

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo deste relatório de pós-doutorado será disponibilizado somente a partir de 31/08/2027.

SILVANA GISELE PEGORIN DE CAMPOS

**REPERCUSSÕES DA EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA E LACTACIONAL A
RESÍDUOS AMBIENTAIS DO PLÁSTICO SOBRE A GLÂNDULA ADRENAL DE
RATOS: CORRELAÇÃO ENTRE ASPECTOS ESTRUTURAIS E PROTEÔMICOS**

Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de
Biociências de Botucatu (IBB – UNESP)

Supervisor: Prof. Wellerson Rodrigo Scarano

Agência de Fomento: Pró-Reitoria de Pesquisa – UNESP
(Programa de Pós-doutorado na UNESP - 12/2022,
Projeto n. 5442)

PROGRAMA DE PÓS-DOCTORADO DA UNESP

Botucatu

2025

RESUMO

A exposição a desreguladores endócrinos (DEs) durante a gravidez e a lactação mostram que estes exercem influência tanto no indivíduo exposto como na sua descendência, através de um processo conhecido como herança transgeracional. Atualmente, uma maior atenção tem sido direcionada aos danos causados por microplásticos (MPs) e nanoplásticos (NPs) que penetram no corpo por várias formas. Os ftalatos são aditivos plásticos, não covalentemente ligados aos produtos em que são utilizados, podendo ser liberados e contaminar alimentos processados ou armazenados em recipientes plásticos. Entre as glândulas vulneráveis a DEs destaca-se a adrenal, um constituinte do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), com vários componentes alvos para ações toxicológicas (receptores, fatores de transcrição e enzimas). Diante do exposto, o presente projeto avaliou os aspectos da citoarquitetura do córtex adrenal de ratos jovens e adultos expostos no período perinatal a uma mistura de diésteres de ftalatos (MFs) e NPs. Ratas prenhes da linhagem Sprague Dawley foram distribuídas em 5 grupos experimentais: G1: (controle; veículo); T1: 20µg/kg/dia MF; T2: 200mg/kg/dia MF; T3: NPs; T4: 20µg/kg/dia MF + NPs; T5: 200mg/kg/dia MF + NPs. Foram utilizadas nanoesferas de poliestireno de 100 nm (1,0 mg/kg/dia) e os DEs administrados por gavagem do dia gestacional 10 ao dia pós-natal 21. Nos DPN22 e DPN120, as adrenais direita e esquerda foram coletadas dos machos F1 para análises histológica e proteômica (espectrometria de massas), sendo apresentados no presente relatório os resultados de DPN120. Os tratamentos não afetaram os parâmetros biométricos de peso corporal e das adrenais no período adulto. As avaliações histopatológicas preliminares das glândulas apontaram alterações na citoarquitetura do córtex adrenal após a exposição à mistura de ftalatos e nanoplásticos. A taxa de proliferação celular, identificada por células positivas à fosfohistona H3, diminuiu significativamente no grupo T3. A funcionalidade glandular foi avaliada pela ação dos DEs sobre a proteína StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) e a enzima 17α-hidroxilase (CYP17A1). StAR foi modulada pelas misturas de ftalatos (T1 e T2) e a CYP17A1 pelas misturas de ftalatos e nanoplásticos (T1, T2 e T4). Nosso estudo infere sobre a modulação de componentes do córtex adrenal mediante à exposição a ftalatos e nanoplásticos e ressalta a importância deste órgão para estudos de toxicologia envolvendo descontrole no eixo HPA.

Palavras-chave: Adrenal. DOHaD. Exposição Materna. Esteroidogênese. Ftalatos. Nanoplásticos

SUMÁRIO

1 Introdução	
1.1 Glândulas adrenais: Aspectos morfológicos, funcionais e do desenvolvimento	3
1.2 Correlação entre aspectos histológicos e esteroidogênese adrenal	5
1.3 Desreguladores endócrinos	6
2 Objetivo geral	9
2.1 Objetivos específicos	9
3 Metodologia	9
3.1 Delineamento Experimental	9
3.2 Análise morfológica e estereológica	11
3.3 Marcações Imunohistoquímicas	12
3.4 Expressão proteica global por espectrometria de massas (LC-Ms/Ms)	13
3.5 Análise Estatística	14
4 Resultados	14
5 Discussão	23
Referências	26
Etapas do projeto a serem concluídas	33
Outras atividades realizadas de agosto de 2024 a julho de 2025	35

1 Introdução

1.1 Glândulas adrenais: Aspectos morfológicos, funcionais e do desenvolvimento

As glândulas suprarrenais, também chamadas de adrenais, consistem em um par de órgãos endócrinos compostos, com uma região mais externa, o córtex (derivado da mesoderme) e, uma mais interna, a medula (derivada da crista neural), as quais integram tipos celulares de diferentes origens em uma unidade anatômica e funcional. O desenvolvimento adequado e homeostase das adrenais são fundamentais para muitas atividades corporais, especialmente como uma parte do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), responsável por controlar as respostas ao estresse e imunológica, maturação sexual e equilíbrio de sais (SMITH; VALE, 2006; KASTRITI; KAMENEVA; ADAMEYKO, 2020; PIGNATTI; FLUCK, 2021).

Essas glândulas estão localizadas anteriormente e sobre o polo superior do rim, são assimétricas, com a adrenal direita em formato piramidal e a esquerda, maior e em forma de crescente. As suprarrenais humanas adultas pesam entre 8 e 10 g, sendo até 90% correspondente ao córtex. Esta região é a principal produtora de esteroides no corpo e a medula secreta catecolaminas que funcionam como hormônios de “luta ou fuga” (YATES et al., 2013).

As adrenais estão inseridas em uma cápsula de fibroblastos e miofibroblastos, que contém um plexo arterial e envia trabéculas com vasos sanguíneos e nervos no córtex subjacente. O córtex é dividido em 3 zonas funcionalmente distintas dispostas ao redor da medula (GUASTI, et al., 2011).

Abaixo da cápsula encontra-se a zona mais externa do córtex, a zona glomerulosa (ZG). Esta zona estreita contém células epiteliais colunares relativamente pequenas, dispostas em *clusters*. As células da ZG apresentam núcleos evidentes e citoplasma basofílico com baixo conteúdo lipídico. A ZG constitui até 15% do córtex e produz o mineralocorticoide aldosterona, responsável pelo controle do volume sanguíneo e equilíbrio sais/água. Abaixo da ZG está a zona fasciculada (ZF), que contém células epiteliais poligonais dispostas em colunas radiais e citoplasma rico em gotículas lipídicas. A ZF secreta principalmente glicocorticoides, sendo o cortisol em humanos e a corticosterona em ratos e camundongos. A zona cortical mais interna é a zona reticular (ZR), composta por células poliédricas dispostas em cordões anastomosados, as quais liberam glicocorticoides e, em humanos e primatas superiores, andrógenos adrenais como androstenediona, desidroepiandrosterona (DHEA) e

sua forma sulfata, DHEAS. Teleologicamente, a zonação funcional permite uma discreta regulação de cada tipo de esteroide (PIGNATTI; FLUCK, 2021).

Embora o arranjo geral da glândula seja o mesmo entre os mamíferos, há algumas diferenças quanto à organização das zonas. Em ratos, as zonas estão distribuídas em camadas concêntricas, com a ZG disposta em faixa contínua abaixo da cápsula e, entre ZG e a ZF há uma porção intermediária com 3 a 4 camadas de células, referida como zona intermediária, zona branca ou zona indiferenciada (GUASTI et al., 2011).

Em mamíferos adultos, a região da medula adrenal é composta principalmente de células cromafins neurosecretoras derivadas da crista neural, responsáveis pela liberação de catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) (von EULER; HAMBERG, 1949). Células gliais periféricas também estão presentes na medula em íntima associação com as células cromafins (JESSEN; MIRSKY, 2019).

O programa de desenvolvimento da adrenal inicia no embrião, continua no feto e no período pós-natal (KIM; CHOI, 2020). O córtex desenvolve-se a partir de um espessamento do epitélio celômico derivado da mesoderme localizado na base do sulco entre a crista urogenital e o mesentério dorsal, que pode ser identificado em humanos a partir da 4ª semana de gestação (ELSE; HAMMER, 2005) e no 13ª dia do desenvolvimento em ratos (BIBEAU et al., 2010). Tal estrutura é denominada primórdio adrenogonadal (*clusters* de precursores gônada/adrenal), sendo identificada por conter células que expressam fatores de transcrição esteroidogênico-1 (SF-1, NR5A1 e Ad4BP) (HATANO, et al., 1996; KIM et al., 2009). A biossíntese dos esteroides DHEA e DHEAS iniciam entre a 8ª e 10ª semana e atingem níveis de 200mg/dia ao final da gestação (ISHIMOTO; JAFFE, 2011). Isto se deve principalmente a expressão de CYP11A1 e CYP17A1 e seus parceiros redox na ZF adrenal, responsável pela maior parte da esteroidogênese fetal (GOTO et al., 2006). Esta atividade auxilia na manutenção da homeostase intrauterina e maturação de órgãos fetais, incluindo a própria adrenal (YATES et al., 2013). Após o nascimento em humanos, a ZF regride por apoptose e o peso da adrenal diminui em 50% nas primeiras 2 semanas, com concomitante queda na secreção de andrógenos. Aos 3 anos de idade, células da ZR são identificadas e aos 6 anos a síntese de andrógenos pela adrenal recomeça, um estágio referido como adrenarca. A ZR continua a aumentar em espessura até a puberdade (HUI et al., 2009). Em camundongos, após o nascimento a zona adrenal fetal (zona X) regride durante a puberdade em machos e na primeira gestação em fêmeas (WOOD; HAMMER, 2011).

Referências

- AQUINO, A. M. et al. Integrated transcriptome and proteome analysis indicates potential biomarkers of prostate cancer in offspring of pregnant rats exposed to a phthalate mixture during gestation and lactation. **Chemosphere**, v. 341, p. 140020, 2023.
- BARKER, D. J. P. Fetal origins of coronary heart disease. **British Medical Journal**, v. 311, p. 171–174, 1995.
- BIBEAU, K.; BATTISTA, M.C.; HOUDE, V.; BROCHU, M. Fetal adrenal gland alterations in a rat model of adverse intrauterine environment. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.298, p. R 899-911, 2010.
- BOSNIR, J. Migration of phthalates from plastic products to model solutions. **Collegium Antropologicum**, v.27, p. 23–30, 2003.
- BRADFORD, M.M. Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plasticos En Colombia Rotoplast, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRÄNDLI-BAIOCCO A. et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Endocrine System. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 31(3 Suppl), p. 1S-95S, 2018.
- BRUN, N.R. et al. Polystyrene nanoplastics disrupt glucose metabolism and cortisol levels with a possible link to behavioural changes in larval zebrafish. **Communications Biology**, v. 2, p.1-9, 2019.
- BURRIS-HIDAY, S.D.; SCOTT, E. E. Steroidogenic cytochrome P450 17A1 structure and function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.528, p. 111261, 2021.
- BUSADA, J.T.; CIDLOWSKI, J.A. Mechanisms of glucocorticoid action during development. **Current Topics in Developmental Biology**, v.125, p. 147-170, 2017.
- CAMPANALE, C. et al. A detailed review study on potential effects of microplastics and additives of concern on human health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.17, p. 1212, 2020.

CAMPIOLI, E.; MARTINEZ-ARGUELLES, D. B.; PAPADOPOULOS, V. *In utero* exposure to the endocrine disruptor di-(2-Ethylhexyl) phthalate promotes local adipose and systemic inflammation in adult Male offspring. **Nutrition & Diabetes**, v.4, p. e115–e15, 2014.

CHAMOUX, E. et al., Fibronectin, laminin, and collagen IV interact with ACTH and angiotensin II to dictate specific cell behavior and secretion in human fetal adrenal cells in culture, **Endocrinology Research**, v. 28 (4), p. 637–640, 2002.

CHAN, L.F.; METHERELL, L.A.; CLARK, A.J. Effects of melanocortins on adrenal gland physiology. **European Journal of Pharmacology**. v. 660, p. 171-180, 2011.

CHOUDHARY, D. et al., Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 414, p. 91–100, 2003.

DALAMAGA, M. et al. The Role of Endocrine Disruptors Bisphenols and Phthalates in Obesity: Current Evidence, Perspectives and Controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25(1), p. 675, 2024.

De WILDT, S.N. et al. Glucuronidation in Humans. **Clinical Pharmacokinetics**, v.36, p. 439–452, 1999.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E., et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v.30, p.293-342, 2009.

ELSE, T., HAMMER, G.D. Genetic analysis of adrenal absence: agenesis and aplasia. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.16, p. 458-468, 2005.

FISHER, J.S. Environmental anti-androgens and male reproductive health: Focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. **Reproduction**, v.127, p. 305–315, 2004.

FLEMING, T.P. Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. **Lancet**, v. 391, p. 1842-1852, 2018.

FOWDEN, A.L. The insulin-like growth and feto-placental growth. **Placenta**, v.24, p.803-812, 2003.

FREEDMAN, B.D., et al. Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. **Developmental Cell**, v. 26, p. 666-673, 2013.

FREITAS, A.T. et al. Regulatory and junctional proteins of the blood-testis barrier in human Sertoli cells are modified by monobutyl phthalate (MBP) and bisphenol A (BPA) exposure **Toxicology in Vitro**, v. 34, p. 1 -7, 2016.

GALLO-PAYET, N.; BATTISTA, M. C. Steroidogenesis-adrenal cell signal transduction. **Comprehensive Physiology**, v. 4 (3), p. 889-964, 2014.

GANNON, A.-L. et al. Androgen receptor signalling in the male adrenal facilitates X-zone regression, cell turnover and protects against adrenal degeneration during ageing. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1045, 2019.

GOTO, M. et al. In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 953-960, 2006.

GUASTI, L. et al. Localization of Sonic hedgehog secreting and receiving cells in the developing and adult rat adrenal cortex. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.336, p. 117-22, 2011.

GUERRA, L. H. A. et al. Lifelong impact of BPA: Steroidogenic reprogramming in aged gerbil adrenal glands following developmental exposure. **Life Sciences**. v. 5, p. 378:123825, 2025.

HARVEY, P.W. Adrenocortical endocrine disruption. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.155, p.199-206, 2016.

HATANO, O. et al. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. **Genes Cells**, v. 1, p.663-71, 1996.

HEINDEL, J. J. et al. Obesogens and Obesity: State-of-the-Science and Future Directions Summary from a Healthy Environment and Endocrine Disruptors Strategies Workshop. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 118 (1), p. 329 – 337, 2023.

HUI, X.G., et al. Development of the human adrenal zona reticularis: morphometric and immunohistochemical studies from birth to adolescence. **Journal of Endocrinology**, v. 203, p. 241-252, 2009.

ISHIMOTO, H.; JAFFE, R.B. Development and function of the human fetal adrenal cortex: a key component in the feto-placental unit. **Endocrine Reviews**, v.32, p.317–355, 2011.

JESSEN, K.R.; MIRSKY, R. Schwann cell precursors; multipotent glial cells in embryonic nerves. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v.12, p. 69, 2019.

KABIR, E.R.; RAHMAN, M.S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 241-258, 2015.

KASTRITI, M.E.; KAMENEVA, P.; ADAMEYKO, I. Stem cells, evolutionary aspects and pathology of the adrenal medulla: A new developmental paradigm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.518, p. 110998, 2020.

KIGATA, T.; SHIBATA, H. Anatomical variations of the arterial supply to the adrenal gland in the rat. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, p. 238-243. 2017

KIM, A.C., et al. In search of adrenocortical stem and progenitor cells. **Endocrine Reviews**, v.30, p.241-63, 2009.

KIM, J.-H.; CHOI, M.H. Embryonic Development and Adult Regeneration of the Adrenal Gland. **Endocrinology and Metabolism**, v.35, p.765-773, 2020.

KREMER, J.L. et al. Proteomic profiling of the extracellular matrix in the human adrenal cortex. **Matrix Biology Plus**, 2024, Erratum in: Matrix Biology Plus, v. 26, p. 100173, 2025.

KURUNTHACHALAM, K.; VIMALKUMAR, K. A review of human exposure to microplastics and insights into microplastics as obesogens. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 978, 2021.

LABRIE, F., ET AL. Is dehydroepiandrosterone a hormone? **Journal of Endocrinology**, v. 187, p. 169-196, 2005.

LATENDRESSE, J. R. et al. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. **Toxicologic Pathology**, v. 30(4), p. 524-533, 2002.

MAGOSSO, N. et al. Maternal exposure to phthalates and nanoplastics, isolated or combined: Impacts on placental structure, development, and antioxidant defense as a trigger for maternal-fetal adversities. **Reproductive Toxicology**, v. 135, p. 108930, 2025.

MILLER, W.L. Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 165(Pt A), p. 18-37, 2017.

MILLER, W.L.; AUCHUS, R.J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocrine Reviews**, v.32, p.81-91, 2011.

MISSAGHIAN, E. et al. Role of DNA methylation in the tissue-specific expression of the CYP17A1 gene for steroidogenesis in rodents. **Journal of Endocrinology**, v. 202, p. 99–109, 2009.

OECD. Acute oral Toxicity–Acute Toxic Class Method. OECD guideline for testing of chemicals. North America, Europe and the Pacific: **OECD**, 423, 2001.

PIGNATTI, E.; FLÜCK, C. E. Adrenal cortex development and related disorders leading to adrenal insufficiency. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 527, p. 111206, 2021.

PÖTZL, B., et al. Disruptive effects of plasticizers bisphenol A, F, and S on steroidogenesis of adrenocortical cells. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, v. 15, p. 1387133, 2024.

PUCHTLER, H. et al. Methacarn (methylcarnoy) fixation practical and theoretical considerations. **Histochemie**, v. 21, n. 2, p. 97-116, 1970.

QUAGLIARIELLO, V. et al. Metabolic syndrome, endocrine disruptors and prostate cancer associations: biochemical and pathophysiological evidences. **Oncotarget**, v.8, p. 30606-30616, 2017.

QUINN, T.A., et al. Adrenal steroidogenesis following prenatal dexamethasone exposure in the spiny mouse. **Journal of Endocrinology**, v.221, p. 347-362, 2014.

ROLFO, A., et al. Fetal-Maternal Exposure to Endocrine Disruptors: Correlation with Diet Intake and Pregnancy Outcomes. **Nutrients**, v.12, p. 1744, 2020.

SCARANO, W.R. et al. Exposure to an environmentally relevant phthalate mixture during prostate development induces microRNA upregulation and transcriptome modulation in rats, **Toxicological Sciences**, v.171, p. 84-97, 2019.

SMITH, S.M.; VALE, W.W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience.**, v.8, p. 383–395, 2006.

STOJANOVIĆ, Z. et al. A single dose of microplastic particles induces changed in organ weight of Male wistar rats. **International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry (ICFAPPC)**, v.2021, p.119–222, 2021.

STORBECK, K.H. et al. Steroid metabolome analysis in disorders of adrenal steroid biosynthesis and metabolism. **Endocrine Reviews**, v.40, p.1605-1625, 2019.

TOBIAS, E.; HAMMER, G.D. Genetic analysis of adrenal absence: agenesis and aplasia **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.16, p.458-468, 2005.

ULLAH, S. et al. A review of the endocrine disrupting effects of micro and nano plastic and their associated chemicals in mammals. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, v.13, p.1084236, 2023.

VON EULER, U.S.; HAMBERG, U. 1-Noradrenaline in the suprarenal medulla. **Nature (Lond.)**, v.163, p. 642–643, 1949.

WALCZAK, E.M.; HAMMER, G.D. Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v.11, p. 14-28, 2015.

WARING, R.H., et al. Phytoestrogens and xenoestrogens: The contribution of diet and environment to endocrine disruption. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.108, 213–220, 2008.

WEIBEL, E.R.; KISTLER, G.S.; SCHERLE, W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **Journal of Cell Biology**, v.30, p. 23–38, 1966. Wood, M. A.,

HAMMER, G. D. Adrenocortical stem and progenitor cells: Unifying model of two proposed origins. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.336, p.206–212, 2011.

YATES, R. et al. Adrenocortical Development, Maintenance, and Disease. **Current Topics in Developmental Biology**, v.106, p. 239-312, 2013.

YILMAZ, B. et al. Endocrine disrupting chemicals: Exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v.21, p. 127–47, 2003.

ZENG, L. et al. The ovarian-related effects of polystyrene nanoplastics on human ovarian granulosa cells and female mice. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 257, p. 114941, 2023.

ZHANG, X., et al. Combined effects of di (2-ethylhexyl) phthalate and bisphenol A on thyroid hormone homeostasis in adolescent female rats. **Environmental science and pollution research international**, v.27, p.40882-40892, 2020.

ZHOU, C.; GAO, L.; FLAWS, J.A. Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice. **Toxicological Applied Pharmacology**, v.318, p.49–57, 2017.