

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Bacharelado em Ciências Biológicas

Luciano André Lemos Júnior

**Exposição isolada e combinada de partículas microplásticas de poliestireno e de metilmercúrio leva a alterações na arquitetura e cobertura de muco no cólon e ao aumento do dano oxidativo nos intestinos de ratos Wistar**

Porto Alegre

2024

Luciano André Lemos Júnior

**Exposição isolada e combinada de partículas microplásticas de poliestireno e de metilmercúrio leva a alterações na arquitetura e cobertura de muco no cólon e ao aumento do dano oxidativo nos intestinos de ratos Wistar**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca  
Moreira

Co-orientador: Henrique Mautone Gomes

Porto Alegre

2024

## CIP - Catalogação na Publicação

Lemos Júnior, Luciano André

Exposição isolada e combinada de partículas microplásticas de poliestireno e de metilmercúrio leva a alterações na arquitetura e cobertura de muco no cólon e ao aumento do dano oxidativo nos intestinos de ratos Wistar / Luciano André Lemos Júnior. -- 2024.  
41 f.

Orientador: José Cláudio Fonseca Moreira.

Coorientador: Henrique Mautone Gomes.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Estresse Oxidativo. 2. Microplásticos. 3. Metilmercúrio. 4. Poluentes. I. Fonseca Moreira, José Cláudio, orient. II. Mautone Gomes, Henrique, coorient. III. Título.

Luciano André Lemos Júnior

**Exposição isolada e combinada de partículas microplásticas de poliestireno e de metilmercúrio leva a alterações na arquitetura e cobertura de muco no cólon e ao aumento do dano oxidativo nos intestinos de ratos Wistar**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Aprovado em Porto Alegre 08 de fevereiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dra. Fernanda Santos Petry  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais, que foram muito importantes para a minha caminhada acadêmica.

Exposição isolada e combinada de partículas microplásticas de poliestireno e de metilmercúrio leva a alterações na arquitetura e cobertura de muco no cólon e ao aumento do dano oxidativo nos intestinos de ratos Wistar

Autores: Luciano André Lemos Júnior<sup>@</sup>, Henrique Mautone Gomes <sup>a</sup>, Alberto Martins Silva<sup>a</sup>, Alexandre Kléber Silveira <sup>a</sup>, Daniel Pens Gelain<sup>a</sup>, José Cláudio Fonseca Moreira<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS – Brazil;

<sup>@</sup>Endereço para correspondência: Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil; Telefone: +55 51 3308-5577, Fax: +55 51 3308-5535.

E-mail: [luciano.andre.lemos@gmail.com](mailto:luciano.andre.lemos@gmail.com)

## RESUMO

O crescimento das atividades industriais resulta na disseminação extensiva de poluentes ambientais, sendo os microplásticos (MPs) e o metilmercúrio (MeHg) poluentes emergentes e preocupantes nos últimos anos. Os MPs, principalmente o poliestireno (PS), encontram-se em ecossistemas aquáticos e terrestres, representando uma ameaça à saúde humana via ingestão de alimentos contaminados. A falta de estudos abrangentes sobre os efeitos biológicos, bioquímicos e fisiológicos desses poluentes é evidente, apesar de sua detecção em diversos ambientes e em amostras humanas. A poluição por MPs-PS recebe atenção considerável, representando um desafio ambiental significativo. Em ambientes marinhos, esses poluentes não apenas impactam diretamente a vida marinha, mas também funcionam como uma rota adicional para a contaminação por outros agentes nocivos, como pesticidas, microrganismos e por moléculas organometálicas. Para avaliar os danos causados por MPs e MeHg, quarenta e oito ratos Wistar foram divididos em quatro grupos, incluindo o grupo controle, exposição individual a MPs, exposição individual a MeHg e exposição conjunta. O estudo focou no dano oxidativo a biomoléculas, utilizando marcadores como TBARS para lipoperoxidação. Técnicas como E.L.I.S.A foram empregadas para avaliar níveis de moléculas de adesão, indicando inflamação. A análise histopatológica permitiu a avaliação da cobertura do muco intestinal. Os resultados destacam a importância de compreender os impactos desses poluentes, isoladamente e em conjunto, para abordar os desafios ambientais e de saúde associados à sua presença disseminada.

**Palavras-chave:** Estresse Oxidativo; Claudina; Ocludina; Microplástico; Metilmercúrio; Poluentes;

## **ABSTRACT**

The growth of industrial activities has led to the extensive spread of environmental pollutants, with microplastics (MPs) and methylmercury (MeHg) being emerging and concerning pollutants in recent years. MPs, particularly polystyrene (PS), are found in aquatic and terrestrial ecosystems, posing a threat to human health through the ingestion of contaminated food. Despite their detection in various environments and human samples, there is a lack of comprehensive studies on the biological, biochemical, and physiological effects of these pollutants. Pollution by PS-containing MPs receives considerable attention, representing a significant environmental challenge. In marine environments, these pollutants not only directly impact marine life but also serve as an additional route for contamination by other harmful agents, such as pesticides, microorganisms, and organometallic molecules. To assess the damage caused by MPs and MeHg, forty-eight Wistar rats were divided into four groups, including the control group, individual exposure to MPs, individual exposure to MeHg, and joint exposure. The study focused on oxidative damage to biomolecules, using markers such as TBARS for lipid peroxidation. Techniques like E.L.I.S.A were employed to assess adhesion molecule levels, indicating inflammation. Histopathological analysis allowed the evaluation of intestinal mucus coverage. The results underscore the importance of understanding the impacts of these pollutants, both individually and in combination, to effectively address the environmental and health challenges associated with their widespread presence.

**Keywords:** Oxidative Stress; Claudin; Occludin; Microplastics; Methylmercury; Pollutants.

**Abreviações:**

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CU: Colite ulcerativa

DC: Doença de Chron

DTNB: (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)

FAPERGS: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfurico

HE: Hematoxilina e eosina

Hg: Mercúrio

IgG: Imunoglobulina G

MDA: Malonaldeído

MeHg: Metilmercúrio

MN: Micronúcleo

MPs: microplásticos

NaCl: Cloreto de sódio

NCE: Eritrócitos normocromáticos

PBS: Tampão fosfato salina

PCE: Eritrócitos policromáticos

PFA: Paraformaldeído

PS: Poliestireno

SH: Tiol reduzido

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TMB: 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
1.1. Microplásticos.....	10
1.2. Mercúrio e Metilmercúrio.....	11
1.3. Interação Mucosa Intestinal e Microbiota Intestinal.....	12
2. Material e Métodos.....	13
2.1. Desenho Experimental e Tratamentos .....	13
2.1.1. Animais.....	13
3. Tratamentos .....	13
3.1.1. Microplástico .....	14
3.1.2. Metilmercúrio .....	14
3.2. Eutanásia .....	14
3.3. Considerações Éticas e Descarte De Resíduos Químicos.....	15
3.4. Análise da cobertura de muco e da estrutura tecidual em intestino grosso .....	15
3.5. Análise da Microbiota Cecal e da disbiose causada por metilmercúrio e microplástico.....	16
3.5.1. Extração de DNA.....	16
3.5.2. Amplificação do DNA.....	16
3.5.3. Sequenciamento de alto desempenho dos produtos de amplificação dos genes de interesse 16	
3.6. Padronização das Amostras .....	16
3.7. E.L.I.S.A .....	17
3.8. Quantificação de marcadores de Dano Oxidativo .....	18
3.9. Teste de avaliação de genotoxicidade.....	18
4. Resultados .....	19
4.1. Consumo de água, ganho de peso e comprimento intestinal .....	19
4.2. Coloração de H&E e quantificação de proteínas de junção e Interleucina-1 $\beta$ .....	19
4.3. Análise da cobertura de muco e da microbiota cecal.....	20
4.4. Quantificação de marcadores de dano oxidativo nos intestinos e de avaliação da genotoxicidade .....	21
5. Discussão.....	22
5.1. Exposição aos contaminantes leva à uma alteração na arquitetura tecidual, perda de moléculas de adesão e aumento da sinalização inflamatória no cólon .....	22

5.2. A arquitetura alterada pode ser um indicativo da perda de produção do muco devido à uma alteração na microbiota dos animais .....	23
5.3. Coexposição depleta os níveis de GSH e causa considerável formação de espécies reativas ao TBA .....	25
7. Conclusão .....	26
8. Apoio Financeiro.....	27
9. Conflito de Interesses .....	27
10. Referencias .....	28

## **1. Introdução**

O aumento das atividades humanas, como a industrialização, tem levado a disseminação generalizada de poluentes ambientais que podem representar sérias ameaças à saúde dos ecossistemas e dos seres vivos que deles dependem. Dentre esses poluentes, o microplástico (MP) e o metilmercúrio (MeHg) surgem como agentes preocupantes.

### **1.1. Microplásticos**

O termo MP foi empregado pela primeira vez em 2004 por Thompson et al., como categorização para partículas de plástico com diâmetro inferior a 5 milímetros onde essas partículas são classificadas de acordo com a fonte de sua origem, matriz polimérica, e tamanho (Thompson et al., 2004). Os MPs primários são aqueles produzidos em dimensões de até 5 mm para utilização em formulações de cosméticos e produtos de higiene pessoal, como sabonetes, esfoliantes e cremes dentais, podendo atingir o ambiente através do descarte inadequado de rejeitos de processos industriais e da perda acidental durante o seu transporte. Por sua vez, os MPs secundários resultam da fragmentação de resíduos plásticos maiores, até atingir o tamanho de MP (Yong et al., 2002). Estudos mostram que os MPs se acumulam no ambiente e são amplamente distribuídos em águas marinhas, lagos interiores e até mesmo em regiões polares (Barnes et al., 2009; Obbard et al., 2014; Eerkes-Medrano et al., 2015). Cerca de 5 trilhões de MPs já foram detectados em diversos ambientes e representam 250 mil toneladas flutuando nos oceanos (Eriksen et al., 2014).

Dentre as diferentes matrizes poliméricas temos o poliestireno (PS), que devido as suas propriedades físicas como isolamento térmico e transparência, é frequentemente manufaturado em itens de uso único e, deste modo, tem um descarte rápido e massivo (Sorrentino, 2009). Os MPs-PS são confundidos com alimentos pela biota marinha e assim são facilmente ingeridos e acumulados devido ao seu tamanho pequeno e sua baixa taxa de degradação (Ivar do Sul e Costa, 2014). No ambiente terrestre este poluente chega até nós humanos através do consumo de peixes, bivalves, moelas de frango e até sal marinho (Van Cauwenberghe e Janssen, 2014; Huerta et al., 2017; Rist et al., 2018), já existem relatos da presença de MPs em placenta e em fezes de humanos (Ragusa et al., 2021; Schwabl et al., 2019). Nas cidades, os MPs se acumulam no solo e na poeira das estradas. Materiais poliméricos de baixa densidade pode ser facilmente suspensos/ressuspensos na atmosfera pelo vento e pelo fluxo de tráfego veicular (Abbasi et al., 2018). Devido a isto os animais

terrestres também estão expostos a MPs por inalação, estudos mostram que os MPs-PS inalados causam alguns efeitos citotóxicos, estresse oxidativo e respostas inflamatórias em células epiteliais pulmonares humanas (Prata et al., 2018). As três vias de contaminação por MPs em seres humanos foram revisadas por Prata, e estas são a via dermal, menos frequente e pouco explorada; a via por inalação, comum em cidades poluídas e em trabalhadores da indústria têxtil e de reciclagem; e a via por ingestão, sendo esta última a mais expressiva via de contaminação humana (Prata et al., 2020).

Apesar da detecção deste poluente em ambientes, itens de consumo, animais e plantas consumidos pelo ser humano, e até mesmo em amostras humanas, é de suma importância descobrirmos os verdadeiros níveis desta contaminação, ainda há uma falta de estudos que elucidem os efeitos biológicos, bioquímicos e fisiológicos destes contaminantes. Estudos com camundongos demonstraram que os MPs ingeridos foram encontrados no intestino, fígado e rim causando alterações patológicas como a redução na secreção do muco, disfunção na barreira intestinal, inflamação intestinal e disbiose na microbiota intestinal (Yong et al., 2020). A poluição por MPs-PS tem recebido grande atenção e representa um problema ambiental expressivo (da Costa, 2018), no ambiente marinho este poluente também se apresenta como uma rota adicional de contaminação para outros contaminantes ambientais prejudiciais, devido a capacidade que os MPs têm de adsorver pesticidas, microrganismos e metais pesados como o mercúrio (Hg) (Fang et al., 2019). A possível dessorção destes químicos dos MPs após sua ingestão pode aumentar a exposição e bioacumulação de contaminantes (Koelmans et al., 2022).

## **1.2. Mercúrio e Metilmercúrio**

O mercúrio (Hg) é um metal pesado altamente tóxico (Liu et al. 2018b) que pode ser encontrado na atmosfera tanto por fatores naturais como vulcões, quanto pela atividade humana (Mason and Pirrone, 2009). A mineração de ouro, principalmente ilegal e de pequena escala, é uma das maiores fontes de contaminação por Hg (Gibb e O'Leary, 2014), e geralmente ocorre em áreas onde a população local utiliza peixes e outros pescados como fonte primária de proteínas, aumentando a exposição destas populações ao Hg, como é o caso dos povos indígenas amazônicos Yanomami e Mundurucu (Ramos et al., 2020; Basta et al., 2021). No ambiente o Hg pode existir quimicamente na forma elemental ( $\text{Hg}^0$ ) inorgânica (estados de oxidação 1+ e 2+) e organometálica (Crespo-López et al., 2009). Nos compostos organometálicos, o Hg se encontra covalentemente ligado a um ou dois átomos de carbono

formando compostos tipo  $\text{RHgX}$  e  $\text{RHgR}'$ , onde R e R' são grupos orgânicos, e X podendo ser um grupo cloreto, brometo, nitrato ou acetato. Como exemplo, nós temos os sais de metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{HgX}$ ), fenilmercúrio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgX}$ ), metoxietilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{OC}_2\text{H}_4\text{HgX}$ ) e dimetilmercúrio ( $(\text{CH}_3)_2\text{HgX}$ ) (Olivero-Verbel e Johnson Restrepo, 2002). O metilmercúrio (MeHg) é a forma mais tóxica dentre os compostos organometálicos de cadeias curtas (WHO, 1996), sendo formado principalmente em sistemas aquáticos. Quando o Hg inorgânico é liberado para a atmosfera, este se armazena nos sedimentos e corpos de água, onde pode ser transformado por bactérias sulfato-redutoras a MeHg (UNEP, 2013). O MeHg é altamente persistente no ambiente devido à estabilidade da ligação carbono-mercúrio frente a ligação mercúrio-oxigênio quando o composto se encontra na água (Chaney et al., 1990). Uma vez nos sistemas aquáticos, o MeHg é bioacumulado e biomagnificado através da cadeia alimentar, sendo as espécies carnívoras de peixe, encontradas no nível trófico superior, aquelas mais consumidas por humanos e que registram as maiores concentrações deste contaminante (Olivero-Verbel e Johnson-Restrepo, 2002). Cerca de 84% da ingestão de Hg se dá através da alimentação de peixes contaminados (WHO, 1996). Além disso, a exposição a estes compostos organomercuriais leva a disfunções neurológicas, renais e cardiovasculares em humanos (Hong et al., 2012). Estudos já demonstram a capacidade destes dois contaminantes (MPs-PS + MeHg) em interagirem no meio ambiente, onde possivelmente tem sua absorção potencializada e seus efeitos amplificados (Brennecke et al. 2016).

### **1.3. Interação Mucosa Intestinal e Microbiota Intestinal**

O intestino é um órgão digestivo importante (Zhang et al. 2019) que atua como barreira biológica, química, mecânica e imunológica para o hospedeiro (Cowan et al. 2020). A mucosa intestinal é a linha de defesa contra a infecção intestinal no organismo de um animal (Martínez et al., 2012). Neste sentido, a barreira mucosa intestinal de um animal pode efetivamente impedir que antígenos intestinais endógenos e exógenos sejam transferidos pelo trato intestinal para a circulação sistêmica (Kong et al., 2017). As células epiteliais intestinais são as principais células funcionais no trato intestinal, sendo elementos importantes das barreiras mecânicas imunológicas e químicas da mucosa intestinal (Sanz e De Palma, 2009). Além disso, trilhões de micróbios habitam no intestino de animais e seres humanos, desempenhando o papel de barreira biológica no intestino (Liu et al., 2021) e por sua vez é conhecida como microbiota intestinal, onde é composta por comunidades microbianas comensais, simbióticas e patogênicas que são toleradas pelo sistema imune do hospedeiro

(Tremaroli and Bäckhed, 2012). Em sua maioria são bactérias, mas também incluem arqueias, fungos, protozoários e vírus, que desempenham várias funções na fisiologia do hospedeiro como produção de metabólitos, peptídeos e proteínas, absorção de nutrientes e o aumento da proteção contra poluentes ambientais (Hooper et al., 2012); (Nicholson et al., 2012).

O entendimento das respostas de estresse celular e a sua relação com exposição a MPs junto com outros contaminantes são importantes para a avaliação dos efeitos subletais de longo prazo dos MPs (Gao et al., 2021). Com isso em mente, o atual trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da exposição a estes dois contaminantes ambientais de forma isolada e conjunta no intestino grosso e delgado de ratos Wistar, determinando e avaliando o dano oxidativo nestes órgãos, também foi realizado a análise histológica do cólon destes animais a fim de observar a arquitetura do tecido e a cobertura do muco.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Desenho Experimental e Tratamentos**

#### **2.1.1. Animais**

Ratos Wistar machos com 30 dias de vida disponibilizados pelo Biotério do Departamento de Bioquímica, ao completarem 30 dias de vida os ratos foram mantidos em caixas de propileno (41x34x18cm) com maravalhas e permaneceram numa sala especial para os animais em experimentação onde foram mantidos com distribuição de até 4 animais por caixa.

Os animais foram manipulados semanalmente para habituação com os pesquisadores, momento em que foram anotadas observações, entre elas o peso dos animais e a quantidade de água consumidos. Os animais foram mantidos num ciclo de 12h de luz com temperatura constante de  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com acesso livre a água e alimento.

## **3. Tratamentos**

Com 30 dias de vida se dará início ao tratamento dos animais, estes serão divididos em quatro grupos:

- 1) Grupo Controle = 12 animais
- 2) Tratamento individual de microplástico = 12 animais
- 3) Tratamento individual de metilmercúrio = 12 animais

#### 4) Tratamento associado de microplástico e metilmercúrio = 12 animais

Total: 48 animais

Todos os tratamentos foram realizados com a mesma metodologia durante oito semanas, a dose de 2000µg/L de MPs com 50 micrômetros foi diluída na água e disponibilizada *ad libitum* aos ratos. A dose para o tratamento de metilmercúrio (MeHg) foi de 0,5mg/L e também foi incluído na diluição do composto na água que estes animais bebem. O tratamento associado consistiu na mesma dose dos tratamentos individuais, porém com os dois compostos presentes na água.

##### **3.1.1. Microplástico**

Foram usados MPs de poliestireno com  $50 \pm 0,09 \mu\text{m}$  adquiridos da empresa Spherotech, número de catálogo #SPHE-PP5010. O tratamento com MPs foi na dose de 2000 µg/L (Lu, et al. 2018), e ocorreu através da diluição destes na água disponível nas garrafas dos animais. Brevemente, 2000 µg de MP foram diluídos em 1 Litro de água e sonicados antes de serem disponibilizados *ad libitum* aos ratos. A dose escolhida foi baseada na dosagem utilizada no trabalho de L. Lu, et al. 2018 e segundo os autores ela apresenta cerca de  $1.456 \times 10^4$  partículas por litro.

##### **3.1.2. Metilmercúrio**

O tratamento de metilmercúrio (MeHg) também se deu através da diluição na água disponível nas garrafas dos animais. A dose de metilmercúrio escolhida é a de 0,5 mg/L, baseada nas concentrações ambientais e no consumo de peixe per capita na Colômbia sendo a dose já utilizada em outros trabalhos do nosso grupo utilizando o metilmercúrio como contaminante (Pérez-Espitia, et al. 2018a, 2018b).

##### **3.2. Eutanásia**

Todos os animais não destinados à histologia foram eutanasiados ao término do tratamento por decapitação com guilhotina em uma sala específica, um de cada vez para minimizar o estresse devido ao odor e som dos animais. A fim de evitar interferências nos parâmetros bioquímicos do fígado pelo uso de anestésico os animais não foram anestesiados e todas as medidas necessárias para minimizar o estresse e desconforto dos animais antes e durante o procedimento foram realizadas.

Imediatamente após a decapitação, coletou-se o sangue para a separação do soro. Imediatamente sobre o gelo os órgãos destes animais foram dissecados. Todos tecidos foram coletados e armazenados em freezer a -80°C até a realização das análises. As carcaças dos animais foram encaminhadas ao Biotério do Departamento de Bioquímica, dentro de sacos plásticos específicos para o descarte de material biológico e foram mantidas a -20°C até a coleta pela empresa contratada responsável pelo descarte apropriado.

Seis animais de cada grupo foram eutanasiados através de perfusão para realizar as análises histológicas. Os animais foram completamente anestesiados com mistura de quetamina/xilazina e então dissecados e perfundidos com uso de NaCl 0,9% até completa limpeza do sangue. Após isso os animais foram fixados com paraformaldeído (PFA) 4% e o cólon retirado e armazenado em PFA 4% até serem parafinizadas e as lâminas preparadas.

### **3.3. Considerações Éticas e Descarte De Resíduos Químicos**

O projeto foi submetido para avaliação do PPG em Ciências Biológicas: Bioquímica e à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA). Cumprindo a diretriz legal brasileira, Lei nº 11.794/2008 (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794, 8 de outubro de 2008), foram tomadas todas as medidas para minimizar o desconforto e sofrimento dos animais durante todos os procedimentos experimentais. O manuseio dos animais experimentais foi realizado estritamente de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), da International Brain Research Organization (IBRO), do Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) e da CEUA da UFRGS (CEUA).

### **3.4. Análise da cobertura de muco e da estrutura tecidual em intestino grosso**

Através de uma análise histopatológica foi possível avaliar a cobertura do muco do intestino grosso destes animais. Após os tecidos serem extraídos estes foram fixados em formaldeído 10%, que então foram desidratados com etanol, hialinizados com xileno e embebidos em cera de parafina à 56°C. As porções então puderam ser coradas com solução de AB-PAS (Alcian blue-periodic acid Schiff) como descrito por Jin et al. (2018<sup>a</sup>). Utilizando-se de softwares para contagem de pixels como o ImageJ, foi possível quantificar a cobertura do muco nas porções do intestino desejadas.

Também foi analisado a estrutura geral do tecido por meio da coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) a fim de observar se a “arquitetura” da mucosa está alterada, se há edema na sub-mucosa e nos grandes vasos linfáticos, e também se existe a infiltração de células inflamatórias na mucosa e sub-mucosa.

### **3.5. Análise da Microbiota Cecal e da disbiose causada por metilmercúrio e microplástico**

A fim de avaliar a disbiose que pode estar sendo causada pelo modelo proposto é necessário avaliar os perfis da comunidade microbiana nestes animais. Isso foi avaliado através da extração e amplificação de DNA de amostras do ceco.

#### **3.5.1. Extração de DNA**

As extrações foram feitas utilizando QIAmp DNA Stool Mini Kit da marca QIAGEN (#51504), específico para extração de DNA fecal. As amostras de material genético extraído foram armazenadas à -20 °C para amplificação e posterior purificação.

#### **3.5.2. Amplificação do DNA**

Os primers utilizados para amplificação por PCR foram os oligos F515 e R806.

#### **3.5.3. Sequenciamento de alto desempenho dos produtos de amplificação dos genes de interesse**

Para análise metagenômica das comunidades presentes nas amostras fecais, os fragmentos dos genes 16S gerados por PCR foram submetidos ao sequenciamento de alto desempenho utilizando-se um sequenciador IonPersonalGenomeMachine (PGM) System (Life Technologies).

### **3.6. Padronização das Amostras**

Para a quantificação de marcadores de dano oxidativo as amostras foram homogeneizadas utilizando 400 µL de tampão fosfato salina (PBS) em homogeneizador de tecidos Cole-Parmer LabGEN 125. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo para a técnica de quantificação. A concentração total de proteínas dos homogenatos foi feita através do método de Bradford e utilizado para a normalização dos dados. Brevemente, as amostras foram diluídas, 10 µL das

amostras foram transferidos para um tubo com 90  $\mu\text{L}$  de NaCl e adicionado 1 mL de Comassie blue e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. 200  $\mu\text{L}$  da solução desses tubos foram transferidos para placas de 96 poços e a leitura foi feita a 532 nm (Bradford, 1976).

### **3.7. E.L.I.S.A**

Proteínas de junção como a Claudina-5 e Ocludina e citocinas próinflamatórias como a Interleucina-1 $\beta$  foram dosadas em tecidos de intestino grosso ao fim do tratamento através da técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sendo possível quantificar níveis de imuno conteúdo celular e perfil inflamatório destes animais.

Foram utilizadas placas ELISA específicas adquiridas da Greiner Bio-One. A solução de substrato TMB foi adquirida da Thermo Fisher, número de catálogo #002023. O Tween-20 para preparação do tampão de lavagem foi adquirido da Kasvi, número de catálogo #K9-9191. Todos os anticorpos utilizados neste manuscrito foram adquiridos da Abcam (Cambridge, Reino Unido) e diluídos nas concentrações 1:2000 e 1:4000 para uso. Os números de catálogo dos anticorpos são os seguintes: Claudina-5 (4C3C2), Ocludina: (OC-3F10), Interleucina-1 $\beta$  (ab9722)

As amostras foram homogeneizadas e normalizadas em tampão fosfato 50 mM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4). A concentração final utilizada para todas as amostras foi de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . As amostras homogeneizadas foram colocadas em placas de ELISA e incubadas por 24 horas e depois lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS 10mM, NaCl 150mM e Tween-20 0,05%). Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de anticorpo primário (1:2000) e a incubação foi realizada por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho e camundongo ligado à peroxidase adquiridos da Merck numa concentração de 1:4000 durante 2 horas. Após lavar a placa três vezes com tampão de lavagem, 100  $\mu\text{L}$  de solução de substrato (kit de detecção espectrofotométrica ELISA TMB, marca Life Technologies) foram adicionados a cada poço e incubados por 10 min. A reação foi finalizada com 50  $\mu\text{L}/\text{poço}$  do reagente de parada, ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M e a absorbância lida a 450 nm em espectrofotômetro (SpectraMax® i3). Os resultados são expressos em porcentagem relativa aos grupos controle.

### **3.8. Quantificação de marcadores de Dano Oxidativo**

O dano oxidativo a biomoléculas foi avaliado a partir da quantificação de marcadores de dano oxidativo a lipídios e proteínas nos tecidos de intestino grosso e intestino delgado. A formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada como parâmetro de lipoperoxidação. Elas foram quantificadas por uma reação ácida de aquecimento com ácido tiobarbitúrico, sendo amplamente adotado como medida de dano oxidativo a lipídios (Draper e Hadley, 1990). Resumidamente, as amostras foram misturadas com 0,6mL de ácido tricloroacético 10% e centrifugadas (10,000×g 10 min). O sobrenadante foi misturado a 0,5mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% e aquecido em banho-maria em água fervente por 25 min. O conteúdo de TBARS foi então determinado por absorvância em espectrofotômetro a 532 nm. Para se quantificar o dano oxidativo a proteínas nesses tecidos o conteúdo tiólico foi medido pela reação com 5,5-ditio-bis-(2-ácido benzóico) (DTNB) 10mM. Resumidamente, 40 µg de proteína foram adicionados à placa de espectrofotometria e combinados com ácido bórico e DTNB, a espectrofotometria foi então lida no momento 0 usando 412 nm. Após 1 hora de incubação, a absorvância foi lida novamente a 412 nm. A primeira leitura foi deduzida da última leitura e os resultados foram então normalizados para serem expressos como µmol SH/mg de proteína. Para tióis não proteicos, o conteúdo de proteína nas amostras foi precipitado usando TCA na concentração final de 20% e depois centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e usado para reagir com DTNB (Ellman, 1959).

### **3.9. Teste de avaliação de genotoxicidade**

O teste de micronúcleo (MN) foi realizado a fim de identificar, a partir do teste citogenético, possíveis alterações cromossômicas baseando-se no aumento da frequência de eritrócitos policromáticos (PCE) com MN. Resumidamente, a técnica consistiu na retirada do fêmur dos animais, com uma seringa previamente preenchida com soro bovino fetal realizou-se lavagens dentro do fêmur onde o conteúdo foi previamente coletado em microtubos e homogeneizados utilizando uma pipeta Pasteur. Posteriormente esses microtubos foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos, 500 µL de sobrenadante foram ressuspensos com as células, com essa mistura foi então realizado o esfregaço das lâminas, onde as mesmas foram secadas verticalmente e posteriormente fixadas por 7 minutos com metanol. Para a coloração foram utilizados o corante Giemsa, permitindo a diferenciação de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (NCE), após certificada a qualidade da coloração montou-

se a lâmina permanente, lamínulas foram fixadas com resina. Em aumento de 200 a 400 vezes avaliou-se a qualidade das lâminas, em aumento de 1000x e imersão foram analisados a presença de MNs, os critérios usados para avaliar a presença dos MNs foram sua coloração e seu tamanho, esse último foi considerado quando 1:10 do tamanho de PCEs. Resultados foram expressos pela proporção de PCE/NCE e também pelo número de MN por 1000 células (Lovell, D., et al 2020).

### **3.10. Análise Estatística**

Para o cálculo estatístico dos resultados obtidos utilizou-se do Software Graphpad Prism 6, e o teste empregado foi ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. Diferenças foram consideradas significantes quando  $P < 0.05$ .

## **4. Resultados**

### **4.1. Consumo de água, ganho de peso e comprimento intestinal**

Foi avaliado o consumo de água dos animais, foi realizado o controle da quantidade em mililitros por gaiola que foram consumidos durante 5 semanas (Figura 1A). Todos os grupos expostos beberam significativamente menos água do que o grupo Controle (MP:  $p < 0,0001$ ; MeHg:  $p < 0,0001$ ; MP+MeHg:  $p < 0,0001$ ) sem grandes diferenças entre eles (Figura 1B). A relação de diferença de peso entre os animais não se mostrou pronunciada (Figura 1C), já o tamanho em comprimento dos intestinos delgado (MP:  $p = 0,0025$ ; MeHg:  $p < 0,0001$ ; MP+MeHg:  $p = 0,0059$ ) e intestino grosso (MP:  $p = 0,0056$ ; MeHg:  $p = 0,0009$ ; MP+MeHg:  $p = 0,0032$ ) dos animais que foram expostos a algum dos 3 tratamentos apresentaram-se com tamanho menor àqueles do grupo Controle, resultados expressos na Figura 1D-E.

### **4.2. Coloração de H&E e quantificação de proteínas de junção e Interleucina-1 $\beta$**

Para verificar a integridade do tecido e sua estrutura geral, foram realizados cortes histológicos do cólon desses animais que por sua vez foram corados por hematoxilina-eosina (H&E), vistos na Figura 2. Através dessa coloração, não foi possível observar uma perda geral da integridade intestinal com *scoring* histológico quando comparados aos modelos de Colite Ulcerativa. Porém, foi possível observar que no grupo tratado com MP+MeHg a arquitetura da mucosa se apresentou danificada havendo presença considerável de edema e infiltração de células inflamatórias, como macrófagos, na região da submucosa intestinal. No grupo MeHg também foram encontradas células inflamatórias, porém tais células só foram observadas na

região da mucosa do tecido, o que pode indicar um aumento na permeabilidade da barreira intestinal.

Foram quantificados os níveis de duas proteínas responsáveis pela adesão célula-célula, Claudina-5 e Ocludina e níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  no cólon dos animais expostos aos contaminantes, Figura 3. Observamos uma diminuição nos níveis de Claudina-5 nos grupos expostos aos poluentes isolados (MP: p=0,0077; MeHg: p=0,0131) e em conjunto (MP+MeHg: p=0,0018) comparados ao grupo Controle (A), observamos também uma diminuição dos níveis de Ocludina nos grupos isolados (MP: p=0,0003; MeHg: p=0,0009) e em conjunto (MP+MeHg: p=0,0001) quando comparados aos do Controle (B). Níveis de citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  também foram quantificados (C), aqui nossos resultados revelaram que os grupos expostos aos poluentes isolados (MP: p=0,0003) e em conjunto (MP+MeHg: p=0,001) expressaram níveis acima da média do nosso grupo Controle, porém esse resultado não foi significativo para o MeHg isolado.

#### **4.3. Análise da cobertura de muco e da microbiota cecal**

Foram também realizados cortes histológicos com o objetivo de observar e avaliar a quantidade de mucina nesse tecido e, para isso foi adotado a metodologia de coloração por Alcian Blue, o qual tem grande especificidade em corar mucinas ácidas. As imagens representativas de cada um dos grupos expostos podem ser encontradas na figura 4, juntamente do gráfico de colunas utilizado para representar a quantificação dessa cobertura no cólon, onde a área da mucosa intestinal no grupo MeHg e no grupo de coexposição apresentaram valores estatisticamente menores do que o grupo Controle (MeHg: p=0,0032; MP+MeHg: p=0,0037).

Foi extraído o RNA do bolo cecal dos animais expostos, e realizado um sequenciamento das regiões 16S por meio do PGM para que pudéssemos avaliar a diversidade e prevalência da população bacteriana na microbiota dos animais. Através do software *Rstudio* foi observado a alfa diversidade por meio de Chao1, Fisher, Simpson, e Shannon (Dados não apresentados). Também foi montado um metacoder (Figura 5) para representar a comparação de todos os grupos experimentais utilizando a diversidade de famílias. Quando comparados com o Controle, os resultados indicam que a contaminação por microplásticos aumenta a prevalência das famílias Enterobacteriaceae e Veillonellaceae, bem como de alguns gêneros da família Lachnospiraceae. O metilmercúrio aumentou a abundância da família Aerococcaceae e alguns

gêneros das famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae, ambos da classe Clostridia. Além disso, a coexposição aumentou a abundância da família Oscillospiraceae e a abundância da família Prevotellaceae, o que não foi observado durante a exposição individual.

#### **4.4. Quantificação de marcadores de dano oxidativo nos intestinos e de avaliação da genotoxicidade**

A Figura 6 apresenta os resultados para a quantificação de grupamentos tióis (-SH) totais e não proteicos, e também de TBARS no intestino delgado (A-C) e no intestino grosso (D-F), importantes marcadores de dano oxidativo às macromoléculas. Nossos resultados mostram que os grupos de exposição e coexposição possuem diferenças significativas nos grupamentos -SH totais no intestino delgado (A) quando comparados com o Controle (MP:  $p=0,0002$ , MeHg:  $p<0,0001$ , MP+MeHg:  $p<0,0001$ ). Além disso, há uma diferença significativa também entre o grupo MP e o grupo MP+MeHg ( $p=0,0335$ ). A quantificação de -SH não proteico (B) apresentou diferenças significativas nos grupos de exposição e coexposição quando comparados com o Controle (MP:  $p=0,0039$ ; MeHg:  $p=0,0009$ ; MP + MeHg:  $p<0,0001$ ), também há uma diferença significativa entre os grupos de exposição comparados ao grupo de coexposição (MP:  $p=0,0086$ ; MeHg:  $p=0,0386$ ). Resultados da quantificação de espécies reativas a TBARS está representada no gráfico C, o qual nos mostra que o grupo MP, bem quanto o grupo de exposição conjunta, quando comparados ao grupo Controle, tiveram seus valores aumentados (MP:  $p=0,0034$ ; MP+MeHg:  $p=0,0001$ ), o grupo MeHg apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo de coexposição ( $p=0,488$ ).

Resultados para a quantificação de marcadores oxidativos em intestino grosso também indicam uma alteração nestes marcadores, particularmente durante a coexposição. Os resultados de grupamento -SH total (D) para esse tecido apresentaram diferenças significativas entre o grupo MeHg e MP+MeHg quando comparados ao grupo Controle (MeHg:  $p=0,0015$ ; MP+MeHg  $p=0,0016$ ), para o grupamento -SH não proteico (E) as diferenças foram significativas entre os nossos grupos de exposição e coexposição quando comparados ao grupo Controle (MP:  $p=0,0002$ ; MeHg:  $p=0,359$ ; MP+MeHg  $p<0,001$ ), diferenças significativas também foram apresentadas quando comparados o grupo MeHg ao grupo MP+MeHg ( $p=0,0382$ ), que apresentaram seus níveis reduzidos. Resultados da quantificação de espécies reativas a TBARS (F) tiveram aumento estatisticamente significativo apenas no grupo de coexposição comparado ao grupo Controle ( $p=0,167$ ).

Para determinação de toxicidade da medula foi avaliado a proporção de PCE/NCE (Figura 7A), diferenças significativas podem ser vistas quando comparados o grupo MeHg e o grupo MP+MeHg com o grupo Controle (MeHg:  $p=0,0013$ ; MP+MeHg $<0,0001$ ), os níveis totais de micronúcleos também foram quantificados (Figura 7B), nossos resultados apontam aumento destes níveis no grupo de coexposição quando comparado ao grupo Controle (MP+MeHg:  $p=0,0173$ ).

## **5. Discussão**

### **5.1. Exposição aos contaminantes leva à uma alteração na arquitetura tecidual, perda de moléculas de adesão e aumento da sinalização inflamatória no cólon**

A exposição ao MP provoca inflamação leve ou moderada na região do cólon no intestino grosso, caracterizada por leve infiltração inflamatória da mucosa, ativação de vias de sinalização pro-inflamatórias e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como demonstrado no trabalho de Zolotova et al (2023). Além disso, a exposição oral ao MeHg pode levar a distúrbios metabólicos no intestino. Segundo estudos in vivo, o MeHg induz o aumento de células inflamatórias no sistema mucoso gástrico, além de danificar as vilosidades e criptas do intestino delgado e grosso (Lin et al., 2021b), a exposição ao MeHg em doses elevadas também já foi relacionada a necrose leve das células intestinais (Bottino et al., 2016; Ruan et al., 2019) e alterações nas junções aderentes e resposta imune intestinal (Tian, X. 2023). Através da coloração H&E realizada em nossas amostras, foi possível visualizar o acúmulo de células inflamatórias nas regiões da submucosa e mucosa, tanto na exposição ao contaminante MeHg quanto na exposição ao MP+MeHg (Fig.2). Também foi possível observar um encurtamento nas criptas celulares nos três tratamentos, diferente do grupo Controle, o qual mostrou suas criptas profundas e bem recortadas, reforçando resultados de estudos em ratos in vivo, onde foi achado a presença de um grande número de aglomerados inflamatórios e danos nas vilosidades e paredes intestinais, tanto no intestino grosso quanto no delgado (Tian et al., 2022).

Os níveis de moléculas de adesão como claudinas, ocludinas, e caderinas são importantes para manter a plena estrutura do epitélio, essas proteínas que unem enterócitos adjacentes são cruciais para a manutenção e integridade da barreira epitelial (Suzuki et al., 2020), principalmente em tecidos como o intestino. A perda destas moléculas no intestino e da arquitetura do tecido intestinal, assim como elevada sinalização inflamatória e presença de células imunes, é característico de doenças inflamatórias intestinais e da perda do epitélio

intestinal, podendo levar a sangramentos por exemplo (Roessner et al., 2008). Nossos resultados indicam uma considerável perda de algumas destas moléculas durante a exposição aos contaminantes, onde os níveis de Ocludina-5 e Claudina (Fig.3A&B) apresentaram-se inferiores aos do grupo Controle, mostrando uma permeabilidade aumentada nesses tecidos. Além disso, foram quantificados os níveis da citocina pró inflamatória IL-1 $\beta$  (Fig.3C), nossos resultados indicam um aumento desta citocina nos grupos de exposição aos contaminantes.

## **5.2. A arquitetura alterada pode ser um indicativo da perda de produção do muco devido à uma alteração na microbiota dos animais**

A barreira química do intestino é composta por muco secretado por células epiteliais intestinais, sucos digestivos e substâncias bacteriostáticas secretadas por bactérias, uma produção perturbada de muco pode indicar dano celular (Tian et al., 2022). A perda de muco ou menor expressão de genes produtores de muco já foi observado para a contaminação de MP durante alguns estudos envolvendo roedores (Jin, Y. et al., 2019; Zolotova et al., 2023). Também já foi revisado que o MeHg pode levar a alterações da microbiota intestinal e produção anormal de metabólitos (Tian, X. et al 2023). Aqui avaliamos a cobertura de muco intestinal através de cortes histológicos do cólon dos animais perfundidos e utilizando a coloração de Alcian Blue. Através dessa técnica foi possível observar que a exposição individual com MP não obteve diferença significativa do grupo Controle, porém a exposição ao poluente MeHg e a exposição ao MP + MeHg induziram uma menor cobertura de muco em comparação com nosso grupo Controle (Fig.4).

Nesse trabalho, não foram investigadas as expressões de genes produtores de muco nesses animais, e isso pode ser considerado um ponto fraco do trabalho. No entanto, aqui nós realizamos a extração de RNA e sequenciamento da microbiota cecal dos animais, e outra hipótese para explicar essa perda da produção de muco observada no cólon, pode ser a perda da diversidade e de organismos que estimulam a produção de muco e pleno funcionamento dessa barreira imunológica e física ao meio externo. O ceco é a porção inicial do intestino grosso e é considerado um importante reservatório de microbiota pois diferente do resto do intestino, que possui em quase sua totalidade bactérias anaeróbicas, o ceco também apresenta uma considerável densidade de bactérias aeróbicas. Diversos trabalhos já demonstraram que os MPs são capazes de alterar a microbiota intestinal em diferentes organismos como ratos (Jiang et al., 2023), camundongos (Lu et al., 2018; Jin et al., 2019; Teng et al., 2022); e peixes (Jin et al., 2018; Feng et al., 2021); (Pei et al., 2022; Usman et al., 2022). Além disso, outros

trabalhos também já identificaram o MeHg como um agressor da microbiota em ratos (Wang et al., 2023), camundongos (Seki et al., 2021), peixes (Zhu et al., 2020), humanos (Yang et al., 2022).

A família Enterobacteriaceae é uma família muito diversa de bactérias aeróbicas gram-negativas e dentro dela estão incluídos diferentes simbiontes inofensivos e também algumas bactérias patogênicas como *Salmonella* e *E.Coli*, as diferenças observadas nessa família para o grupo MP devem ser mais profundamente avaliadas. Veillonellaceae e Lachnospiraceae são duas famílias de bactérias anaeróbicas presentes na microbiota de humanos e roedores e também se apresentaram elevadas durante a exposição ao MP. O gênero *Veillonella*, da família Veillonellaceae, é capaz de metabolizar lactato em propionato e acetato pela via da metil-malonil-CoA. Enquanto bactérias da família Lachnospiraceae são responsáveis pela metabolização de ácidos graxos de cadeia curta como butirato e acetato, estudos também já observaram uma contribuição de Lachnospiraceae para o desenvolvimento da diabetes de ratos obesos (Kameyama & Itoh, 2014). A família Aerococcaceae, identificada no grupo MeHg, já foi observada em infecções humanas (Stackebrandt, 2013) e acredita-se que a família Ruminococcaceae possui um importante papel na digestão de componentes da parede celular de plantas e, consequentemente de mucinas, já tendo sido documentado um aumento de *Ruminococcus* durante doenças inflamatórias intestinais. A obesidade já foi associada com maiores níveis e maior variedade de *Prevotella* e uma menor abundância de *Oscillospira* (Kaplan et al., 2019) observadas no grupo MP+MeHg.

Estes dados reforçam a nossa hipótese de que esses poluentes em conjunto podem apresentar efeito tóxico e causar uma alteração tanto à nível estrutural e celular quanto no que diz respeito à comunidade microbiana. Além disso, a produção anormal de metabólitos e alteração nos genes para produção de mucina podem também estar sendo responsáveis por causar uma menor produção de muco no epitélio intestinal causando a diminuição desta barreira, permitindo que tanto a porção microbiana quanto o conteúdo do lúmen entrem cada vez mais em contato direto com o epitélio, causando a ativação de sinais inflamatórios e a perda da arquitetura tecidual correta como tentamos demonstrar pelos resultados presentes nas Figuras 2 e 3.

### **5.3. Coexposição depleta os níveis de GSH e causa considerável formação de espécies reativas ao TBA**

Alguns estudos já observaram o papel do estresse oxidativo e da inflamação durante algumas doenças intestinais como a CU (Roessner et al., 2008; Wang et al., 2022). Além disso, níveis elevados de estresse oxidativo são característicos de inflamação e displasia tecidual alterando uma grande diversidade de funções celulares (Senoner et al., 2019; Teleanu et al., 2022). Os tióis proteicos são considerados os principais responsáveis pela ação antioxidante nas proteínas plasmáticas, e estão presentes nos resíduos de cisteína, os quais são suscetíveis a oxidação, originando dissulfetos e ácido sulfúrico, formas que inativam a função proteica (Moran et., al 2001). Nossos resultados mostram que a quantificação dos grupamentos tióis totais nos grupos de exposição apresentaram valores reduzidos, sugerindo a existência da situação de estresse oxidativo maior comparados ao Controle. A glutathiona reduzida é o principal excludente de radicais livres no organismo humano, a dosagem de tióis não proteicos avalia o conteúdo desse antioxidante no organismo (Townsend et., al 2003). Este antioxidante foi quantificado e obtivemos em nossos resultados a diminuição dos níveis de tióis não proteicos nos grupos de exposição aos contaminantes quando comparados ao Controle, reforçando a situação de estresse oxidativo em ambos os tecidos.

Apesar dos estudos envolvendo a contaminação com MP terem recebido mais atenção nos últimos anos, poucos trabalhos avaliam o dano a grupamentos tiólicos totais e não proteicos, durante a exposição à MP. Por outro lado, a análise desses grupamentos em estudos que envolvam o MeHg já é estudada há algum tempo e algumas dessas evidências foram apresentadas. Em relação aos lipídios, quantificou-se o dano oxidativo pela formação de espécies reativas ao TBA, como o MDA que é formado através do ataque de espécies reativas a um ácido graxo gerando um radical peroxil que é novamente oxidado à MDA ou 4-hidroxinonenal. Lipídios são um importante constituinte da membrana celular e também desempenham um papel no citosol. As diferentes formas de dano a essas moléculas, como o ensaio de TBARS, vêm sendo utilizadas mais amplamente para quantificação de dano oxidativo a lipídios quando comparado com o dano oxidativo a outras moléculas. Através dessa metodologia, foi possível observar um aumento nos níveis de TBARS no tecido intestinal durante a exposição aos contaminantes e que foi particularmente acentuado durante a coexposição (Fig.6H&K).

## 7. Conclusão

Ao longo dos últimos anos, tem havido uma extensa pesquisa sobre os efeitos biológicos de diversos poluentes, resultando em maior compreensão dos seus efeitos. Apesar da relevância, a contaminação por plástico só começou a receber a devida atenção recentemente. Nesse contexto, é contundente estudar o impacto dos contaminantes plásticos de diversas fontes, compreendendo seus efeitos combinados com outros poluentes, a fim de entender como a presença dos MPs no ser humano pode contribuir para o desenvolvimento de diferentes doenças.

Nesse estudo, observamos mudanças na arquitetura do epitélio do cólon além de presença de aglomerados de células inflamatórias. Também foram quantificados os níveis de proteínas de adesão, como Claudina-5 e Ocludina, onde os mesmos apresentaram-se reduzidos nos grupos expostos aos poluentes. Apesar dos esforços para o entendimento dos danos causados por MPs e MeHg mais estudos devem ser realizados, análises mais completas da estrutura e arquitetura do tecido por meio de imunofluorescência, ou também através do uso de técnicas como Western Blotting e rtPCR para quantificação das proteínas de adesão aqui observadas ou dos genes responsáveis por elas e também por outras moléculas de adesão presentes nas junções célula-célula.

Nossos resultados mostram que principalmente o MeHg e o MP+MeHg levaram a uma área de muco reduzida e que isso possivelmente tenha uma ligação com alterações na microbiota destes animais. Técnicas como a PCR elucidariam para se observar a expressão de genes como MUC1 e MUC2 e também análises mais criteriosas e à nível de gênero da composição microbiana destes animais para que possamos melhor compreender os processos em que essas bactérias estão envolvidas.

É importante ressaltar, que o TBARS é um ensaio não específico para quantificação de grupamentos MDA e, dessa forma, avaliar também outros marcadores de dano oxidativo à lipídios, como a formação de 4-hidroxinonenal e dienos conjugados, e também a oxidação a outras moléculas, como proteínas, é importante para avaliar o espectro redox completo da contaminação por MP e/ou MeHg nos trabalhos futuros. Avaliar também o papel destes contaminantes para o desenvolvimento ou colaboração de doenças inflamatórias intestinais, como Colite Ulcerativa e a Doença de Chron, podem também ajudar a melhor compreendermos o papel destes contaminantes em condições humanas já existentes.

## **8. Apoio Financeiro**

Esse projeto contou com apoio financeiro da Capes CNPQ FAPERGS. O projeto foi aprovado no CEUA e na PROPESQ/UFRGS para o uso de animais de laboratório sob o projeto número **36530**.

## **9. Conflito de Interesses**

Os autores afirmam não ter conflitos de interesses no presente trabalho.

## 10. Referencias

ABBASI, S. et al. Distribution and potential health impacts of microplastics and microrubbers in air and street dusts from Asaluyeh County, Iran. *Environmental pollution* (Barking, Essex: 1987), v. 244, p. 153–164, 2019.

ALEJANDRO, J. EL LADO GRIS DE LA MINERÍA DEL ORO. 2016.

ALI, I. et al. Micro- and nanoplastics in the environment: Occurrence, detection, characterization and toxicity – A critical review. *Journal of cleaner production*, v. 313, n. 127863, p. 127863, 2021.

BARNES, D. K. A. et al. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 364, n. 1526, p. 1985–1998, 2009.

BASTA, P. C. et al. Mercury exposure in Mundurucu indigenous communities from Brazilian Amazon: Methodological background and an overview of the principal results. *International journal of environmental research and public health*, v. 18, n. 17, p. 9222, 2021.

BOTTINO, C. et al. Impaired aquaporins expression in the gastrointestinal tract of rat after mercury exposure. *Journal of applied toxicology: JAT*, v. 36, n. 1, p. 113–120, 2016.

BRENNECKE, D. et al. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, coastal and shelf science*, v. 178, p. 189–195, 2016.

CHANEY, R. L. *The heavy elements: Chemistry, environmental impact, and health effects*: J.E. fergusson, pergamon press, Maxwell house, Fairview Park, Elmsford, NY 10523. 1990. 614 p. \$45 (softcover). ISBN 008-0402755. *Journal of environmental quality*, v. 20, n. 4, p. 876–876, 1991.

CHOI, Y. J. et al. Inflammatory response in the mid colon of ICR mice treated with polystyrene microplastics for two weeks. *Laboratory animal research*, v. 37, n. 1, 2021.

CRESPO-LÓPEZ, M. E. et al. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, v. 60, n. 4, p. 212–220, 2009.

- DENG, Y. et al. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, 2017.
- DENG, Y. et al. Evidence that microplastics aggravate the toxicity of organophosphorus flame retardants in mice (*Mus musculus*). *Journal of hazardous materials*, v. 357, p. 348–354, 2018.
- EERKES-MEDRANO, D.; THOMPSON, R. C.; ALDRIDGE, D. C. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water research*, v. 75, p. 63–82, 2015.
- ERIKSEN, M. et al. Plastic pollution in the world's oceans: More than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PloS one*, v. 9, n. 12, p. e111913, 2014.
- FANG, S. et al. Adsorption behavior of three triazole fungicides on polystyrene microplastics. *The Science of the total environment*, v. 691, p. 1119–1126, 2019.
- FENG, S. et al. Polystyrene microplastics alter the intestinal microbiota function and the hepatic metabolism status in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *The Science of the total environment*, v. 759, n. 143558, p. 143558, 2021.
- GAO, X. et al. Behaviors and influencing factors of the heavy metals adsorption onto microplastics: A review. *Journal of cleaner production*, v. 319, n. 128777, p. 128777, 2021.
- GIBB, H.; O'LEARY, K. G. Mercury exposure and health impacts among individuals in the artisanal and small-scale gold mining community: A comprehensive review. *Environmental health perspectives*, v. 122, n. 7, p. 667–672, 2014.
- Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/guidance-for-identifying-populations-at-risk-from-mercury-exposure>>. Acesso em: 27 jan. 2024.
- HONG, Y.-S.; KIM, Y.-M.; LEE, K.-E. Methylmercury exposure and health effects. *Yebang Uihakhoe chi [Journal of preventive medicine and public health]*, v. 45, n. 6, p. 353–363, 2012.
- HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the Microbiota and the immune system. *Science (New York, N.Y.)*, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 2012.

HUERTA LWANGA, E. et al. Field evidence for transfer of plastic debris along a terrestrial food chain. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017.

IVAR DO SUL, J. A.; COSTA, M. F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, v. 185, p. 352–364, 2014.

JIA, R. et al. Exposure to polypropylene microplastics via oral ingestion induces colonic apoptosis and intestinal barrier damage through oxidative stress and inflammation in mice. *Toxics*, v. 11, n. 2, p. 127, 2023.

JIANG, W. et al. Dysregulation of the microbiota-brain axis during long-term exposure to polystyrene nanoplastics in rats and the protective role of dihydrocaffeic acid. *The Science of the total environment*, v. 874, n. 162101, p. 162101, 2023.

JIN, Y. et al. Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, v. 235, p. 322–329, 2018.

JIN, Y. et al. Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. *The Science of the total environment*, v. 649, p. 308–317, 2019.

KAMEYAMA, K.; ITOH, K. Intestinal colonization by a Lachnospiraceae bacterium contributes to the development of diabetes in obese mice. *Microbes and environments*, v. 29, n. 4, p. 427–430, 2014.

KAPLAN, R. C. et al. Gut microbiome composition in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos is shaped by geographic relocation, environmental factors, and obesity. *Genome biology*, v. 20, n. 1, 2019.

LI, B. et al. Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice. *Chemosphere*, v. 244, n. 125492, p. 125492, 2020.

LIN, X. et al. Towards screening the neurotoxicity of chemicals through feces after exposure to methylmercury or inorganic mercury in rats: A combined study using gut microbiome, metabolomics and metallomics. *Journal of hazardous materials*, v. 409, n. 124923, p. 124923, 2021.

- LIU, M. et al. Impacts of farmed fish consumption and food trade on methylmercury exposure in China. *Environment international*, v. 120, p. 333–344, 2018.
- LIU, Y. et al. Using nanoselenium to combat Minamata disease in rats: the regulation of gut microbes. *Environmental science. Nano*, v. 8, n. 5, p. 1437–1445, 2021.
- LOVELL, D. P. et al. Analysis of historical negative control group data from the rat in vivo micronucleus assay. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, v. 849, n. 503086, p. 503086, 2020.
- LU, L. et al. Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *The Science of the total environment*, v. 631–632, p. 449–458, 2018.
- LUO, T. et al. Maternal polystyrene microplastic exposure during gestation and lactation altered metabolic homeostasis in the dams and their F1 and F2 offspring. *Environmental science & technology*, v. 53, n. 18, p. 10978–10992, 2019.
- MARTÍNEZ, C. et al. Cellular and molecular basis of intestinal barrier dysfunction in the irritable bowel syndrome. *Gut and liver*, v. 6, n. 3, p. 305–315, 2012.
- MASON, R.; PIRRONE, N. (EDS.). *Mercury fate and transport in the global atmosphere: Emissions, measurements and models*. Boston, MA: Springer US, 2009.
- MEHRI, A. Trace elements in human nutrition (II) – an update. *International Journal of Preventive Medicine*, v. 11, 2020.
- MORAN, L. K.; GUTTERIDGE, J. M. C.; QUINLAN, G. J. Thiols in Cellular Redox Signalling and Control. *Current Medicinal Chemistry*, v. 8, n. 7, p. 763–772, [s.d.].
- NICHOLSON, J. K. et al. Host-gut Microbiota metabolic interactions. *Science (New York, N.Y.)*, v. 336, n. 6086, p. 1262–1267, 2012.
- OBBARD, R. W. et al. Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. *Earth's future*, v. 2, n. 6, p. 315–320, 2014.
- PEI, X.; HENG, X.; CHU, W. Polystyrene nano/microplastics induce microbiota dysbiosis, oxidative damage, and innate immune disruption in zebrafish. *Microbial pathogenesis*, v. 163, n. 105387, p. 105387, 2022.

- PRATA, J. C. Airborne microplastics: Consequences to human health? *Environmental pollution* (Barking, Essex: 1987), v. 234, p. 115–126, 2018.
- PRATA, J. C. et al. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *The Science of the total environment*, v. 702, n. 134455, p. 134455, 2020.
- RAGUSA, A. et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment international*, v. 146, n. 106274, p. 106274, 2021.
- RAMOS, A. R. A.; OLIVEIRA, K. A. DE; RODRIGUES, F. DOS S. Mercury-based mining in Yanomami indigenous lands and accountabilities. *Ambiente & sociedade*, v. 23, p. e03262, 2020.
- REDONDO-HASSELERHARM, P. E.; RICO, A.; KOELMANS, A. A. Risk assessment of microplastics in freshwater sediments guided by strict quality criteria and data alignment methods. *Journal of hazardous materials*, v. 441, n. 129814, p. 129814, 2023.
- RIST, S. et al. A critical perspective on early communications concerning human health aspects of microplastics. *The Science of the total environment*, v. 626, p. 720–726, 2018.
- ROESSNER, A. et al. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathology, research and practice*, v. 204, n. 7, p. 511–524, 2008.
- ROSENBERG, E. et al. (EDS.). *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- RUAN, Y. et al. High doses of copper and mercury changed cecal Microbiota in female mice. *Biological trace element research*, v. 189, n. 1, p. 134–144, 2019.
- SANZ, Y.; DE PALMA, G. Gut Microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function. *International reviews of immunology*, v. 28, n. 6, p. 397–413, 2009.
- SCHWABL, P. et al. Detection of various microplastics in human stool: A prospective case series. *Annals of internal medicine*, v. 171, n. 7, p. 453–457, 2019.

SEKI, N. et al. Adverse effects of methylmercury on gut bacteria and accelerated accumulation of mercury in organs due to disruption of gut microbiota. *The Journal of toxicological sciences*, v. 46, n. 2, p. 91–97, 2021.

SENONER, T.; DICHTL, W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: Still a therapeutic target? *Nutrients*, v. 11, n. 9, p. 2090, 2019.

SORRENTINO, A.; VITTORIA, V. Structure, morphology, and crystallization behavior of syndiotactic polystyrene. *Syndiotactic Polystyrene* Wiley, , 9 Nov. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/9780470557006.ch9>>

SUN, H. et al. Effects induced by polyethylene microplastics oral exposure on colon mucin release, inflammation, gut microflora composition and metabolism in mice. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 220, n. 112340, p. 112340, 2021.

SUZUKI, T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal science journal*, v. 91, n. 1, 2020.

TELEANU, D. M. et al. An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 11, p. 5938, 2022.

TENG, M. et al. Polystyrene nanoplastics toxicity to zebrafish: Dysregulation of the brain–intestine–Microbiota axis. *ACS nano*, v. 16, n. 5, p. 8190–8204, 2022.

THOMPSON, R. C. et al. Lost at sea: Where is all the plastic? *Science (New York, N.Y.)*, v. 304, n. 5672, p. 838–838, 2004.

TIAN, X. et al. Gut as the target tissue of mercury and the extraintestinal effects. *Toxicology*, v. 484, n. 153396, p. 153396, 2023.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]*, v. 57, n. 3–4, p. 145–155, 2003.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, v. 489, n. 7415, p. 242–249, 2012.

USMAN, S. et al. Polystyrene microplastics induce gut microbiome and metabolome changes in Javanese medaka fish (*Oryzias javanicus* Bleeker, 1854). **Toxicology reports**, v. 9, p. 1369–1379, 2022.

VAN CAUWENBERGHE, L.; JANSSEN, C. R. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, v. 193, p. 65–70, 2014.

WANG, L.; WANG, J. Honokiol ameliorates DSS-induced mouse colitis by inhibiting inflammation and oxidative stress and improving the intestinal barrier. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2022, p. 1–15, 2022.

WANG, W. et al. Neurotransmitter disturbances caused by methylmercury exposure: Microbiota-gut-brain interaction. *The Science of the total environment*, v. 873, n. 162358, p. 162358, 2023.

XIE, S. et al. Microplastics perturb colonic epithelial homeostasis associated with intestinal overproliferation, exacerbating the severity of colitis. *Environmental research*, v. 217, n. 114861, p. 114861, 2023.

YANG, Y.-F. et al. Toxicity-based toxicokinetic/toxicodynamic assessment for bioaccumulation of polystyrene microplastics in mice. *Journal of hazardous materials*, v. 366, p. 703–713, 2019.

YONG, C.; VALIYAVEETIL, S.; TANG, B. Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. *International journal of environmental research and public health*, v. 17, n. 5, p. 1509, 2020.

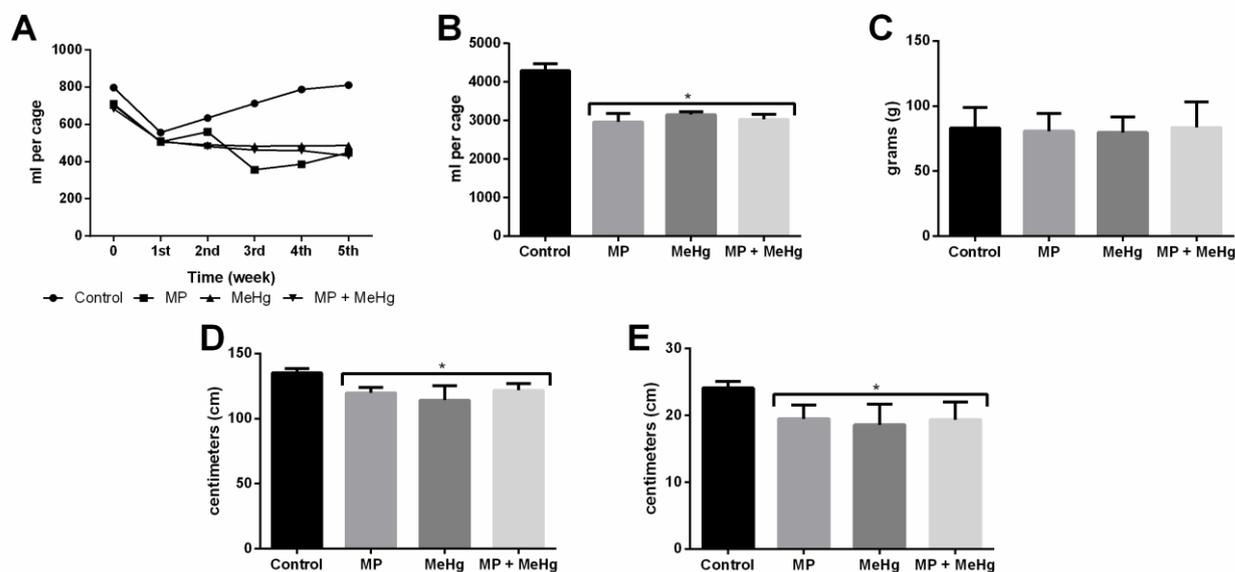
ZHANG, D.-X. et al. Effect of *Bacillus velezensis* on *Aeromonas veronii*-Induced Intestinal Mucosal Barrier Function Damage and Inflammation in Crucian Carp (*Carassius auratus*). *Frontiers in microbiology*, v. 10, 2019.

ZHU, J. et al. Low-dose methylmercury exposure impairs the locomotor activity of zebrafish: Role of intestinal inositol metabolism. *Environmental research*, v. 190, n. 110020, p. 110020, 2020.

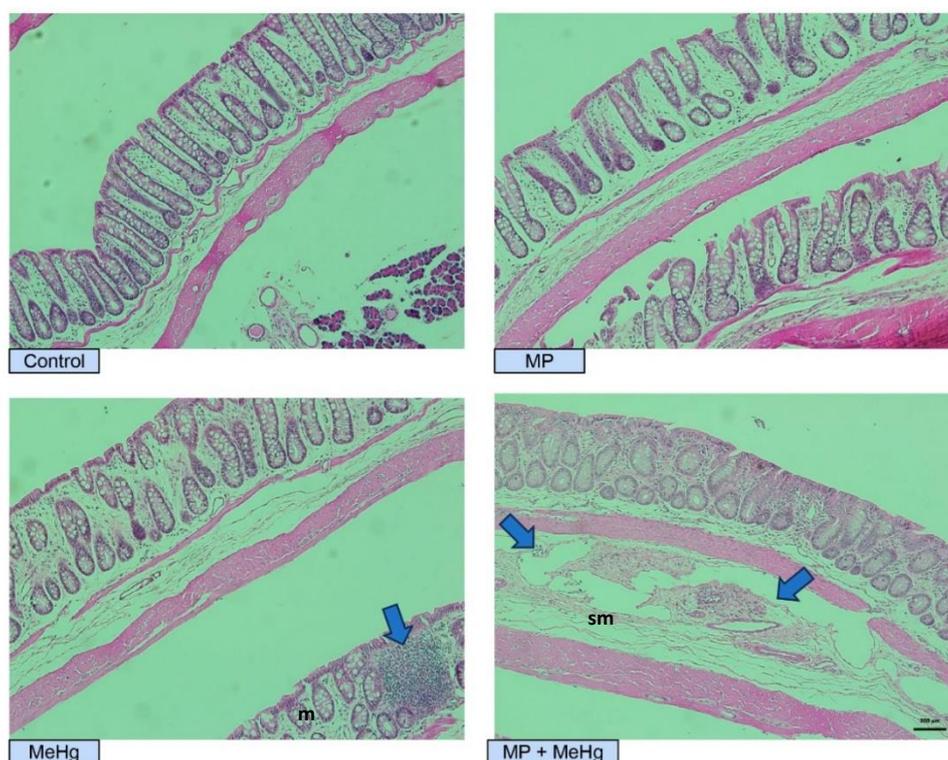
ZOLOTOVA, N. et al. Influence of microplastics on morphological manifestations of experimental acute colitis. *Toxics*, v. 11, n. 9, p. 730, 2023.

## Figuras:

Figura 1:

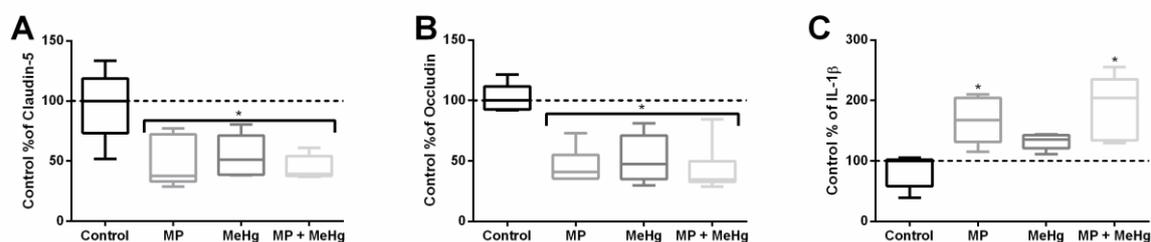


**Legenda Figura 1:** (A) Volume de água consumido mensalmente por gaiola. (B) Volume total de água consumido por gaiola (C) Peso dos ratos ao final do tratamento. (D) Ratos dos grupos tratados apresentaram comprimento reduzido do intestino delgado comparados ao grupo Controle. (E) Os grupos tratados também tiveram encurtamento do intestino grosso quando comparados aos animais do Controle. As médias foram comparadas entre si e analisadas por ANOVA de uma via seguido de pós teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas estão representadas por \* quando  $p < 0,05$  média  $\pm$  desvio padrão.



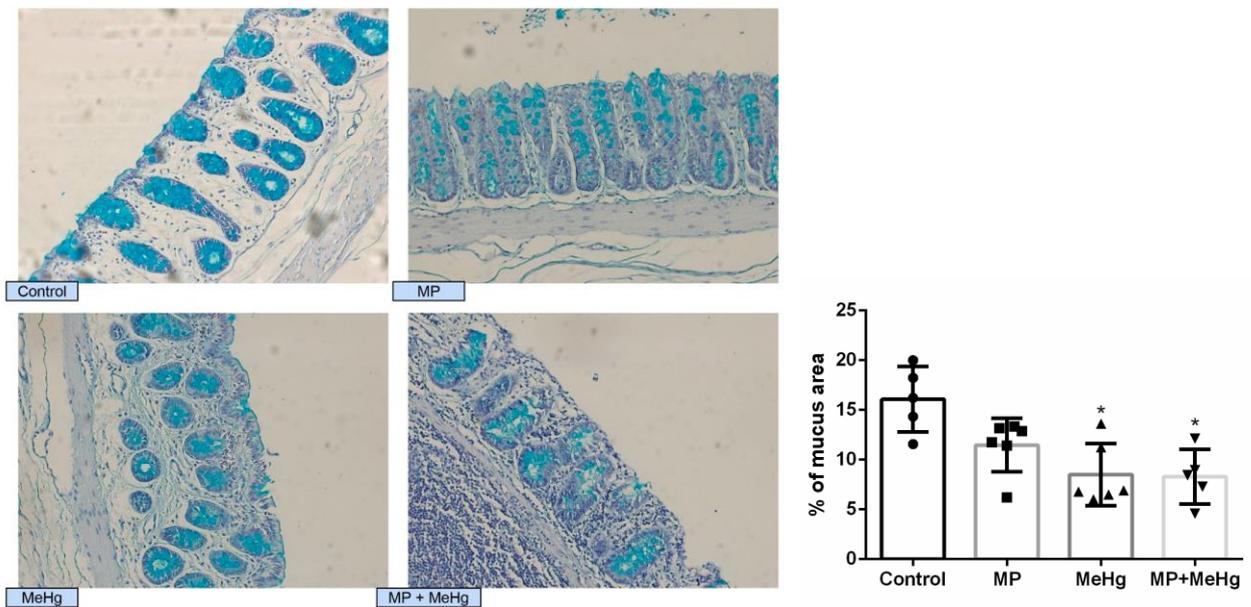
**Figura 2:**

**Legenda Figura 2:** Lâminas representativas em tecido de cólon coradas com H&E, onde é possível observar as camadas da mucosa (m) e submucosa (sm) do tecido. No grupo MeHg é possível observar um aglomerado de células inflamatórias (setas em azul) na região da mucosa intestinal, no grupo da coexposição o aglomerado de células inflamatórias encontrou-se presente na região da submucosa intestinal.



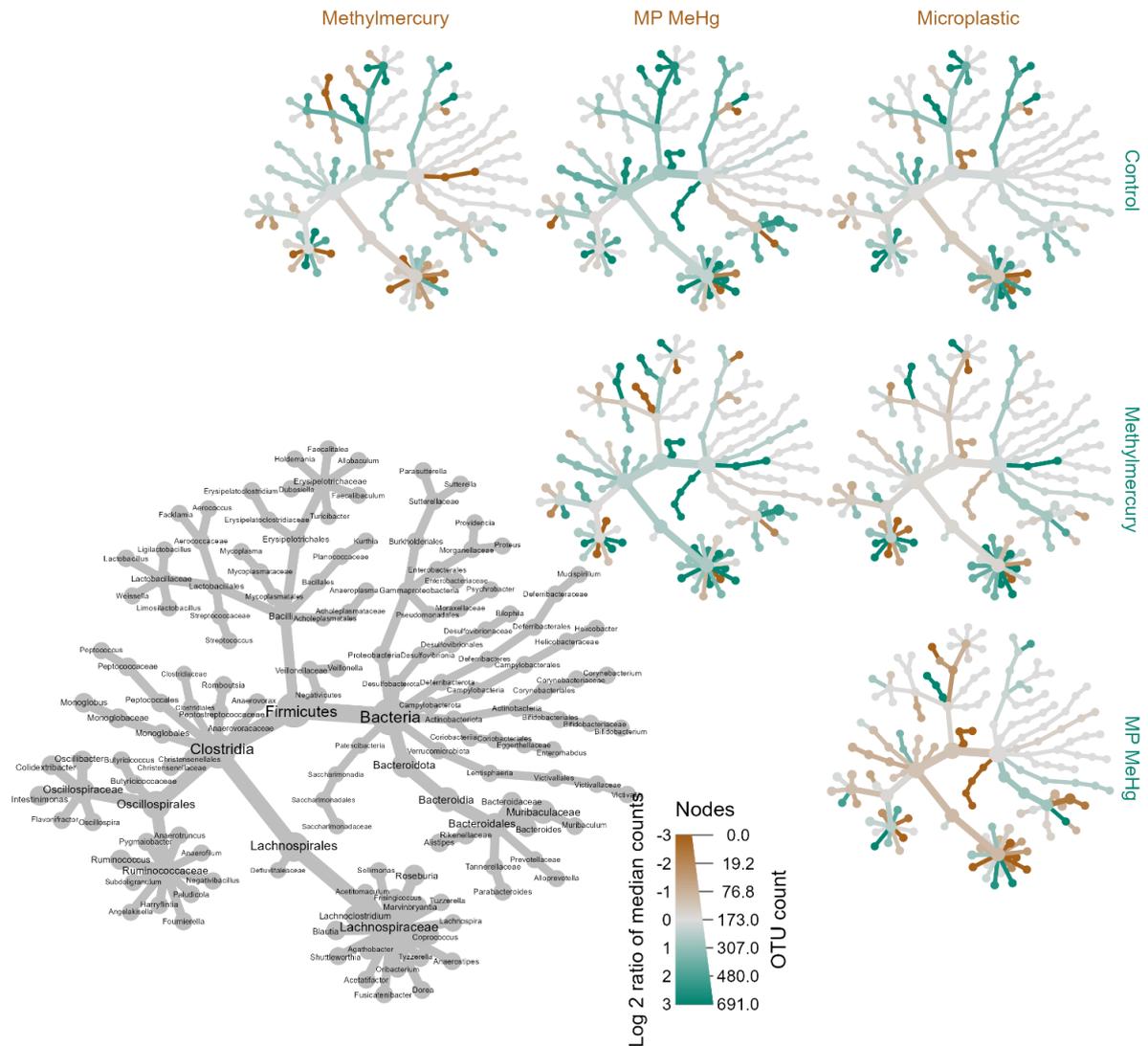
**Figura 3:**

**Legenda Figura 3:** Gráficos da quantificação de Claudina-5 (A), Occludina (B) e IL-1 $\beta$  (C) em cólon através da E.L.I.S.A., resultados estão representados pela média em relação ao Controle. Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via utilizando um pós-teste de Bonferroni, os \* representam diferenças estatísticas quando  $p < 0,05$  média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 4:**

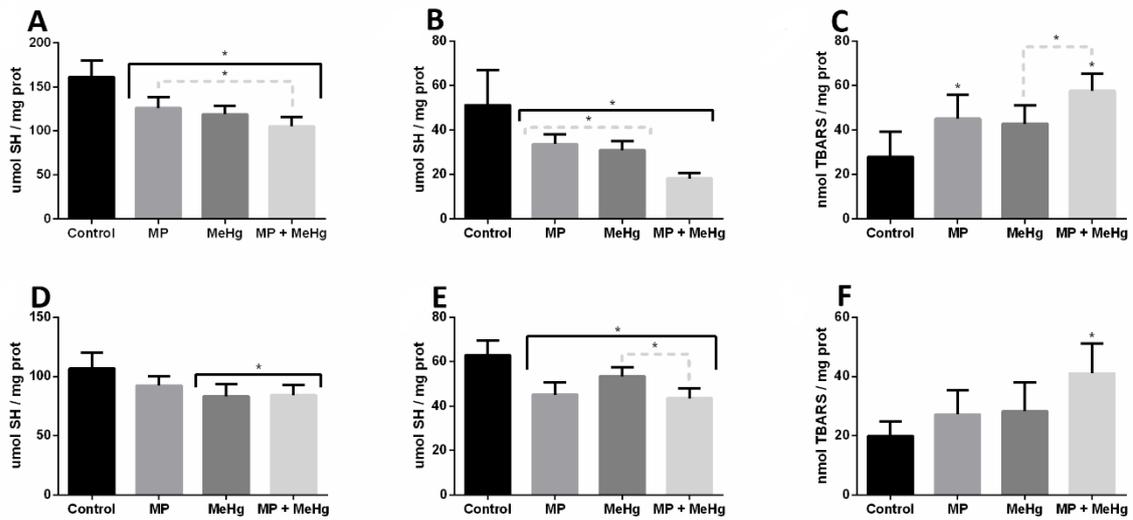
**Legenda Figura 4:** Imagem representativa da quantificação do corante azul de alciano em cortes histológicos do cólon dos animais expostos (A), gráficos de barra dos valores da quantificação das lâminas de azul de alciano no cólon (B). O grupo MeHg assim como o grupo de exposição conjunta obtiveram menor área de muco quando comparados ao Controle indicando uma perda dessa barreira no tecido destes animais. As médias foram comparadas entre si e analisadas por ANOVA de uma via seguido de pós teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas estão representadas por \* quando  $p < 0,05$  média  $\pm$  desvio padrão.



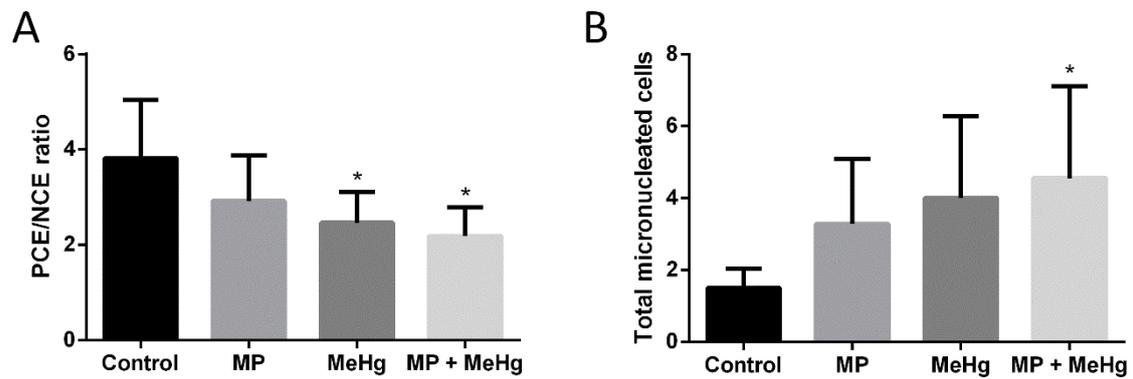
**Figura 5:**

**Legenda Figura 5:** Táxons metacodificados de amplificação da microbiota cecal, a árvore cinza deve ser usada como chave. Um táxon colorido de marrom é mais abundante no grupo experimental da coluna, enquanto um táxon colorido de verde é mais abundante no grupo experimental da linha.

Figura 6:



**Legenda Figura 6:** Quantificação de marcadores de dano oxidativo em tecido de intestino delgado (A-C) e intestino grosso (D-F) após exposição aos contaminantes. Onde o (A e D) representam -SH total, em (E e J) -SH não proteico, (C e F) apresentam a quantificação de espécies reativas ao TBARS. As médias foram comparadas entre si e analisadas por ANOVA de uma via seguido de pós teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas estão representadas por \* quando  $p < 0,05$  média  $\pm$  desvio padrão.



**Legenda Figura 7:** Quantificação da razão entre eritrócitos policromáticos (PCE)/eritrócitos normocromáticos (NCE) (A) e o total de células micronucleadas por mil células (B). As médias foram comparadas entre si e analisadas por ANOVA de uma via seguido de pós teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas estão representadas por \* quando  $p < 0,05$  média  $\pm$  desvio padrão.