

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Alberto Martins Silva

Trabalho a ser submetido à Revista *Chemosphere* sob o título:
Efeitos isolados e combinados da administração de
micropartículas de Poliestireno e Metilmercúrio em ratos Wistar:
uma análise de parâmetros de estresse oxidativo e microbiota

Porto Alegre

2023

Alberto Martins Silva

**Efeitos isolados e combinados da administração de
micropartículas de Poliestireno e Metilmercúrio em ratos Wistar:
uma análise de parâmetros de estresse oxidativo e microbiota**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Co-orientador: Henrique Mautone Gomes

Porto Alegre

2023

Efeitos isolados e combinados da administração de micropartículas de Poliestireno e Metilmercúrio em ratos Wistar: estresse oxidativo e microbiota

Alberto Martins Silva^{a@}, Henrique Mautone Gomes ^a, Alexandre Kléber Silveira ^a, Luiz Filipe Bastos Mendes^a, Daniel Pens Gelain^a, José Cláudio Fonseca Moreira ^a.

^a 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;

@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: alberto.silva@ufrgs.br

Abreviações:

MPs - Microplásticos; PS-MPs - Microplásticos de Poliestireno; Hg - Mercúrio; MeHg - Metilmercúrio; CREAL - Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório; PBS - Tampão fosfato salina; TBARS - Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; TBA - Ácido Tiobarbitúrico; TCA - Ácido Tricloroacético; SH - Tiol reduzido; DTNB - 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DNTB); DNPH - Dinitrofenilhidrazina; PCR - Reação em cadeia da Polimerase; Glutathiona - GSH; Nrf2 - Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2;

1 **Resumo:** Os microplásticos (MPs) e o metilmercúrio (MeHg) são contaminantes amplamente
2 presentes no ambiente, tornando a exposição humana inevitável. Já foi demonstrado que
3 tanto diferentes MPs como o MeHg têm o estresse oxidativo como precursor de toxicidade.
4 Esse estudo tem como objetivo determinar o dano oxidativo em fígado, rins e coração, assim
5 como avaliar possíveis alterações na composição microbiana cecal em ratos Wistar machos
6 expostos a microplásticos de poliestireno (PS-MPs e/ou MeHg de maneira isolada e
7 combinada. A exposição se deu através da água com doses de PS-MPs de 1 mg/L e MeHg de
8 0,5 mg/kg. A normobiose foi mantida com a administração dos contaminantes apesar de ter
9 sido observado encurtamento nos intestinos delgado e grosso dos animais expostos.
10 Alterações nos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo foram observadas durante as
11 exposições isolada e combinada em fígado, coração e rins. Coletivamente, nossos resultados
12 indicam uma alteração morfológica no intestino e alguma alteração na composição
13 microbiana, assim como uma sinergia na toxicidade de PS-MPs e MeHg, principalmente no
14 fígado. Este estudo é o primeiro a avaliar alterações nos parâmetros de estresse oxidativo e na
15 microbiota de ratos Wistar machos tratados com PS-MPs e MeHg, fornecendo indícios dos
16 riscos à saúde decorrentes da contaminação por estes compostos isolados, mas que podem ter
17 seus efeitos potencializados quando combinados.

18 **Palavras-chave:** Microplástico; Metilmercúrio; Contaminante ambiental; Estresse
19 oxidativo; Microbiota.

20 1. Introdução

21 Com o contínuo aumento na produção de plástico para fabricação de embalagens e
22 produtos de uso diário que, em geral, são descartáveis, também cresce o número de resíduos
23 plásticos mal descartados. Muitos desses itens acabam chegando na água, onde já
24 representam 50 a 80% do lixo marinho e, portanto, podem ser considerados onipresentes em
25 ambientes aquáticos (Barnes et al., 2009). Uma vez no ambiente, devido à centenária ou
26 milenar longevidade dos plásticos, estes podem lentamente se fragmentar em pedaços cada
27 vez menores, que passam a ser classificados de microplásticos (MPs) a partir de seu tamanho
28 quando menores que 5mm (Koelmans et al., 2015), e também através da sua origem, quando
29 gerados através da degradação por radiação UV, ação biológica e/ou abrasão no ambiente,
30 são chamados de MPs secundários (Thompson et al., 2004). Os MPs primários, que são
31 liberados no ambiente já em forma de micropartículas, têm como sua principal fonte de
32 contaminação ambiental a lavagem de roupas de tecido sintético (De Falco et al., 2019).

33 A poluição por MPs tem recebido grande atenção e representa um problema ambiental
34 expressivo (da Costa, 2018). Cerca de 5 trilhões de MPs já foram detectados em diversos
35 ambientes e representam 250 mil toneladas flutuando nos oceanos (Eriksen et al., 2014).
36 Dentre os diversos tipos de plásticos, o poliestireno (PS), devido a suas propriedades físicas
37 como isolamento térmico e transparência, é frequentemente manufaturado em itens de uso
38 único e, deste modo, tendo descarte rápido e massivo (Schellenberg, 2009). Portanto, é
39 importante entender a toxicidade de microplásticos de poliestireno (PS-MPs) e seus
40 potenciais riscos à saúde humana e à biota (Hwang et al., 2020).

41 MPs podem ser considerados onipresentes em águas superficiais, subterrâneas e
42 residuais, portanto, outros poluentes presentes na água são passíveis de serem adsorvidos
43 pelos MPs e terem sua exposição e bioacumulação facilitada, gerando um problema
44 ambiental maior (Galloway et al., 2017); (Koelmans et al., 2019). Além disso, já foi relatada
45 a presença de MPs em placenta e em fezes humanas (Ragusa et al., 2021); (Schwabl et al.,
46 2019).

47 Ao serem ingeridos ou inalados pela biota, os PS-MP podem representar uma ameaça
48 por causar diversos efeitos tóxicos subletais e respostas a nível celular como dano oxidativo,
49 ativação de defesas antioxidantes e inflamação (Anbumani and Kakkar, 2018) . As três vias
50 de contaminação por MPs em seres humanos são a via dermal, menos frequente e pouco
51 explorada; a via por inalação, comum em cidades poluídas e em trabalhadores da indústria

52 têxtil e de reciclagem; e a via por ingestão, sendo esta última a mais expressiva via de
53 contaminação humana (Prata et al., 2020).

54 Os PS-MP, principalmente no ambiente marinho, podem representar uma rota
55 adicional de contaminação para outros contaminantes ambientais prejudiciais através da sua
56 capacidade de adsorver pesticidas, microorganismos e metais pesados como o mercúrio (Hg)
57 (Fang et al., 2019). A possível dessorção destes químicos dos MPs após sua ingestão pode
58 aumentar a exposição e bioacumulação de contaminantes (Koelmans et al., 2022).

59 Somado ao problema da poluição por MPs temos a crescente acumulação de
60 metilmercúrio (MeHg) também nos corpos hídricos. O Hg é um componente natural na crosta
61 terrestre e é liberado no ambiente por razões naturais e como resultado de atividade humana
62 (Mason and Pirrone, 2009). A mineração de ouro é uma das maiores fontes de contaminação
63 por Hg, principalmente em pequena escala e de maneira artesanal (Gibb and O’Leary, 2014),
64 e geralmente ocorre em áreas onde a população local utiliza peixes e outros pescados como
65 fonte primária de proteínas, aumentando a exposição destas populações ao Hg, como é o caso
66 dos povos indígenas amazônicos Yanomami e Munduruku (Ramos et al., 2020) (Basta et al.,
67 2021).

68 Ao chegar em corpos d’água, o Hg pode ser convertido em MeHg por bactérias
69 sulfato-redutoras, com um potencial de biomagnificação enorme, suas concentrações são
70 capazes de passar de 1 ng/L na água até 1 mg/kg em peixes piscívoros (Hintelmann, 2010).
71 Além disso, a exposição a estes compostos organomercuriais leva a disfunções neurológicas,
72 renais e cardiovasculares em humanos (Hong et al., 2012) .

73 Um fator importante a ser levado em conta na toxicidade de poluentes é a integridade
74 da microbiota intestinal. A microbiota intestinal é composta por comunidades microbianas
75 comensais, simbióticas e patogênicas que são toleradas pelo sistema imune do hospedeiro
76 (Tremaroli and Bäckhed, 2012). Em sua maioria são bactérias, mas também incluem
77 arqueias, fungos, protozoários e vírus, que desempenham várias funções na fisiologia do
78 hospedeiro como produção de metabólitos, peptídeos e proteínas, absorção de nutrientes e o
79 aumento da proteção contra poluentes ambientais (Hooper et al., 2012); (Nicholson et al.,
80 2012).

81 O entendimento das respostas de estresse celular e a sua relação com exposição a MPs
82 junto com outros contaminantes são importantes para a avaliação dos efeitos subletais de
83 longo prazo dos MPS (Gao et al., 2021). Portanto, levando-se os dados apresentados acima, o
84 objetivo deste trabalho é determinar o dano oxidativo em fígado, rins, e coração, assim como
85 avaliar possíveis alterações na microbiota em ratos Wistar machos expostos a PS-MP e/ou

86 MeHg de maneira isolada e combinada, mimetizando o que pode estar acontecendo em
87 muitos ambientes aquáticos.

88 **2. Materiais e Métodos**

89 **2.1. Reagentes**

90 **2.1.1 Microplástico**

91 Foram usadas esferas microplásticas de poliestireno, de 50 µm de tamanho,
92 adquiridos da empresa Spherotech. O tratamento com PS-MPs se deu na dose de 1000 µg/L,
93 de acordo com (Lu et al., 2018), através da diluição destes na água, que foi disponibilizada
94 nas garrafas dos animais *ad libitum*. Brevemente, 1000 µg de MP foram diluídos em 1 litro
95 de água. A dose escolhida para ser utilizada foi a mesma que apresentou os efeitos mais
96 evidentes no trabalho de (Lu et al., 2018), sendo cerca de 1.456×10^4 partículas por litro.

97 **2.1.2 Metilmercúrio**

98 O tratamento de MeHg se deu através da diluição na água disponível nas garrafas dos
99 animais *ad libitum*, a água utilizada na diluição é a mesma água ofertada aos animais pelo
100 biotério. A dose de MeHg escolhida é a de 0,5 mg/L, baseada nas concentrações ambientais e
101 no consumo de peixe per capita na Colômbia, sendo a metodologia já empregada em outros
102 trabalhos do nosso grupo utilizando o MeHg como contaminante (Espitia-Pérez et al.,
103 2018b); (Espitia-Pérez et al., 2018a)

104 **2.2. Animais e tratamento**

105 **2.2.1 Animais**

106 32 ratos Wistar machos com 30 dias de vida, disponibilizados pelo CREAL, foram
107 utilizados para o desenvolvimento deste estudo. Assim que disponibilizados, os ratos foram
108 mantidos em caixas de propileno (41 x 34 x 18 cm) com maravalhas e permaneceram numa
109 sala especial para os animais em experimentação onde foram mantidos com distribuição de

110 até 4 animais por caixa. Os animais foram mantidos num ciclo de 12h de luz com temperatura
111 constante de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com acesso livre a água e alimento.

112 O projeto cadastrado na plataforma UFRGS (número #36530) foi aprovado pelo
113 CEUA-UFRGS.

114 **2.2.2 Tratamento**

115 Com 30 dias de vida foi iniciado o tratamento dos animais com duração de 8 semanas,
116 estes foram divididos em quatro grupos:

117

118 1) Grupo Controle = 8 animais

119 2) Tratamento individual de MPs = 8 animais

120 3) Tratamento individual de MeHg = 8 animais

121 4) Tratamento associado de MPs e MeHg = 8 animais

122 Total: 32 animais

123 **2.2.3 Eutanásia e obtenção das amostras**

124

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

131 Imediatamente após a decapitação, serão dissecados os órgãos e de interesse sobre
132 gelo: fígado, rins, coração, e as porções do intestino. Todos tecidos serão coletados e
133 armazenados em freezer a -80°C até a realização das análises. As carcaças dos animais serão
134 encaminhadas ao Biotério do Departamento de Bioquímica, dentro de sacos plásticos
135 específicos para o descarte de material biológico e serão mantidas a -20°C até a coleta pela
136 empresa contratada responsável pelo descarte apropriado.

137 **2.3. Análises bioquímicas e morfométricas**

138 **2.3.1. Padronização das amostras**

139 As amostras foram homogeneizadas utilizando 400 µL de tampão fosfato salina (PBS)
140 em homogeneizador de tecidos Cole-Parmer LabGEN 125. As amostras foram centrifugadas
141 a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo para a
142 técnica de quantificação. A concentração total de proteínas dos homogenatos foi feita através
143 do método de Bradford e utilizado para a normalização dos dados. Brevemente, as amostras
144 foram diluídas, 10 µL das amostras foram transferidos para um tubo com 90 µL de NaCl e
145 adicionado 1 mL de Comassie blue e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. 200
146 µL da solução desses tubos foram transferidos para placas de 96 poços e a leitura foi feita a
147 532 nm (Bradford, 1976).

148

149 **2.3.2. Quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

150 Esta técnica quantifica extremidades aldeídicas dos lipoperóxidos que reagem com o
151 ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido e altas temperaturas como parâmetro de
152 lipoperoxidação. Para isso, utiliza-se uma quantidade fixa de proteínas a serem precipitadas
153 pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 15% e centrifugação a 10.000 g por 10
154 minutos. Transfere-se 100 µL do sobrenadante à placa e adiciona-se 100 µL de TBA 0,67% e
155 incuba-se a 100 °C por 20 minutos para a reação ocorrer. A leitura é feita em
156 espectrofotômetro em 532 nm (Esterbauer and Cheeseman, 1990).

157 **2.3.3. Quantificação dos grupamentos SH totais (tióis reduzidos)**

158 A técnica utilizada para a quantificação de grupamentos SH total valendo-se da reação
159 entre o tiol reduzido e o Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) é feita diretamente em
160 placas de 96 poços. Utiliza-se uma quantidade fixa de proteína combinada com 30 µL de
161 tampão forte, 10 µL de DTNB 10 mM e completa-se com PBS 10 mM para o volume final de
162 200 µL. Para a reação, é incubada por 1h à temperatura ambiente e a leitura é feita em
163 espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm (Ellman, 1959).

164 **2.3.4. Quantificação de grupamentos carbonila**

165 A quantificação dos grupamentos carbonila é baseada na reação com
166 dinitrofenilhidrazina (DNPH), onde utiliza-se uma quantidade fixa de proteína que é
167 precipitada por adição de ácido tricloroacético (TCA) a 20%, após centrifugação de 5
168 minutos a 4000xg, descarta-se o sobrenadante. O precipitado é ressuspensionado em 100µL de
169 NaOH 0,2 M e, então, adicionado o DNPH a 10 mM. Após a incubação de 1 hora com
170 agitações a cada 15 minutos, adiciona-se 100 µL de TCA 20% e centrifuga-se por 5 minutos
171 a 16000xg, após, realiza-se 3 lavagens de 500 µL com solução etanol/acetato de etila (1:1)
172 centrifugando as amostras a 16000xg por 5 minutos. O precipitado é então ressuspensionado em
173 1 mL de uréia (8M, pH 2,3) e centrifugado por 4 minutos a 16000xg para remoção de
174 material insolúvel. Ao final, transferiu-se 200 µL do sobrenadante para a placa de 96 poços e
175 a leitura é feita em espectrofotômetro a 370 nm (Levine et al., 1990).

176 **2.3.5. Determinação de parâmetros morfométricos nos intestinos dos animais**

177 Para avaliar uma possível alteração nas dimensões dos intestinos dos animais tratados,
178 foi realizada a dissecação dos intestinos seguida de posterior lavagem interna com salina. Os
179 intestinos foram estendidos e fotografados ao lado de uma régua para posterior medição. O
180 comprimento dos intestinos foi quantificado a partir das fotos desses órgãos com uso de
181 escala através do dimensionamento no programa ImageJ.

182 **2.3.6. Estatística**

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

186 **2.4. Análises de Microbiota**

187 **2.4.1. Coleta fecal**

188 As fezes dos animais foram coletadas durante a dissecação da região cecal dos
189 intestinos. As fezes foram recolhidas e colocadas em microtubos previamente esterilizados
190 por 20 min no UV dentro do fluxo laminar.

191 **2.4.2. Extração de DNA cecal**

192 Imediatamente após as coletas, foram feitas as extrações de DNA cecal com o QIAmp
193 DNA Stool Mini Kit da marca QIAGEN. O material genético extraído foi acondicionado à -
194 20 °C até o sequenciamento.

195 **2.4.3. Amplificação do DNA**

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

197 **2.4.4. Sequenciamento de alto desempenho dos produtos de amplificação dos genes de**
198 **interesse**

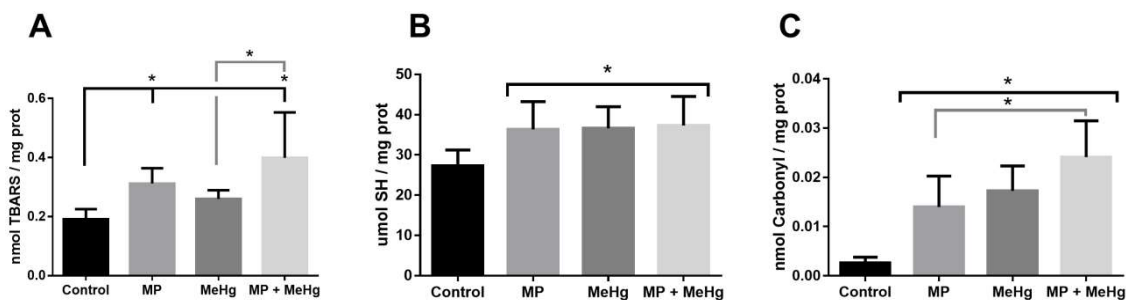
199 Para analisar as comunidades presentes nas amostras fecais, foi realizado um
200 sequenciamento de alto desempenho dos produtos de amplificação de genes de interesse. O
201 Sistema Ion Personal Genome Machine (Life Technologies) foi utilizado para sequenciar os
202 fragmentos dos genes 16S gerados por PCR. A partir de 100 ng de produto de amplificação,
203 foram construídas as bibliotecas com o kit Ion Plus Fragment Library, que é indicado para
204 amplicons curtos (≤ 350 pb). Cada amostra recebeu um adaptador (barcode) do kit
205 IonXpressBarcode 1-16. As etapas para a construção das bibliotecas seguiram as instruções
206 do fabricante e foram quantificadas e equalizadas com o kit Ion Library Equalizer. A PCR em
207 emulsão e os passos de enriquecimento foram realizados conforme descrito no kit Ion PGM
208 Template OT2 200, utilizando o equipamento IonOneTouch 2 System. A sequência dos
209 fragmentos foi realizada em um chip Ion 316, com o kit Ion PGM Sequencing 200 v2,
210 seguindo as recomendações do fabricante.

211 2.4.5. Análise de sequenciamento de alto desempenho

212 Os dados das sequências foram analisados através do programa R (versão 4.2.2) e a
213 versão 1.26.0 do *Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2* (DADA2) (García-López et al.,
214 2021) . A função "*filterAndTrim*" do DADA2 foi empregada para filtrar as leituras (Schloss,
215 2020), seguida do cálculo das taxas de erro para cada amostra. Para eliminar variantes de
216 sequências de baixa qualidade, foi utilizado o método "*removeChimeraDenovo*" (García-
217 López et al., 2021) para remover ASVs quiméricas. Em seguida, a função "*assignTaxonomy*"
218 utilizou a base de dados de referência SILVA (versão 138), obtida do Zenodo, para atribuir
219 taxonomias correspondentes às ASVs. É importante destacar que as ASVs são amplicons
220 resultantes da remoção de erros de amplificação e sequenciamento. Para filtragem de táxons,
221 foram utilizadas ambas as abundância e prevalência, com o intuito de remover táxons raros e
222 possíveis falsos positivos. A prevalência de táxons foi plotada para subconjuntos
223 taxonômicos de contagens de filós utilizando a função "*subset*". Em seguida, a plotagem foi
224 feita com a função "*ggplot*" do pacote *ggplot2*. Além disso, foram gerados gráficos de
225 abundância relativa para as 200 filós, classes, famílias e gêneros procarióticos mais
226 abundantes, utilizando o pacote *phyloseq* (versão 1.42.0).

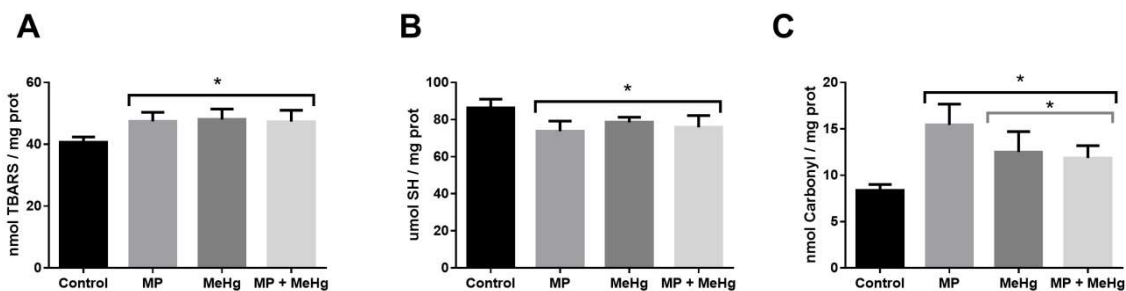
227 3. Resultados

228 Na figura 1 são apresentados os resultados da quantificação de marcadores de dano
229 oxidativo no fígado dos animais expostos. Os grupos PS-MP e PS-MP+MeHg apresentaram
230 aumentos significativos em relação ao controle nas quantidades de TBARS (A) (Controle vs
231 PS-MP; $P=0,0426$), (Controle vs PS-MP+MeHg; $P=0,0006$), enquanto o grupo MP+MeHg
232 mostrou aumento significativa em relação ao grupo MeHg (MeHg vs PS-MP+MeHg;
233 $P=0,0229$). Todos os grupos apresentaram aumentos significativos de quantidade de
234 grupamento SH (B) em comparação ao grupo controle (Controle vs PS-MP; $P=0,0455$),
235 (Controle vs MeHg; $P=0,0484$) e (Controle vs MP+MeHg; $P=0,0186$). A quantificação de
236 grupamentos carbonila (C) demonstrou aumento significativo em todos os grupos
237 experimentais quando comparados ao grupo controle (Controle vs MP; $P=0,0043$), (Controle
238 vs MeHg; $P=0,0004$), (Controle vs PS-MP+MeHg; $P=< 0,0001$). Também houve um
239 aumento significativo entre os grupos PS-MP e PS-MP+MeHg (PS-MP vs PS-
240 MP+MeHg; $P=0,016$).



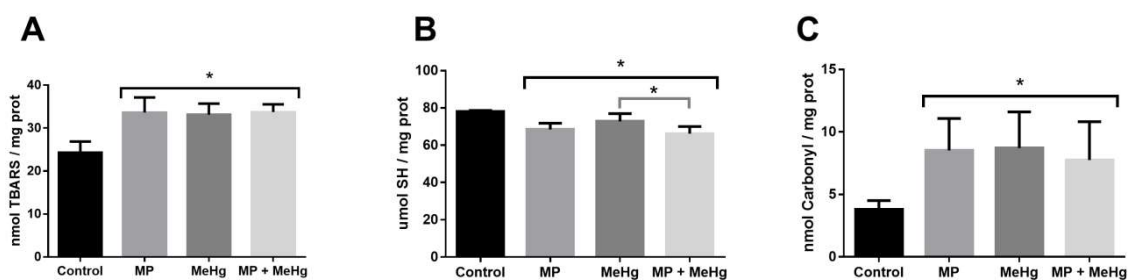
241 Figura 1: Efeitos isolados e combinados da exposição de PS-MP (1000 $\mu\text{g/L}$) e MeHg(0,5 mg/L) em parâmetros
 242 de estresse oxidativo no fígado de animais tratados durante 8 semanas. (A) Quantidade de TBARS,
 243 (B) conteúdo de SH e (C) quantidade de grupamentos carbonila. Média \pm desvio padrão.

244 Na figura 2 são apresentados os resultados da quantificação de marcadores de dano
 245 oxidativo nos rins dos animais expostos. Em relação ao controle, todos os grupos
 246 experimentais apresentaram quantidades significativamente maiores de TBARS (A):
 247 (Controle vs PS-MPs; $P=0,002$), (Controle vs MeHg; $P=0,0008$) e (Controle vs PS-
 248 MPs+MeHg; $P=0,0015$). A quantificação dos grupamentos SH (B) apresentou uma
 249 diminuição significativa em todos os grupos em comparação com o grupo controle. (Controle
 250 vs PS-MPs; $P=0,0003$), (Controle vs MeHg; $P=0,0273$) e (Controle vs PS-MPs+MeHg;
 251 $P=0,0035$). Todos os grupo apresentaram quantidades significativamente maiores de
 252 grupamentos carbonila (C) em relação ao controle (Controle vs PS-MPs; $P<0,0001$),
 253 (Controle vs MeHg; $P=0,0014$) e (Controle vs PS-MPs+MeHg; $P=0,0058$), o grupo PS-MPs
 254 apresentou maiores quantidades de carbonila que os grupos MeHg (PS-MPs vs MeHg;
 255 $P=0,0229$) e o grupo PS-MPs+MeHg (PS-MPs vs. PS-MPs+ MeHg; $P=0,0032$).
 256



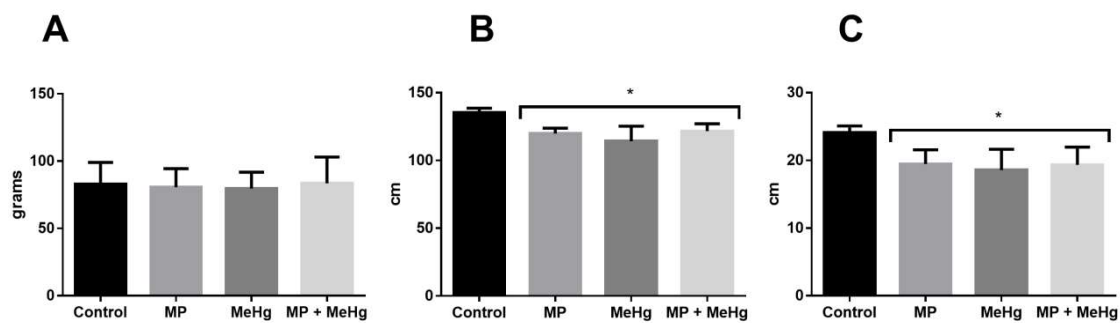
257 Figura 2: Efeitos isolados e combinados da exposição de PS-MP (1000 $\mu\text{g/L}$) e MeHg (0,5 mg/L) em parâmetro
 258 de estresse oxidativo nos rins de animais tratados durante 8 semanas. (A) Quantidade de TBARS, (B) conteúdo
 259 de SH e (C) quantidade de grupamentos carbonila. Média \pm desvio padrão.

260 Na figura 3 são apresentados os resultados da quantificação de marcadores de dano
 261 oxidativo no coração dos animais. Todos os grupos apresentaram quantidades de TBARS
 262 superiores significativamente as do grupo controle (A). (Controle vs PS-MPs; $P < 0,0001$),
 263 (Controle vs MeHg; $P < 0,0001$) e (Controle vs PS-MPs+MeHg; $P < 0,0001$). A quantificação
 264 dos grupamentos SH (B) mostra uma diminuição significativa nas quantidades de todos os
 265 grupos em relação ao grupo controle (Controle vs PS-MPs; $P = 0,0002$), (Controle vs MeHg;
 266 $P = 0,0488$) e (Controle vs PS-MPs+MeHg; $P < 0,0001$), e o grupo MeHg mostrou maiores
 267 quantidades de SH que o grupo PS-MPs+MeHg (MeHg vs PS-MPs+MeHg; $P = 0,006$). Todos
 268 os grupos experimentais apresentaram quantidades superiores de carbonila (C) em relação ao
 269 grupo controle (Controle vs PS-MPs; $P = 0,0264$), (Controle vs MeHg; $P < 0,0309$) e (Controle
 270 vs PS-MPs+MeHg; $P = 0,0459$).



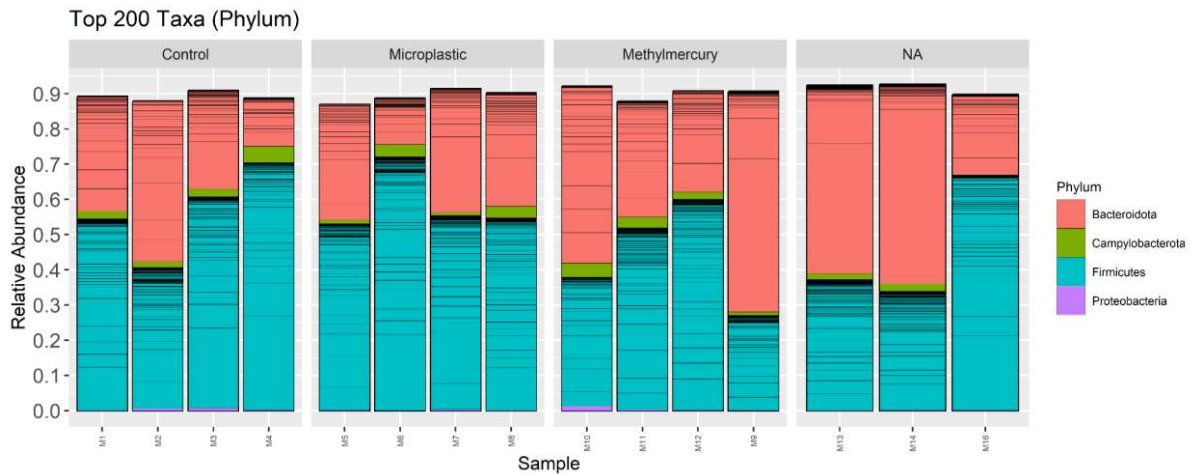
271 Figura 3: Efeitos isolados e combinados da exposição de PS-MP (1000 $\mu\text{g/L}$) e MeHg (0,5 mg/L) em parâmetro
 272 de estresse oxidativo no coração de animais tratados durante 8 semanas. (A) Quantidade de TBARS, (B)
 273 conteúdo de SH e (C) quantidade de grupamentos carbonila. Média \pm desvio padrão.

274 Foram avaliados como parâmetros morfométricos, o comprimento intestinal dos
275 animais após o tratamento e o ganho de peso durante o tratamento. Na figura 4 são
276 apresentados parâmetros morfométricos dos animais e de seus intestinos mediante exposição
277 aos MPs e ao MeHg. Não foi observada alteração no ganho de peso dos animais durante a
278 exposição (A). Entretanto, todos os grupos experimentais apresentaram um encurtamento
279 significativo no tamanho dos intestinos quando comparados com o controle. Tanto para o
280 intestino delgado (B): (Controle vs MP; $P=0,0025$), (Controle vs MeHg; $P< 0,0001$) e
281 (Controle vs MP+MeHg; $P=0,0059$), quanto para o intestino grosso (C): (Controle vs MP;
282 $P=0,0056$), (Controle vs MeHg; $P=0,0009$) e (Controle vs MP+MeHg; $P=0,0032$). O
283 comprimento do intestino foi quantificado a partir das fotos desses órgãos com uso de escala
284 através do dimensionamento no programa ImageJ.



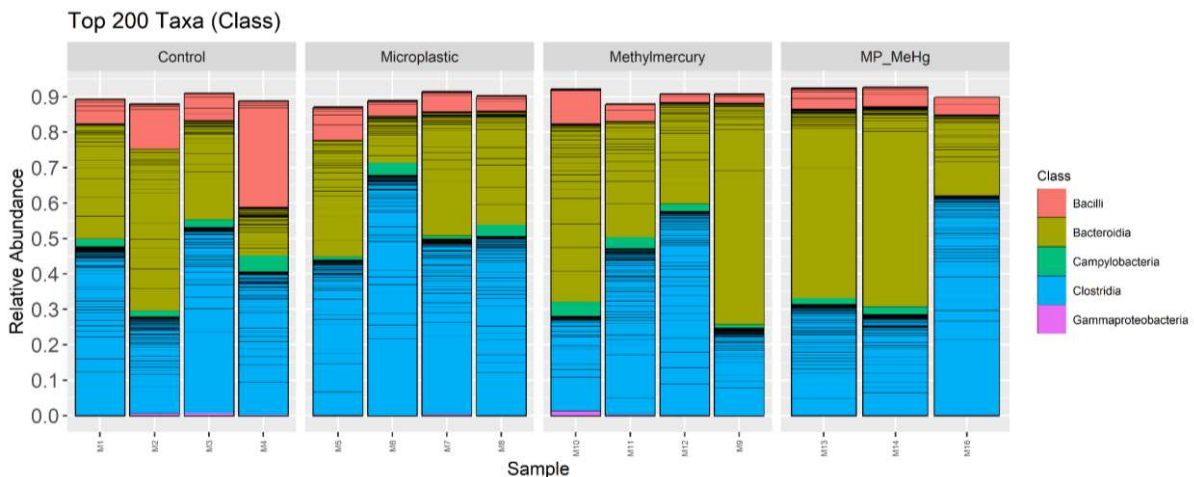
285 Figura 4: Efeitos isolados e combinados da exposição de PS-MP (1000 $\mu\text{g/L}$) e MeHg(0,5 mg/L) em parâmetros
286 morfométricos de animais tratados durante 8 semanas. (A) Ganho de peso, (B) comprimento do intestino
287 delgado e (C) comprimento do intestino grosso. Média \pm desvio padrão.

288 Na figura 5 é apresentada abundância relativa de bactérias na microbiota intestinal em
289 nível de filo. São apresentados apenas os 200 filios mais representativos. Não foram
290 observadas diferenças significativas entre os grupos.



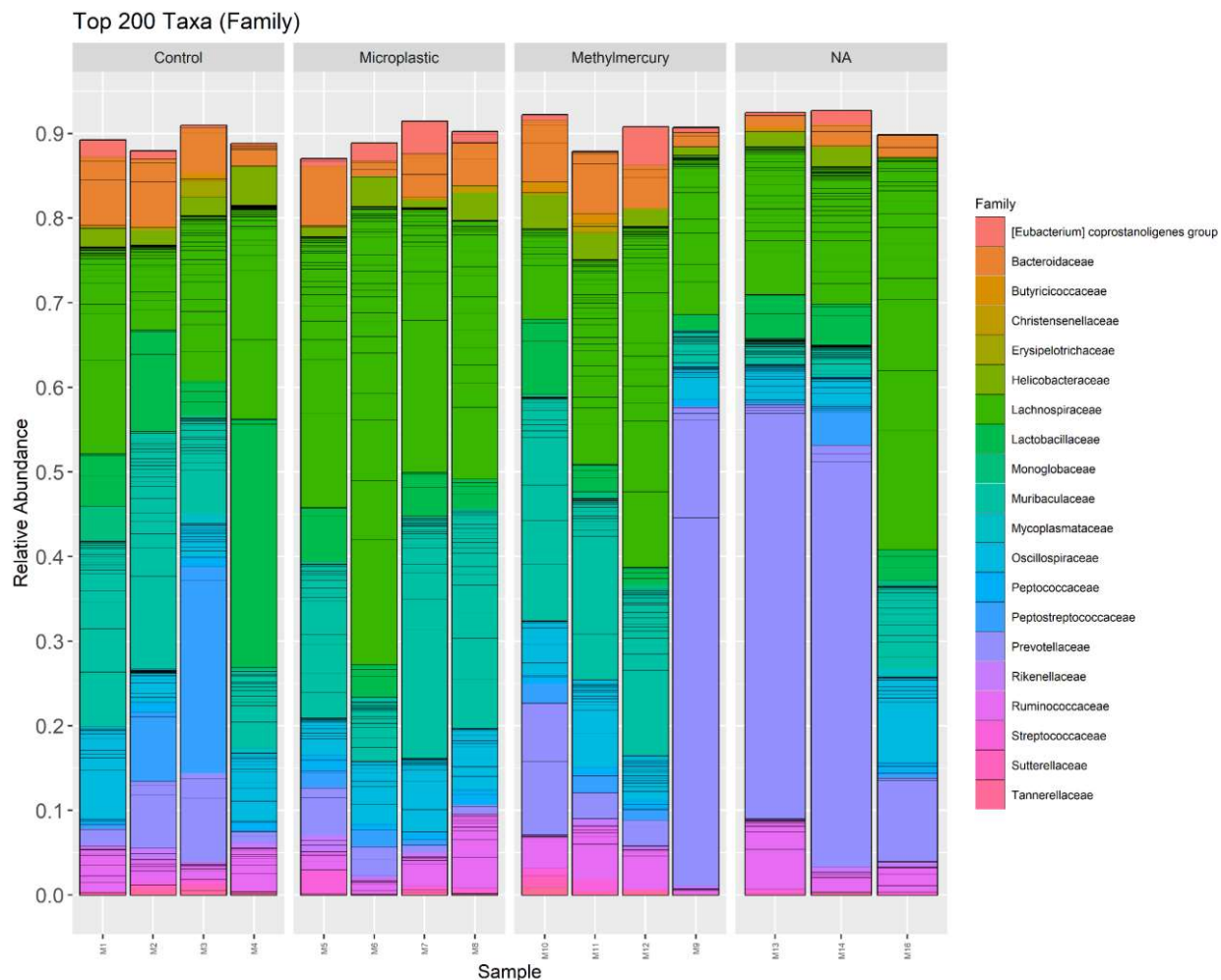
291 Figura 5: Abundância relativa dos 200 filios mais representativos. n= 4-3 por grupo.

292 Na figura 6 é apresentada a abundância relativa de bactérias na microbiota intestinal a nível
293 de classe . São apresentadas apenas as 200 classes mais representativas. Não foram
294 observadas diferenças significativas entre os grupos.



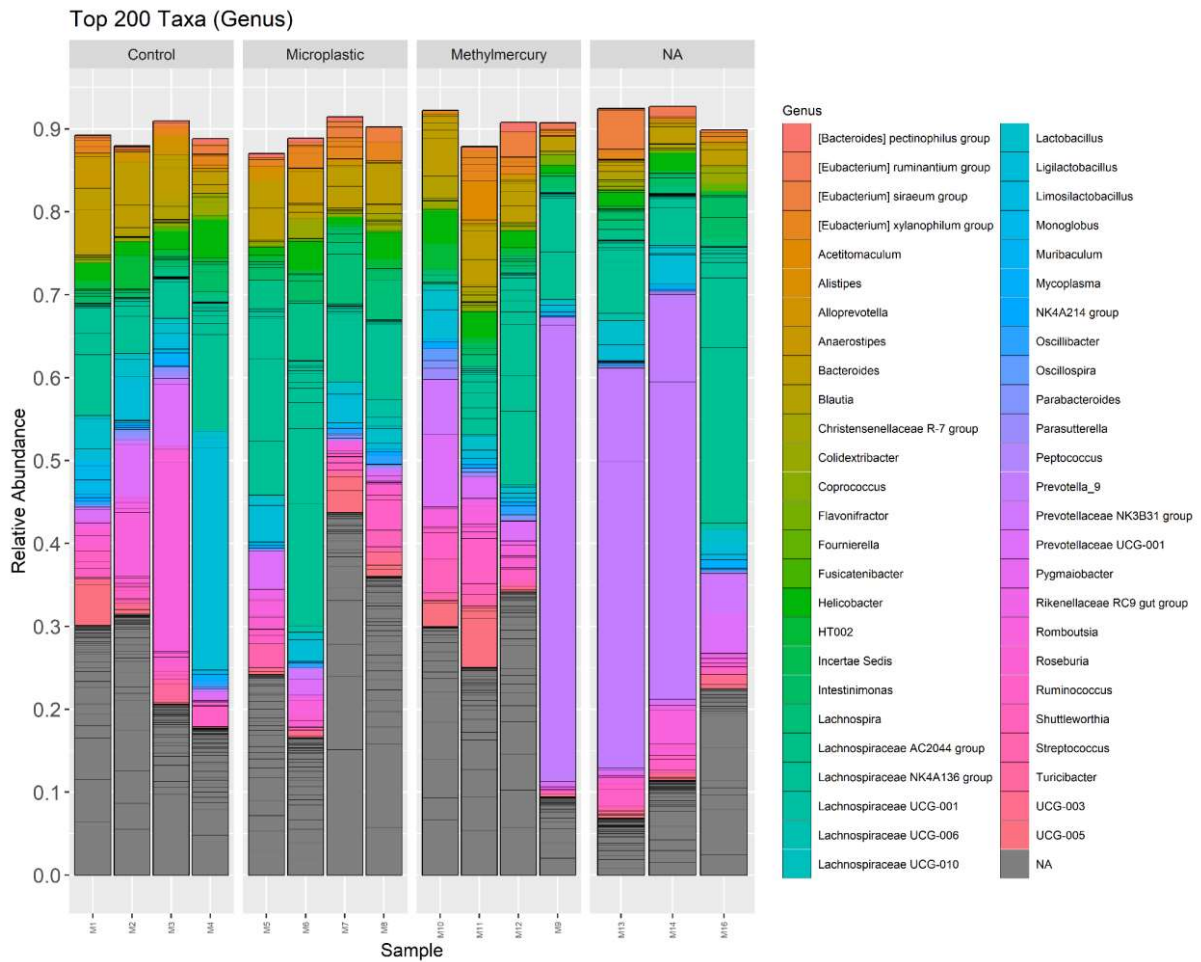
295 Figura 6: Abundância relativa das 200 classes mais representativas. n= 4-3 por grupo.

296 Na figura 7 é apresentada a abundância relativa de bactérias na microbiota intestinal
297 a nível de família. São apresentadas apenas as 200 famílias mais representativas. Não foram
298 observadas diferenças significativas entre os grupos.

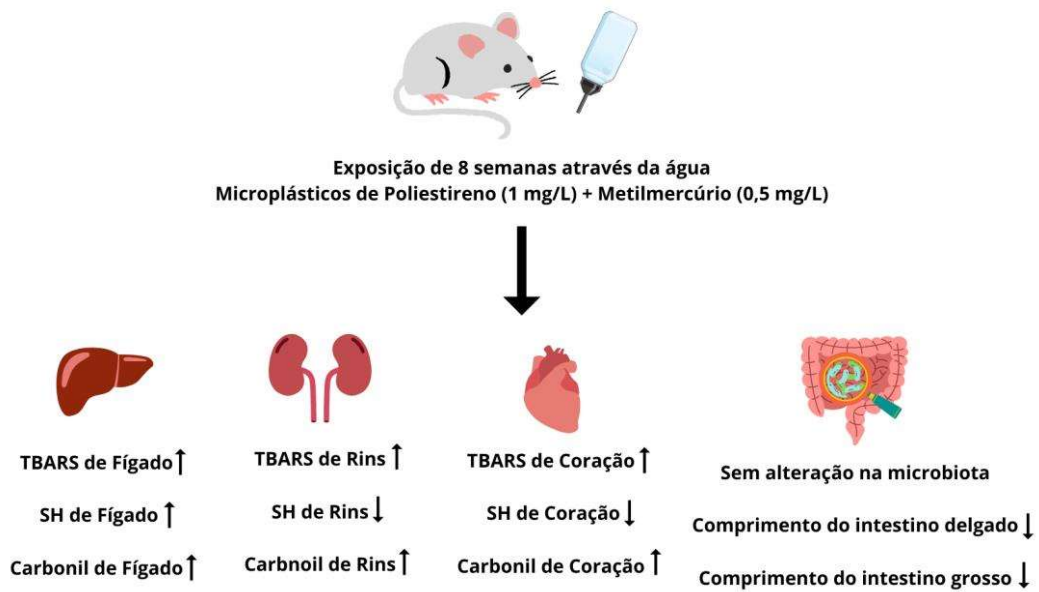


299 Figura 7: Abundância relativa das 200 famílias mais representativas. n= 4-3 por grupo.

300 Na figura 8 é apresentada a abundância relativa de bactérias na microbiota intestinal
 301 em nível de gênero. São apresentadas apenas as 200 gêneros mais representativos. Não foram
 302 observadas diferenças significativas entre os grupos.



303 Figura 8: Abundância relativa dos 200 gêneros mais representativos. n= 4-3 por grupo.



304 Figura 9: Resumo gráfico

305 4. Discussão

306 4.1. Aumento de marcadores de dano oxidativos no fígado de animais expostos ao 307 microplástico e ao metilmercúrio

308 O fígado é considerado o principal órgão-alvo de muitos poluentes químicos, devido
309 ao seu papel fisiológico de detoxificação e sensibilidade a xenobióticos, mostrando-se como
310 um importante órgão para estudo dos efeitos de contaminantes, como metais pesados;
311 (Abarghoei et al., 2016); (Di Giulio and Hinton, 2008). Tendo isso em vista, em nosso
312 trabalho buscamos observar possíveis aumentos em parâmetros de dano oxidativo a
313 macromoléculas neste órgão. Aqui, foram observados níveis aumentados de SH no fígado dos
314 animais em todos os grupos experimentais, quando comparados ao grupo controle. A
315 excreção de glutathione (GSH) através de complexos GSH-metal pode ser um mecanismo de
316 remoção celular de MeHg (Vázquez et al., 2014). Devido às propriedades eletrofílicas do
317 MeHg, já foi reportada em estudos in vitro a interação do MeHg com o grupamento cisteína
318 na estrutura do Keap1, levando a translocação nuclear do Nrf2 (fator nuclear eritróide 2
319 relacionado ao fator 2) (Canning et al., 2015); (Farina and Aschner, 2019), um fator nuclear
320 que regula de maneira positiva a síntese de glutathione (Lu, 2009).

321 Diversos trabalhos demonstram, em diferentes organismos, que a contaminação por
322 MPs está intimamente relacionada ao metabolismo de GSH e das tiorredoxinas (Trx) (Li,
323 2022; Branco and Carvalho, 2019; Tang, 2019). Além disso, Li e colaboradores realizaram
324 uma meta-análise de estudos toxicológicos com bivalves, o grupo com maior documentação
325 de efeitos fisiológicos da exposição de PS-MPs, e os resultados demonstram que os níveis de
326 GSH aumentaram de maneira consistente em diversos estudos, além de também demonstrar
327 que os PS-MPs são capazes de induzir estresse oxidativo (Li et al., 2022). Outro componente
328 tiológico importante para o balanço redox das células são as Trx. Branco & Carvalho, em seu
329 trabalho de revisão, afirmam que a cadeia complexa de mecanismo de toxicidade por
330 contaminação mercurial tem seu início na inibição da selenoenzima Tiorredoxina redutase
331 (TrxR) que reduz os grupamentos SH das Trx oxidadas, e com a inibição da TrxR a Trx
332 passa a ser reduzida pela glutaredoxina, que, por sua vez, é reduzida por glutathione (Branco
333 and Carvalho, 2019). A exposição crônica de PS-MP em *Daphnia magna* mostrou que em
334 concentrações mais baixas a TrxR estava aumentada e em altas concentrações estava inibida
335 (Tang et al., 2019).

336 Nossos resultados sugerem efeitos isolados e sinérgicos dos PS-MPs e do MeHg na
337 formação de grupos carbonila no fígado dos animais, possivelmente causado por uma
338 perturbação no balanço redox e acumulação de espécies reativas de oxigênio, gerando danos
339 oxidativos às proteínas. Em 2020, Hu & Palić revisaram os mecanismos de toxicidade
340 induzidos por MPs em diversos organismos e modelos celulares com ênfase no estresse
341 oxidativo e na inflamação, chegando à conclusão de que o efeito molecular inicial dos MPs
342 deve ser a formação de estresse oxidativo (Hu and Palić, 2020) . Assim como os MPs, o Hg
343 tem o desbalanço redox como ponto principal da sua toxicidade, e também é capaz de
344 aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (Antunes Dos Santos et al., 2018). Os
345 grupamentos carbonila são gerados pela oxidação das cadeias laterais de proteínas e
346 indicam/são indicadores de oxidação protéica causada principalmente por espécies reativas de
347 oxigênio, podendo interromper a função de proteínas e enzimas (Dalle-Donne et al., 2003);
348 (Ellis, 2007). No entanto, diversos mecanismos são capazes de gerar a oxidação protéica e,
349 virtualmente, todas as cadeias laterais de aminoácidos podem ser modificadas por oxidação
350 (Dalle-Donne et al., 2003). O conteúdo de carbonila pode estar aumentado em diversas
351 condições patológicas que envolvem estresse oxidativo, como, por exemplo, a hepatite C
352 crônica (De Maria et al., 1996) e nos estágios iniciais de diabetes mellitus do tipo 1 (Telci et
353 al., 2000). Acumulam-se evidências que o aumento de grupos carbonila no processo de
354 envelhecimento pode ser decorrente do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio
355 e pela redução da capacidade do organismo de degradar as proteínas danificadas (Chaudhuri
356 et al., 2006), o qual pode ser um indicativo estresse do retículo rugoso, através da resposta à
357 proteínas mal-enoveladas. Outro estudo de Yu e colaboradores demonstra que as enzimas
358 antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx),
359 responsáveis pela detoxificação de espécies reativas de oxigênio, inibem suas atividades
360 conforme maior for a concentração de exposição de PS-MPs em peixes (Yu et al., 2018).

361 Nesse trabalho, os MPs isolados e em combinação com o MeHg foram capazes de
362 elevar as quantidades de TBARS no fígado dos animais, sugerindo danos devido à
363 lipoperoxidação. Lipídios oxidados podem formar TBARS como produto final da
364 peroxidação (Pryor and Stanley, 1975), os lipídios quando oxidados podem alterar a estrutura
365 e função das membranas celulares, alterando sua permeabilidade e promovendo a absorção de
366 agentes tóxicos (Ayala et al., 2014) ;(Ferreira et al., 2005). Em oposição aos nossos achados,
367 Joshi e colaboradores observaram o aumento da quantidade de TBARS em fígado de ratos
368 Sprague-Dawley tratados com MeHg (Joshi et al., 2014). Não obstante, uma revisão de Hu &
369 Palić feita em 2020, salienta que, com base na literatura revisada, é inconclusivo o papel dos

370 MPs em induzir lipoperoxidação, mas que é prudente considerar este evento molecular como
371 um ponto-chave desencadeado por MPS (Hu and Palić, 2020).

372 **4.2. Aumento no dano oxidativo nos rins associado a exposição com Metilmercúrio e** 373 **Microplásticos**

374 Os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo em rins avaliados neste trabalho
375 demonstram uma maior quantidade de TBARS e de grupos carbonila em todos os grupos
376 experimentais em relação ao grupo controle, e níveis de grupamentos SH diminuídos em
377 todos os grupos que receberam algum contaminante, indicando um desbalanço redox e danos
378 oxidativos nos rins. Mitocôndrias de rins de ratos tratados com HgCl₂, apresentaram
379 despolarização da membrana interna mitocondrial mediada pelo Hg, seguido por um aumento
380 na produção de peróxido de hidrogênio e concomitante peroxidação lipídica (Lund et al.,
381 1993). Foi demonstrado que MPs causam disfunção mitocondrial, estresse de retículo
382 endoplasmático, inflamação e autofagia em células renais, sendo internalizadas e se
383 acumulando em células renais HK-2 e nos rins de camundongos expostos (Wang et al.,
384 2021). A administração oral por gavagem de PS-MPs aumentou o conteúdo renal de MDA e
385 diminuiu as quantidades de GSH em ratos Wistar (Ahmed et al., 2022). Woods & Ellis,
386 demonstraram a relação inversamente proporcional ao longo do tempo entre a quantidade de
387 GSH e TBARS nos rins de ratos tratados com MeHg (Woods and Ellis, 1995). Em
388 concordância, já foi observado danos aos rins via depleção de GSH e aumento nos níveis de
389 TBARS em ratos submetidos a estresse crônico de contenção (Samarghandian et al., 2017).
390 Aveles e colaboradores encontraram uma relação entre o aumento na concentração de
391 carbonilas e a diminuição na concentração de tióis no plasma sanguíneo de pacientes com
392 Doença Crônica Renal, sugerindo que o comprometimento da função renal está associado
393 com estresse oxidativo, possivelmente devido ao acúmulo de proteínas oxidadas (Aveles et
394 al., 2010).

395 **4.3. Marcadores de estresse se apresentam elevados no coração de animais expostos**

396 No coração, todos os grupos apresentaram quantidades aumentadas de TBARS e
397 carbonila junto com a diminuição de SH em comparação com o grupo controle (Figura 4),
398 sugerindo dano oxidativo a macromoléculas possivelmente causado por um ambiente mais
399 pró-oxidante refletido na diminuição de SH. O MeHg já foi associado ao aumento do risco de

400 eventos coronarianos agudos e mortalidade cardiovascular (Virtanen et al., 2005), assim
401 como aumento de espécies reativas de oxigênio e apoptose em cardiomiócitos (Yang et al.,
402 2018). Em concordância, Wei et al., 2021 demonstraram que micropartículas plásticas
403 induziram aumentos significativos no conteúdo de TBARS enquanto diminuíram a atividade
404 de SOD, GSH-Px e CAT, levando a piroptose de células cardíacas por sinalização
405 NLRP3/Caspase-1 através de estresse oxidativo e inflamação, culminando em disfunção
406 cardíaca (Wei et al., 2021).

407 **4.4. MP e MeHg causam diminuição no comprimento intestinal sem causar alterações** 408 **significativas no ganho de peso**

409 Apesar de apresentarem encurtamento intestinal, não foram observadas alterações no
410 ganho de peso durante o tratamento em nenhum grupo experimental. MPs ingeridos tendem a
411 acumular no trato gastrointestinal podendo causar afinamento do epitélio intestinal,
412 provocando resposta inflamatória e estresse oxidativo (Anbumani and Kakkar, 2018).
413 Diversos trabalhos revisados por Hirt e Body-Malapel relatam uma série de efeitos de MPs
414 no epitélio intestinal como estresse oxidativo, lesões histológicas e alteração na integridade e
415 na expressão de genes relacionados à mucosa (Hirt and Body-Malapel, 2020). Foi
416 demonstrada a alta deposição de MeHg nas paredes do intestino de ratos, e também
417 perturbação na estrutura da microbiota intestinal e alteração de metabólitos relacionados ao
418 eixo intestino-cérebro (Lin et al., 2020). Os intestinos são muito importantes para a absorção
419 de nutrientes e de água, e apresentam diversas adaptações, como as vilosidades e
420 microvilosidades, para otimizar suas funções através da maximização da área de sua
421 superfície (Weaver et al., 1991), por isso o encurtamento do intestino pode significar uma
422 perda na função desse tecido e culminar em outros efeitos prejudiciais.

423 **4.5. Normobiose é mantida com exposição aos contaminantes**

424 Diversos trabalhos já demonstraram que os PS-MPs são capazes de alterar a
425 microbiota intestinal de diversos modelos animais como ratos (Jiang et al., 2023),
426 camundongos (Lu et al., 2018); (Jin et al., 2019; Teng et al., 2022); (Jin et al., 2019; Teng et
427 al., 2022) e peixes (Jin et al., 2018); (Feng et al., 2021); (Pei et al., 2022); (Usman et al.,
428 2022). Além disso, outros trabalhos também já identificaram o MeHg como um agressor da

429 microbiota em ratos (Wang et al., 2023), camundongos (Seki et al., 2021), peixes (Zhu et al.,
430 2020), humanos (Yang et al., 2022).

431 Apesar de não termos observado alterações significativas na microbiota em nível de
432 filo (Figura 5), classe (Figura 6), família (Figura 7) e gênero (Figura 8) em nosso trabalho,
433 podemos observar uma tendência de aumento da família *Prevotellaceae* no grupo PS-MPs +
434 MeHg. Do mesmo modo, já foi relatado uma maior presença da família *Prevotellaceae* após a
435 exposição de PS-MPS (Huang et al., 2022), e também após a exposição ao MeHg (Zhang et
436 al., 2019)

437 Os MPs continuam se apresentando como um problema para à saúde humana, pois
438 cada vez mais sua presença é detectada em itens e espécies animais e vegetais de consumo
439 humano. Além disso, a contínua e elevada produção, junto da falta de políticas, e até mesmo
440 alternativas, efetivas sob a redução de seu uso, fazem com que este contaminante se torne
441 cada vez mais problemático. Recentemente, espera-se que as concentrações de MeHg
442 aumentem no ambiente, não somente, mas principalmente devido ao garimpo ilegal e falta de
443 fiscalização das políticas ambientais na Amazônia, afetando as mais diversas populações
444 presentes na área. Apesar de alguns autores já terem demonstrado o potencial de
445 contaminantes ambientais, como metais pesados, em interagirem e serem adsorvidos pelos
446 MPs no ambiente, quase nenhum trabalho explorou essa exposição combinada em
447 organismos modelo. Assim, para nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro a
448 avaliar parâmetros de estresse oxidativo e microbiota intestinal em ratos Wistar mediante a
449 exposição combinada de PS-MPs e MeHg sendo este um dos pontos fortes do nosso
450 trabalho. Apesar de não terem sido observadas alterações significativas quanto à composição
451 microbiana após a exposição, foi observado encurtamento dos intestinos grosso e delgado, o
452 que ainda não foi observado em outros trabalhos. Este resultado sugere que alguma alteração
453 fisiológica e possivelmente funcional esteja acontecendo nestes órgãos. Também é
454 importante ressaltar, que a sinalização redox é essencial na regulação da proliferação e morte
455 celular controlada mediada por apoptose e é algo que não foi explorado aqui. Portanto, em
456 futuros trabalhos pretendemos explorar parâmetros de estresse oxidativo e vias apoptóticas
457 nestes órgãos, assim como a integridade da barreira intestinal por meio de cortes histológicos
458 e da determinação do imunocontéudo de proteínas como Claudina-5 e Ocludina.

459 O estresse oxidativo é amplamente estudado e se apresenta alterado numa diversidade
460 de doenças, condições patológicas, e em muitas situações com função tecidual impactada. Os
461 marcadores observados aqui indicam um dano oxidativo a macromoléculas já estabelecidas e
462 com difícil reversão mesmo com a regularização do balanço redox. Além disso, a presença

463 elevada desses marcadores nos tecidos pode indicar a sinalização de diferentes vias
464 biológicas citadas anteriormente, sendo uma das limitações deste trabalho. Por exemplo, a
465 expressão de genes e atividade de enzimas antioxidantes deve ser analisada; o dano
466 observado à proteínas por meio do carbonila pode ser um indicativo de vias de estresse do
467 retículo sendo ativadas; os marcadores observados também podem ser indicativo de
468 alterações na via apoptótica da NRLP3/Caspase-1. Portanto, estas rotas devem ganhar
469 atenção em trabalhos futuros, a fim de melhor elucidar os mecanismos celulares pelos quais
470 essa contaminação está agindo.

471 Além disso, diversas outras vias e mecanismos celulares são sugeridos na revisão de
472 (Prata et al., 2020), como a capacidade de translocação destas partículas no organismo,
473 efeitos pró-inflamatórios sistêmicos, e a ativação de vias tumorais. Junto da falta de análises
474 histológicas, esses importantes mecanismos também não foram explorados no presente
475 trabalho e se apresentam como outra limitação de nosso estudo.

476 **5. Conclusão**

477 O presente trabalho apresenta as primeiras evidências dos efeitos nocivos de duas
478 contaminações ambientais importantes em conjunto, relacionando essa exposição combinada
479 com os efeitos observados individualmente na literatura. Dessa forma, aqui buscamos chamar
480 a atenção para os efeitos individuais e combinados destes contaminantes, que observamos,
481 mas que provavelmente não estão limitados, ao intestino grosso e delgado; ao fígado, aos rins
482 e ao coração.

483 **6. Agradecimentos e financiamento**

484 CNPq - CAPES e FAPERGS.

485 **7. Conflitos de interesse**

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

487 **8. Referências**

- 488 Abarghoei, S., Hedayati, A., Ghorbani, R., Miandareh, H.K., Bagheri, T., 2016.
489 Histopathological effects of waterborne silver nanoparticles and silver salt on the gills and
490 liver of goldfish *Carassius auratus*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13, 1753–1760.
491 doi:10.1007/s13762-016-0972-9
- 492 Ahmed, Y.H., El-Naggar, M.E., Rashad, M.M., M Youssef, A., Galal, M.K., Bashir,
493 D.W., 2022. Screening for polystyrene nanoparticle toxicity on kidneys of adult male albino
494 rats using histopathological, biochemical, and molecular examination results. *Cell Tissue*
495 *Res.* 388, 149–165. doi:10.1007/s00441-022-03581-5
- 496 Anbumani, S., Kakkar, P., 2018. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review.
497 *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 14373–14396. doi:10.1007/s11356-018-1999-x
- 498 Antunes Dos Santos, A., Ferrer, B., Marques Gonçalves, F., Tsatsakis, A.M., Renieri, E.A.,
499 Skalny, A.V., Farina, M., Rocha, J.B.T., Aschner, M., 2018. Oxidative Stress in
500 Methylmercury-Induced Cell Toxicity. *Toxics* 6. doi:10.3390/toxics6030047
- 501 Aveles, P.R., Criminácio, C.R., Gonçalves, S., Bignelli, A.T., Claro, L.M., Siqueira,
502 S.S., Nakao, L.S., Pecoits-Filho, R., 2010. Association between biomarkers of carbonyl stress
503 with increased systemic inflammatory response in different stages of chronic kidney disease
504 and after renal transplantation. *Nephron Clin. Pract.* 116, c294-9. doi:10.1159/000318792
- 505 Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism,
506 and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med.*
507 *Cell. Longev.* 2014, 360438. doi:10.1155/2014/360438
- 508 Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and
509 fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*
510 *Biol. Sci.* 364, 1985–1998. doi:10.1098/rstb.2008.0205
- 511 Basta, P.C., Viana, P.V. de S., Vasconcellos, A.C.S. de, Périssé, A.R.S., Hofer, C.B., Paiva,
512 N.S., Kempton, J.W., Ciampi de Andrade, D., Oliveira, R.A.A. de, Achatz, R.W.,
513 Perini, J.A., Meneses, H. do N. de M., Hallwass, G., Lima, M. de O., Jesus, I.M. de,
514 Santos, C.C.R.D., Hacon, S. de S., 2021. Mercury Exposure in Mundurucu Indigenous
515 Communities from Brazilian Amazon: Methodological Background and an Overview of
516 the Principal Results. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18.
517 doi:10.3390/ijerph18179222
- 518 Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram
519 Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*
520 72, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999

521 Branco, V., Carvalho, C., 2019. The thioredoxin system as a target for mercury compounds.
522 *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1863, 129255. doi:10.1016/j.bbagen.2018.11.007

523 Canning, P., Sorrell, F.J., Bullock, A.N., 2015. Structural basis of Keap1 interactions with
524 Nrf2. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 101–107. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.034

525 Chaudhuri, A.R., de Waal, E.M., Pierce, A., Van Remmen, H., Ward, W.F., Richardson, A.,
526 2006. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based
527 proteomic approach. *Mech. Ageing Dev.* 127, 849–861. doi:10.1016/j.mad.2006.08.006

528 Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl
529 groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329, 23–38.
530 doi:10.1016/s0009-8981(03)00003-2

531 da Costa, J.P., 2018. Micro- and nanoplastics in the environment: Research and
532 policymaking. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 1, 12–16.
533 doi:10.1016/j.coesh.2017.11.002

534 De Falco, F., Di Pace, E., Cocca, M., Avella, M., 2019. The contribution of washing
535 processes of synthetic clothes to microplastic pollution. *Sci. Rep.* 9, 6633.
536 doi:10.1038/s41598-019-43023-x

537 De Maria, N., Colantoni, A., Fagioli, S., Liu, G.J., Rogers, B.K., Farinati, F., Van Thiel,
538 D.H., Floyd, R.A., 1996. Association between reactive oxygen species and disease
539 activity in chronic hepatitis C. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 291–295. doi:10.1016/0891-
540 5849(96)00044-5

541 Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), 2008. *The toxicology of fishes*. CRC Press.
542 doi:10.1201/9780203647295

543 Ellis, E.M., 2007. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic
544 intervention. *Pharmacol. Ther.* 115, 13–24. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.03.015

545 Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
546 doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6

547 Eriksen, M., Lebreton, L.C.M., Carson, H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borerro, J.C., Galgani,
548 F., Ryan, P.G., Reisser, J., 2014. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5
549 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE* 9,
550 e111913. doi:10.1371/journal.pone.0111913

551 Espitia-Pérez, P., Albino, S.M., da Rosa, H.T., Silveira, A.K., Espitia-Pérez, L., Brango, H.,
552 Moraes, D.P., Hermann, P.R.S., Mingori, M., Barreto, F., Kunzler, A., Gelain, D.P.,
553 Schnorr, C.E., Moreira, J.C.F., 2018a. Effects of methylmercury and retinol palmitate
554 co-administration in rats during pregnancy and breastfeeding: Metabolic and redox

555 parameters in dams and their offspring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 162, 603–615.
556 doi:10.1016/j.ecoenv.2018.06.093

557 Espitia-Pérez, P., Albino, S.M., Espitia-Pérez, L., Brango, H., da Rosa, H., Kleber Silveira,
558 A., Moraes, D.P., Cerveira, C., Mingori, M., Tiefensee Ribeiro, C., Gelain, D.P.,
559 Schnorr, C.E., Fonseca Moreira, J.C., 2018b. Neurobehavioral and oxidative stress
560 alterations following methylmercury and retinyl palmitate co-administration in pregnant
561 and lactating rats and their offspring. *Neurotoxicology* 69, 164–180.
562 doi:10.1016/j.neuro.2018.10.004

563 Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation
564 products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, in: *Oxygen Radicals in Biological
565 Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants, Methods in Enzymology*. Elsevier,
566 pp. 407–421. doi:10.1016/0076-6879(90)86134-H

567 Fang, S., Yu, W., Li, C., Liu, Y., Qiu, J., Kong, F., 2019. Adsorption behavior of three
568 triazole fungicides on polystyrene microplastics. *Sci. Total Environ.* 691, 1119–1126.
569 doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.176

570 Farina, M., Aschner, M., 2019. Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced
571 neurotoxicity: An intriguing interplay. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1863,
572 129285. doi:10.1016/j.bbagen.2019.01.007

573 Feng, S., Zeng, Y., Cai, Z., Wu, J., Chan, L.L., Zhu, J., Zhou, J., 2021. Polystyrene
574 microplastics alter the intestinal microbiota function and the hepatic metabolism status
575 in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Sci. Total Environ.* 759, 143558.
576 doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143558

577 Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., Reis-Henriques, M.A., 2005. Oxidative stress biomarkers
578 in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from
579 a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquat. Toxicol.* 71, 39–48.
580 doi:10.1016/j.aquatox.2004.10.009

581 Galloway, T.S., Cole, M., Lewis, C., 2017. Interactions of microplastic debris throughout the
582 marine ecosystem. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 116. doi:10.1038/s41559-017-0116

583 Gao, X., Hassan, I., Peng, Y., Huo, S., Ling, L., 2021. Behaviors and influencing factors of
584 the heavy metals adsorption onto microplastics: A review. *J. Clean. Prod.* 319, 128777.
585 doi:10.1016/j.jclepro.2021.128777

586 Gibb, H., O’Leary, K.G., 2014. Mercury exposure and health impacts among individuals in
587 the artisanal and small-scale gold mining community: a comprehensive review.
588 *Environ. Health Perspect.* 122, 667–672. doi:10.1289/ehp.1307864

589 Hintelmann, H., 2010. Organomercurials. Their formation and pathways in the environment.
590 Met. Ions Life Sci. 7, 365–401. doi:10.1039/BK9781847551771-00365

591 Hirt, N., Body-Malapel, M., 2020. Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and
592 microplastics: a review of the literature. Part. Fibre Toxicol. 17, 57.
593 doi:10.1186/s12989-020-00387-7

594 Hong, Y.-S., Kim, Y.-M., Lee, K.-E., 2012. Methylmercury exposure and health effects. J.
595 Prev. Med. Public Health 45, 353–363. doi:10.3961/jpmph.2012.45.6.353

596 Hooper, L.V., Littman, D.R., Macpherson, A.J., 2012. Interactions between the microbiota
597 and the immune system. Science 336, 1268–1273. doi:10.1126/science.1223490

598 Hu, M., Palić, D., 2020. Micro- and nano-plastics activation of oxidative and inflammatory
599 adverse outcome pathways. Redox Biol. 37, 101620. doi:10.1016/j.redox.2020.101620

600 Huang, D., Zhang, Y., Long, J., Yang, X., Bao, L., Yang, Z., Wu, B., Si, R., Zhao, W., Peng,
601 C., Wang, A., Yan, D., 2022. Polystyrene microplastic exposure induces insulin
602 resistance in mice via dysbacteriosis and pro-inflammation. Sci. Total Environ. 838,
603 155937. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.155937

604 Hwang, J., Choi, D., Han, S., Jung, S.Y., Choi, J., Hong, J., 2020. Potential toxicity of
605 polystyrene microplastic particles. Sci. Rep. 10, 7391. doi:10.1038/s41598-020-64464-9

606 Jiang, W., Hu, C., Chen, Y., Li, Y., Sun, X., Wu, H., Yang, R., Tang, Y., Niu, F., Wei, W.,
607 Sun, C., Han, T., 2023. Dysregulation of the microbiota-brain axis during long-term
608 exposure to polystyrene nanoplastics in rats and the protective role of dihydrocaffeic
609 acid. Sci. Total Environ. 874, 162101. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.162101

610 Jin, Y., Lu, L., Tu, W., Luo, T., Fu, Z., 2019. Impacts of polystyrene microplastic on the gut
611 barrier, microbiota and metabolism of mice. Sci. Total Environ. 649, 308–317.
612 doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.353

613 Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., Fu, Z., 2018. Polystyrene microplastics induce
614 microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. Environ. Pollut.
615 235, 322–329. doi:10.1016/j.envpol.2017.12.088

616 Joshi, D., Kumar, M.D., Kumar, S.A., Sangeeta, S., 2014. Reversal of methylmercury-
617 induced oxidative stress, lipid peroxidation, and DNA damage by the treatment of N-
618 acetyl cysteine: a protective approach. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 33, 167–182.
619 doi:10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.2014010291

620 Koelmans, A.A., Besseling, E., Shim, W.J., 2015. Nanoplastics in the aquatic environment.
621 critical review, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic
622 Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 325–340. doi:10.1007/978-3-319-

623 16510-3_12

624 Koelmans, A.A., Mohamed Nor, N.H., Hermsen, E., Kooi, M., Mintenig, S.M., De France, J.,
625 2019. Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment
626 of data quality. *Water Res.* 155, 410–422. doi:10.1016/j.watres.2019.02.054

627 Koelmans, A.A., Redondo-Hasselerharm, P.E., Nor, N.H.M., de Ruijter, V.N., Mintenig,
628 S.M., Kooi, M., 2022. Risk assessment of microplastic particles. *Nat. Rev. Mater.*
629 doi:10.1038/s41578-021-00411-y

630 Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.-W.,
631 Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. [49] Determination of carbonyl content in
632 oxidatively modified proteins, in: *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B:
633 Oxygen Radicals and Antioxidants, Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 464–478.
634 doi:10.1016/0076-6879(90)86141-H

635 Lin, X., Zhao, J., Zhang, W., He, L., Wang, L., Chang, D., Cui, L., Gao, Y., Li, B., Chen, C.,
636 Li, Y.-F., 2020. Acute oral methylmercury exposure perturbs the gut microbiome and
637 alters gut-brain axis related metabolites in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 190, 110130.
638 doi:10.1016/j.ecoenv.2019.110130

639 Li, Z., Chang, X., Hu, M., Fang, J.K.-H., Sokolova, I.M., Huang, W., Xu, E.G., Wang, Y.,
640 2022. Is microplastic an oxidative stressor? Evidence from a meta-analysis on bivalves.
641 *J. Hazard. Mater.* 423, 127211. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127211

642 Lund, B.O., Miller, D.M., Woods, J.S., 1993. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and
643 oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*
644 45, 2017–2024. doi:10.1016/0006-2952(93)90012-1

645 Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., Jin, Y., 2018. Polystyrene microplastics induce gut
646 microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Sci. Total Environ.*
647 631–632, 449–458. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.051

648 Lu, S.C., 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30, 42–59.
649 doi:10.1016/j.mam.2008.05.005

650 Mason, R., Pirrone, N. (Eds.), 2009. *Mercury fate and transport in the global atmosphere:
651 emissions, measurements and models*. Springer US, Boston, MA. doi:10.1007/978-0-
652 387-93958-2

653 Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., Pettersson, S.,
654 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262–1267.
655 doi:10.1126/science.1223813

656 Pei, X., Heng, X., Chu, W., 2022. Polystyrene nano/microplastics induce microbiota

657 dysbiosis, oxidative damage, and innate immune disruption in zebrafish. *Microb.*
658 *Pathog.* 163, 105387. doi:10.1016/j.micpath.2021.105387

659 Prata, J.C., da Costa, J.P., Lopes, I., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T., 2020. Environmental
660 exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Sci. Total*
661 *Environ.* 702, 134455. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134455

662 Pryor, W.A., Stanley, J.P., 1975. Letter: A suggested mechanism for the production of
663 malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic
664 production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J. Org. Chem.* 40,
665 3615–3617. doi:10.1021/jo00912a038

666 Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa,
667 F., Rongioletti, M.C.A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M.,
668 Giorgini, E., 2021. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta.
669 *Environ. Int.* 146, 106274. doi:10.1016/j.envint.2020.106274

670 Ramos, A.R.A., Oliveira, K.A. de, Rodrigues, F. dos S., 2020. Mercury-Based Mining in
671 Yanomami Indigenous Lands and Accountabilities. *Ambient. soc.* 23.
672 doi:10.1590/1809-4422asoc20180326r2vu202015ao

673 Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Farkhondeh, T., Samini, F., 2017. Anti-oxidative
674 effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and
675 kidney. *Biomed. Pharmacother.* 87, 223–229. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.105

676 Schellenberg, J. (Ed.), 2009. Syndiotactic polystyrene: synthesis, characterization,
677 processing, and applications. Wiley. doi:10.1002/9780470557006

678 Schwabl, P., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsics, T., Trauner, M., Reiberger, T., Liebmann,
679 B., 2019. Detection of various microplastics in human stool: A prospective case series.
680 *Ann. Intern. Med.* 171, 453–457. doi:10.7326/M19-0618

681 Seki, N., Akiyama, M., Yamakawa, H., Hase, K., Kumagai, Y., Kim, Y.-G., 2021. Adverse
682 effects of methylmercury on gut bacteria and accelerated accumulation of mercury in
683 organs due to disruption of gut microbiota. *J. Toxicol. Sci.* 46, 91–97.
684 doi:10.2131/jts.46.91

685 Tang, J., Wang, X., Yin, J., Han, Y., Yang, J., Lu, X., Xie, T., Akbar, S., Lyu, K., Yang, Z.,
686 2019. Molecular characterization of thioredoxin reductase in waterflea *Daphnia magna*
687 and its expression regulation by polystyrene microplastics. *Aquat. Toxicol.* 208, 90–97.
688 doi:10.1016/j.aquatox.2019.01.001

689 Telci, A., Cakatay, U., Salman, S., Satman, I., Sivas, A., 2000. Oxidative protein damage in
690 early stage Type 1 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 50, 213–223.

691 doi:10.1016/s0168-8227(00)00197-2

692 Teng, M., Zhao, X., Wang, Chengju, Wang, Chen, White, J.C., Zhao, W., Zhou, L., Duan,
693 M., Wu, F., 2022. Polystyrene Nanoplastics Toxicity to Zebrafish: Dysregulation of the
694 Brain-Intestine-Microbiota Axis. *ACS Nano* 16, 8190–8204.
695 doi:10.1021/acsnano.2c01872

696 Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G.,
697 McGonigle, D., Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304,
698 838. doi:10.1126/science.1094559

699 Tremaroli, V., Bäckhed, F., 2012. Functional Interactions Between the Gut Microbiota and
700 Host Metabolism. *Nature* 489, 242–249. doi:10.1038/nature11552

701 Usman, S., Razis, A.F.A., Shaari, K., Azmai, M.N.A., Saad, M.Z., Isa, N.M., Nazarudin,
702 M.F., 2022. Polystyrene microplastics induce gut microbiome and metabolome changes
703 in Javanese medaka fish (*Oryzias javanicus* Bleeker, 1854). *Toxicol. Rep.* 9, 1369–
704 1379. doi:10.1016/j.toxrep.2022.05.001

705 Vázquez, M., Vélez, D., Devesa, V., 2014. In vitro evaluation of inorganic mercury and
706 methylmercury effects on the intestinal epithelium permeability. *Food Chem. Toxicol.*
707 74, 349–359. doi:10.1016/j.fct.2014.10.022

708 Virtanen, J.K., Voutilainen, S., Rissanen, T.H., Mursu, J., Tuomainen, T.-P., Korhonen, M.J.,
709 Valkonen, V.-P., Seppänen, K., Laukkanen, J.A., Salonen, J.T., 2005. Mercury, fish
710 oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart
711 disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler. Thromb. Vasc.*
712 *Biol.* 25, 228–233. doi:10.1161/01.ATV.0000150040.20950.61

713 Wang, W., Chen, F., Zhang, L., Wen, F., Yu, Q., Li, P., Zhang, A., 2023. Neurotransmitter
714 disturbances caused by methylmercury exposure: Microbiota-gut-brain interaction. *Sci.*
715 *Total Environ.* 162358. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.162358

716 Wang, Y.-L., Lee, Y.-H., Hsu, Y.-H., Chiu, I.-J., Huang, C.C.-Y., Huang, C.-C., Chia, Z.-C.,
717 Lee, C.-P., Lin, Y.-F., Chiu, H.-W., 2021. The Kidney-Related Effects of Polystyrene
718 Microplastics on Human Kidney Proximal Tubular Epithelial Cells HK-2 and Male
719 C57BL/6 Mice. *Environ. Health Perspect.* 129, 57003. doi:10.1289/EHP7612

720 Weaver, L.T., Austin, S., Cole, T.J., 1991. Small intestinal length: a factor essential for gut
721 adaptation. *Gut* 32, 1321–1323. doi:10.1136/gut.32.11.1321

722 Wei, J., Wang, X., Liu, Q., Zhou, N., Zhu, S., Li, Z., Li, X., Yao, J., Zhang, L., 2021. The
723 impact of polystyrene microplastics on cardiomyocytes pyroptosis through
724 NLRP3/Caspase-1 signaling pathway and oxidative stress in Wistar rats. *Environ.*

725 Toxicol. 36, 935–944. doi:10.1002/tox.23095

726 Woods, J.S., Ellis, M.E., 1995. Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl
727 mercury. Relationship to mercury-induced oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 50,
728 1719–1724. doi:10.1016/0006-2952(95)02075-6

729 Yang, X., Feng, L., Zhang, Y., Hu, H., Shi, Y., Liang, S., Zhao, T., Cao, L., Duan, J., Sun, Z.,
730 2018. Co-exposure of silica nanoparticles and methylmercury induced cardiac toxicity
731 in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.* 631–632, 811–821.
732 doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.107

733 Yang, X.-F., Yang, S.-C., Wen, F.-L., Feng, L., Meng, B., Hu, H.-Y., Wang, B.-L., Li, J.,
734 Poulain, A.J., Li, P., 2022. Impacts of mercury exposure levels and sources on the
735 demethylation of methylmercury through human gut microbiota. *Bull. Environ.*
736 *Contam. Toxicol.* 109, 534–541. doi:10.1007/s00128-022-03569-5

737 Yu, P., Liu, Z., Wu, D., Chen, M., Lv, W., Zhao, Y., 2018. Accumulation of polystyrene
738 microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver.
739 *Aquat. Toxicol.* 200, 28–36. doi:10.1016/j.aquatox.2018.04.015

740 Zhang, B.-B., Liu, Y.-M., Hu, A.-L., Xu, S.-F., Fan, L.-D., Cheng, M.-L., Li, C., Wei, L.-X.,
741 Liu, J., 2019. HgS and Zuotai differ from HgCl₂ and methyl mercury in intestinal Hg
742 absorption, transporter expression and gut microbiome in mice. *Toxicol. Appl.*
743 *Pharmacol.* 379, 114615. doi:10.1016/j.taap.2019.114615

744 Zhu, J., Tang, L., Qiao, S., Wang, Lijuan, Feng, Y., Wang, Li, Wu, Q., Ding, P., Zhang, Z.,
745 Li, L., 2020. Low-dose methylmercury exposure impairs the locomotor activity of
746 zebrafish: Role of intestinal inositol metabolism. *Environ. Res.* 190, 110020.
747 doi:10.1016/j.envres.2020.110020

ANEXO 1 – FIGURAS

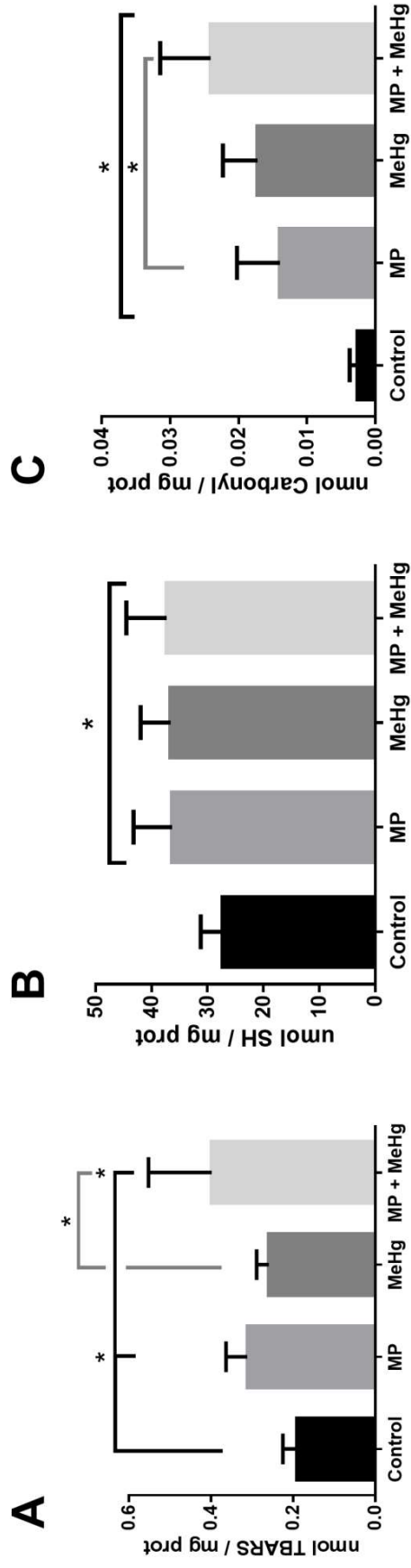


Figura 1: Efeitos isolados e combinados da exposição de PS-MP (1000 µg/L) e MeHg(0,5 mg/Kg) em parâmetros de estresse oxidativo no fígado de animais tratados durante 8 semanas. (A) Quantidade de TBARS, (B) conteúdo de SH e (C) quantidade de grupamentos carbonílica. Média ± desvio padrão.

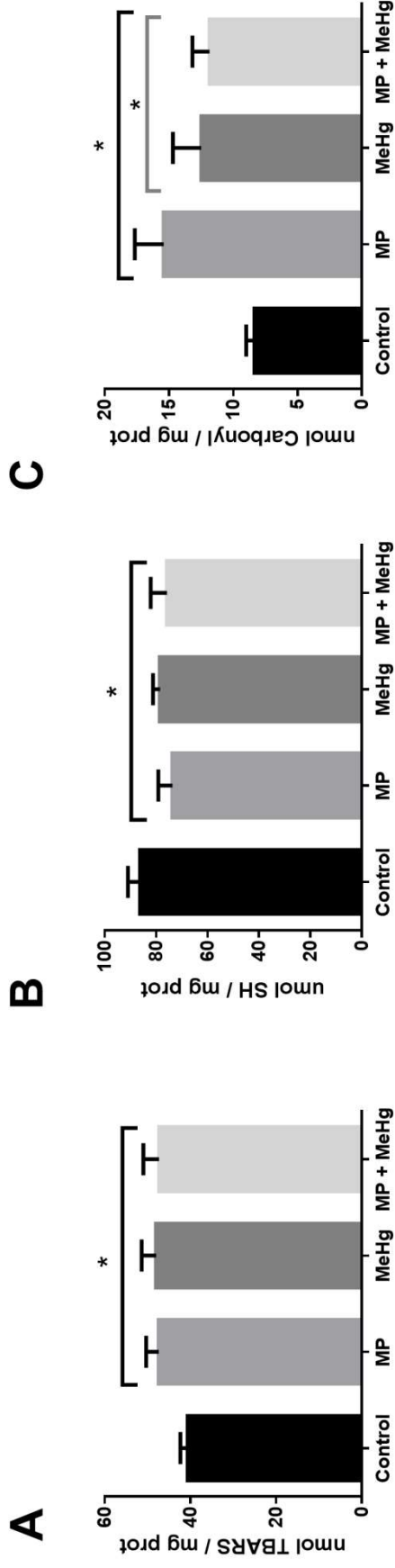


Figura 2: Efeitos isolados e combinados da exposição de PS-MP (1000 µg/L) e MeHg (0,5 mg/Kg) em parâmetro de estresse oxidativo nos rins de animais tratados durante 8 semanas. (A) Quantidade de TBARS, (B) conteúdo de SH e (C) quantidade de grupamentos carboníla. Média ± desvio padrão.

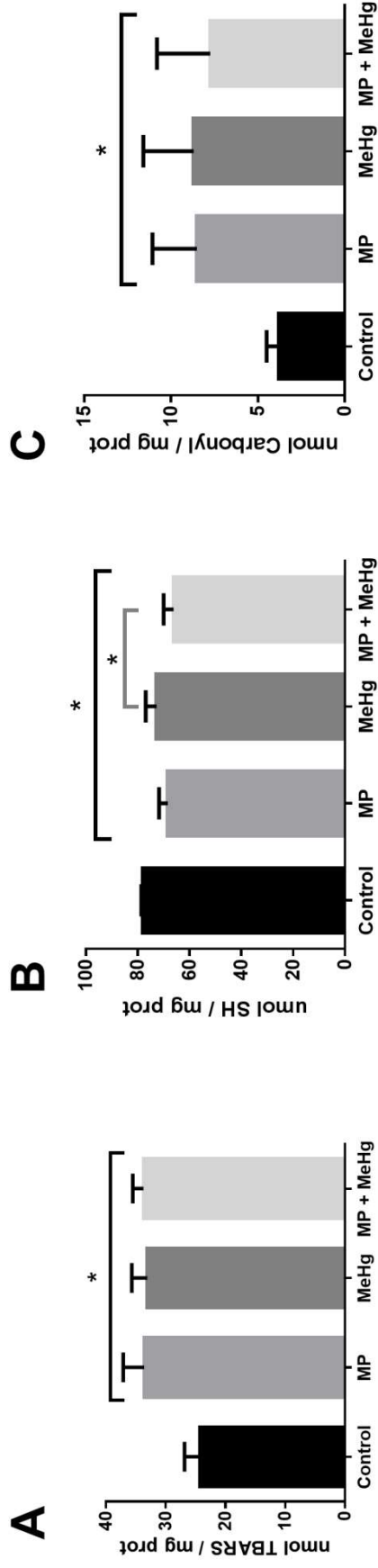


Figura 3: Efeitos isolados e combinados da exposição de PS-MP (1000 µg/L) e MeHg(0,5 mg/Kg) em parâmetro de estresse oxidativo no coração de animais tratados durante 8 semanas. (A) Quantidade de TBARS, (B) conteúdo de SH e (C) quantidade de grupamentos carbonílica.

Média ± desvio padrão.

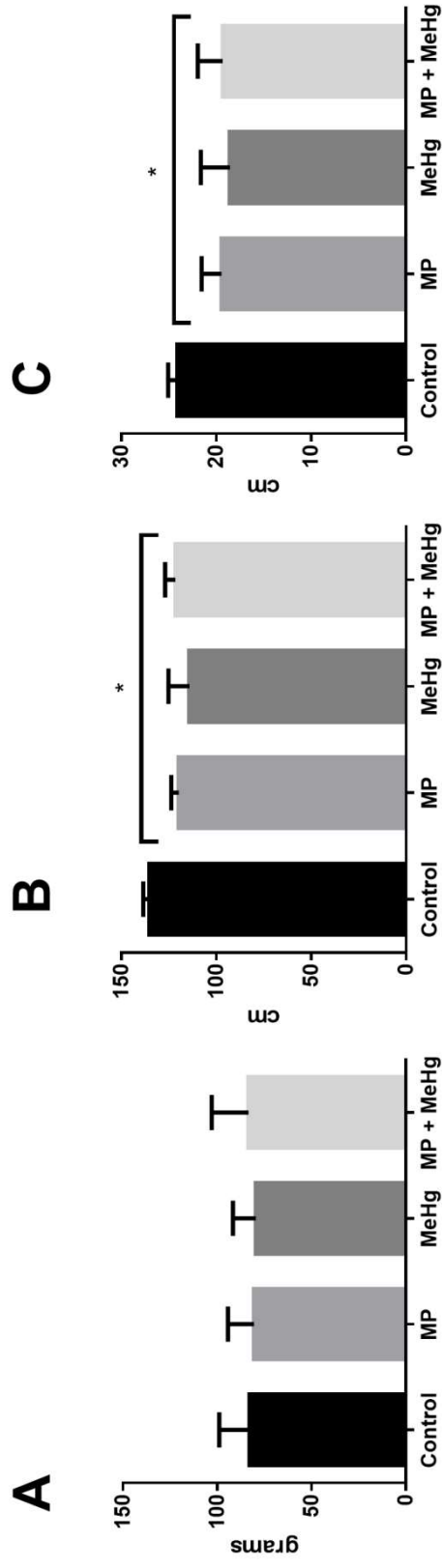


Figura 4: Efeitos isolados e combinados da exposição de PS-MP (1000 µg/L) e MeHg(0,5 mg/Kg) em parâmetros morfométricos de animais tratados durante 8 semanas. (A) Ganho de peso,, (B) comprimento do intestino delgado e (C) comprimento do intestino grosso.

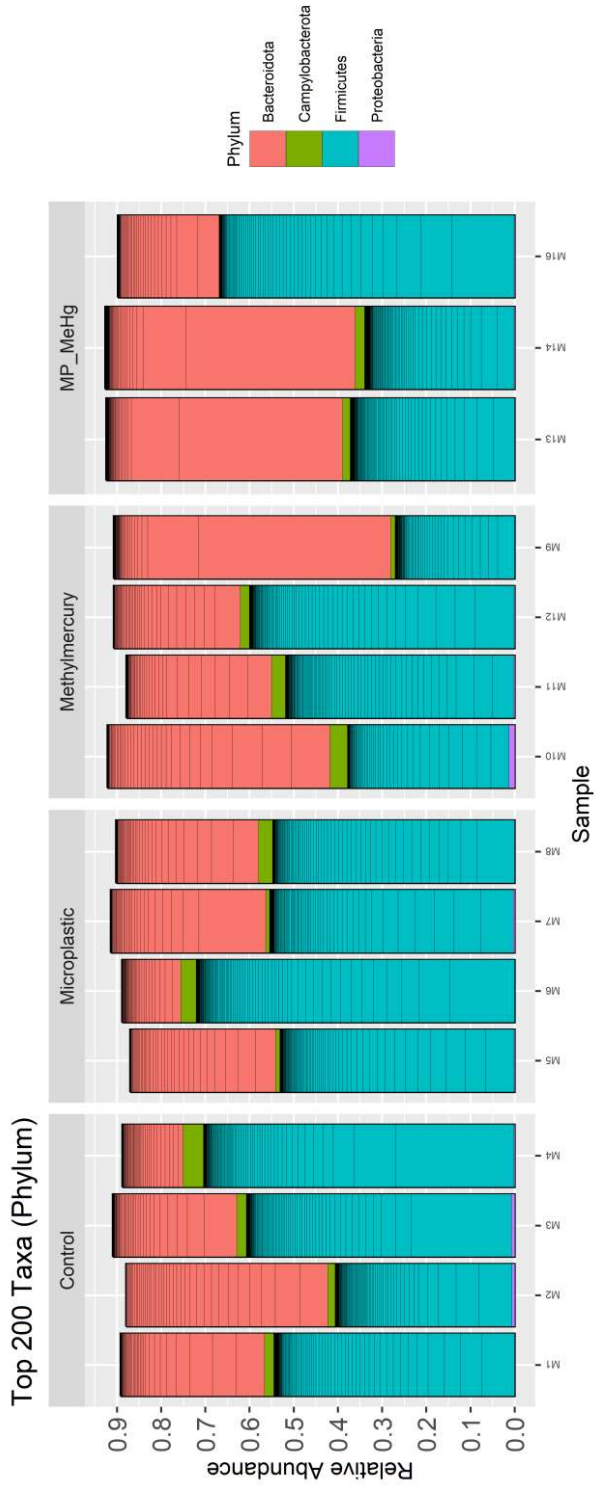


Figura 5: Abundância relativa dos 200 filós mais representativos. n=15

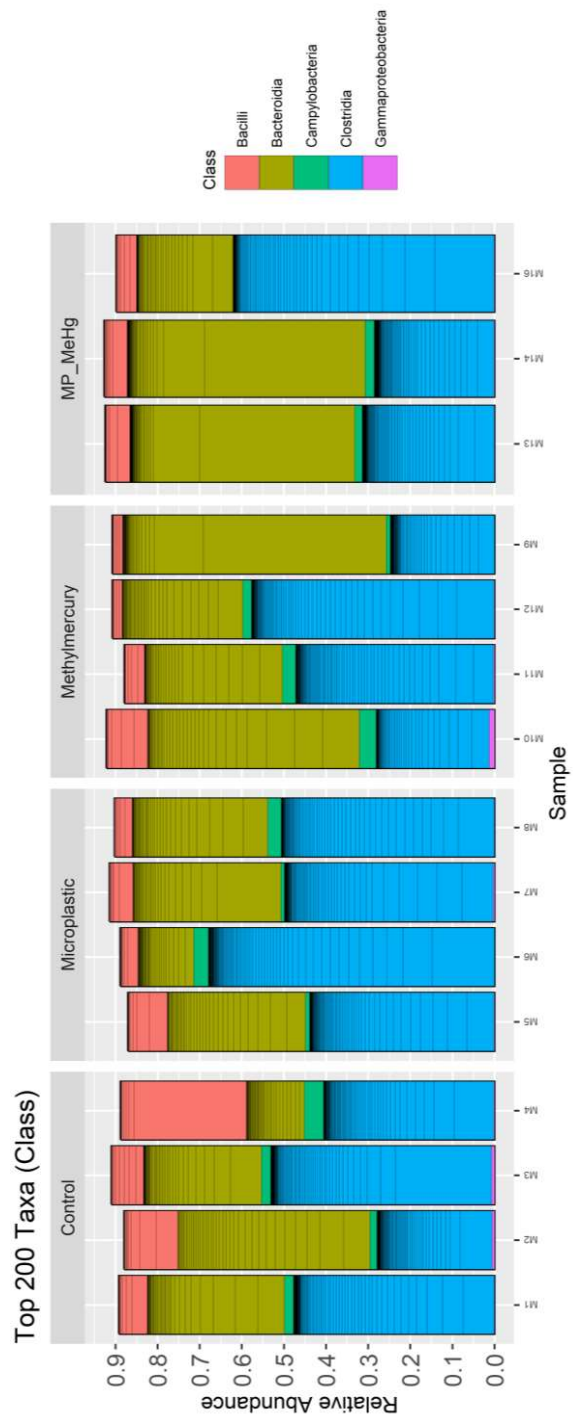


Figura 6: Abundância relativa das 200 classes mais representativas. n=15

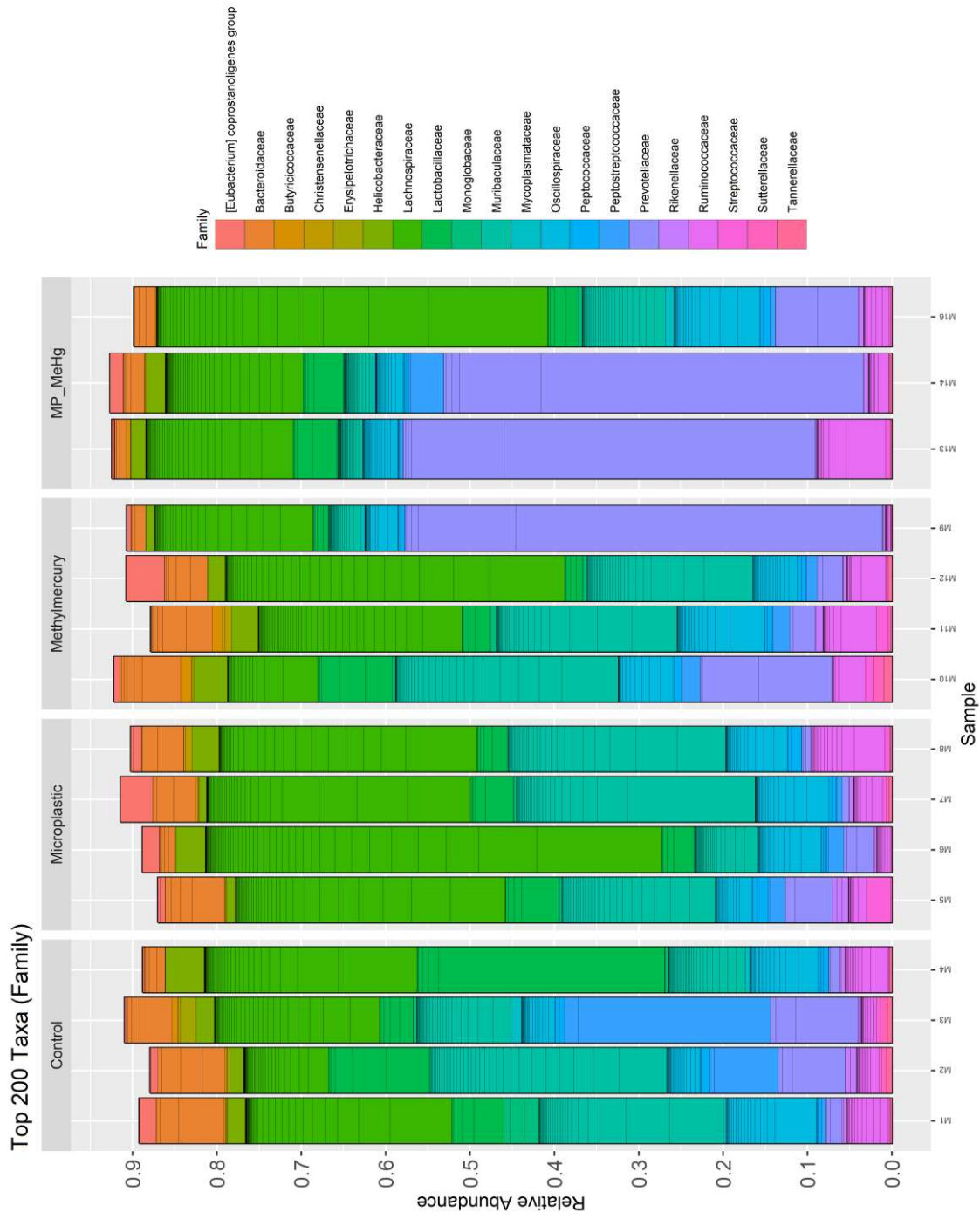


Figura 7: Abundância relativa das 200 famílias mais representativas. n=15.

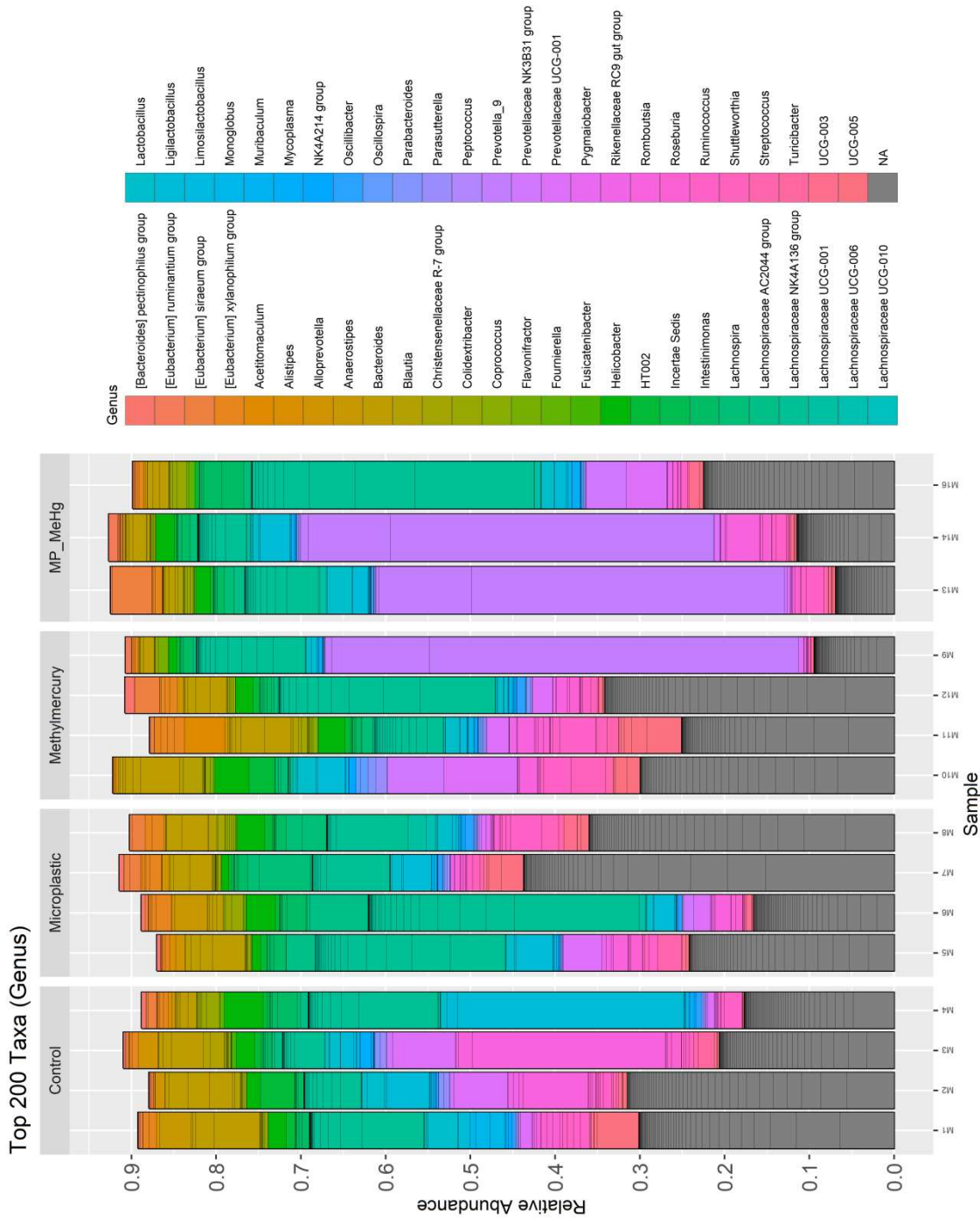
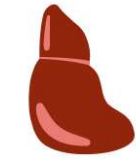


Figura 8: Abundância relativa dos 200 gêneros mais representativos. n=15.



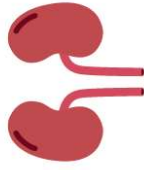
Exposição de 8 semanas através da água
Microplásticos de Poliestireno (1 mg/L) + Metilmercúrio (0,5 mg/Kg)



TBARS de Fígado ↑

SH de Fígado ↑

Carbonil de Fígado ↑



TBARS de Rins ↑

SH de Rins ↓

Carbonil de Rins ↑



TBARS de Coração ↑

SH de Coração ↓

Carbonil de Coração ↑



Sem alteração na microbiota

Comprimento do intestino delgado ↓

Comprimento do intestino grosso ↓

Figura 9: Resumo gráfico