



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Isabella Carolina Cozim

Efeitos do Sulfato de Deidroepiandrosterona (DHEA-S) Sobre a
Glândula Adrenal de Fêmeas Senis de Gerbilo da Mongólia (*Meriones
unguiculatus*)

São José do Rio Preto
2023

Isabella Carolina Cozim

Efeitos do Sulfato de Deidroepiandrosterona (DHEA-S) Sobre a
Glândula Adrenal de Fêmeas Senis de Gerbilo da Mongólia (*Meriones
unguiculatus*)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas, junto ao Conselho de Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: PIBIC - Proc: 122880/2023-4

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
Coorientadora: Ma. Carolina Marques Bedolo

São José do Rio Preto
2023

C882e Cozim, Isabella Carolina

Efeitos do sulfato de deidroepiandrosterona (DHEA-S) sobre a glândula adrenal de fêmeas senis de gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) / Isabella Carolina Cozim. -- São José do Rio Preto, 2023

38 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Sebastião Roberto Taboga

Coorientadora: Carolina Marques Bedolo

1. Histologia. 2. Glândulas Adrenais. 3. Hormônios adrenocórticos. 4. Gerbilos. 5. Células Envelhecimento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Isabella Carolina Cozim

Efeitos do Sulfato de Deidroepiandrosterona (DHEA-S) Sobre a
Glândula Adrenal de Fêmeas Senis de Gerbilo da Mongólia (*Meriones
unguiculatus*)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado como parte dos requisitos para
obtenção do Bacharel em Ciências Biológicas,
junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: PIBIC – Proc: 122880/2023-4

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Ma. Stella Bicalho Silva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Me. Vitor Grigio
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
30 de novembro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão pelo incentivo aos meus estudos e pelo apoio incondicional durante toda minha vida.

Aos meus amigos pelos conselhos, conversas e risadas que tornaram essa jornada mais leve.

Sou grata ao meu orientador Sebastião Roberto Taboga e à minha coorientadora Carolina Marques Bedolo pelos conhecimentos transmitidos e pela dedicação a minha pesquisa.

A todos do Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises do IBILCE que me auxiliaram em diversos momentos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa pesquisa sob o processo nº 122880/2023-4.

Também quero agradecer a Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" e a todos os professores do meu curso pela qualidade do ensino oferecido.

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam tão positivamente que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”

Charles Darwin (1871, p. 03)

RESUMO

As glândulas adrenais são órgãos endócrinos localizados na região perirrenal. Este órgão é dividido em duas regiões: o córtex, que secreta hormônios esteroides; e a medula, que é responsável pela produção de catecolaminas. O córtex apresenta zonas funcionais, sendo dividido nas zonas glomerulosa, fasciculada e reticulada. O deidroepiandrosterona (DHEA) e o sulfato de deidroepiandrosterona (DHEA-S) são secretados pela zona reticulada e são precursores da testosterona e de estrógenos nos tecidos periféricos. Com o envelhecimento, os níveis de DHEA circulantes no sangue diminuem em humanos. Em mulheres pós-menopausa, o DHEA e o DHEA-S adrenal se tornam os principais precursores dos hormônios estrógenos e andrógenos. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações morfofuncionais nas glândulas adrenais mediante a administração de DHEA-S em fêmeas senis de gerbilos da Mongólia (*Meriones unguiculatus*). Para isto, as fêmeas foram divididas em 3 grupos experimentais (n=15): grupo intacto; grupo veículo (0,1ml de óleo mineral); grupo DHEA-S (60mg/kg). As amostras foram submetidas a análises por técnicas de colorações citoquímicas através da hematoxilina-eosina e do tricrômico de Gömöri-Halmi. Assim como análises imunoistoquímicas para os receptores de andrógeno e estrógenos (AR, ER α e ER β), enzimas esteroidogênicas (3 β -HSD e 17 β -HSD) e para proliferação celular (anti-PHH3). Portanto, o presente estudo apresentou resultados relacionados a modulação da expressão de receptores hormonais e as enzimas esteroidogênicas envolvidas nas glândulas adrenais de fêmeas de gerbilo, assim como o processo de senescência celular após aplicação de DHEA-S. Esse sulfatado esteroide não demonstrou ter influência sobre a morfometria da adrenal, porém resultou na diminuição da expressão dos receptores estrogênicos ER α e ER β assim como a expressão da enzima 17 β -HSD. As diferenças na expressão foram observadas entre as zonas corticais. Ademais houve um acúmulo de grânulos de lipofusцина nas glândulas adrenais do grupo experimental tratado. O DHEA-S acelerou o processo de senescência celular.

Palavras-chave: Sulfato de Deidroepiandrosterona. DHEA. Glândula Adrenal. Gerbilo da Mongólia. Envelhecimento. Precursor Esteóide.

ABSTRACT

The adrenal glands are endocrine organs located in the perirenal region. This organ is divided into two regions: the cortex, which secretes steroid hormones; and the medulla, which is responsible for producing catecholamines. The cortex has functional zones and is divided into the glomerulosa, fasciculata and reticularis zones. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) are secreted by the reticularis zone and are precursors of testosterone and estrogens in peripheral tissues. With ageing, circulating DHEA levels in the blood decrease in humans. In postmenopausal women, DHEA and adrenal DHEA-S become the main precursors of estrogen and androgen hormones. The aim of this study was to evaluate the morphofunctional changes in the adrenal glands following the administration of DHEA-S in senile female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). For this purpose, the females were divided into 3 experimental groups (n=15): intact group; vehicle group (0.1ml of mineral oil); DHEA-S group (60mg/kg). The samples were analyzed by cytochemical staining techniques using hematoxylin-eosin and Gömöri-Halmi trichrome. As well as immunohistochemical analysis for androgen and estrogen receptors (AR, ER α and ER β), steroidogenic enzymes (3 β -HSD and 17 β -HSD) and for cell proliferation (anti-PHH3). Therefore, the present study presented results related to the modulation of the expression of hormone receptors and steroidogenic enzymes involved in the adrenal gland of female gerbils, as well as the process of cellular senescence following the application of DHEA-S. This sulfated steroid did not prove to have an influence on adrenal morphometry but resulted in a decrease in the expression of the estrogen receptors ER α and ER β as well as the expression of the enzyme 17 β -HSD. Differences in expression were observed between cortical zones. In addition, there was an accumulation of lipofuscin granules in the adrenal glands of the treated experimental group. DHEA-S accelerated the process of cellular senescence.

Keywords: Dehydroepiandrosterone sulphate. DHEA. Adrenal gland. Mongolian gerbil. Ageing. Steroid precursor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Glândula Suprarrenal Humana	13
Figura 2 - Via da esteroidogênese da Glândulas Adrenais em Humanos	16
Figura 3 - Representação esquemática dos grupos experimentais	19
Figura 4 - Zonas do Córtex da Glândulas Adrenais coradas por hematoxilina-eosina.	23
Figura 5 - Expressão do receptor AR no córtex adrenal.	24
Figura 6 - Expressão do receptor ER α no córtex adrenal.	25
Figura 7 - Expressão do receptor ER β no córtex adrenal.	26
Figura 8 - Expressão da enzima 3 β -HSD no córtex adrenal.	27
Figura 9 - Expressão da enzima 17 β -HSD no córtex adrenal	28
Figura 10 - Marcação dos grânulos de lipofuscina no córtex adrenal através do tricrômico de Gömöri-Halmi.	29
Figura 11 - Imunomarcagem de PHH3 para proliferação celular no córtex adrenal.	30
 Tabela 1 - Protocolo e anticorpos primários utilizados na imunoistoquímica	 20
Tabela 2 - Dados biométricos dos grupos experimentais.	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide desidrogenase
17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide desidrogenase
AR	receptor de andrógeno
CYP11A1	enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol
CYP17A1	17 α -hidroxilase
CYB5	citocromo b5 forma A
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Anima
DHEA	deidroepiandrosterona
DHEA-S	sulfato de deidroepiandrosterona
ER α	receptor de estrógeno α
ER β	receptor de estrógeno β
HE	hematoxilina-eosina
P450aro	citocromo P450 aromatase
PAPSS2	3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato sintase tipo 2
PBS	tampão fosfato-salino
SULT2A	sulfotransferase 2A
TBSt	solução salina tris-tamponada com tween
Tris-EDTA	tris-ácido etileno diamino tetra acético
PHH3	fosfohistona H3

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
Fe	ferro
Cu	cobre
Al	alumínio
Zn	zinco
Ca	cálcio
Mn	magnésio
®	marca registrada
µm	micrômetro
mg	miligrama
ml	mililitro
Kg	quilograma
n	grupo amostral
M	molar
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Glândulas Adrenais	12
1.2	Esteroidogênese: DHEA e DHEA-S	13
1.3	Envelhecimento e Senescência Celular	16
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	Delineamento Experimental e Cuidado Animal	17
3.2	Processamento do Material Histológico	18
3.3	Análises Morfológicas e Morfométricas	19
3.4	Análises Imunoistoquímicas	20
3.5	Análises Estatísticas	21
4	RESULTADOS	22
4.1	Dados Biométricos e Morfométricos	22
4.2	Expressão de Receptores	23
4.3	Expressão de enzimas da esteroidogênese	25
4.4	Senescência Celular	28
4.5	Proliferação Celular	29
5	DISCUSSÃO	30
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

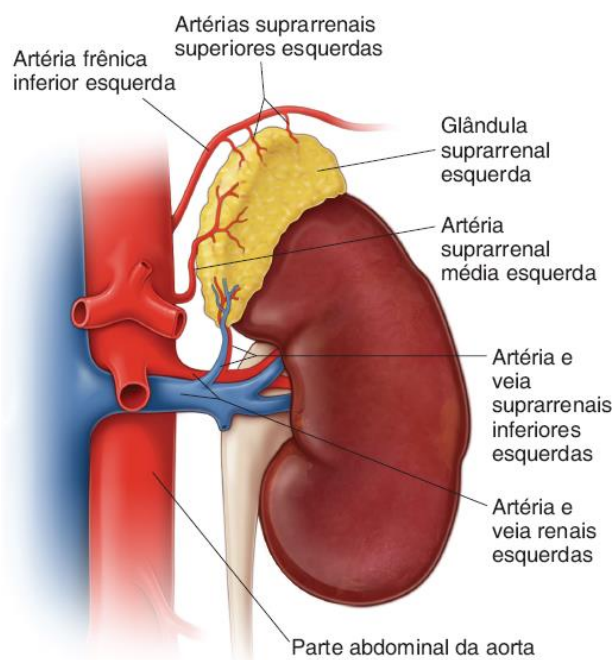
1.1 Glândulas Adrenais

A glândulas adrenais foram descritas e ilustradas pela primeira vez em 1563 pelo anatomista italiano Bartolomeo Eustachio e desde então constantes descobertas vem sendo feitas quanto a sua estrutura e fisiologia (Yates *et al.*, 2013). São órgãos endócrinos bilaterais localizados na região dos rins e compostas por córtex e medula, duas regiões que apresentam origem de desenvolvimento e finalidades distintas (Ross; Louw, 2015). Elas são denominadas de glândulas adrenais em animais quadrúpedes, porém nos seres humanos recebem o nome de suprarrenais, pois na posição bípede elas se localizam acima dos rins (Junqueira; Carneiro, 2023). Nos humanos a formação embriológica do córtex adrenal ocorre a partir de uma região do mesoderma intermediário adjacente ao rim em desenvolvimento; a medula se origina das células da crista neural (Schoenwolf; Bleyl; Brauer, 2014). O córtex adrenal é composto estruturalmente por três zonas distintas e cada uma produz um tipo de hormônio (Apen, 2016). A zona glomerulosa é a mais periférica e delgada, suas células são pequenas e compactas com pouco citoplasma (Apen, 2016). Essa zona é responsável por secretar aldosterona, o principal mineralocorticoide responsável por controlar a homeostase do sódio e da água e por regular a pressão arterial (Berger *et al.*, 2019). A zona fasciculada é a mais espessa entre as zonas. Suas células são grandes comparativamente e menos densamente compactadas, além de possuírem grande quantidade de gotículas lipídicas (Berger *et al.*, 2019). A zona fasciculada secreta hormônios importantes para o metabolismo, imunidade e resposta periférica ao estresse, são os chamados glicocorticoides (Sapolsky; Romero; Munck, 2000). A zona reticulada por sua vez circunda a medula. Suas células possuem menos gotículas lipídicas quando comparadas às células da zona fasciculada e tem como característica a presença do pigmento chamado de lipofuscina (Berger *et al.*, 2019). Ela secreta principalmente os andrógenos e esteroides adrenais, em especial o DHEA e seu derivado sulfatado DHEA-S (Dumontet; Martinez, 2021).

A medula adrenal fica localizada no interior das glândulas. É composta por células ganglionares, células sustentaculares e células cromafins. As células cromafins são responsáveis pela síntese das catecolaminas. A epinefrina e a norepinefrina fazem parte desse grupo de hormônios encarregados pela resposta

rápida do corpo ao estresse (Berger *et al.*, 2019). O córtex e a medula da adrenal, embora sejam considerados dois órgãos diferentes em razão da origem embriológica de ambos, são morfologicamente e funcionalmente relacionados e sua interação parece fundamental para o funcionamento adequado das glândulas (Ehrhart-Bornstein; Bornstein, 2008).

Figura 1: Glândula Suprarrenal Humana. O desenho mostra a localização da glândula suprarrenal esquerda no polo superior do rim esquerdo, assim como evidencia o suprimento sanguíneo no órgão.



Fonte: Pawlina, 2023

1.2 Esteroidogênese: DHEA e DHEA-S

O deidroepiandrosterona (DHEA) é um precursor esteroide produzido principalmente na zona reticulada das glândulas adrenais. O DHEA também é sintetizado nos ovários e testículos, e uma pequena quantidade pode ser secretada pelas células do córtex cerebral (Davis; Panjari; Stanczyk, 2011). Entretanto, sua principal fonte de síntese e secreção ocorre na zona reticulada do córtex adrenal (Davis; Panjari; Stanczyk, 2011). A via biossintética do DHEA ocorre a partir do colesterol. A esteroidogênese se inicia na mitocôndria, a partir de três reações sequenciais de monooxigenase catalisadas pelo colesterol monooxigenase (CYP11A1) onde o colesterol é convertido em pregnenolona (Kater; Giorgi; Costa-Barbosa, 2022). Através da catalização pelo 17-alfahidroxilase/17,20 liase

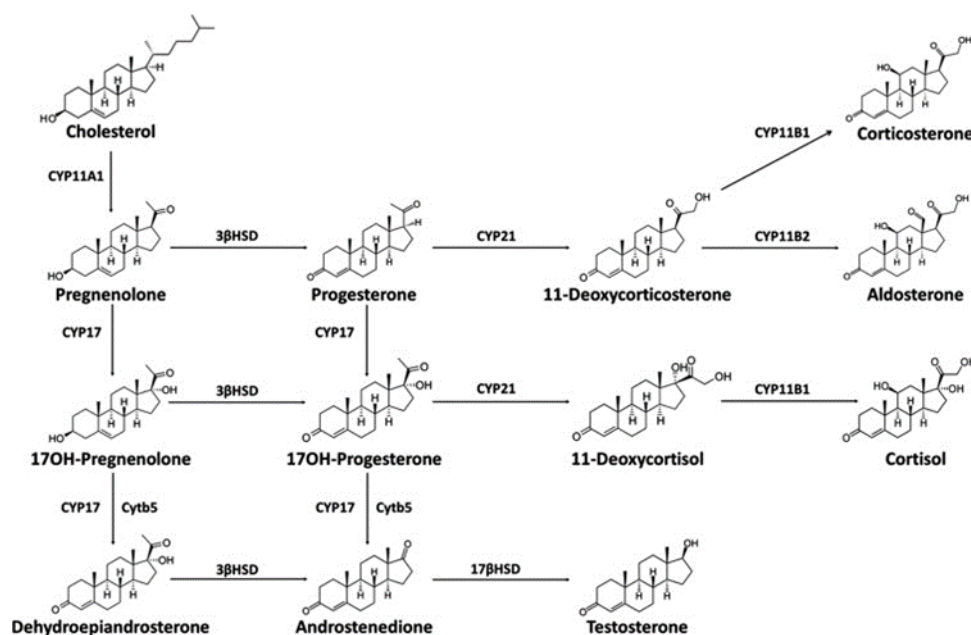
(CYP17A1), a pregnenolona é transformada em 17-hidroxipregnenolona, que por sua vez é convertida em DHEA pela ação da CYP17A1 associado a uma hemoproteína, o cofator citocromo b5 (CYB5) que é expresso somente na zona reticulada. Uma parte do DHEA é convertido em sulfato de deidroepiandrosterona (DHEA-S) por meio da sulfotransferase (SULT2A) juntamente com o seu cofator 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato sintase tipo 2 (PAPSS2). Essa conversão ocorre principalmente na zona reticulada das glândulas adrenais e nas gônadas, sendo necessária para controlar a quantidade de DHEA disponível para a síntese de andrógenos (Bacila; Elder; Krone, 2019). A outra porção de DHEA é catalisado através da ação da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD) em androstenediona que então é transformada pela enzima aromatase (CYP19A1) em estrona ou pela 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD) em testosterona e posteriormente pela P450aro em estradiol (Reisch *et al.*, 2019).

Em humanos os níveis de DHEA e o DHEA-S no sangue são altos ao nascimento e atingem seu pico entre os 20-30 anos (Rutkowski *et al.*, 2014). A partir dessa idade, a produção desses hormônios cai progressivamente, até que a concentração diminua cerca de 80% em idosos entre 70 e 80 anos (RUTKOWSKI *et al.*, 2014). Baixas concentrações de DHEA-S já foram relacionadas com diferentes condições que afetam sobretudo a população idosa, como por exemplo em homens idosos institucionalizados com dependência funcional grave ou doença de Alzheimer (Rudman; Mattson, 1990). Os níveis séricos de DHEA em idosos também estão associados com a porcentagem de gordura corporal, massa adiposa total, porcentagem massa corporal magra e aptidão física (Abbasi *et al.*, 1998). Ademais, estudos demonstram que os níveis de DHEA são inversamente associados ao colesterol, obesidade e diabetes, doenças intimamente ligadas ao risco de doença cardíaca coronária (Wu *et al.*, 2019). Atualmente este hormônio é utilizado para reposição hormonal em consequência da sua função como precursor de esteroides estrógenos e andrógenos (Leowattana, 2004). O DHEA é ainda, vulgarmente conhecido como “super-hormônio” e “hormônio da juventude ” pois médicos e farmacêuticos dos anos 80 vincularam sua relação com alterações fisiológicas relacionadas com a idade, como a imunossenescência e a longevidade (Rutkowski *et al.*, 2014). A diminuição dos níveis de DHEA e DHEA-S é o fator típico do envelhecimento das glândulas adrenais. Este fato ocorre devido ao córtex das glândulas adrenais sofrer alterações morfológicas em decorrência do envelhecimento,

fenômeno conhecido como adrenopausa. A massa e a espessura total do córtex diminuem e a zona reticulada se torna mais delgada (Papierska, 2017). A atividade do citocromo b5 diminui, assim como a função da enzima CYP17A1 (Dharia *et al.*, 2005). Na figura 1 observa-se a via de esteroidogênese das glândulas adrenais em humanos.

Estudos demonstram que apenas primatas produzem uma grande quantidade de DHEA (Gao *et al.*, 2021). Roedores e mais especificamente os camundongos não apresentam a zona reticulada assim como não possuem expressão de CYP17A1 e por isso produzem pregnenolona no lugar do DHEA (Keeney; Jenkins; Waterman, 1995). O gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) foi o modelo animal utilizado para este estudo. Esta espécie de roedor é encontrada na Rússia, China e Mongólia e vem sendo cada vez mais utilizado para estudos em glândulas endócrinas, fisiológicos, de carcinogênese e de reprodução (Ruiz *et al.*, 2023). As glândulas adrenais desse animal é muito semelhante à dos seres humanos. O córtex também é dividido e as zonas glomerulosa, fasciculada e reticulada são bem evidenciadas. No entanto, nos gerbilos a zona reticulada é a maior porção do córtex, enquanto a zona glomerulosa é a mais delgada (Ruiz *et al.*, 2023). O DHEA, testosterona, progesterona e androstenediona são os principais hormônios secretados pelo córtex, e a quantidade de CYP17A1 é significativa (Ruiz *et al.*, 2023).

Figura 2: Via da esteroidogênese das Glândulas Adrenais em Humanos . Os principais produtos esteroides secretados pelo córtex adrenal, mineralocorticoides, glicocorticoides e andrógenos adrenais são sintetizados em etapas sequenciais por um conjunto de enzimas.



Fonte: Yates, R. et., 2013

1.3 Envelhecimento e Senescência Celular

Durante a senescência, o envelhecimento celular é observado por características celulares que marcam esse processo, como o acúmulo de grânulos de lipofuscina (Ilie *et al.*, 2020). O termo lipofuscina é empregado a inclusões eletrodensas de coloração marrom-amarelada presentes em diferentes tipos de células pós-mitóticas e que se acumulam principalmente em decorrência do envelhecimento, por isso é conhecida como o “pigmento do desgaste” (Terman; Brunk, 1998). Nos diferentes tipos celulares, os grânulos de lipofuscina são compostos por uma porção proteica com composição variável de aminoácidos e uma lipídica formada principalmente por triglicerídeos, colesterol, ácidos graxos livres e fosfolipídios (Terman; Brunk, 2004). A autofluorescência é uma propriedade marcante da lipofuscina, porém a natureza dos fluoróforos ainda não está esclarecida (Terman; Brunk, 2004). Ademais, uma pequena parte desse material apresenta os metais Fe, Cu, Al, Zn, Ca e Mn, e é circundado por uma membrana lisossômica de três camadas (Terman; Brunk, 1998). Os organismos biológicos constantemente reciclam os componentes celulares e a via lisossomal é a principal forma de autofagia (Ilie *et al.*, 2020). Porém com o envelhecimento, biomoléculas e organelas defeituosas deixam de ser degradadas pelos lisossomos de modo eficiente. O principal motivo é o acúmulo

de inclusões chamadas de “lixo biológico”, como é o caso da lipofuscina (Kurz; Terman; Brunk, 2007). Os lisossomos não conseguem degradar a lipofuscina devido à sua composição que se assemelha a do plástico; em decorrência disso a autofagia celular de outras estruturas celulares é prejudicada e a maquinaria celular passa a funcionar de maneira defeituosa (Kurz; Terman; Brunk, 2007). Portanto, a lipofuscina é um importante marcador do envelhecimento celular.

O envelhecimento feminino em específico está diretamente relacionado com o DHEA. Isto deve-se ao fato de que após a menopausa a função folicular ovariana diminui drasticamente (Zhu *et al.*, 2021). O DHEA adrenal e o DHEA-S se tornam os principais precursores dos hormônios estrógenos e andrógenos que são produzidos localmente nos tecidos periféricos (Zhu *et al.*, 2021). Por isso, a suplementação de DHEA para mulheres é vista como uma estratégia fisiológica para as consequências da deficiência hormonal causada pela menopausa, os tratamentos são propostos para melhora do bem-estar, disfunção sexual e sintomas vasomotores (Davis; Panjari; Stanczyk, 2011). Apesar disso, estudos sobre os efeitos do DHEA exógeno ainda demonstram resultados incertos, possivelmente porque não foi descoberto um receptor próprio para ele, mas sabe-se que o DHEA se liga aos receptores de estrógeno (ER α e ER β) e de andrógeno (AR) (Widstrom; Dillon, 2004).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do projeto foi avaliar o efeito da suplementação com DHEA-S nas glândulas adrenais do gerbilo *Meriones unguiculatus* em fêmeas senis.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Verificar se o DHEA-S alterou a morfologia das glândulas adrenais durante o processo de envelhecimento;
- II. Analisar a proliferação celular, a expressão das enzimas 17- β -HSD3, 3- β -HSD3 e dos receptores AR, ER α e ER β ;
- III. Analisar a morfometria das diferentes zonas que compõem as glândulas adrenais sob influência do DHEA-S;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental e Cuidado Animal

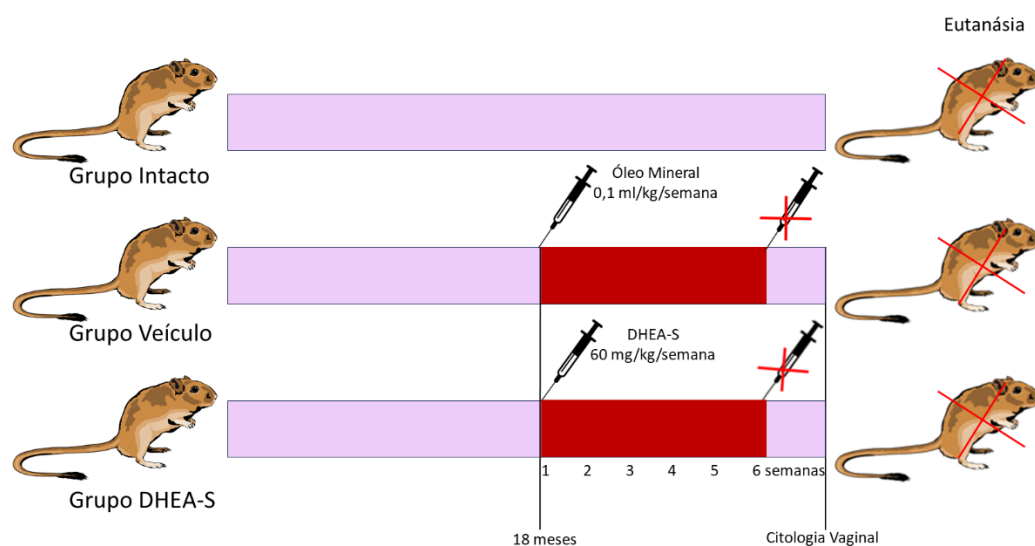
No projeto em questão foram usadas fêmeas nulíparas de gerbilo divididas em 3 grupos (N=15) (CEUA nº 229/2021 - IBILCE/UNESP). Os animais foram mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP – *campus* de São José do Rio Preto. As fêmeas permaneceram em isoladores de polisulfona, livres de BPA (Bisfenol A) fabricadas pela empresa Alesco®, em estantes equipadas com exaustão de ar a uma temperatura de 22 +/- 2°C, com ração e água *ad libitum*. Os procedimentos foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA, Brasil) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais local (CEUA, IBILCE, UNESP), sob número 229/2021. Os 3 grupos foram delimitados da seguinte forma: grupo DHEA-S: 60 mg/kg de DHEA-S (Wang *et al.*, 2018); grupo veículo: 0,1 ml de óleo mineral; grupo controle intacto.

A administração do tratamento foi iniciada no 18º mês pois nessa idade o gerbilo já é considerado um animal velho (Sohal; Agarwal; Sohal, 1995). O tratamento se deu com dosagem de 60mg/kg de DHEA-S diluído em 0,1 ml de óleo mineral via aplicação subcutânea no grupo DHEA-S (n=5), assim como as aplicações de 0,1 ml de óleo mineral no grupo Veículo (n=5). As aplicações aconteceram uma vez por semana em um período de 5 semanas. Passados sete dias da última aplicação, as fêmeas foram submetidas à citologia vaginal para a identificação da fase do ciclo estral. Os animais foram eutanasiados em estro, com o intuito de conter as alterações morfológicas ocasionadas pelas fases do ciclo. Caso a fêmea não estivesse nessa fase, foi reavaliada diariamente e eutanasiada assim que estivessem no estro.

3.2 Processamento do Material Histológico

Previamente a eutanásia, os animais foram pesados e anestesiados por meio de isoflurano diluídos em 3% de oxigênio. Os animais foram decapitados em guilhotina. Em seguida, foram retiradas as glândulas adrenais, imediatamente pesadas e depositados em uma solução de fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M. Os órgãos permaneceram no fixador por 24 horas.

Figura 3: Representação esquemática dos grupos experimentais. A semana 1 representa o início da exposição ao DHEA-S (Grupo DHEA-S) e ao óleo mineral (Grupo Veículo) em fêmeas nulíparas senis. A última aplicação ocorreu na semana 5 e ao fim da semana 6 foi realizada a citologia vaginal.



Fonte: autor

3.3 Análises Morfológicas e Morfométricas

Para as técnicas de coloração os blocos foram seccionados no micrótomo manualmente a 5µm de espessura, para a obtenção dos cortes histológicos. Em seguida, os cortes foram colocados em lâminas. Os cortes histológicos passaram pela desparafinização através de três banhos de xilol, posteriormente submetidos a banhos de álcool em concentrações decrescentes e finalmente colocados em água destilada para hidratação. Após esse processo, cada coloração foi realizada de acordo com o seu protocolo específico e então os cortes foram desidratados por meio de banhos de álcool e xilol e as lâminas montadas com a adesão de uma lamínula mediante a utilização do bálsamo do Canadá. Os cortes foram corados com: hematoxilina-eosina (HE) para a avaliação da morfologia geral do tecido e tricrômico de Gömöri-Halmi para identificar e analisar o acúmulo de grânulos de lipofusina, que estão relacionados com o processo de peroxidação lipídica e indicam senescência celular.

Para as análises morfométricas foram utilizadas as lâminas coradas pela HE, através de imagens capturadas em fotomicroscópio Olympus BX60 com software Image-Pro-Plus ©Média Cybernetics. Foi medido a área celular de células por zona das glândulas adrenais, para a identificação de possíveis alterações na morfologia celular. Posteriormente foi medida a espessura das três zonas dos córtex separadamente, para analisar se houve atrofia ou outras alterações morfológicas no tamanho das zonas. As análises foram feitas através do QuPath versão 0.4.3.

Para a quantificação dos grânulos de lipofuscina foram capturados 15 campos aleatórios de cada zona do córtex adrenal separadamente e a porcentagem de área com grânulos de lipofuscina foi dada por meio da densidade de cor utilizando o “limite global” da ferramenta ImageJ versão 1.8.0. Os dados obtidos foram utilizados para avaliar se houve acúmulo de grânulos de lipofuscina no córtex adrenal.

3.4 Análises Imunoistoquímicas

Os procedimentos de imunoistoquímica passaram pelas seguintes etapas: desparafinização e reidratação dos cortes respectivamente em banhos em xilol, álcool e água; recuperação antigênica; bloqueio das peroxidases endógenas, inibição das proteínas inespecíficas; incubação do anticorpo primário overnight. Em seguida, foi realizada a incubação do anticorpo secundário, revelação das ligações com diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) ou com fosfatase alcalina e contracoloração com hematoxilina.

Para o AR, ER α e o ER β após a reidratação os cortes sofreram recuperação antigênica a 98°C por 45 minutos intercalado por bloqueios de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% de H₂O₂ em temperatura ambiente (2 x 20 minutos), seguido de bloqueio de proteínas inespecíficas com leite desnatado 5% em PBSnp40 por 1 hora. Os cortes então foram incubados *overnight* com o anticorpo primário a 4°C (tabela 1). Após a lavagem dos cortes foi aplicado um kit polímero por 1 hora em temperatura ambiente seguindo as instruções do fabricante. A coloração positiva foi revelada usando o diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) (Novocastra, RE7164, Leica Biosystems) e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer. Para PHH3 foi realizado protocolo semelhante ao descrito anteriormente, porém os cortes passaram por recuperação antigênica a 98°C durante 30 minutos. E para a quantificação das enzimas 3 β -HSD e 17 β -HSD, após a reidratação os cortes foram submetidos a recuperação antigênica a 98°C por 1 hora seguida de um bloqueio de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% de H₂O₂ em temperatura ambiente. E então o bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com leite desnatado 5% em TBSt por 1 hora. Após essa etapa os cortes então foram incubados *overnight* com o anticorpo primário a 4°C (tabela 1). Depois de lavados, os cortes foram incubados com um kit polímero a 37°C por 1 hora, seguindo as instruções do fabricante. A coloração positiva foi detectada através da fosfatase alcalina (Vulcan

Fast Red Chromogen Kit 2, REFFR8055, Biocare Medical) e a contracoloração foi feita por meio da hematoxilina de Mayer.

Para a quantificação das células positivas para os receptores e enzimas esteroidogênicas e imunomarcadores descritos, foi utilizado o software automático QuPath versão 0.4.3. A frequência relativa das células imunorreativas foi definida pela porcentagem de células imunopositivas em cada zona do córtex.

Tabela 1: Protocolo e anticorpos primários utilizados na imunoistoquímica.

	Recuperação de Antígeno	Tampão de Lavagem	Referências do anticorpo primário	Diluição do anticorpo primário
AR	Tampão citrato pH: 6	PBSnp40 pH: 7,4	Anti-AR policlonal de coelho, IgG, sc-816, Santa Cruz Biotechnology	1:50 em BSA 1%
ERα	Tampão citrato pH: 6	PBSnp40 pH: 7,4	Anti-ER α monoclonal de rato, IgG _{2a} , sc-8005, Santa Cruz Biotechnology	1:50 em BSA 1%
ERβ	Tampão citrato pH: 6	PBSnp40 pH: 7,4	Anti-ER β monoclonal de rato, IgG _{2a} , sc-53494, Santa Cruz Biotechnology	1:50 em BSA 1%
PHH3	Tampão citrato pH: 6	PBS pH: 7,4	Anti-Fosfohistona H3 policlonal de rato, Ser10, 9701, Cell Signaling	1:100 em BSA 1%
3β-HSD	Tampão Tris-EDTA pH: 9	TBSt pH: 7,6	Anti-3 β -HSD policlonal de coelho, Cat. No.E-AB-15114, Elabscience	1:50 em TBS
17β-HSD	Tampão Tris-EDTA pH: 9	TBSt pH: 7,6	Anti-17 β -HSD (M-174), monoclonal de coelho, sc-32872, Santa Cruz Biotechnology	1:50 em TBS

Fonte: Autor

3.5 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e então comparados por ANOVA (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$ através do software Graph Prism 6.

4. RESULTADOS

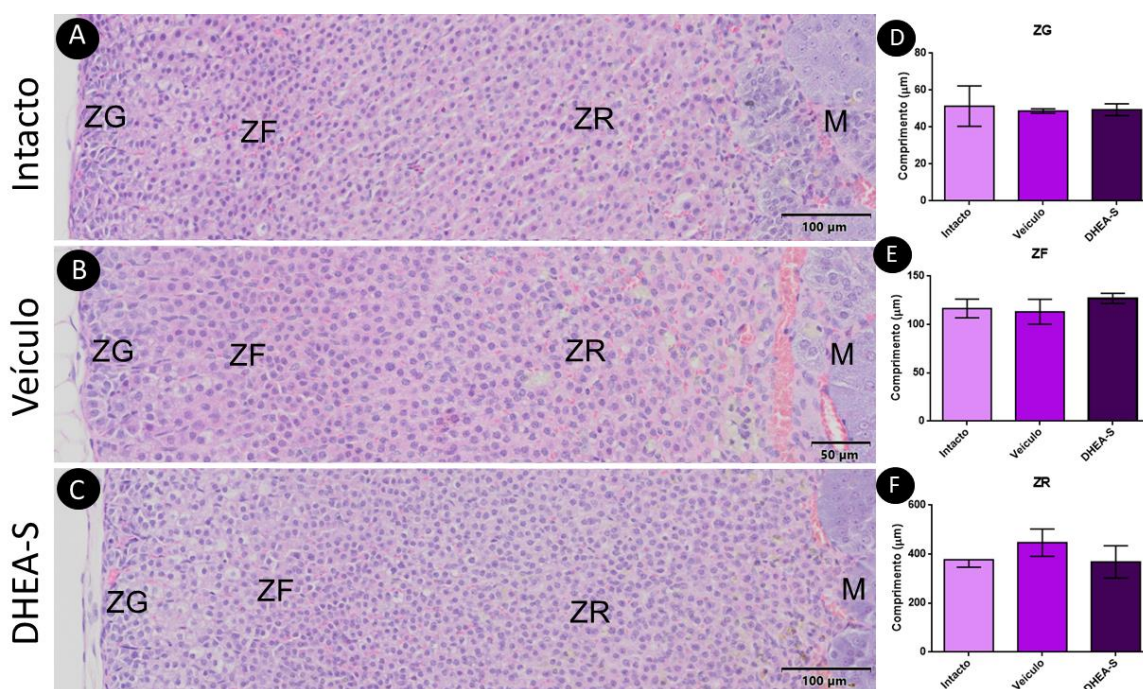
4.1 Dados Biométricos e Morfométricos

O peso corporal, e o peso absoluto e o peso relativo das glândulas adrenais foram avaliados, porém nenhum desses dados apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (Tabela 2). Não houve diferenças estatísticas significativas nas espessuras das zonas do córtex adrenal, o mesmo ocorreu com a área celular das células por zona entre os grupos. (Figura 3).

Tabela 2: Dados biométricos dos grupos experimentais. Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Dados Biométricos	Intacto	Veículo	DHEA-S
Peso Corporal (g)	74,00 $\pm$ 10,43	75,00 $\pm$ 7,12	75,67 $\pm$ 8,8
Peso Absoluto das Glândulas Adrenais (g)	0,031 $\pm$ 0,009	0,027 $\pm$ 0,006	0,029 $\pm$ 0,008
Peso Relativo das Glândulas Adrenais (g)	0,038 $\pm$ 0,01	0,036 $\pm$ 0,008	0,037 $\pm$ 0,006

Figura 4: Zonas do Córtex das Glândulas Adrenais coradas por hematoxilina-eosina. A-C: Imagens representativas da coloração de HE nos Grupos Intacto, Veículo e DHEA-S. **D-F:** quantificação do comprimento de cada uma das zonas corticais. **ZG:** zona glomerulosa; **ZF:** zona fasciculada; **ZR:** zona reticulada; **M:** Medula. Os dados estão apresentados em erro padrão da média.



4.2 Expressão de Receptores

Foi realizada quantificação da expressão nuclear de receptores de andrógeno (AR) e estrogênio (ER α e ER β) na região cortical. O AR foi expresso nas três zonas em todos os grupos experimentais (Figura 4). Na zona fasciculada a expressão de AR foi maior no grupo intacto (Figura 4 A) quando comparado ao grupo veículo (Figura 4 B). O grupo DHEA-S (Figura 4 C) não apresentou diferenças estatísticas. Os gráficos demonstram as diferenças significativas entre os grupos (Figuras 4 D-E) assim como as imunomarcações positivas também estão sendo representadas (Figuras 4 G-I). A expressão do ER α (Figura 5) na zona glomerulosa é maior nos grupos intacto (Figura 5 A) e veículo (Figura 5 B) quando comparada ao grupo DHEA-S (Figura 5 C), sendo essa diferença estatisticamente significativa (Figura 5 D). Na zona fasciculada não foi constatada diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 5 E). A expressão desse receptor também diminuiu na zona reticulada no grupo DHEA-S em referência ao Veículo (Figura 5 F), constatadas pelas imunomarcações positivas (Figuras G-I). O ER β (Figura 6) na zona glomerulosa foi mais expresso no grupo intacto (Figura 6 A) quando comparado ao grupo veículo (Figura 6 B). O mesmo ocorreu nessa zona entre o grupo DHEA-S (Figura 6 C) e o veículo, onde a expressão do receptor

estatisticamente maior no DHEA-S (Figura 6 D). Já na zona fasciculada a expressão de ER β foi menor no DHEA-S comparativamente ao intacto e veículo (Figura 6 E). Na zona reticulada também houve redução estatística de expressão de ER β no grupo DHEA-S com respeito ao grupo intacto (Figura 6 F), verificadas pela marcação nuclear (Figuras 6 G-I).

Figura 5: Expressão do receptor AR no córtex adrenal. A-C: imagens representativas de imunoistoquímica para expressão de AR nos grupos Intacto, Veículo e DHEA-S. D-F: quantificação da expressão do receptor nas zonas glomerulosa, fasciculada e reticulada. G: imagem representativa do grupo Intacto em maior aumento (objetiva de 40x). H: imagem representativa do grupo Veículo em maior aumento (objetiva de 40x). I: imagem representativa do grupo DHEA-S em maior aumento (objetiva de 40x). Os asteriscos correlacionam diferenças significativas entre os grupos (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001). ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculada; ZR: zona reticulada; M: Medula; seta: núcleo com imunomarcação para AR. Os dados estão apresentados em erro padrão da média.

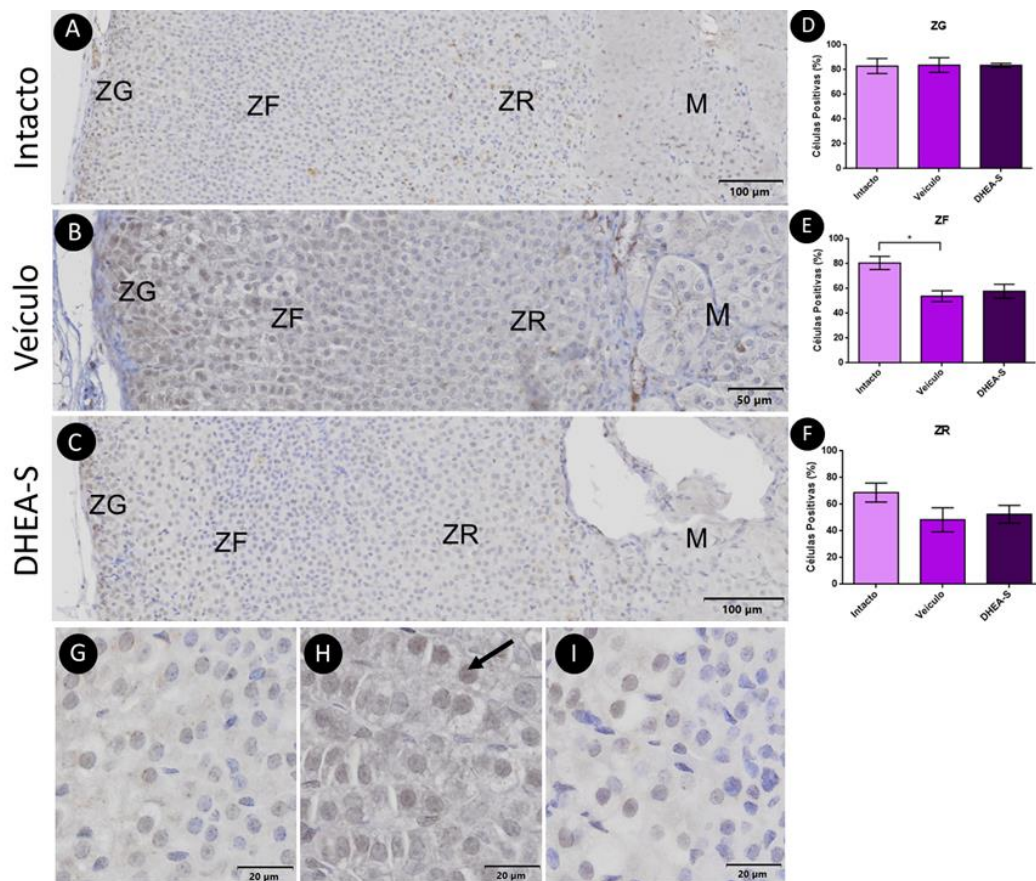


Figura 6: Expressão do receptor ER α no córtex adrenal. **A-C:** imagens representativas de imunoistoquímica para expressão de ER α nos grupos Intacto, Veículo e DHEA-S. **D-F:** quantificação da expressão do receptor nas zonas glomerulosa, fasciculada e reticulada. **G:** imagem representativa do grupo Intacto em maior aumento (objetiva de 40x). **H:** imagem representativa do grupo Veículo em maior aumento (objetiva de 40x). **I:** imagem representativa do grupo DHEA-S em maior aumento (objetiva de 40x). Os asteriscos correlacionam diferenças significativas entre os grupos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). **ZG:** zona glomerulosa; **ZF:** zona fasciculada; **ZR:** zona reticulada; **M:** Medula; **seta:** núcleo com imunomarcação para ER α . Os dados estão apresentados em erro padrão da média.

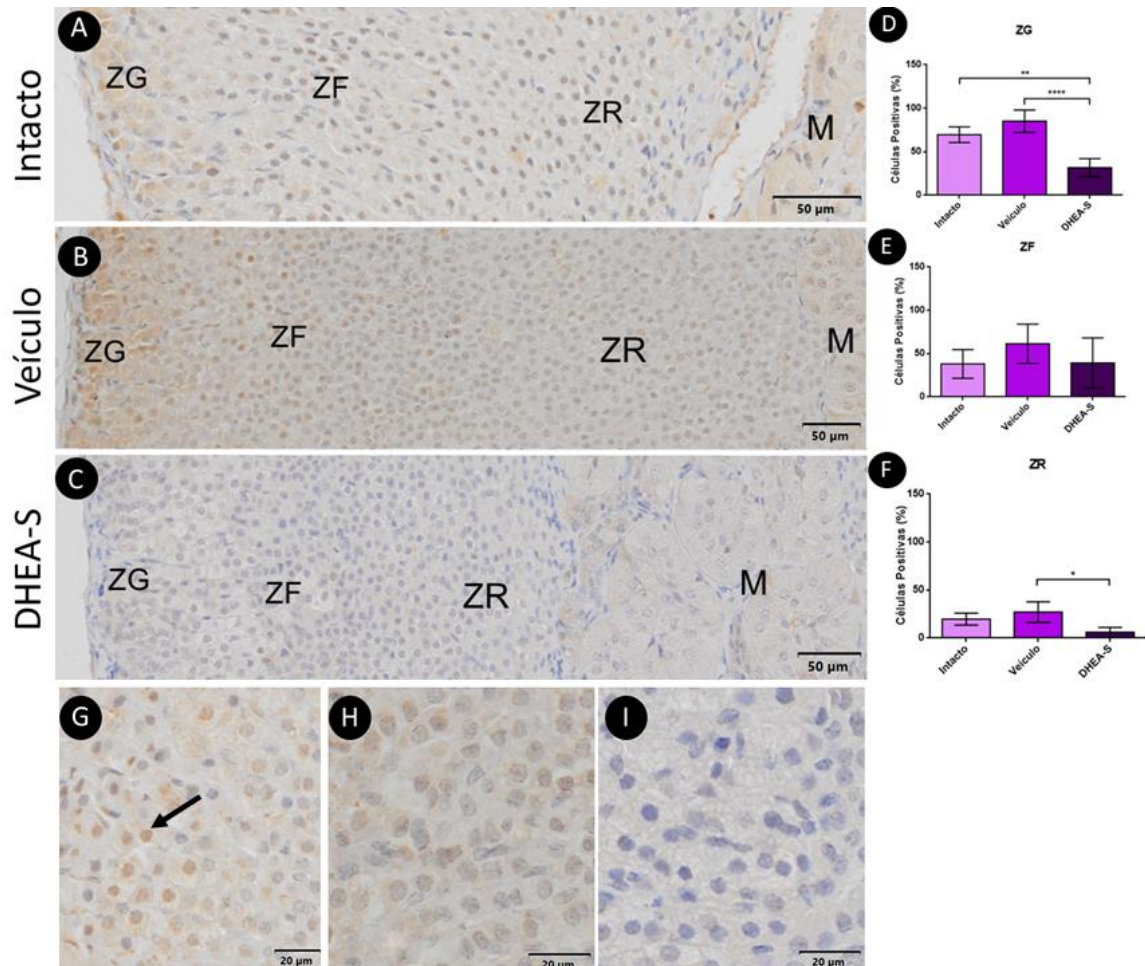
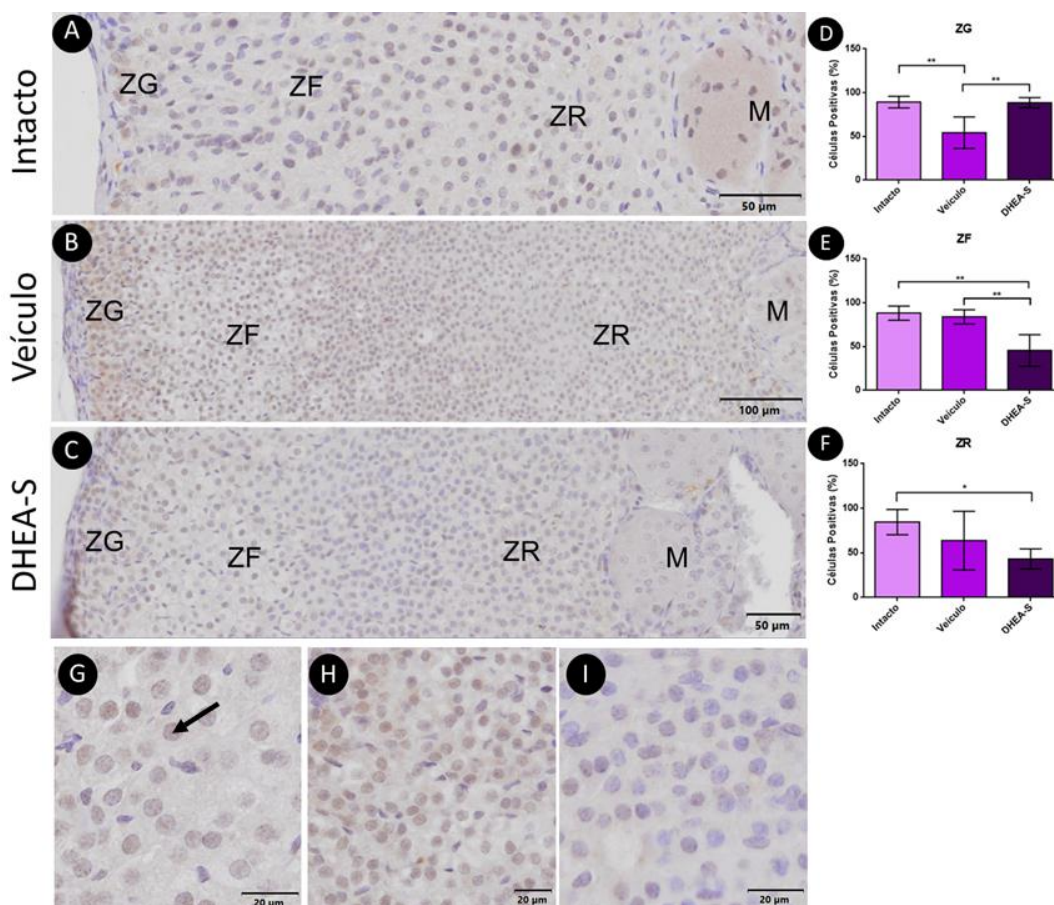


Figura 7: Expressão do receptor ER β no córtex adrenal. A-C: imagens representativas de imunoistoquímica para expressão de ER α nos grupos Intacto, Veículo e DHEA-S. D-F: quantificação da expressão do receptor nas zonas glomerulosa, fasciculada e reticulada. G: imagem representativa do grupo Intacto em maior aumento (objetiva de 40x). H: imagem representativa do grupo Veículo em maior aumento (objetiva de 40x). I: imagem representativa do grupo DHEA-S em maior aumento (objetiva de 40x). Os asteriscos correlacionam diferenças significativas entre os grupos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculada; ZR: zona reticulada; M: Medula; seta: núcleo com imunomarcação para ER β . Os dados estão apresentados em erro padrão da média.



4.3 Expressão de enzimas da esteroidogênese

A expressão das enzimas foi analisada com a finalidade de correlacionar sua modulação com a expressão de receptores. Na expressão da enzima 3 β -HSD (Figura 7) as zonas corticais não apresentaram diferença estatística significativa na expressão de 3 β -HSD entre os grupos intacto (Figura 7 A) veículo (Figura 7 B) e DHEA-S (7 C). No que se refere ao local onde as enzimas foram expressas, a 3 β -HSD teve predominância na zona glomerulosa (Figura 7 D) e na zona fasciculada (Figura 7 E) ao passo que ocorreu de modo menor intenso na zona reticulada (Figura 7 F) as imunomarcações positivas nos três grupos estão representadas (Figuras 7 G-I). O mesmo ocorreu com a enzima 17 β -HSD (Figura 8), sendo expressa de modo mais intenso nas zonas glomerulosa e fasciculada. Não houveram diferenças significativas

na expressão dessa enzima entre os grupos intacto (Figura 8 A), veículo (Figura 8 B) e DHEA-S (Figura 8 C) na zona glomerulosa (Figura 8 D). Por outro lado, ocorreu uma diminuição na expressão de 17β -HSD na zona fasciculada (Figura 8 E) do grupo DHEA-S em comparação ao Intacto. O mesmo aconteceu na zona reticulada, onde houve uma redução na expressão de 17β -HSD no grupo DHEA-S relativamente ao grupo Veículo (Figura 8 F). As imunomarcações positivas para 17β -HSD podem ser vistas nas figuras abaixo (Figuras 8 G-I).

Figura 8: Expressão da enzima 3β -HSD no córtex adrenal. A-C: imagens representativas de imunoistoquímica para expressão de 3β -HSD nos grupos Intacto, Veículo e DHEA-S. D-F: quantificação da expressão da enzima nas zonas corticais). G: imagem representativa do grupo Intacto em maior aumento (objetiva de 40x). H: imagem representativa do grupo Veículo em maior aumento (objetiva de 40x). I: imagem representativa do grupo DHEA-S em maior aumento (objetiva de 40x). ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculada; ZR: zona reticulada; M: Medula; seta: citoplasma com imunomarcação para 3β -HSD. Os dados estão apresentados em erro padrão da média.

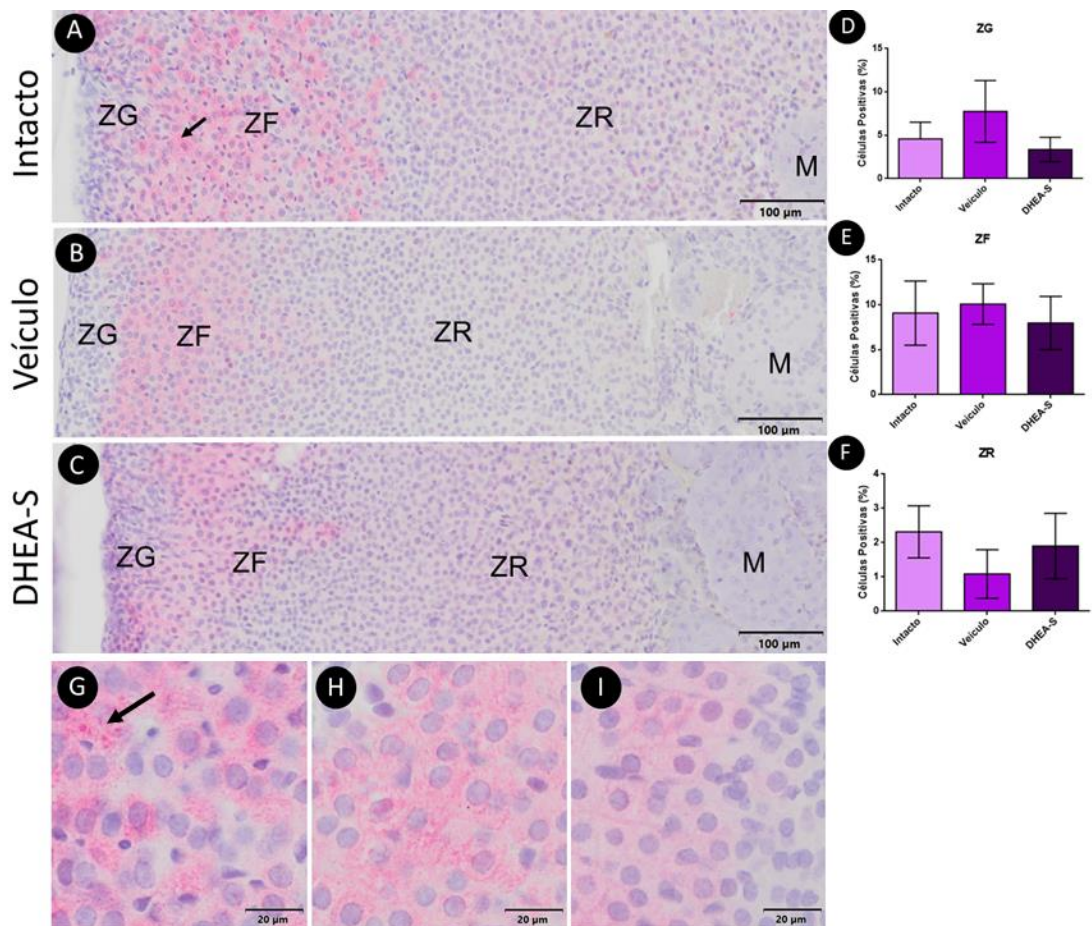
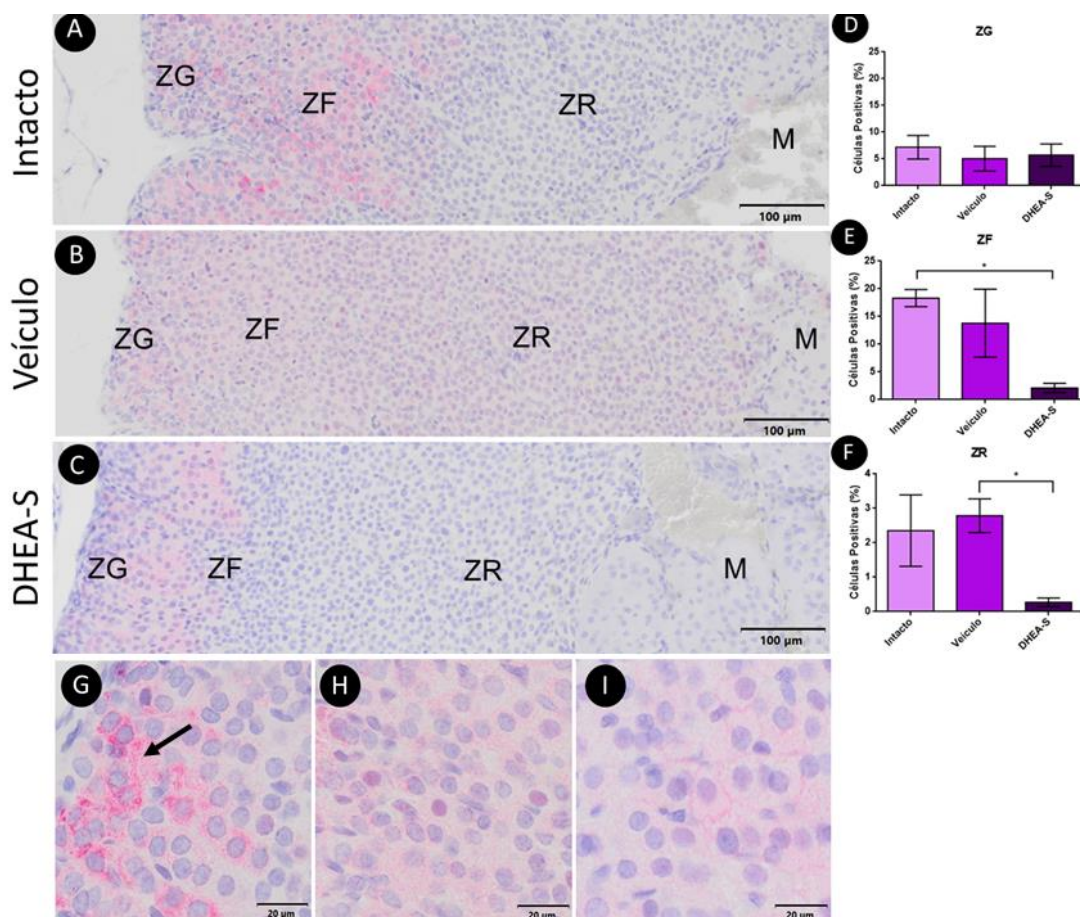


Figura 9: Expressão da enzima 17 β -HSD no córtex adrenal. A-C: imagens representativas de imunistoquímica para expressão de 17 β -HSD nos grupos Intacto, Veículo e DHEA-S. D-F: quantificação da expressão da enzima nas zonas corticais). G: imagem representativa do grupo Intacto em maior aumento (objetiva de 40x). H: imagem representativa do grupo Veículo em maior aumento (objetiva de 40x). I: imagem representativa do grupo DHEA-S em maior aumento (objetiva de 40x). Os asteriscos correlacionam diferenças significativas entre os grupos (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001). ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculada; ZR: zona reticulada; M: Medula; seta: imunomarcação citoplasmática para 17 β -HSD. Os dados estão apresentados em erro padrão da média.

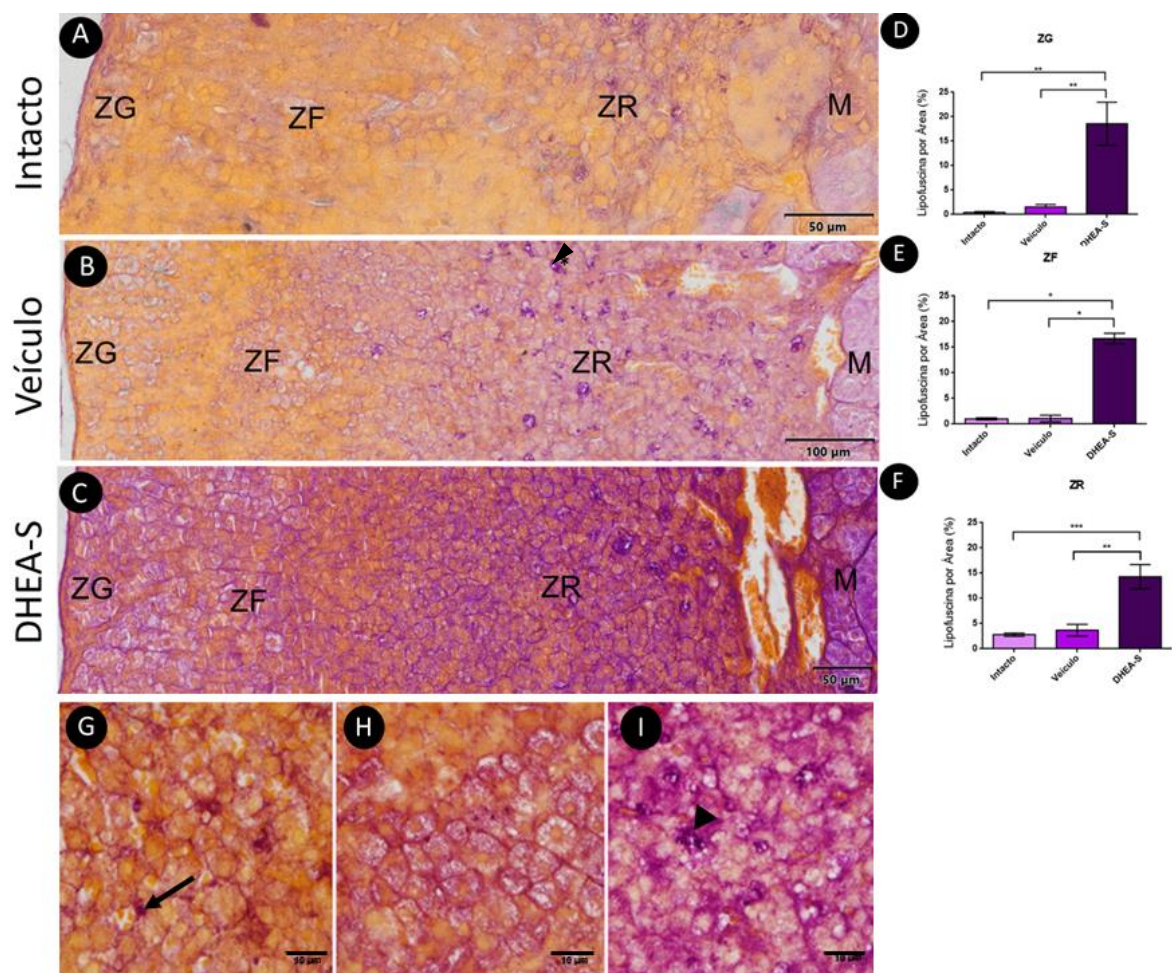


4.4 Senescência Celular

Foi realizada a coloração de tricrômio Gömori-Halmi afim verificar a presença de grânulos de lipofuscina, como meio de investigar possíveis interferências do DHEA-S no envelhecimento celular. Apesar da frequência de lipofuscina estar mais associada a zona reticulada do que às outras zonas corticais os grânulos desse pigmento foram detectados por toda a região cortical (Figura 9). Em contraposição aos grupos intacto (Figura 9 A) e veículo (Figura 9 B) houve um aumento expressivo na quantidade de grânulos de lipofuscina no grupo DHEA-S (Figura 9 C) na zona glomerulosa (Figura 9 D). O mesmo aconteceu na zona fasciculada, onde a quantidade de grânulos foi aumentada no grupo DHEA-S em relação ao intacto e ao

veículo (Figura 9 E). E o acúmulo de grânulos de lipofuscina foi ainda maior na zona reticulada do DHEA-S quando comparado aos outros grupos experimentais (Figura 9 F). Apesar de apresentar uma maior frequência no grupo DHEA-S os grânulos também são observados nos outros dois grupos experimentais (Figuras 9 G-I).

Figura 10: Marcação dos grânulos de lipofuscina no córtex adrenal através do tricrômico de Gömori-Halmi. A-C: imagens representativas de Gömori-Halmi para lipofuscina nos grupos Intacto, Veículo e DHEA-S. **D-F:** quantificação dos grânulos de lipofuscina nas zonas corticais. **G:** imagem representativa do grupo Intacto em maior aumento (objetiva de 100x em imersão de óleo). **H:** imagem representativa do grupo Veículo em maior aumento (objetiva de 100x em imersão óleo). **I:** imagem representativa do grupo DHEA-S em maior aumento (objetiva de 100x em imersão óleo). Os asteriscos correlacionam diferenças significativas entre os grupos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). **ZG:** zona glomerulosa; **ZF:** zona fasciculada; **ZR:** zona reticulada; **M:** Medula; **seta:** grânulo de lipofuscina. **ponta de seta:** célula morta. Os dados estão apresentados em erro padrão da média.

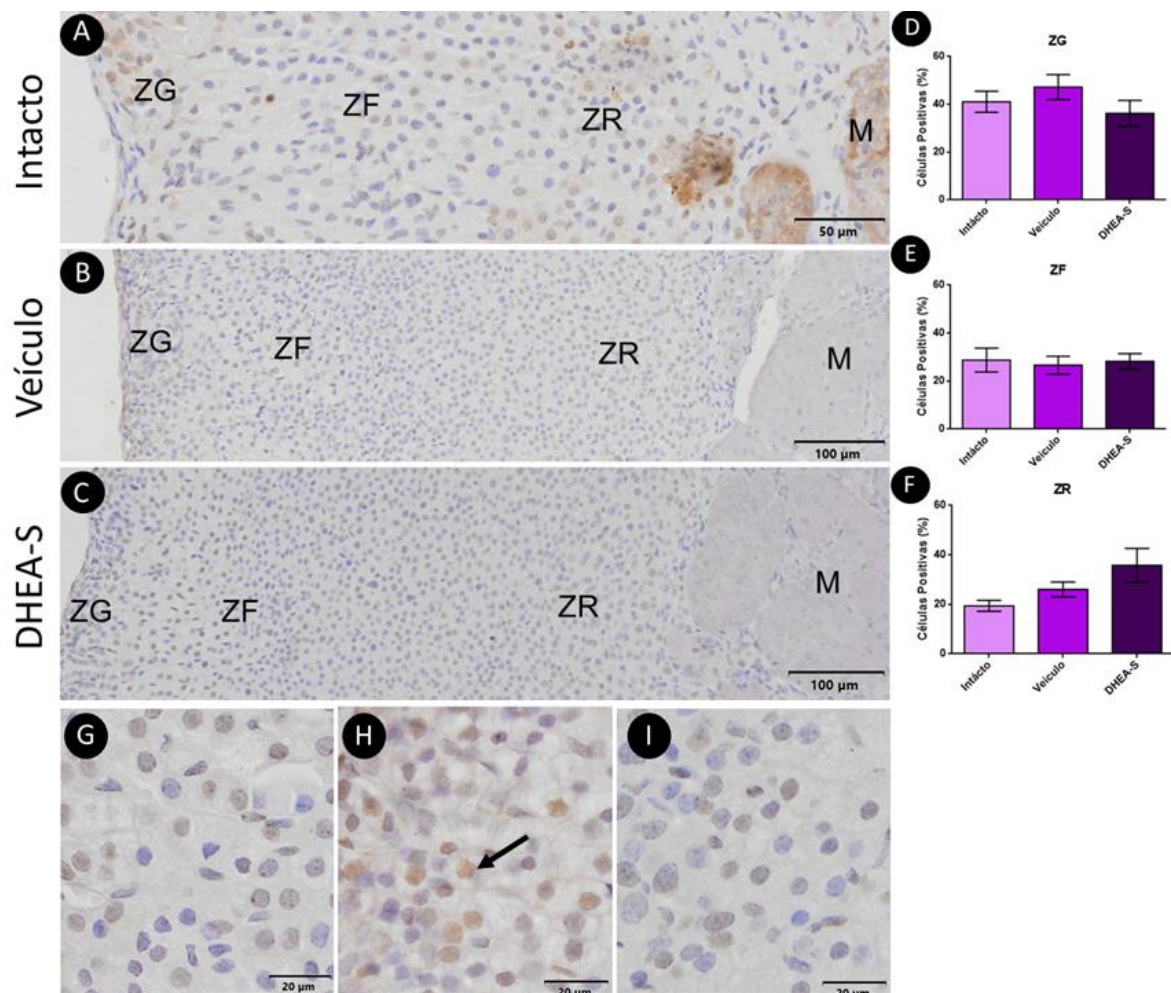


4.5 Proliferação Celular

Após constatada a interferência do DHEA-S no acúmulo de grânulos de lipofuscina foi realizada a análise de células positivas para PHH3 (Figura 10) com o intuito de correlacionar a administração de DHEA-S com possíveis alterações na

proliferação celular. Entretanto, os grupos intacto (Figura 10 A), veículo (Figura 10 B) e DHEA-S (Figura 10 C) não apresentaram diferenças estatísticas significativas na proliferação das células do nas zonas glomerulosa (Figura 10 D), fasciculada (Figura 10 E) e reticulada (Figura 10 F). As marcações positivas são observadas nas figuras abaixo (Figuras 10 G-I).

Figura 11: Imunomarcação de PHH3 para proliferação celular no córtex adrenal. A-C: imagens representativas de imunistoquímica para PHH3 nos grupos Intacto, Veículo e DHEA-S. D-F: quantificação de imunomarcação positiva para PHH3 nas zonas glomerulosa, fasciculada e reticulada. G: imagem representativa do grupo Intacto em maior aumento (objetiva de 40x). H: imagem representativa do grupo Veículo em maior aumento (objetiva de 40x). I: imagem representativa do grupo DHEA-S em maior aumento (objetiva de 40x). ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculada; ZR: zona reticulada; M: Medula; seta: imunomarcação nuclear para PHH3. Os dados estão apresentados em erro padrão da média.



5 DISCUSSÃO

O presente estudo apontou os efeitos do uso do DHEA-S e suas consequências nas glândulas adrenais durante o envelhecimento feminino. Em relação às características estruturais do tecido, as lâminas coradas pela

hematoxilina-eosina foram fundamentais para a análise da arquitetura e das características normais do tecido. (Chen *et al.*, 2017). Histologicamente substâncias químicas lesivas às glândulas adrenais sucedem em atrofia ou aumento crônico das zonas corticais (Lorenzo; Di *et al.*, 2020). Nesta pesquisa não foram observadas diferenças significativas na espessura das zonas do córtex adrenal entre os grupos experimentais. Assim, o DHEA-S não teve influência sobre a morfometria destas glândulas, porém alterações em relação à expressão de receptores e enzimas esteroidogênicas foram significativas.

Em relação aos receptores de andrógeno e estrogênio no córtex adrenal, a imunoexpressão de AR apresentou alteração significativa na zona fasciculada, diminuindo no grupo Veículo em relação ao grupo Intacto. GUERRA *et al.*, (2019) demonstrou que a expressão de AR em grupo tratado com óleo mineral na próstata de machos de gerbilo foi aumentada, em oposição ao resultado da nossa pesquisa. Em estudos realizados em glândulas adrenais de camundongos *knockout* para receptor de andrógeno (AR) (ARKO) machos, a ausência de expressão de AR resultou no aumento da produção de glicocorticoides na zona fasciculada (Miyamoto *et al.*, 2007). Já em camundongos ARKO fêmeas são relatados principalmente problemas relacionados aos ovários, onde níveis insuficientes da expressão de AR estão ligados a infertilidade feminina (HU *et al.*, 2004).

No que diz respeito ao receptor ER α , a suplementação de DHEA-S diminuiu sua expressão nas zonas glomerulosa e reticulada em relação ao grupo Veículo. Do mesmo modo, ER β houve uma redução em sua expressão no grupo experimental tratado com DHEA-S em contraposição ao Veículo nas zonas fasciculada e reticulada. Sabe-se que a ativação do receptor ER, principalmente de ER α , ocorre através de vias de sinalização MAPK/ERK ou AKT, (Clarke *et al.*, 2014). E uma dessas vias é ativada por receptor acoplado a proteína G na membrana plasmática (Levin, 2015). Como dito anteriormente, o DHEA-S não possui um receptor próprio, e a associação desse precursor esteroide ao receptor acoplado à proteína G é um de seus mecanismos de ativação de receptores de membrana (Widstrom; Dillon, 2004). Com a administração de DHEA-S, ele pode supostamente estar competindo com o estrogênio pelo sítio de ligação da Proteína G, interferindo na via de sinalização e consequentemente diminuindo a expressão dos receptores ER α e ER β .

Uma revisão feita por RUIZ *et al.*, (2023) demonstrou homologias na morfologia das glândulas adrenais de humanos e gerbilos. Nós constatamos que além de características morfológicas o córtex adrenal também possui enzimas esteroidogênicas em comum. Este fato deve-se a imunomarcagem positiva tanto da enzima 3β -HSD quanto da enzima 17β -HSD. O DHEA-S possivelmente não altera a expressão de 3β -HSD, já que os resultados da quantificação da expressão dessa enzima não apresentaram diferenças significativas. Por outro lado, o DHEA-S causou uma redução na expressão de 17β -HSD na zona fasciculada no grupo DHEA-S em comparação com o Intacto. O mesmo ocorreu com o grupo Intacto na zona reticulada, onde 17β -HSD foi estatisticamente menos expresso se comparado ao grupo Veículo. A principal função de 17β -HSD é converter androstenediona em testosterona (Yazawa *et al.*, 2020). Além disso, essa enzima também pode reduzir a potência dos esteroides diidrotestosterona, testosterona e 17β -estradiol por meio da oxidação do álcool C17, assim como ativa 5α -androstenediona, androstenediona e estrona ao reduzir a cetona C17 (Baker, 2001). Desse modo ela se mostra uma importante enzima nas regulações androgênica e estrogênica nos mamíferos e sua supressão pode levar a quadros de desregulações endócrinas. Por outro lado, estudos recentes indicam que a superexpressão de 17β -HSD está relacionada a endometriose em mulheres humanas (Xanthoulea *et al.*, 2021). A inibição desta enzima por meio de fármacos resultou na redução de lesões no endométrio de camundongos fêmeas com modelo de câncer humano (Xanthoulea *et al.*, 2021). Portanto a influência do DHEA-S na menor expressão de 17β -HSD pode gerar efeitos negativos ou positivos. No fígado a falta de 17β -HSD reduz a gliconeogênese hepática ocasionando em gordura no fígado humano (Wang; Peng, 2023). Por outro lado, na glândula mamária o aumento da expressão dessa enzima vem sendo relacionada com a presença de tumores malignos (Cornel *et al.*, 2012), nesse caso a diminuição na expressão de 17β -HSD ocasionada pelo DHEA-S atuaria positivamente.

Ainda, o DHEA-S parece ter aumentado o metabolismo celular o que acelerou o processo de senescência celular nas glândulas adrenais. Isso porque o acúmulo de lipofuscina é observado principalmente em células de tecidos com metabolismo altamente ativo (Song; Shim; Hwang, 2023). Ademais, a lipofuscina é considerada um marcador de dano oxidativo celular e do envelhecimento dos

tecidos (Song; Shim; Hwang, 2023). Evidências sugerem que o processo de envelhecimento está ligado a uma redução na capacidade antioxidante do corpo, e assim, com a peroxidação lipídica, que aumenta com a idade (Schuessel *et al.*, 2006). O DHEA foi relacionado com a diminuição da monoamina oxidase dos níveis de peroxidação lipídica e consequentemente com a menor acumulação de lipofuscina em certas regiões cerebrais de ratos (Kumar *et al.*, 2008). Ao contrário do que foi visto em nosso trabalho, onde a exposição ao DHEA-S resultou em um acúmulo desse pigmento. Mediante a isso, é razoável supor que nesse trabalho em questão, esse precursor esteroide aumentou o processo metabólico das células das diferentes zonas do córtex adrenal interferindo na senescência celular nas glândulas adrenais de gerbilos fêmeas em idade avançada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, concluímos que a exposição ao DHEA-S durante a senescência de gerbilos fêmeas não promoveu alterações estruturais no tecido das glândulas adrenais. O DHEA-S reduziu a expressão dos receptores ER α e ER β consequentemente reduzindo a ação de estrógenos no órgão. A esteroidogênese também foi alterada por meio da modulação da expressão de 17 β -HSD, diminuindo sua ação. Além disso, houve o acúmulo de grânulos de lipofuscina indicando o aumento metabólico celular e consequentemente no processo de senescência celular. Isso possivelmente indica que o DHEA-S interferiu no envelhecimento dos gerbilos fêmea e acelerou o processo de senescência celular. Outros estudos correlacionando o DHEA-S devem ser feitos a fim de esclarecer os processos decorrentes do seu uso nas glândulas adrenais, sobretudo em relação à senescência celular.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, A.; DUTHIE, E. H.; SHELD AHL, L.; WILSON, C.; SASSE, E.; RUDMAN, I.; MATTSON, D. E. Association of dehydroepiandrosterone sulfate, body composition, and physical fitness in independent community-dwelling older men and women. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 46, n. 3, p. 263–273, 1998. DOI: 10.1111/j.1532-5415.1998.tb01036.x. Disponível em: <https://agsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.15325415.1998.tb01036.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 06 de nov. de 2022.
- APEN, C. H. C. C. Adrenal Gland : Structure , Function , and Mechanisms of Toxicity. v. 29, n. 1, p. 41–48, 2016. DOI: 10.1080/019262301301418847. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1080/019262301301418847?url_ver=Z39.88-

2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 07 de fev. de 2023.

BACILA, I. A.; ELDER, C.; KRONE, N. Update on adrenal steroid hormone biosynthesis and clinical implications. **Archives of Disease in Childhood**, v. 104, n. 12, p. 1223–1228, 2019. DOI: 10.1136/archdischild-2017-313873. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31175123/>. Acesso em: 04 de ago. 2023.

BAKER, M. E. Evolution of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases and their role in androgen, estrogen and retinoid action. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 171, n. 1–2, p. 211–215, 2001. DOI: 10.1016/s0303-7207(00)00414-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11165032/>. Acesso em: 19 de jan. de 2023.

BERGER, I.; WERDERMANN, M.; BORNSTEIN, S. R.; STEENBLOCK, C. The adrenal gland in stress – Adaptation on a cellular level. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 190, n. March, p. 198–206, 2019. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.04.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30959152/>. Acesso em: 11 de out. de 2023.

CHEN, J. M.; LI, Y.; XU, J.; GONG, L.; WANG, L. W.; LIU, W. LOU; LIU, J. Computer-aided prognosis on breast cancer with hematoxylin and eosin histopathology images: A review. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, 2017. DOI: 10.1177/1010428317694550. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28347240/>. Acesso em: 05 de mai. de 2023.

CORNEL, K. M. C.; KRUITWAGEN, R. F. P. M.; DELVOUX, B.; VISCONTI, L.; VIJVER, K. K. VAN DE; DAY, J. M.; GORP, T. VAN; HERMANS, R. J. J.; DUNSELMAN, G. A.; ROMANO, A. Overexpression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 increases the exposure of endometrial cancer to 17 β -estradiol. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 4, p. 591–601, 2012. DOI: 10.1210/jc.2011-2994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22362820/>. Acesso em: 03 de fev. 2023

DAVIS, S. R.; PANJARI, M.; STANCZYK, F. Z. DHEA replacement for postmenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 6, p. 1642–1653, 2011. DOI: 10.1210/jc.2010-2888. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21411558/>. Acesso em: 19 de nov. de 2022.

DHARIA, S.; SLANE, A.; JIAN, M.; CONNER, M.; CONLEY, A. J.; BRISSIE, R. M.; PARKER, C. R. Effects of aging on cytochrome B5 expression in the human adrenal gland. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 7, p. 4357–4361, 2005. DOI: 10.1210/jc.2005-0017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15870126/>. Acesso em: 06 de dez. 2022.

DUMONTET, T.; MARTINEZ, A. Adrenal androgens, adrenarche, and zona reticularis: A human affair? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 528, n. March, p. 111239, 2021. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111239. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33676986/>. Acesso em: 11 de abr. de 2023.

EHRHART-BORNSTEIN, M.; BORNSTEIN, S. R. Cross-talk between adrenal medulla

and adrenal cortex in stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, p. 112–117, 2008. DOI: 10.1196/annals.1410.053. Acesso em: 26 de mai. de 2023.

GAO, X.; LI, F.; LIU, B.; WANG, YUXIONG; WANG, YISHU; ZHOU, H. Cellular senescence in adrenocortical biology and its disorders. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 1–26, 2021. DOI: 10.3390/cells10123474. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34943980/>. Acesso em: 23 de jul. de 2023.

GUERRA, L. H. A. *et al.* Do mineral and corn oil serve as potential endocrine disruptors in the gerbil prostate? **Reproductive Toxicology**, v. 90, p. 141–149, 1 dez. 2019. DOI: 10.1016/j.reprotox.2019.09.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623818306877>. Acesso em: 07 de nov. de 2023.

ILIE, O. D.; CIOBICA, A.; RIGA, S.; DHUNNA, N.; MCKENNA, J.; MAVROUDIS, I.; DOROFTEI, B.; CIOBANU, A. M.; RIGA, D. Mini-review on lipofuscin and aging: Focusing on the molecular interface, the biological recycling mechanism, oxidative stress, and the gut-brain axis functionality. **Medicina (Lithuania)**, v. 56, n. 11, p. 1–22, 2020. DOI: 10.3390/medicina56110626. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33228124/>. Acesso em: 02 de ago. de 2023.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

KATER, C. E.; GIORGI, R. B.; COSTA-BARBOSA, F. A. Classic and current concepts in adrenal steroidogenesis: a reappraisal. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 66, n. 1, p. 77–87, 2022. DOI: 10.20945/2359-3997000000438. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aem/a/g3bSdhVjMd84KXTcxcyNNDd/>. Acesso em: 15 de jul. de 2023.

KEENEY, D. S.; JENKINS, C. M.; WATERMAN, M. R. Developmentally regulated expression of adrenal 17 α -hydroxylase cytochrome p450 in the mouse embryo. **Endocrinology**, v. 136, n. 11, p. 4872–4879, 1995. DOI: 10.1210/endo.136.11.7588219. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7588219/>. Acesso em: 02 de ago. de 2023

KUMAR, P.; TAHA, A.; SHARMA, D.; KALE, R. K.; BAQUER, N. Z. Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on monoamine oxidase activity, lipid peroxidation and lipofuscin accumulation in aging rat brain regions. **Biogerontology**, v. 9, n. 4, p. 235–246, 2008. DOI: 10.1007/s10522-008-9133-y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18307051/>. Acesso em: 18 de nov. de 2022.

KURZ, T.; TERMAN, A.; BRUNK, U. T. Autophagy, ageing and apoptosis: The role of oxidative stress and lysosomal iron. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 462, n. 2, p. 220–230, 2007. DOI: 10.1016/j.abb.2007.01.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000398610700029X>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

LEOWATTANA, W. DHEAS as a new diagnostic tool. **Clinica Chimica Acta**, v. 341, n. 1–2, p. 1–15, 2004. DOI: 10.1016/j.cccn.2003.10.031. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14967152/>. Acesso em: 21 set 2022

LEVIN, E. R. Extranuclear steroid receptors are essential for steroid hormone actions. **Annual Review of Medicine**, v. 66, p. 271–280, 2015. DOI: 10.1146/annurev-med-050913-021703. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25587652/>. Acesso em 05 jan. 2023

LORENZO, M. DI; BARRA, T.; ROSATI, L.; VALIANTE, S.; CAPALDO, A.; FALCO, M. DE; LAFORGIA, V. Adrenal gland response to endocrine disrupting chemicals in fishes, amphibians and reptiles: A comparative overview. **General and Comparative Endocrinology**, v. 297, n. June, p. 113550, 2020. DOI: 10.1016/j.ygcen.2020.113550. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32679158/>. Acesso em: 15 out. 2022.

MIYAMOTO, J. *et al.* The Pituitary Function of Androgen Receptor Constitutes a Glucocorticoid Production Circuit. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 13, p. 4807–4814, 2007. DOI: 10.1128/MCB.02039-06. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1951475/>. Acesso em: 09 set. 2022.

PAPIERSKA, L. Adrenopause - Does it really exist? **Przegląd Menopauzalny**, v. 16, n. 2, p. 57–60, 2017. DOI: 10.5114/pm.2017.68593. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5509973/>. Acesso em: 18 de fev. de 2023

REISCH, N.; TAYLOR, A. E.; NOGUEIRA, E. F.; ASBY, D. J.; DHIR, V.; BERRY, A.; KRONE, N.; AUCHUS, R. J.; SHACKLETON, C. H. L.; HANLEY, N. A.; ARLT, W. Alternative pathway androgen biosynthesis and human fetal female virilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 44, p. 22294–22299, 2019. DOI: 10.1073/pnas.1906623116. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31611378/>. Acesso em 20 de mai. 2023

WOJCIECH PAWLINA; ROSS, M. H. *Histologia : texto y atlas correlación con biología celular y molecular*. 8. ed. Barcelona: Wolters Kluwer, 2020

ROSS, I. L.; LOUW, G. J. Embryological and molecular development of the adrenal glands. **Clinical Anatomy**, v. 28, n. 2, p. 235–242, 2015. DOI: 10.1002/ca.22422. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25255746/>. Acesso em: 07 de out. 2022.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Ross **Histologia: texto e atlas**. 8 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2020.

RUDMAN, D. *et al.* Plasma testosterone in nursing home men. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 41, n. 3, p. 231–236, jan. 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3339375/>. Acesso em 01 de set. 2022.

RUIZ, T. F. R.; VILAMAIOR, P. S. L.; GRIGIO, V.; COLLETA, S. J.; ZUCÃO, M. I.; CAMPOS, S. G. P. DE; SANTOS, F. C. A. DOS; BIANCARDI, M. F.; PEREZ, A. P. S.; TABOGA, S. R.; LEONEL, E. C. R. The Mongolian Gerbil as a Useful Experimental Model in Reproductive Biology. **Reproductive Sciences**, n. 0123456789, 2023. DOI:

10.1007/s43032-023-01171-6. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s43032-023-01171-6>. Acesso em: 23 de jun. 2023

RUTKOWSKI, K.; SOWA, P.; RUTKOWSKA-TALIPSKA, J.; KURLISZYN-MOSKAL, A.; RUTKOWSKI, R. Dehydroepiandrosterone (DHEA): Hypes and hopes. **Drugs**, v. 74, n. 11, p. 1195–1207, 2014. DOI:10.1007/s40265-014-0259-8. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/263935583_Dehydroepiandrosterone_DHEA_Hypes_and_Hopes. Acesso em: 06 de nov. de 2022.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.

SCHOENWOLF, G. C.; BLEYL, S. B.; BRAUER, P. R. **LARSEN EMBRIOLOGIA HUMANA**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1210/edrv.21.1.0389. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10696570/>. Acesso em: 10 de set. 2022

SCHUESSEL, K.; FREY, C.; JOURDAN, C.; KEIL, U.; WEBER, C. C.; MÜLLER-SPAHN, F.; MÜLLER, W. E.; ECKERT, A. Aging sensitizes toward ROS formation and lipid peroxidation in PS1M146L transgenic mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 5, p. 850–862, 2006. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.041. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16520237/>. Acesso em: 14 de out. de 2023

SONG, S. B.; SHIM, W.; HWANG, E. S. Lipofuscin Granule Accumulation Requires Autophagy Activation. **Molecules and Cells**, v. 46, n. 8, p. 486–495, 2023. DOI: 10.14348/molcells.2023.0019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10440269/>. Acesso em 10 de nov. de 2023.

SOHAL, R. S.; AGARWAL, S.; SOHAL, B. H. Oxidative stress and aging in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 81, n. 1, p. 15–25, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7475349/>. Acesso em: 01 de jan. de 2023.

TERMAN, A.; BRUNK, U. T. Lipofuscin: Mechanisms of formation and increase with age. **Apmis**, v. 106, n. 2, p. 265–276, 1998. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1998.tb01346.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9531959/>. Acesso em: 04 de set. de 2022.

TERMAN, A.; BRUNK, U. T. Lipofuscin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 8, p. 1400–1404, 2004. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.08.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15147719/>. Acesso em: 04 de set. de 2022.

WANG, D.; WANG, W.; LIANG, Q.; HE, X.; XIA, Y.; SHEN, S.; WANG, H.; GAO, Q.; WANG, Y. DHEA-induced ovarian hyperfibrosis is mediated by TGF- β signaling pathway. **Journal of Ovarian Research**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1186/s13048-017-0375-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29321035/>. Acesso em: 05 de out. de 2023.

WANG, M. X.; PENG, Z. G. 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 246, p. 108428, 2023. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2023.108428. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37116587/>. Acesso em: 03 de nov. de 2023.

WIDSTROM, R. L.; DILLON, J. S. Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 22, n. 4, p. 289–298, 2004. DOI: 10.1055/s-2004-861546. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15635497/>. Acesso em: 11 de nov 2022.

WU, T. T.; GAO, Y.; ZHENG, Y. Y.; MA, Y. T.; XIE, X. Association of endogenous DHEA/DHEAS with coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 46, n. 11, p. 984–994, 2019. DOI: 10.1111/1440-1681.13146. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1440-1681.13146>. Acesso em: 16 de jan. 2023.

XANTHOULEA, S. *et al.* Pharmacological inhibition of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase impairs human endometrial cancer growth in an orthotopic xenograft mouse model. **Cancer Letters**, v. 508, n. March, p. 18–29, 2021. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.03.019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33762202/>. Acesso em: 18 de set. 2023.

YATES, R.; KATUGAMPOLA, H.; CAVLAN, D.; COGGER, K.; MEIMARIDOU, E.; HUGHES, C.; METHERELL, L.; GUASTI, L.; KING, P. **Adrenocortical Development, Maintenance, and Disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 106

YAZAWA, T. *et al.* Evaluation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity using androgen receptor-mediated transactivation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 196, n. July 2019, p. 105493, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-416021-7.00007-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24290352/>. Acesso em 14 de mar. 2023.

ZHU, Y.; QIU, L.; JIANG, F.; GĂMAN, M. A.; ABUDORAEHEM, O. S.; OKUNADE, K. S.; ZHANG, M. The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on estradiol levels in women: A dose-response and meta-analysis of randomized clinical trials. **Steroids**, v. 173, n. June, 2021. DOI: 10.1016/j.steroids.2021.108889. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X2100101X>. Acesso em: 25 de jul de 2023.