeta tipo Pasteur e mantidas em banho de gelo, logo a contagem absoluta de células foi realizada após diluição das amostras da suspensão celular com líquido de Turk e contagem em hemocitômetro de Neubauer.

O resultado foi obtido com a expressão matemática: *células x mm³ da medula óssea* = $(Cmo \times 20 \times 10)/4$. Na qual: Cmo = número total de células contados em 4 mm²; 4= fator de conversão para 1 mm³; 20= fator de conversão da diluição utilizada; 10= fator de conversão para 1 mm³ (profundidade da lamina).

Contagem diferencial de células da medula óssea

A partir das amostras da suspensão total de células da medula óssea, obtidas conforme descrito no item 3.4.1, foram preparadas lâminas do lavado e coradas utilizando kit Panótico Rápido LB (Laborclin Ltda, BR). Para a avaliação morfológica e quantificação dos tipos celulares foram contadas 200 células de precursores das linhagens eritróide, mielóide e linfóide, conforme figura abaixo.

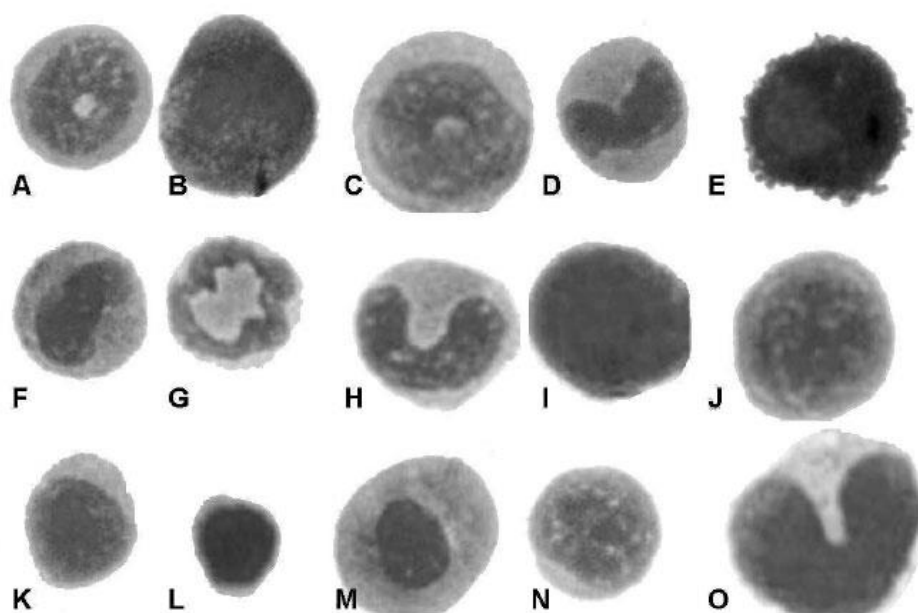


Figura 1- Esfregaço de medula óssea de ratas com as linhagens celulares. Panótico, 250x. A) mieloblasto, B) promielócito, C) mielócito, D) metamielócito, E) basófilo, F) eosinófilo, G) neutrófilo, H) bastonete, I) rubroblasto, J) pró-rubrócito, K) rubrócito, L) metarubrócito, M) plasmócito, N) linfócito, O) monócito. *Fonte: CASTRO, R. D. et al. 2011.*

Relação mielóide: eritróide (M:E)

Após a contagem diferencial das células da medula óssea foi estimado a relação M:E, dividindo as células granulocíticas da linhagem mielóide pelas células nucleadas da linhagem eritróide obtendo-se o quociente (JAIN, 1993).

Contagem Global de timócitos

Através de uma cirurgia torácica o timo foi retirado e pesado. Um dos lobos foi macerado com solução PBS, adaptado (SOUTO, 2006). As células suspensas na solução foram colocadas em tubos plásticos e mantidas em banho de gelo. A partir da suspensão celular foi estimado o número total de células através da contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer.

3.5 Processamento histológico do material

Medula óssea e timo

Após a eutanásia dos animais, o fêmur direito foi retirado, limpo, fixado em solução de Zenker por 24 horas, descalcificado em solução de ácido fórmico. Um dos lobos do timo foi colocado em solução de formol 10%.

As amostras, fêmur e timo, foram lavados em água corrente, desidratado em gradiente alcoólico e incluído em parafina de acordo com a rotina histológica. Após a inclusão, o material emblocado foi submetido à microtomia (Thermo Scientific® HM355S) para obtenção de cortes finos (4,5µm) (Figura 2A, 2B e 2C). Estes cortes foram desparafinizados, hidratados em gradiente de álcool e a seguir foram corados por hematoxilina-eosina de acordo com a rotina histológica (BRITO, 2001).

Todas as lâminas foram analisadas por microscopia óptica (Nikon Eclipse E-200, microscópio óptico, Tokyo, Japão). Imagens foram obtidas por meio de câmera fotográfica (Sony Cyber Shot®), em seguida transferidas para um microcomputador para serem analisadas com o auxílio do software ImageJ®.



Figura 2- Etapas do processamento histológico. A) medula óssea em solução de Zenker. B) emblocamento do material em parafina. C) Micrótomo utilizado para realizar os cortes.

3.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Foram utilizados para análise estatística os testes *t Student*, Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de *p* for menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados no software GraphPadInStat versão 3.0.

4 RESULTADOS

Todos os biomarcadores coletados estão representados em tabelas e figuras. Foi observado que não houve mortes de ratos em qualquer grupo. O tratamento com frutose na água *ad libitum* não apresentou toxicidade e/ou letalidade, sendo assim todos os animais contribuíram para os dados deste estudo.

Parâmetros fisiológicos, bioquímicos e nutricionais

Em relação ao ganho de peso corpóreo (Figura 3A), comparando o grupo Controle com o grupo tratado, nota-se que houve significância nas semanas (S) 2, 3, 4, 5, 6 e 10 com variações da S3 para a S4. Comparando os valores dentro do mesmo grupo, observa-se que no grupo Controle todos os valores foram significantes, todavia no grupo Frutose apenas a S2 e S4 não foram significantes. Nota-se que os ratos ganharam mais peso no início do tratamento e menos peso até o final do tratamento. Avaliando a linha de tendência de ganho de peso (Figura 3B) observa-se que no grupo Frutose houve maior variação de ganho de peso se comparado ao Controle.

Os parâmetros nutricionais (Tabela 1) foram avaliados através da ingesta energética de *ração*, *água + frutose* (grupo frutose) e *ração + água*. Avaliando a ingesta de energia pelo consumo de ração entre os grupos, nota-se que, nos meses 1 e 3 os animais do grupo Frutose ingeriram menos ração, acompanhado de maior aporte energético quando se é analisado a *ração + água*. Quanto a análise da ingesta de energia apenas pela água, entre os grupos, nota-se significância, uma vez que a água dos animais do grupo controle não tinha adição de substância de aporte energético.

O ganho de massa corporal foi o valor antropométrico analisado. Pode-se notar que no mês 1, o grupo Frutose ganhou menos massa corporal. Dentro do mesmo grupo, observa-se que os animais Controle ganharam mais massa corpórea no mês 3 e no grupo frutose os animais ganharam mais massa corpórea nos meses 2 e 3 comparado com o mês 1.

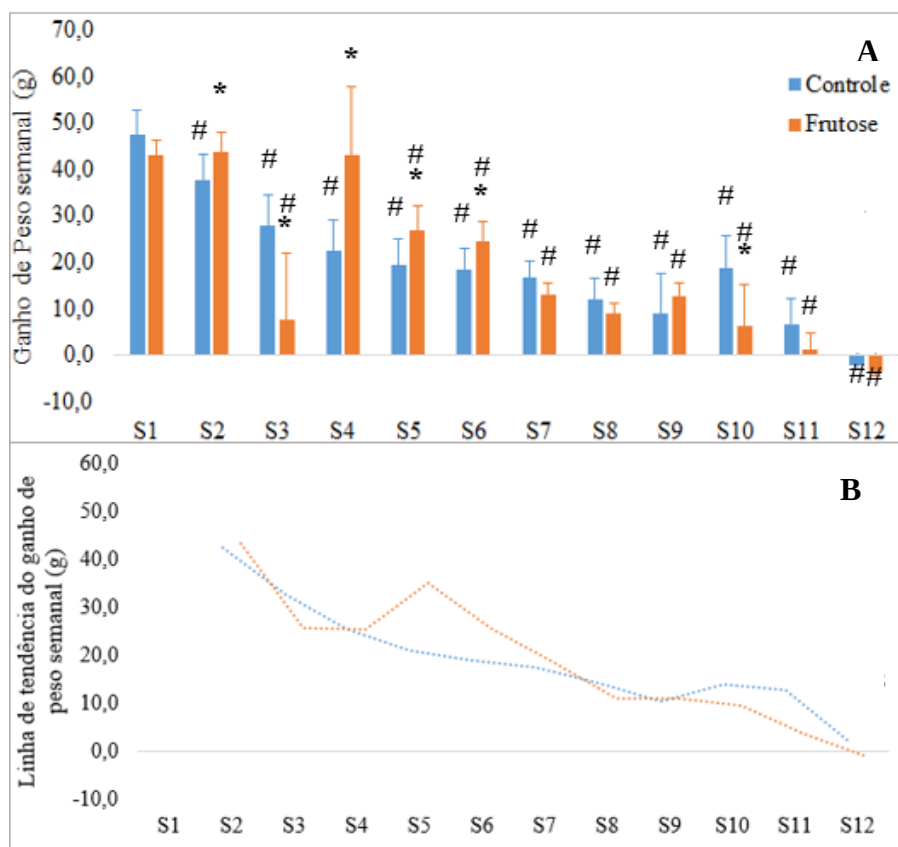


Figura 3- (3A) Ganho de peso corpóreo semanal nos grupos Frutose e Controle. Valores expressos como média ± desvio padrão. **(3B)** Linha de tendência entre os grupos Controle e Frutose. Teste de variância ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. * Frutose vs Controle. # valor vs S1 do mesmo grupo.

Tabela 1- Parâmetros antropométricos e nutricionais dos animais Controle e Frutose.

Parâmetros antropométricos e nutricionais			
INGESTA DE ENERGIA (KJ)			
RAÇÃO	M1	M2	M3
Controle	65,34±3,39	64,49±2,12	68,99±2,35#
Frutose	57,28±0,5*	67,03±3,51#	52,87±3,01#
ÁGUA			
Controle	0	0	0
Frutose	16,46±0,27*	18,55±1,25*	18,50±3,08*
RAÇÃO+ÁGUA			
Controle	65,34±3,39	64,49±2,12	68,99±2,35
Frutose	73,74±0,23*	85,58±4,76*#	71,38±6,09*
GANHO DE PESO MENSAL			
Controle	113,14 ± 12,50	189,85 ± 23,82#	236 ± 30,32#
Frutose	94,25 ± 20,46	201,75 ± 11,52#	230,75 ± 24,23#
GANHO DE MASSA CORPORAL			
Controle	0,77 ± 0,13	1,29 ± 0,23#	1,60 ± 0,29#
Frutose	0,53 ± 0,14*	1,14 ± 0,21#	1,31 ± 0,32#

Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste de variância ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. * Frutose vs Controle. # valor vs Mês1 do mesmo grupo.

Em relação a mensuração de glicemia mensal (Tabela 02) nota-se que houve um aumento da glicemia no Mês 1 no grupo Frutose comparado ao grupo Controle. Avaliando os valores dentro do mesmo grupo, observa-se que não houve diferença estatística no grupo Controle, porém o grupo Frutose apresentou significância comparando o Mês 3 vs o Mês 1.

Tabela 2- Glicemia mensal mensurada de ratos dos grupos Controle e Frutose.

Grupos	Glicemia mg/dl		
	Mês 1	Mês 2	Mês 3
Controle	94,1 ± 9,5	93,0 ± 6,9	86,9 ± 4,5
Frutose	107,8 ± 12,9 *	100,3 ± 39,0	60,4 ± 4,3 #

Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste de variância ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. * *Frutose vs Controle*. # *valor vs Mês1 do mesmo grupo*.

Avaliando os valores do lipidograma entre os grupos Frutose e Controle (Figura 4), nota-se que os valores séricos de Lipoproteína de baixa densidade (LDL), Lipoproteína de alta densidade (HDL), Triglicerídeos (TG), Colesterol Total (COL) e Lipoproteína de baixíssima densidade (VLDL) não apresentaram diferença estatística.

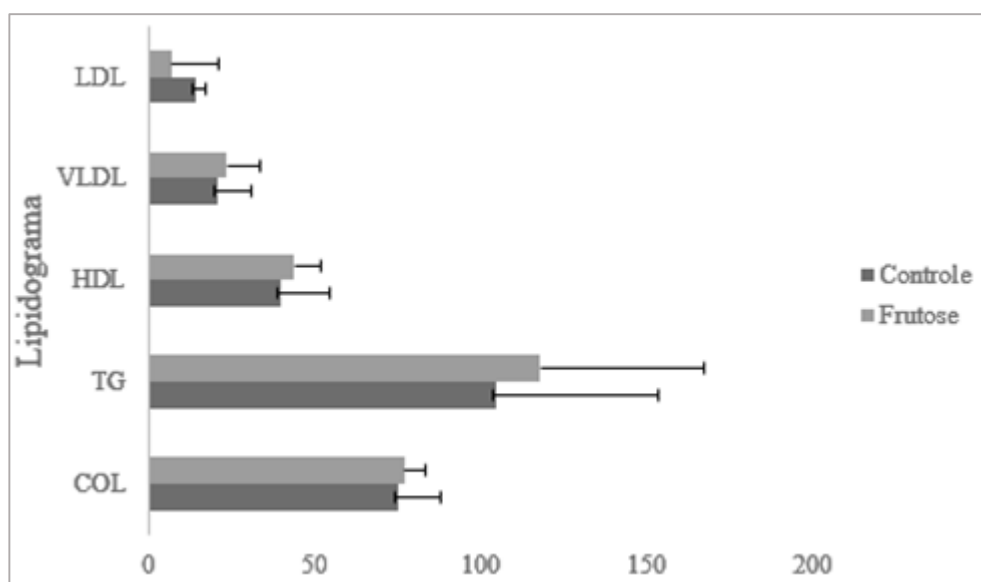


Figura 4- Lipidograma realizado entre os grupos Frutose e Controle. Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste t de Student. * *Frutose vs Controle*.

Análise imunológica da Medula óssea

O leucograma mostra a porcentagem de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos (Figura 5.) Ele apresentou uma taxa de leucócitos totais menor no grupo Frutose ($7,49 \pm 0,99$) se comparado ao Controle ($6,31 \pm 2,52$). Os demais parâmetros não apresentaram significância estatística.

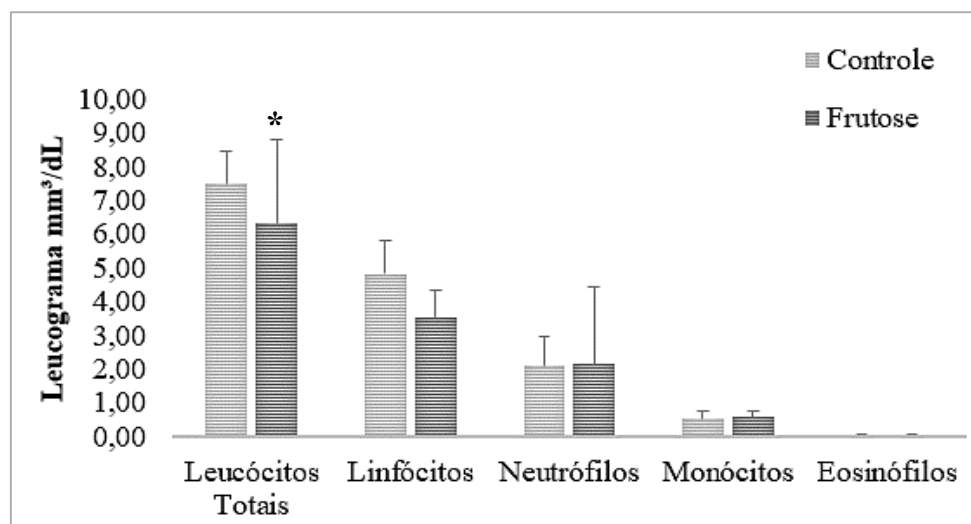


Figura 5 - Leucograma nos grupos Controle e Frutose. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste t Student. * Frutose vs Controle. Fonte- Miranda, 2016 (dados não publicados)

Na contagem diferencial (Tabela 03) foram encontradas alterações nas linhagens eritróide, mielóide e linfóide. Na linhagem eritróide, houve diminuição na porcentagem dos precursores, rubroblastos ($1,83 \pm 1,21$ e $0,44 \pm 0,83$) e pró-rubróцитs ($1,17 \pm 1,21$ e $0,50 \pm 0,76$) nos grupos Controle e Frutose respectivamente. Na linhagem mielóide houve aumento de eosinófilos ($2,00 \pm 1,67$ e $2,94 \pm 1,46$), diminuição de bastonetes ($2,50 \pm 1,55$ e $1,63 \pm 1,28$) e neutrófilos ($27,25 \pm 4,37$ e $22,63 \pm 7,42$) comparando grupos Controle e Frutose respectivamente. No grupo tratado houve aumento de células da linhagem linfóide ($42,50 \pm 7,05$) se comparado ao Controle ($36,33 \pm 7,53$).

Os quocientes da relação Mielóide: Eritróide encontram-se na Figura 6. Observa-se que no grupo tratado com Frutose, houve um aumento dessa relação se comparado ao grupo Controle.

Ao analisar os valores de celularidade do aspirado medular (contagem total de células) notou-se um aumento significativo de células no grupo Frutose se comparado ao Controle como mostra o gráfico (Figura 7).

Tabela 3- Contagem diferencial de células da medula óssea, linhagem eritróide, mielóide e linfóide de ratos tratados com água (Controle) e frutose na água a 7% (Frutose).

Células	Controle	Frutose
Rubroblasto	1,83 ± 1,21	0,44 ± 0,83*
Pró-rubrócito	1,17 ± 1,21	0,50 ± 0,76*
Rubrócito	1,33 ± 1,03	1,06 ± 0,83
Metarubrócito	2,42 ± 1,47	2,25 ± 4,17
Mieloblasto	8,83 ± 4,80	9,81 ± 5,37
Pró-mielócito	3,42 ± 1,72	2,94 ± 2,59
Mielócito	4,83 ± 3,39	5,69 ± 2,39
Metamielócito	6,58 ± 3,66	6,13 ± 3,01
Basófilo	0,33 ± 0,52	0,19 ± 0,52
Eosinófilo	2,00 ± 1,67	2,94 ± 1,46*
Neutrófilo	27,25 ± 4,37	22,63 ± 7,42*
Bastonete	2,50 ± 1,55	1,63 ± 1,28*
Monócito	1,00 ± 2,10	0,75 ± 0,93
Plasmócitos	0,17 ± 0,82	0,56 ± 0,64
Linfócitos	36,33 ± 7,53	42,50 ± 7,05*

Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste t *Student*.. * *Frutose vs Controle*.

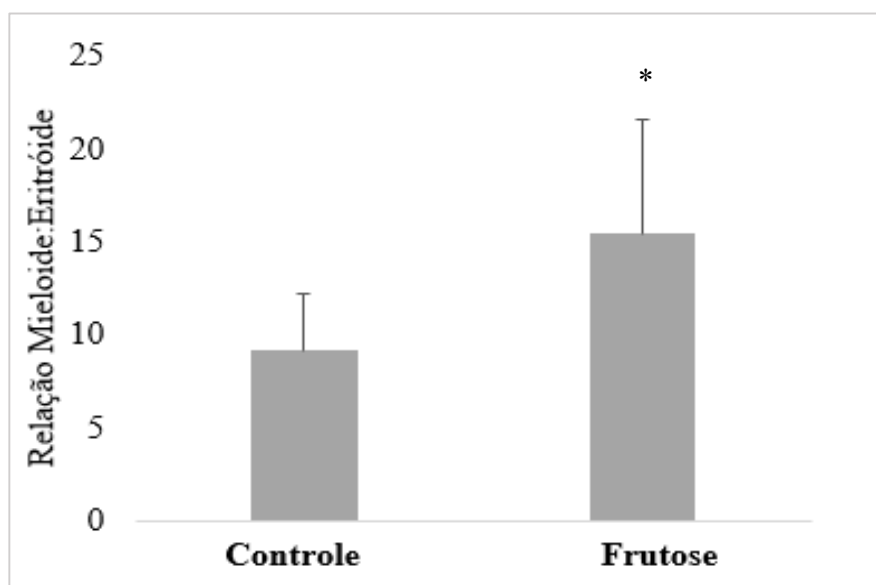


Figura 6- Relação mielóide:eritróide nos grupos Controle e Frutose. Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste t *Student*.. *Frutose vs Controle

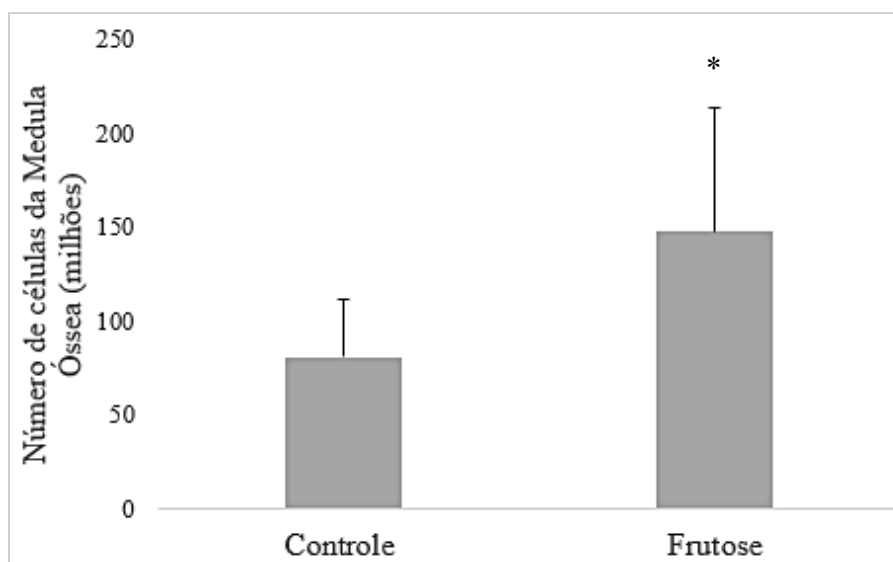


Figura 7- Contagem total de células da Medula Óssea nos grupos Controle e Frutose. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste t *Student*.. *Frutose vs Controle.

A Figura 08 mostra duas porções distintas da medula óssea de ratos Controle (Figura 08A e B) e Frutose (Figura 08C e D) onde há presença de um número aumentado de células no grupo tratado confirmando os dados achados na figura 07.

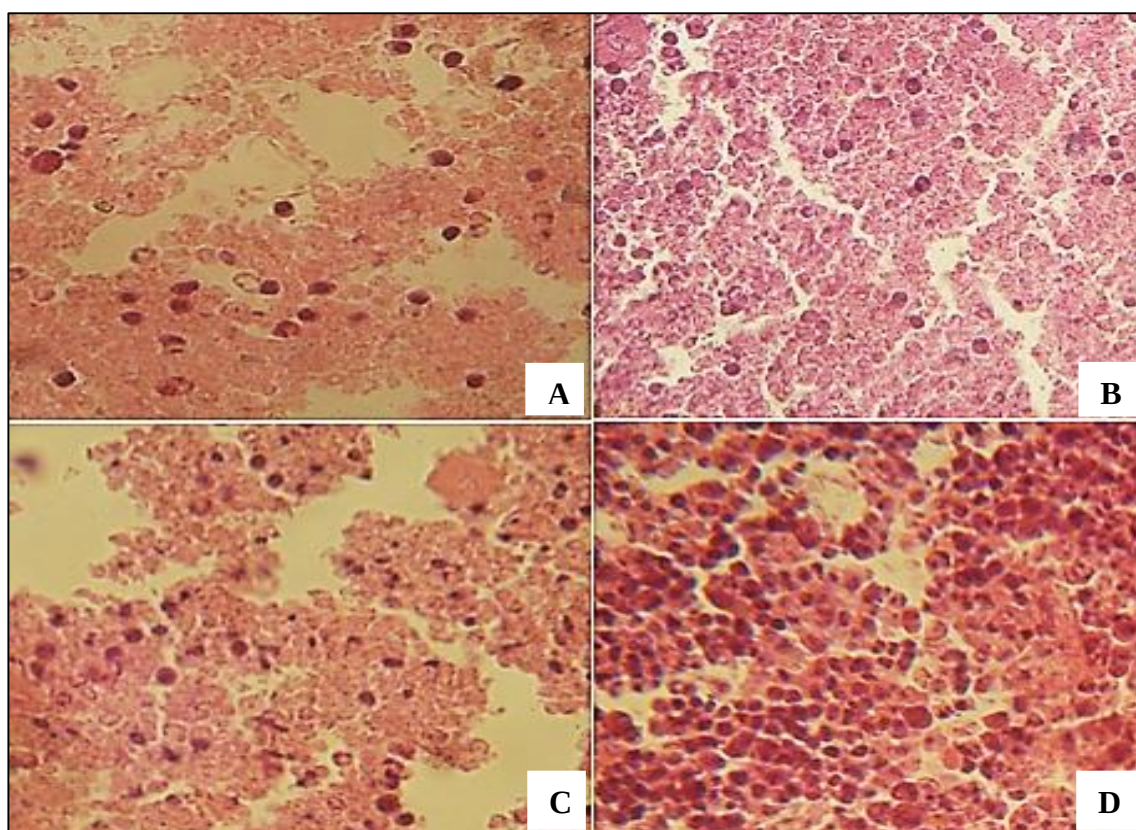


Figura 8- Hiper celularidade da Medula Óssea. A microscopia optica mostra aumento na produção de células no Grupo Frutose (C e D) se comparado ao controle (A e B). HE. 400x.

Nas análises das fotomicrografias da medula óssea, apresentada na Figura 9, observa-se que a arquitetura óssea e medular se mantém dentro dos padrões de normalidade, onde há presença de medula vermelha e amarela nos dois grupos (Figura 9A e 9B), e não há alterações, visuais, no tecido ósseo do grupo Frutose comparando ao controle (Figura 9C e 9D).

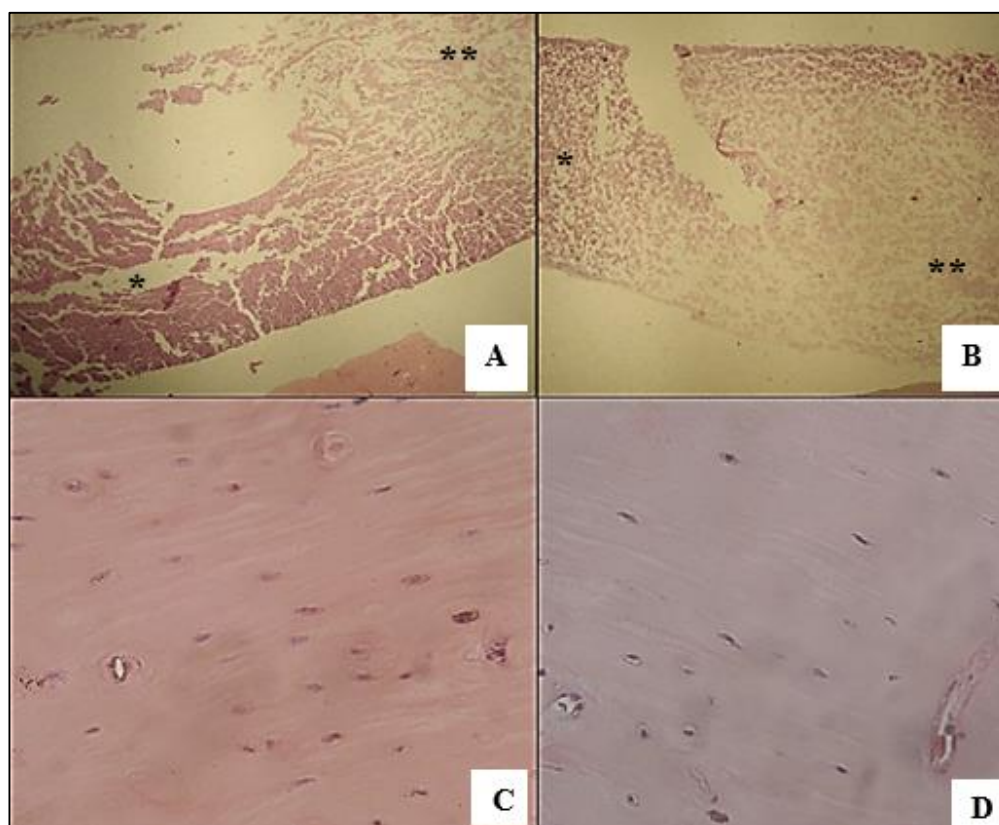


Figura 9- Estrutura da medula óssea dos grupos Frutose (B) e Controle (A). Medula vermelha (*), Medula amarela (**). Tecido ósseo sem alterações, Controle (C) e Frutose (D). HE. 40x (A e B), 100x (C e D).

Análise imunológica do Timo

Após a eutanásia dos animais e retirada do timo foi realizada a análise o peso relativo do órgão (Figura 10) nos grupos Controle ($0,08 \pm 0,01$) e Frutose ($0,07 \pm 0,01$), pode-se notar que não houve alteração significativa entre os grupos.

Ao analisar os valores de celularidade do macerado tímico (contagem total de células) notou-se um aumento significativo de células no grupo Frutose se comparado ao Controle como mostra o gráfico (Figura 11).

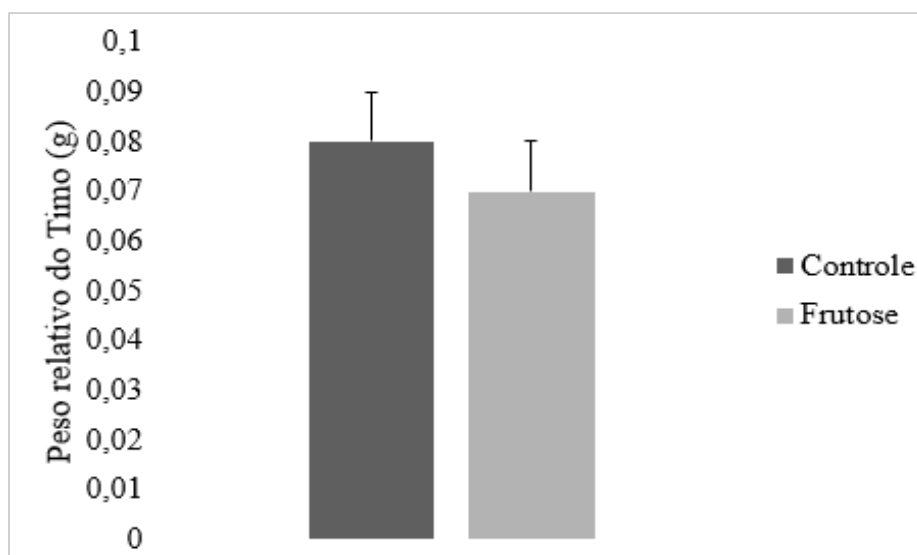


Figura 9- Peso relativo do timo entre os grupos Frutose e Controle. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste t *Student*.. *Frutose vs Controle.

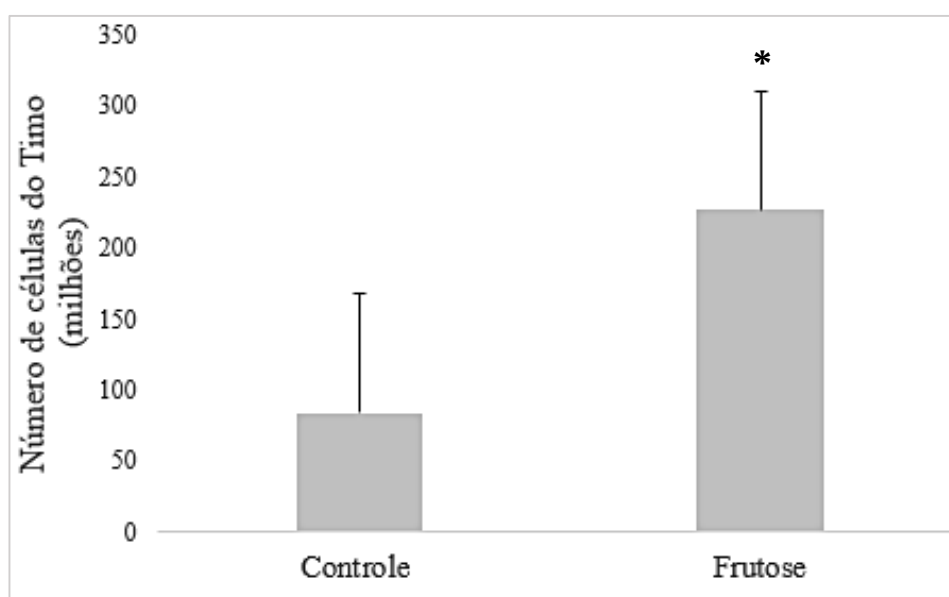


Figura 10- Contagem total de células do Timo entre os grupos Controle e Frutose. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste t *Student*.. * Frutose vs Controle.

A fim de averiguar possíveis alterações nos órgãos linfóides foram analisados alguns parâmetros histomorfométricos como números de lobos e desarranjo medular (timo) e comparações estruturais na medula óssea. A Tabela 04 mostra que não houve diferença estatística se comparado área total, área medula e área tímica entre os grupos.

Tabela 4- Parâmetros histomorfométricos analisados no timo dos Grupos Controle e Frutose.

	Área total	Área medular	Área cortical
Controle	14,7 ± 2,4	3,1 ± 0,45	11,5 ± 2,3
Frutose	13 ± 2,7	3,3 ± 1,4	9,6 ± 1,5

Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste t *Student*. * *Frutose vs Controle*. Software ImageJ®.

Na Figura 12 observa-se fotomicrografias de uma porção do córtex tímico, onde há células em maior número, visualmente em tamanho menor aglomeradas no grupo frutose (12B) se comparado ao grupo controle (12A) corroborando com os achados de hiper celularidade da Figura 11.

O desarranjo medular encontra-se na Figura 13. Há a presença de um desarranjo da arquitetura do timo onde há perda da conformação da medula em relação ao córtex no Grupo Frutose (Figura 13B) se comparado ao Controle (Figura 13A).

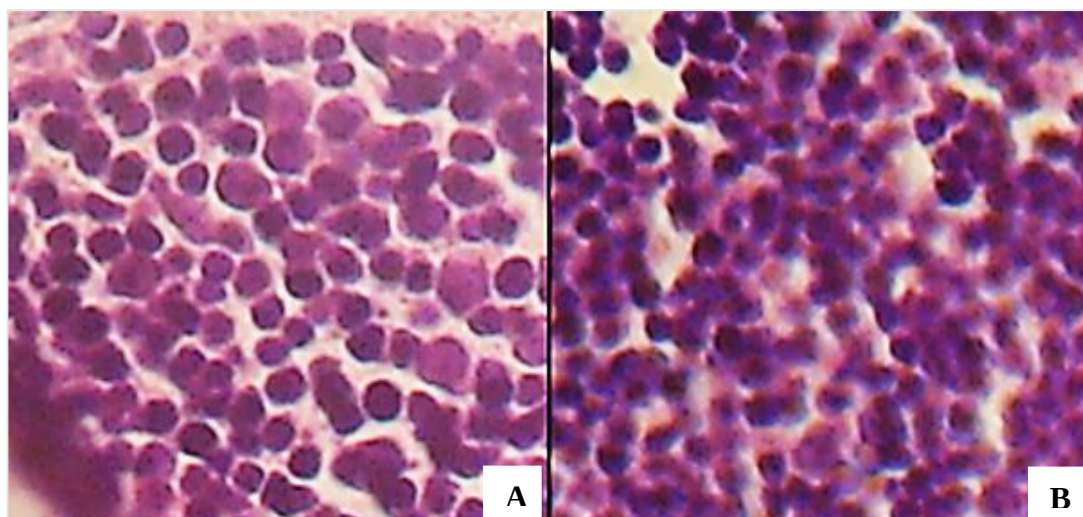


Figura 11- Hiper celularidade tímica. A microscopia óptica mostra aumento no número de células no córtex do timo no grupo frutose (B) se comparado ao grupo Controle (A).HE. 400x.

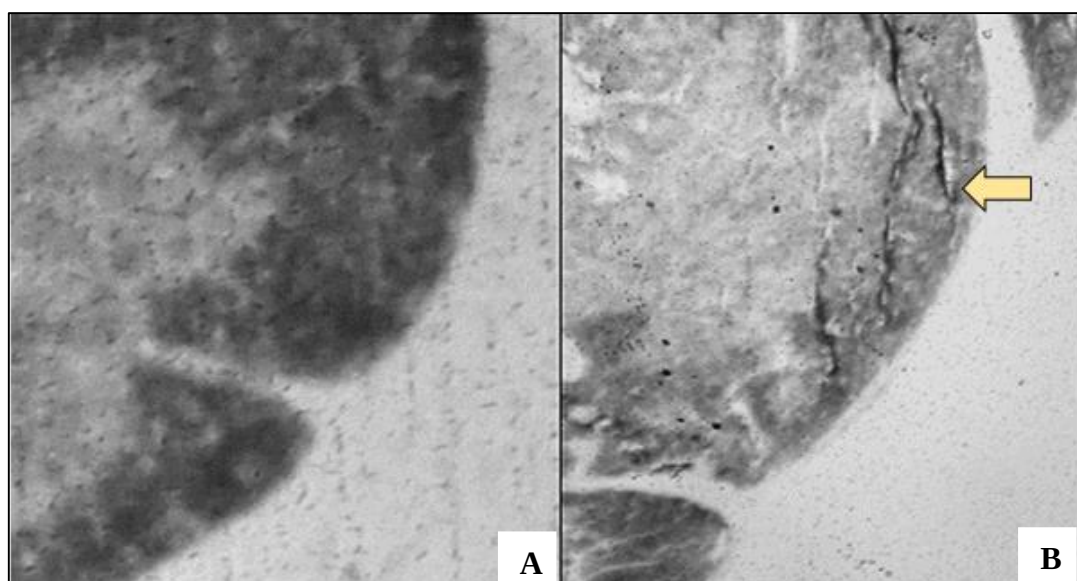


Figura 12- Desarranjo medular do timo. A microscopia óptica mostra um lobo do timo onde houve perda de conformação da medula no grupo Frutose (13B) comparado com o grupo Controle (13A). HE. 40x.

Na Figura 14 observa-se a microscopia óptica da região cortical do timo onde há aumento de infiltrado de histiócitos no grupo Frutose (Figura 14A), dando aspecto de “céu estrelado”, comparado ao grupo Controle (Figura 14B) onde há presença de histiócitos, porém em número reduzido.

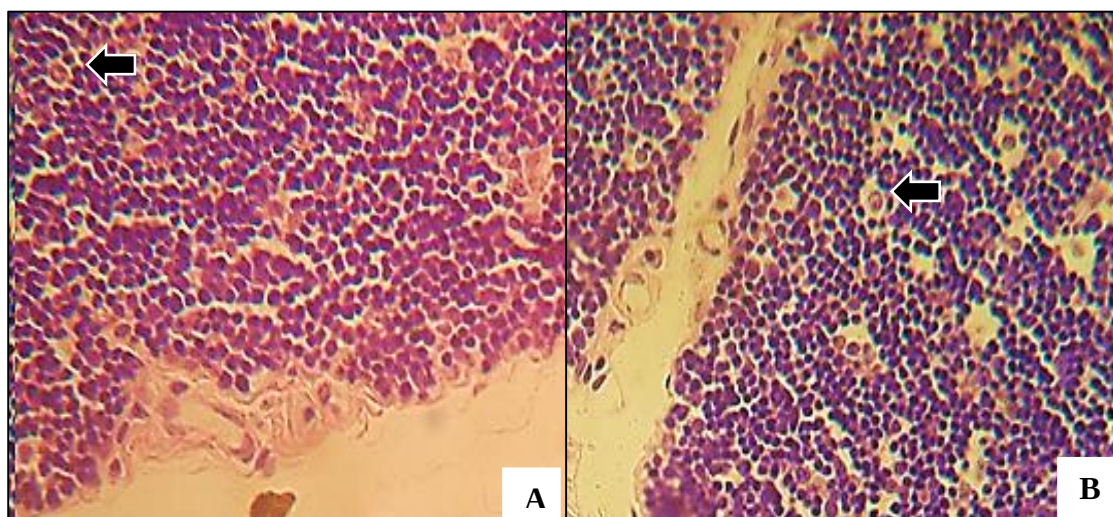


Figura 13- Presença de histiócitos no córtex tímico (seta) no grupo Controle (14A) comparado ao grupo Frutose (14B). HE. 400x.

5 DISCUSSÃO

A alimentação e a nutrição, adequadas e em quantidades suficientes, são essenciais para a manutenção da saúde nas diversas fases da vida. O declínio de atividades físicas e a mudança dos hábitos alimentares, com alto teor energético e poucos nutrientes, como sódio, açúcares e gorduras, contribuem diretamente para o surgimento de problemas graves de saúde (BRASIL, 2013). As ingestões de frutose presente nos alimentos naturais podem trazer efeitos favoráveis, no entanto a ingestão da mesma em alimentos industrializados vem mostrando um crescente aumento de sobrepeso e doenças como obesidade, diabetes e síndrome metabólica (BARREIROS *et al.*, 2005).

A pesquisa em órgãos linfóides é de fundamental relevância para a demonstração de alterações de aspectos imunológicos quando são expostos a agentes estranhos no organismo, uma vez que estes são os órgãos geradores de células importantes envolvidas nas respostas imunes (ROTH *et al.*, 2006). Além disso, há diversos estudos analisando a relação da ingestão de frutose com o metabolismo e prejuízos a órgãos como fígado, rins, pâncreas e coração (VOS e LAVINE, 2013; YANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2013; KORICANAC *et al.*, 2014), porém não são frequentes estudos que analisem a relação de ingestão de frutose e alterações em órgãos linfóides primários, para tanto, este estudo visa avaliar timo e medula óssea de ratos tratados com frutose durante 90 dias, além de alguns padrões fisiológicos e bioquímicos. Não houve perda de animais durante o tratamento, indicando que ele não causou toxicidade, podendo desta forma ser reproduzido em qualquer laboratório.

Os animais iniciaram o tratamento dentro da mesma faixa de peso corporal (180 a 200g). Ao avaliar o ganho de peso durante as 12 semanas de tratamento (Figura 3A), a linearidade (Figura 3B) do ganho de peso para sua diminuição no grupo Controle foi também mostrado por Curi *et al.* (1989) e Tomanari *et al.* (2003), uma vez que, ao passar pelo período jovem adulto, ações hormonais fazem com que as vias metabólicas sejam alteradas, fazendo com que há gasto energético para que o organismo se torne finalmente adulto. Por outro lado, o ganho de peso do grupo Frutose mostrou com oscilações de valores ao longo do tratamento, destacando as semanas 3 e 4 de tratamento. Acredita-se que alguns fatores externos podem ter influenciado esta variação de ganho de peso, como

condições ambientais do biotério, ansiedade e até estresse (ANDRADE, *et al.*, 2006), possibilitando mudanças energéticas e, por consequência, mudança de peso corpóreo.

As decisões alimentares são os determinantes para a conduta alimentar, sendo que tais decisões são iniciadas no cérebro e se integram a uma rede neural e hormonal que refletem em todo o organismo (SMEETS *et al.*, 2012; FROÉS, 2012). O desequilíbrio entre ganho e gasto energético (proveniente da alimentação, estilo de vida e metabolismo) resulta em ganho de peso, sendo que esse desequilíbrio crônico pode resultar em obesidade (LOPES, *et al.*, 2004). A ingesta energética oriunda da ração no grupo Frutose foi menor em relação ao controle (Tabela 1). Uma vez que estes ratos ingeriram energia provinda da água, não houve necessidade de consumir mais ração. O excesso de ingesta energética (água+ração) do grupo Frutose no 2º mês foi acompanhado também de um certo ganho de peso repentino. Em contrapartida, a taxa de ganho de massa corporal (massa magra) foi menor nesse grupo. O aumento de ingesta energética pode estar relacionado a alta palatabilidade que a frutose apresenta, deixando o alimento mais saboroso, o que reforça o seu papel na indústria alimentícia (ACKROFF e SCLAFAN, 2011), sugerindo em ganho de peso na massa gorda do organismo.

Apesar do aumento da glicemia (Tabela 2), os animais não apresentaram estado hiperglicêmico, como nos estudos de Luz, *et al.* (2015). Isso se deve porque a frutose pura provoca pequenos aumentos na glicemia sérica apesar de estimular a gliconeogênese (DIRLEWANGER *et al.*, 2000). Sugere-se, neste estudo, que se o tempo de tratamento fosse prolongado ou a porcentagem de frutose utilizada fosse maior, a hiperglicemia poderia ser manifestada. Contudo, a intenção foi utilizar uma dose experimental que modulasse uma hiperglicemia leve e que não causasse esteatose hepática, como nos estudos de MAMIKUTT *et al.* (2015), para não interferir nas análises imunológicas de celularidade.

Os valores do lipidograma (Figura 4) mostram que não houve diferença entre os grupos quanto aos biomarcadores lipídicos analisados. Além disso, é de interesse salientar que há uma tendência biológica no grupo Frutose para um ligeiro aumento de lipídeos circulantes, indicando que a frutose pode estar atuando pela via lipogênese *de novo*. Em outros estudos a taxa lipídica dos animais tratados com frutose se mostrou elevada, embora a taxa de frutose utilizada foi maior que em nosso estudo (CASTRO, *et al.*, 2013; LUZ *et al.*, 2015).

Durante alguns processos patológicos causados por fungos, protozoários e também desarranjos metabólicos como desnutrição protéica e *Diabetes mellitus*, o timo pode sofrer alterações que prejudicam o desenvolvimento de timócitos e consequentemente uma deficiência na resposta imunológica (SOUTO *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2012; GAVIA-GARCÍA, *et al.*, 2015). Nota-se que apesar do aumento de celularidade no timo (Figura 11 e 12), a análise de peso relativo do timo não mostrou diferença entre os grupos (Figura 10), sendo que as células, visualmente, estão em menor tamanho. Em contrapartida, observa-se um aumento de histiócitos no córtex tímico (Figura 14). Desta forma, sugeriria o início de apoptose de timócitos e acúmulo de macrófagos com consequente aumento da atividade, devido a apoptose, como em um estudo feito em ratos hiperglicêmicos (BARBU *et al.*, 2013).

A conservação dos compartimentos tímicos são de extrema relevância para a maturação de timócitos uma vez que eles precisam migrar várias vezes entre córtex e medula. Isso faz com que passem por todas as fases de maturação e somente depois migrarem para órgãos linfoides periféricos (RAVAROTTO, 2011). Nota-se que não houve diferenças no tamanho da área córtico-medular (Tabela 4), no entanto, o tratamento trouxe modificações na arquitetura tímica. Dessa forma, apresentou uma desordem na conformação córtico-medular no grupo Frutose, devido a um desarranjo durante a migração de células e mudança de receptores (Figura 13) (LIMA, 2014).

Como dito anteriormente, a medula óssea é responsável por sintetizar as diversas células circulantes no organismo que é estimulada por citocinas (ABBAS, 2015). O processo de produção de células é sensível e pode sofrer influência de diversos fatores externos como radiação, produtos químicos e má nutrição (KROŚNIAK *et al.*, 2013). As análises histopatológicas da medula óssea, mostraram que não houve alterações quanto a arquitetura de seu compartimento (Figura 9). No entanto, seriam necessários realizar testes pontuais quanto composição da matriz óssea e colágeno para averiguar tais modificações (ALVES, 2009), uma vez que o comportamento de células hematopoiéticas é gerido, em grande parte, devido as interações do sangue com o microambiente ósseo (SMITH e CALVI, 2013).

A inflamação é um processo que ocorre devido a resposta imunológica a tecido injuriados onde leucócitos, proteínas plasmáticas e fluídos se acumulam no local da infecção onde, normalmente, o agente estranho é eliminado. Já a inflamação metabólica, caracterizada como baixo grau da inflamação crônica, ocorre por mecanismos diferentes

como a ingestão excessiva de nutrientes (ABBAS, 2015; GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2011). Células Th1 e CD4 + CD25hi Tregs atuam como reguladoras de peso corpóreo, tolerância à glicose, hipertrofia de adipócitos, resistência à insulina e progressão ao diabetes tipo 2, além de mediadores de inflamação sistêmica de baixo grau (WINER *et al.*, 2009; FEUERER *et al.*, 2009; KOLB e MANDRUP-POULSEN, 2005; ZENG *et al.*, 2012). Células especializadas, como os adipócitos, liberam diversos agentes pró-inflamatórios que são responsáveis por manter a resposta contra a injúria causando desequilíbrio metabólico (FRÓÉS, 2012).

Foi observado uma diferença quanto a relação mieloide:eritróide (Figura 6), com diminuição de células da linhagem eritróide, principalmente rubroblastos e pró-rubrócitos, e aumento da linhagem mielóide, principalmente linfócitos e eosinófilos e diminuição de neutrófilos e bastonetes (Tabela 3). Porém, o número de linfócitos produzidos pela medula óssea aumentou (Figura 7). Em um estudo realizado em 2013 por Krośniak e colaboradores, houve uma diminuição de linfócitos na medula óssea em ratos tratados com frutose (31%), porém, os valores não foram significantes. Em contrapartida, as análises do leucograma (Figura 5) não mostraram diferenças de linfócitos entre os grupos, mesmo tendo sido intensificada a produção de células, acreditando-se que até o momento da eutanásia dos animais as células estavam ainda retidas na medula óssea.

Esse aumento de produção de células (Figuras 7 e 8) pode indicar um início de desequilíbrio metabólico de baixo grau, já que houve um aumento significativo de linfócitos, fato que pode ter ocorrido por um mecanismo de reposição linfocitário (ABBAS, 2015), uma vez que a presença de um elevado número de macrófagos no córtex tímico pode indicar aumento de apoptose celular, mas para isso seria necessário realizar testes para confirmar tal atividade apoptótica. Ainda nesse contexto, sugere-se que se o tratamento com frutose fosse prolongado, poderíamos observar a evolução desse desequilíbrio metabólico para uma inflamação crônica central, podendo trazer prejuízos maiores aos órgãos linfoides primários. Como nos estudos de BARRETO *et al.* (2005) e JANUSZYK *et al.*, (2014) onde houve depleção de timócitos, prejuízo de células progenitoras e diminuição da capacidade clonal e aumento de apoptose de progenitores granulócitos em animais tratados com alto teor de frutose (TAGZIRT *et al.*, 2014).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos dados apresentados e discutidos no decorrer do trabalho, podemos concluir que a ingesta de frutose (7%) não foi suficiente para induzir uma hiperglicemia ou dislipidemia nos animais tratados, no entanto pode modular a produção de células e alterar estruturas importantes aos órgãos linfóides. Cabe enfatizar a necessidade de estudos sobre as vias de atuação da frutose relacionada aos órgãos linfóides, dado a sua importância durante respostas contra agentes infecciosos e doenças crônicas.

Este estudo pode ser ampliado em novos experimentos, em que poderia avaliar os biomarcadores imunológicos em etapas seriadas dentro dos 90 dias de tratamento com frutose ou também a possibilidade de prolongar o tempo de tratamento (cronicidade).

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. **Elsevier Brasil**, 2008.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. **Elsevier Brasil**, 2015.

ACKROFF, K; SCLAFANI, A. Rats' preferences for high fructose corn syrup vs. sucrose and sugar mixtures. **Physiology & behavior**, v. 102, n. 5, p. 548-552, 2011.

AL-SALEH, I *et al.* Status of selenium, vitamin E, and vitamin A among Saudi adults: potential links with common endemic diseases. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 26, n. 3, 2007.

ALVES, A.C. Histologia da medula óssea. **Rev bras hematol hemoter**, v. 31, n. 3, p. 183-188, 2009.

ALVES, G. J; PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação: influências do sistema imune sobre o sistema nervoso central. **Médica**, v. 477621, p. 2004-0, 2010.

ANDRADE, A; PINTO, S. C; DE OLIVEIRA, R. S. Animais de laboratório: criação e experimentação. **SciELO-Editora FIOCRUZ**, 2006.

APPAY, V; SAUCE, D; PRELOG, M. The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. **Aging (Albany NY)**, v. 2, n. 2, p. 78-81, 2010.

BAGUL, P. K. *et al.* Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 3, p. 260-268, 2012.

BARBU, L. T. *et al.* Accumulation of tissue macrophages and depletion of resident macrophages in the diabetic thymus in response to hyperglycemia-induced thymocyte apoptosis. **Journal of diabetes and its complications**, v. 27, n. 2, p. 114-122, 2013.

BARREIROS, R.C; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C.E.P. Fructose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista de Nutrição**, p. 377-389, 2005.

BARRETO, E. O. *et al.* Thymus involution in alloxan diabetes: analysis of mast cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 127-130, 2005.

BASCIANO, H. *et al.* Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutrition & metabolism**, v. 2, n. 1, p. 5, 2005.

BEIERWALTES, W. *et al.* A Fructose Enriched Diet (20%) Induces Salt-Sensitive Hypertension and Prevents Salt-Induced Decrease in Plasma Renin. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 1 Supplement, p. 960.6, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Alimentação e Nutrição / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde.– 1. ed., 1. reimpr. – Brasília, 2013.

BRAY, G. A. Fructose: should we worry&quest. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. S127-S131, 2008.

BRAY, G. A.; NIELSEN, S. J.; POPKIN, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 4, p. 537-543, 2004.

BRITO, V. N. Estudo imunopatológico sequencial dos órgãos linfoides primários de camundongos dos camundongos balb/c inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de Mestrado. **Biblioteca Digital Unicamp**. 2001

BRITO, V. N. *et al.* Thymic atrophy and fungal virulence during experimental paracoccidioidomycosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 14-16, 2003.

CASTRO, M. C. *et al.* Lipoic acid prevents liver metabolic changes induced by administration of a fructose-rich diet. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 1, p. 2226-2232, 2013.

CASTRO, R. D. *et al.* Bone marrow examination in rats with thyroid dysfunction. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1246-1250, 2011.

COUTINHO, W. Etiologia da obesidade, 2014. **ABESO**. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/pagina/14/artigos>>. Acesso em: 17 jan. 2016.

CURI, R. *et al.* Reversibility of metabolic changes induced by feeding schedule in rats. *Physiology & behavior*, v. 45, n. 2, p. 249-254, 1989.

DAI, S.; MCNEILL, J. H. Fructose-induced hypertension in rats is concentration-and duration-dependent. *Journal of Pharmacological Toxicological Methods*. 33(2):101–7, 1995.

DE LEÓN-BOJORGE, B. Biopsia de médula ósea. **Acta Pediátrica de México**, v. 31, n. 4, 2010.

DE LOURDES VITURI, C *et al.* Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides in vitro no modelo de desnutrição protéica em camundongos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, 2008.

DINIZ, Y. S *et al.* Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 749-755, 2005.

DIONETE, A. C. atrofia tímica induzida por *Plasmodium berghei*: análise da expressão e atividade das metaloproteinases e seus inibidores. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da UNICAMP. Campinas, SP: (s.n), 2012.

DIPP, T. Efeito agudo da ingestão de frutose no controle autonômico de indivíduos saudáveis co história familiar de DM2. Dissertação de Mestrado. **Fundação universitária de cardiologia**. Rio grande do sul. 2010.

DIRLEWANGER, M; SCHNEITER, P; JÉQUIER, E; TAPPY, L. Effects of fructose on hepatic glucose metabolism in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 279, n. 4. 2000.

ELLIOT, S. S. *et al.* Fructose, weight gain, and insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr**, v. 76, p. 911-922, 2002.

FAGUNDES, D .J; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FAHIM, A.; ABUZAKOUK, M.; HART, S. P. Haemophilus influenzae pneumonia and immunodeficiency in association with thymoma—A presentation of Good's Syndrome. **Revista portuguesa de pneumologia**, v. 17, n. 6, p. 272-274, 2011.

FEIG, D. I; SOLETSKY, B; JOHNSON, R.J. Effect of allopurinol on blood pressure of adolescents with newly diagnosed essential hypertension: a randomized trial. **Jama**, v. 300, n. 8, p. 924-932, 2008.

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B; BARBOSA, JARDINI, M.V.. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta cir. bras**, v. 20, n. supl. 2, p. 28-34, 2005.

FERREIRA, S. S. Fructose and the Metabolic Syndrome. Monografia. **Universidade do Porto**. 2010.

FERREIRA, S.R.G. Alimentação, nutrição e saúde: avanços e conflitos da modernidade. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 4, p. 31-33, 2010.

FEUERER, M *et al.* Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. **Nature medicine**, v. 15, n. 8, p. 930-939, 2009.

FORTE, W. C. N. *et al.* Avaliação de neutrófilos na desnutrição moderada. **Rev Ass Med Bras**, v. 45, n. 2, p. 147-51, 1999.

FRIEDWALD, W.T; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, p. 499-502. 1972.

FRÓES, F.C.T.S. Obesidade: um enfoque na inflamação periférica e central. 2012.

GAVIA-GARCÍA, G. *et al.* Oxidative damage and antioxidant defense in thymus of malnourished lactating rats. **Nutrition**, v. 31, n. 11, p. 1408-1415, 2015.

GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 415-445, 2011.

GUSMÃO, L. S. *et al.* Utilização de indicadores dietéticos como critérios prognósticos da Síndrome Metabólica. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição-RASBRAN**, v. 6, n. 1, p. 37-46, 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa Nacional de Saúde Escolar, 2009. Rio de Janeiro, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro, 2004.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares [Internet] 1996. Acesso em: 28 de agosto de 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Rio de Janeiro. 2011.

JAIN, N. C. Essentials of Veterinary Hematology, Lea and Febiger. **Philadelphia, Pennsylvania**, 1993.

JANUSZYK, M *et al.* Diabetes Irreversibly Depletes Bone Marrow–Derived Mesenchymal Progenitor Cell Subpopulations. **Diabetes**, v. 63, n. 9, p. 3047-3056, 2014.

KAC, G; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. **Cad Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 4-5, 2003.

KOLB, H; MANDRUP-POULSEN, T. An immune origin of type 2 diabetes? **Diabetologia**. v. 48, p. 1038–1050. 2005.

KORICANAC, G. *et al.* Expression and cellular distribution of glucose transporters and alpha subunits of Na⁺/K⁺-ATPase in the heart of fructose-fed female rats: the role of estradiol. **Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et métabolisme**, v. 46, n. 2, p. 109-115, 2014.

KROŚNIAK, M. *et al.* Influence of Fructose and Fatty-Rich Diet Combined with Vanadium on Bone Marrow Cells. **Biological trace element research**, v. 155, n. 2, p. 276-282, 2013.

LEANDRO, C. G. *et al.* Efeito da L-Glutamina sobre o perfil leucocitário ea função fagocítica de macrófagos de ratos estressados. **Rev. nutr**, v. 19, n. 4, p. 437-444, 2006.

LI, J. M *et al.* "Quercetin preserves β -cell mass and function in fructose-induced hyperinsulinemia through modulating pancreatic Akt/FoxO1 activation." **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2013.

LIMA, A. C. D. *et al.* "Thymic alterations induced by Plasmodium berghei: Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors." **Cellular immunology** v. 279, p. 53-59. 2012.

LIMA, S. C.; ARRAIS, R. F.; PEDROSA, L. F. C. Avaliação da dieta habitual de crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, p. 469-477, 2004.

LORDELO, R. A.; MANCINI, M. C.; CERCATO, C.; HALPERN, A. Hormonal axes in obesity: cause or effect? **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v.51, p. 34-41. 2007

LUZ, C. M. *et al.* Efeitos da sobrecarga de frutose e atividade física sobre a parede intestinal do cólon ascendente e plexo mientérico de ratos. **Arq. ciências saúde UNIPAR**, v. 17, n. 2, 2015.

MALTA, D. C. *et al.* A construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis no contexto do Sistema Único de Saúde. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 15, p. 47-65. 2006.

MAMIKUTTY, N; THENT, Z. C; HAJI SUHAIMI, F. Fructose-Drinking Water Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Ultrastructural Alteration of Hepatocyte Mitochondria in Male Wistar Rat. **BioMed Research International**, 2015.

MARSÁN SUÁREZ, V; DEL VALLE PÉREZ, L. O.; MACÍAS ABRAHAM, C. Aspectos actuales de la organogénesis. Función e involución del timo. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 349-358, 2013.

MEDEIROS, R *et al.* Aerobic training prevents the impaired vascular reactivity of fructose-treated rats (1106.22). **The FASEB Journal**, v. 28, n. 1 Supplement, p. 1106.22, 2014.

MIRANDA, C. A. Efeitos do tratamento com extrato aquoso de Hibiscus sabdariffa L. em ratos tratados com frutose: Biomarcadores bioquímicos e imunológicos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMT. Barra do Garças-MT: (s.n), 2016.

MORRISON, S. J.; SCADDEN, D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 327-334, 2014.

MUÑOZ, M. *et al.* Obesidad y sistema immune. **Nutrición Hospitalaria**, v. 19, n.6, p. 319-324, 2004.

NARDY, A. F; FREIRE-DE-LIMA, C. G; MORROT, A. Immune evasion strategies of Trypanosoma cruzi. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.

NISHINO, M. *et al.* The thymus: a comprehensive review 1. **Radiographics**, v. 26, n. 2, p. 335-348, 2006.

NOVELLI, E. L. B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.

OZATA, M. *et al.* Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clin Biochem**, v. 35, n. 8, p. 627-31. 2002.

PARKS, E. J. *et al.* Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 6, p. 1039-1046, 2008.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775-777, 2005.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 17, p. 1246-1253. 1993.

ROTH, D. R. *et al.* Design and evaluation of immunotoxicity studies. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 57, p. 367-371. 2006.

ROVAROTTO, C. F. Efeito da infecção experimental com *Plasmodium berghei* NK65 sobre o timo: níveis elevados de apoptose e saída prematura de timócitos CD4⁺ CD8⁺. Tese de Doutorado, **Instituto de Biologia, UNICAMP**. 2011.

RUMESSEN, J. J. Fructose and related food carbohydrates. **Scand J Gastroenterol**, v. 27, n. 10, p. 819-28. 1992.

SANTOS, E.W.C.O. Estudo da função de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos à dieta hipoprotéica e dieta hiperlipídica. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**. 2013.

SARDENBERG, T. A ética da pesquisa em seres humanos e a publicação de artigos científicos. **J Pneumol**, v. 25, p. 2, 1999.

SAVINO, W. Sintaxe comum e conexões imunoneuroendócrinas. Ia JORNADA FLUMINENSE SOBRE COGNIÇÃO IMUNE E NEURAL História da imunologia cognitiva, p. 242, 2009.

SCHANAIDER, A; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 4, p. 441-7, 2004.

SMEETS, P.A.M *et al.* Food-induced brain responses and eating behaviour. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 04, p. 511-520, 2012.

SMITH, J. N. P; CALVI, L. M. Concise review: current concepts in bone marrow microenvironmental regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. **Stem Cells**, v. 31, n. 6, p. 1044-1050, 2013.

SONG, M. *et al.* Kupffer cell depletion protects against the steatosis, but not the liver damage, induced by marginal copper, high fructose diet in male rats. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, p. ajpgi. 00285.2014, 2015.

SOUTO, P. C. S. Análise ultra-estrutural de órgãos linfóides primários de camundongos balb/c inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia, Instituto de Biologia, UNICAMP. Campinas, SP: (s.n), 2002.

SOUTO, P. C. S, BRITO, V. N., GAMEIRO, J., DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; VERINAUD, L. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Medical microbiology and immunology**. v. 192, n. 4, p. 225-229. 2003.

SOUTO, P.C.S. Paracoccidioidomicose experimental: infecção e doença em animais infectados por um isolado atípico da cepa Pb18. Tese de Doutorado. **Biblioteca Digital Unicamp**. 2006.

STANHOPE, K.L.; HAVEL, P.J. Fructose consumption: recent results and their potential implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1190, n. 1, p. 15-24, 2010.

STIBBE, W.; WEISE, M.; SEIDEL, D. Automated platelet count in thrombocytopenic patients: a comparison of methods. **J Clin Chem Clin Biochem**, v. 23, n. 7, p. 339-404, 1985.

SWARBRICK, M. M. *et al.* Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks increases postprandial triacylglycerol and apolipoprotein-B concentrations in overweight and obese women. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 05, p. 947-952, 2008.

TAGZIRT, M. *et al.* Alterations in neutrophil production and function at an early stage in the high-fructose rat model of metabolic syndrome. **American journal of hypertension**, v. 27, n. 8, p. 1096-1104, 2014.

TAKAHAMA, Yousuke. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 2, p. 127-135, 2006.

TAPPY, L; LÊ, K. A Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiological reviews**, v. 90, n.1, p. 23-46. 2010.

THORBURN, A.N.; MACIA, L.; MACKAY, C.R. Diet, metabolites, and “western-lifestyle” inflammatory diseases. **Immunity**, v. 40, n. 6, p. 833-842, 2014.

TOMANARI, Gerson Yukio; PINE, Alexandre de Souza; SILVA, Maria Teresa Araújo. Ratos Wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 5, n. 1, p. 57-71, 2003.

VOS, M. B.; LAVINE, J. E. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 57, n. 6, p. 2525-2531, 2013.

WANG, Y. M; VAN, E.J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. *Ann Rev Nutr*, v. 1, p. 437-475. 1981.

WINER, S. *et al.* Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. **Nat Med**. V. 15, p. 921–929. 2009.

YANG, M. *et al.* Ginger extract diminishes chronic fructose consumption-induced kidney injury through suppression of renal overexpression of proinflammatory cytokines in rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v.14, n.1, p. 174. 2014.

YOUNG, D. S. Effects of drugs on clinical laboratory tests. **AACC press**, 4th ed, 2001.

ZALESIN, K. C; FRANKLIN, B. A; MILLER, W. M; PETERSON, E. D; MCCULLOUGH, P. A. Impact of obesity on cardiovascular disease. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v. 37, p. 663-84. 2008.

ZENG, C. *et al.* The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. **Journal of molecular medicine**. v. 90, n. 2, p. 175-186. 2012.