

Desenvolvimento de Biomarcadores para Avaliação dos Efeitos Disruptores Endócrinos da Exposição a Ambiente Vulcânico Usando a Glândula Suprarrenal de *Mus musculus*

Dissertação de Mestrado

Ana Rita Simões Nunes

Mestrado em

Ambiente Saúde e Segurança



Desenvolvimento de Biomarcadores para Avaliação dos Efeitos Disruptores Endócrinos da Exposição a Ambiente Vulcânico Usando a Glândula suprarrenal de *Mus musculus*

Dissertação de Mestrado

Ana Rita Simões Nunes

Orientadores

Prof. Doutor Armindo dos Santos Rodrigues

Prof.^a Doutora Patrícia Ventura Garcia

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ambiente Saúde e Segurança



“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martim Luher King Jr

Abstract

Populations that live around active volcanic areas are more exposed to pollutants emitted from soil degassing.

The main objective of this study is to evaluate the histological changes in adrenal gland of mice (*Mus musculus*) exposed to a volcanic environment. To achieve this goal, 8 mice exposed to the volcanic environment and 23 mice from *Rabo de Peixe* (control group) were collected, in which the following histological parameters of the adrenal were studied: the total area and perimeter of the adrenal gland; area and perimeter of cortex; the thickness of the different layers of the cortex (zona glomerulosa, zona fasciculata and zona reticularis); area, perimeter and diameter of the adrenal medulla.

The results show that mice exposed to the volcanic environment (exposed group) are significantly older, and therefore have been longer exposed to the volcanic environment, which may have resulted in cortical fatigue. Nevertheless, the results obtained reflect that the exposure to the volcanic environment did not result in significant alterations of the adrenal medulla. Thus, the differences found in the adrenal area and perimeter values are due to changes in the adrenal cortex.

The analysis of the three layers of the cortex showed that there were no significant differences in the thickness of zona glomerulosa between the studied groups. Both zona fasciculata and zona reticularis presented a significant reduction of their thickness in the exposed group when compared to the control group.

Furnas mice are permanently exposed to an atmosphere rich in CO₂ (hypercapnia) and poor in O₂ (hypoxia). These results may be explained by the chronic exposure to an environment rich in CO₂: due to the relaxing effect of this gas, such exposure probably produced a reduction in anxiety and stress levels resulting in a reduction of the adrenal cortex and, consequently, its atrophy. Another explanation for the obtained results, may be the occurrence of hypocortisolism, i.e., the reduction of cortisol production by the zona fasciculata. This situation may be due to chronic exposure to environmental stress, resulting in adrenal fatigue due to the over stimulation of the cortex without ever being able to reach a balance.

Based on the results, we can conclude that, *Mus musculus* is a good bioindicator for the biomonitoring of the effects of volcanism, being the thickness of the cortex, and in particular the zona fasciculata, effective biomarkers of exposure.

Key Words: Endocrine disruption; adrenal gland; biomarkers; hypocortisolism;
Mus musculus.

Resumo

As populações que vivem em áreas de vulcanismo ativo estão expostas aos poluentes emitidos pela desgaseificação difusa dos solos.

Este estudo tem como principal objetivo avaliar as alterações histológicas na glândula suprarrenal de ratinhos (*Mus musculus*) decorrentes da exposição ao ambiente vulcânico. Para alcançar este objetivo foram recolhidos 8 ratinhos expostos ao ambiente vulcânico (grupo exposto) e 23 ratinhos recolhidos em Rabo de Peixe (grupo controlo), nos quais foram estudados os seguintes parâmetros histológicos da suprarrenal: a área e o perímetro totais da suprarrenal; a área e o perímetro do córtex, e a espessura das diferentes zonas constituintes do córtex (zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticulada); e, a área, o perímetro e o diâmetro da medula.

Tendo em conta os resultados obtidos para a idade verificou-se que os ratinhos do grupo exposto são significativamente mais velhos, o que implica mais tempo de exposição ao ambiente vulcânico, o que poderá resultar em fadiga cortical. Na medula adrenal, os resultados obtidos refletem que a exposição ao ambiente vulcânico não resultou em alterações histológicas significativas dos parâmetros analisados. Assim, as diferenças encontradas nos valores de área e perímetro da suprarrenal devem-se às alterações verificadas no córtex adrenal.

Analisando as três zonas do córtex, comparando o grupo controlo com o grupo exposto, é possível depreender que, para a zona glomerulosa, não existem diferenças significativas ao nível da sua espessura. Relativamente à zona fasciculada e à zona reticulada, estas apresentaram uma redução significativa de espessura no grupo exposto comparativamente ao grupo controlo.

Os ratos das Furnas estão permanentemente expostos a uma atmosfera bastante rica em CO₂ (hipercapnia) e pobre em O₂ (hipoxia). Os resultados obtidos poderão encontrar explicação na exposição crónica a um ambiente bastante rico em CO₂, a qual poderá produzir uma redução dos níveis de ansiedade e de stress (devido ao efeito relaxante deste gás) com a concomitante redução da solicitação do córtex adrenal e, consequentemente, à sua atrofia. Outra hipótese para explicar os resultados obtidos é a ocorrência de hipocortisolismo, devido à redução da produção de cortisol na zona fasciculada como consequência de uma exposição crónica ao stress ambiental, resultando num quadro de fadiga adrenal por excesso de estimulação da glândula sem que nunca se consiga atingir um equilíbrio.

Com base nos resultados obtidos pode concluir-se que, para além de o *Mus musculus* ser um bom bioindicador para a biomonitorização dos efeitos do vulcanismo, a espessura do córtex, e em particular da zona fasciculada, constituem bons biomarcadores de exposição.

Palavras chave: Disrupção endócrina; Suprarrenal; Biomarcadores; Hipocortolicismo; *Mus musculus*.

Índice

Abstract	5
Resumo	7
Índice de Figuras.....	10
Índice de Tabelas	13
Lista de Abreviaturas	14
Introdução.....	15
Enquadramento Teórico	17
Ilha de São Miguel	17
Caracterização do ambiente vulcânico	17
Atividade Vulcânica.....	17
O Vulcão das Furnas e a emissão de CO ₂	17
Vulcanismo como fonte de poluentes do ar	18
Sistema Endócrino	18
Glândula Suprarrenal	19
Circulação Sanguínea	20
Córtex	21
Medula.....	23
Disruptores endócrinos.....	23
Efeitos na Glandula Suprarrenal	24
O <i>Mus musculus</i> como modelo de exposição <i>in situ</i>	25
Materiais e Métodos.....	27
Áreas de estudo.....	27
Amostragem e preparação	28
Análise Estatística.....	31
Resultados	32
Discussão.....	44
Conclusões	48
Bibliografia.....	49

Índice de Figuras

- Figura 1. O Fluxograma representa a correlação dos componentes de um sistema regulado. Uma alça de retroalimentação negativa é o sistema de regulação automático comum do organismo. As alterações de uma substância ou atividade regulada resultam na reversão do evento iniciador pelos vários tecidos ou órgãos efetores. Se o nível de uma substância ou atividade aumentar, então os efetores diminuem o nível da substância ou atividade. O reverso também ocorre. Imagem adaptada de: Banks, 1992. 19
- Figura 2. Glândula Suprarrenal de *Mus musculus*. A divisão da glândula em córtex (C) e medula (M) é bem delimitada, o córtex divide-se ainda em zona glomerulosa (ZG), zona fasciculada e zona reticulada (ZR)..... 20
- Figura 3. Estrutura geral e circulação do sangue na glândula suprarrenal. Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2013..... 21
- Figura 4. (a) Localização da ilha de Miguel no arquipélago dos Açores; (b) Áreas de amostragem Rabo de Peixe (1) e Furnas (2), a distância entre os dois locais é de aproximadamente 33 km. (Adaptado de Linhares, 2018). 28
- Figura 5. *Mus musculus*..... 29
- Figura 6. Esquema representativo das medições efetuadas na glândula suprarrenal, a linha vermelha/verde a circundar a glândula permite obter a área e o perímetro, e as linhas perpendiculares a azul, os diâmetros. 30
- Figura 7. Esquema representativo das medições efetuadas na medula da glândula suprarrenal, a linha vermelha/verde a circundar a medula permite obter a área e o perímetro, e as linhas perpendiculares a azul, os diâmetros..... 30
- Figura 8. Esquema representativo das medições efetuadas nas zonas do córtex da glândula suprarrenal, a linha a vermelho representa a medição da espessura da zona Glomerulosa, a linha a azul da zona Fasciculada e a verde da zona Reticulada. 31
- Figura 9. Gráfico de caixa-bigodes para o peso (em gramas) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. 32

Figura 10. Gráfico de caixa-bigodes para a idade (em dias) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.	33
Figura 11. Gráfico de caixa-bigodes para a área da suprarrenal (em μm^2) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.....	34
Figura 12. Gráfico de caixa-bigodes para o perímetro da suprarrenal (em μm) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.....	35
Figura 13. Gráfico de caixa-bigodes para a área do córtex suprarrenal (em μm^2) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.....	36
Figura 14. Gráfico de caixa-bigodes para a espessura do córtex (em μm) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.....	36
Figura 15. Gráfico de caixa-bigodes para a área da medula (em μm^2) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.....	37
Figura 16. Gráfico de caixa-bigodes para o perímetro da medula (em μm) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.....	38
Figura 17. Gráfico de caixa-bigodes para o diametro da medula (em μm) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.....	39
Figura 18. Gráfico de caixa-bigodes para espessura média da zona glomerulosa (em μm) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.	40

Figura 19. Gráfico de caixa-bigodes para espessura média da zona fasciculada (em μm) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.....	41
Figura 20. Gráfico de caixa-bigodes para espessura média da zona reticulada (em μm) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.....	41
Figura 21. Gráfico de caixa-bigodes da percentagem da espessura da zona glomerulosa relativamente à espessura total do córtex.....	42
Figura 22. Gráfico de caixa-bigodes da percentagem da espessura da zona fasciculada relativamente à espessura total do córtex.....	43
Figura 23. Gráfico de caixa-bigodes da percentagem da espessura da zona reticulada relativamente à espessura total do córtex.....	43

Índice de Tabelas

Tabela 1. Peso médio (\pm EP) e idade média (\pm EP) dos ratinhos do grupo controlo e do grupo exposto. Letras diferentes na mesma coluna referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre o grupo exposto e o grupo controlo.....	32
Tabela 2: Resultados dos biomarcadores em estudo para o grupo controlo e para o grupo exposto. As letras presentes nos biomarcadores significam: Letras diferentes na mesma coluna referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Área - μm^2 ; Perímetro - μm ; Diâmetro - μm ; Espessura - μm	33
Tabela 3. Resultados dos biomarcadores referentes às três zonas do córtex para grupo controlo e para o grupo exposto. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os dois grupos.....	40

Lista de Abreviaturas

- ACTH – Hormona Adrenocorticotrófica
CRF – Fator de Liberação de Corticotrofina
DE – Disruptores Endócrinos
DHEA – Dihidroepiandrosterona
DHEAS – Sulfato de Dihidroepiandrosterona
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
FSH – Hormona Folículo Estimulante
GABA – Ácido Gama-aminobutírico
GnRh – Hormona Libertadora de Gonodotrofinas
HPA – Eixo Hipotálamo-Hipófise-adrenal
H₂S – Sulfeto de Hidrogênio
LH – Hormona Luteinizante
ZF – Zona Fasciculada
ZG – Zona Glomerulosa
ZR – Zona Reticulada

Introdução

O vulcanismo constitui uma fonte de poluentes naturais com impacto na saúde e na qualidade ambiental (Hansell e Oppenheimer, 2004).

Existem duas fontes de poluição do ar, as naturais e/ou antropogénicas. A poluição não é toda da responsabilidade humana (antropogénica), sendo que as fontes de poluição naturais são de maior volume do que as antropogénicas. São consideradas fontes naturais, os incêndios florestais de causas naturais, as tempestades de poeiras, os poluentes biogénicos, as atividades vulcânicas, entre outras (Rodrigues e Garcia 2014).

Em ambientes de vulcanismo ativo os valores dos vários compostos libertados são muito altos em relação a outros ambientes não vulcanicamente ativos. Estima-se que anualmente sejam libertadas cerca de 150 milhões de toneladas de CO₂ por meio de fontes vulcânicas (Amaral e Rodrigues, 2011).

Uma vez que cerca de 10% da poluição mundial vive junto a vulcões ativos, é indispensável estudar o efeito da poluição vulcânica sobre a saúde das populações.

A ilha de S. Miguel, situada no arquipélago dos Açores, é a maior ilha do arquipélago sendo composta por três vulcões ativos (Sete Cidades, Fogo e Furnas), ligados entre si por zonas de vulcanismo fissural (Guest *et al.*, 1999).

Atualmente, a Ilha de São Miguel, caracteriza-se por apresentar vulcanismo ativo com grande produção e emissão de gases, afetando ininterruptamente o meio ambiente e a saúde das populações (Rodrigues *et al.*, 2012).

O vulcão das Furnas apresenta várias formas de vulcanismo secundário, nomeadamente campos fumarólicos, nascentes de águas termais e gasocarbónicas e zonas de desgaseificação difusa dos solos (Eleutério, 2013); estima-se que, aproximadamente, 1000 toneladas de CO₂ são expelidas diariamente para o ar por desgaseificação do solo (Viveiros *et al.*, 2010).

O ratinho *Mus musculus* é frequentemente utilizado como modelo bioindicador em estudos de biomonitorização, uma vez que as populações desta espécie geralmente apresentam um elevado número de indivíduos (sendo, portanto, facilmente amostrados. *Mus musculus* está presente em todas as zonas do mundo onde exista associação com o Homem, ou seja, onde lhe seja proporcionado alimento e abrigo apropriados (Macdonald e Barret, 1993).

Por outro lado, a elaboração de estudos de campo utilizando modelos animais bioindicadores de exposição a poluentes ambientais, permite-nos recolher dados

ecotoxicológicos cruciais, uma vez que, em condições de laboratório, é extremamente difícil replicar a complexidade das condições de campo, bem como, todos os fatores extrínsecos (Pereira *et al.*, 2006).

A glândula suprarrenal é considerada das mais importantes glândulas endócrinas devido ao seu envolvimento nas principais funções biológicas dos animais, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento, no sistema imunitário, na regulação da osmose, entre outras atividades fisiológicas.

A glândula suprarrenal é um órgão encapsulado e dividido, nitidamente, em duas camadas concêntricas: o córtex e a medula. Estas duas camadas podem ser consideradas dois órgãos distintos, de origens embrionárias diferentes, apenas unidos anatomicamente (Junqueira e Carneiro, 2013). O córtex pode ainda ser subdividido em três zonas distintas, sendo estas: a zona glomerulosa, a zona fasciculada e a zona reticulada, as quais produzem, respetivamente, mineralocorticóides (aldosterona), glucocorticóides (corticosterona e cortisol) e esteróides sexuais (andrógenos) (Harvey, 2010). As hormonas da glândula suprarrenal influenciam diretamente os ajustes metabólicos dos hidratos de carbono, proteínas, lípidos e sais minerais, afetando desta forma o metabolismo de todos os principais órgãos do corpo, incluindo coração, fígado, rins, músculos e sistema nervoso dos animais (Harvey, 2010).

Este estudo tem como principal objetivo avaliar as alterações histológicas na glândula suprarrenal de ratinhos (*Mus musculus*), decorrentes da exposição ao ambiente vulcânico. Para alcançar este objetivo foram recolhidos *M. musculus* de uma população exposta ao ambiente vulcânico e de uma população não exposta à atividade vulcânica (grupo controlo), nos quais se estudaram os seguintes parâmetros histológicos da suprarrenal: a área e o perímetro totais da suprarrenal; a área e o perímetro do córtex, e a espessura das diferentes zonas constituintes do córtex (zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticulada); e, a área, o perímetro e o diâmetro da medula adrenal.