

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Jaison Ferreira dos Santos

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

Porto Alegre

2024

Jaison Ferreira dos Santos

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

Trabalho de conclusão de curso
submetido como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas na Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Coorientador: Henrique Mautone Gomes

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Jaison Ferreira

Efeitos isolados e combinados da administração de micropartículas de Poliestireno e Metilmercúrio em ratos Wistar : análise de parâmetros de estresse oxidativo e comportamento / Jaison Ferreira Santos. -- 24.

55 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, 24.

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

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Jaison Ferreira dos Santos

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

Trabalho de conclusão de curso submetido como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca
Moreira

Coorientador: Henrique Mautone Gomes

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. Marcelo Dutra Arbo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

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

Autores: Jaison Ferreira dos Santos^{a@}, Henrique Mautone Gomes^a, Alberto Martins Silva^a, Alexandre Kléber Silveira^a, Daniel Pens Gelain^a, José Cláudio Fonseca Moreira^a.

^aCentro 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: Jaison.97@hotmail.com

Resumo:

No ambiente, os plásticos estão sujeitos à degradação por processos biológicos e físico-químicos, gerando partículas menores. São chamados de microplásticos (MPs) as partículas com tamanhos entre 1 µm e 5 mm. Estudos já demonstraram a presença de MPs em produtos alimentícios, medicamentos e cosméticos. Também podem ser encontrados em diversos níveis tróficos e em humanos. MPs de poliestireno são capazes de se translocar do lúmen intestinal para a corrente sanguínea e provocar efeitos prejudiciais a nível celular e tecidual. Já o metilmercúrio (MeHg) é um contaminante ambiental cuja exposição, mesmo que branda, pode resultar em riscos à biota e à saúde humana, sendo capaz de atravessar membranas biológicas. Devido à ampla distribuição e capacidade de bioacumulação, os microplásticos e o mercúrio (Hg) são considerados grandes ameaças à saúde humana e ao meio ambiente. No entanto, suas interações toxicológicas, especialmente os efeitos combinados, ainda são pouco compreendidos e por isso precisam ser melhor elucidados. O presente estudo tem como objetivo quantificar o dano oxidativo a macromoléculas por meio de ensaios redox, para -SH total, -SH não proteico, TBARS e carbonila; identificar alterações

comportamentais, por meio do teste de campo aberto e Labirinto em cruz elevada; e o imunocnteúdo das proteínas de oclusão Ocludina e Claudina-5 em ratos Wistar. as análises foram realizadas a partir de cerebelo, córtex pré-frontal e córtex total de ratos Wistar. O teste de azul de Evans foi utilizado para verificar a permeabilidade de membrana em fígado e cérebro total; Evidenciamos aumento de dano oxidativo como diminuição nas quantidades de -SH total, TBARS e carbonila causado por MP e MeHg em todos os tecidos analisados de forma individual ou de modo conjunto, aumento da permeabilidade das membranas e possíveis alterações comportamentais relacionadas ao dano oxidativo observado pelas contaminações estudadas. Apesar dos esforços do nosso estudo, ainda não estão claros os mecanismos de toxicidade e os efeitos no status redox e comportamental, dito isso mais estudos são necessários para elucidar e corroborar as análises feitas aqui.

Palavras-chave : Metilmercúrio; Microplástico; Estresse Oxidativo; Permeabilidade; Comportamento; Imunocnteúdo;

Abstract:

In the environment, plastics are subject to degradation by biological and physicochemical processes, generating smaller particles. Particles with sizes between 1 μm and 5 mm are called microplastics (MPs). Studies have already demonstrated the presence of MPs in food products, medicines, and cosmetics. It can also be found at various trophic levels and in humans. Polystyrene MPs are capable of translocating from the intestinal lumen to the bloodstream and causing harmful effects at the cellular and tissue level. Methylmercury (MeHg) is an environmental contaminant whose exposure, even if mild, can result in risks to biota and human health, being able to cross biological membranes. Due to their wide distribution and bioaccumulation capacity, microplastics and mercury (Hg) are considered major threats to human health and the environment. However, their toxicological interactions, especially the combined effects, are still poorly understood and therefore need to be better elucidated. The present study aims to quantify oxidative damage to macromolecules through redox assays, for total -SH, non-protein -SH, TBARS, and carbonyl; identify behavioral changes, through the open field test and elevated cross maze; and the immunocontent of the adhesion

proteins Occludin and Claudin-5. The analyses were performed in the cerebellum, prefrontal cortex, and total cortex of Wistar rats; And the Evans blue test was used to check membrane permeability in the liver and total brain; We evidenced an increase in oxidative damage as a decrease in the amounts of total -SH, TBARS, and carbonyl caused by MP and MeHg in all tissues analyzed individually or jointly, increased membrane permeability, and possible behavioral changes related to the oxidative damage observed by the contaminations studied. Despite the efforts of our study, the mechanisms of toxicity and the effect on redox and behavioral status are still not clear, that said, more studies are needed to elucidate and corroborate the analyses made here.

Keywords: Methylmercury; Microplastic; Oxidative Stress; Permeability; Behavior; Immunocontent.

Highlights:

- Primeiro estudo a utilizar a combinação de MP e MeHg, dois contaminantes emergentes, demonstrando efeitos sinérgicos entre eles.
- Análise extensiva do dano oxidativo causado na fase de desenvolvimento juvenil em ratos Wistar
- A exposição combinada de MP + MeHg causa aumento da permeabilidade da BHE e redução do imunoconteúdo de Ocludina e Claudina-5

Abreviações:

4-HNE - 4-hidroxinonenal

ATP - Adenosina trifosfato

AGEs - Produtos de glicação avançada

BHE - Barreira Hematoencefálica

CAT - Catalase

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DNPH - Dinitrofenilhidrazina;

DTNB - 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico ;

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

GSH-Px - Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂O - Água

Hg - Mercúrio;

LDH - Lactato desidrogenase

MPs - Microplásticos;

MeHg - Metilmercúrio;

NPs - Nanoplásticos;

PBS - Tampão fosfato salina;

SH - Tíol reduzido;

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

TBA - Ácido Tiobarbitúrico;

TBARS - Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico;

TCA - Ácido Tricloroacético;

RNS - Espécies reativas de nitrogênio

ROS - Espécies reativas de oxigênio

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UV - Ultravioleta

Sumário

1. Introdução	10
2. Metodologia	14
2.1. Animais	14
2.2 .Exposição	15
2.2.1. Microplástico	15
2.2.2 .Metilmercúrio	16
3. Técnicas	16
3.1. Azul de Evans	16
3.2. Bradford	16
3.3. Western Blotting	17
3.4. Marcadores de dano oxidativo	18
3.4.1. Conteúdo tiólico ou grupamentos -SH	18
3.4.2. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	18
3.4.3. Carbonila	19
3.4.4. E.L.I.S.A	19
3.5. Comportamento	20
3.5.1. Campo aberto	20
3.5.2. Labirinto em cruz elevada	21
4. Resultados	21
4.1. Permeabilidade de membrana e quantificação de imunocnteúdo de Claudina-5 e Ocludina em tecido cerebral	21
4.2. Marcadores de dano oxidativo em córtex total	22
4.3. Marcadores de dano oxidativo em cerebelo	23
4.4. Marcadores de dano oxidativo em córtex pré frontal	23
4.5. Parâmetros comportamentais em animais expostos a MP e MeHg	24
4.5.1. Campo aberto	24
4.5.2. Labirinto em cruz elevada	25
5. Discussão	25
5.1. Perda do conteúdo de Claudina-5 e Ocludina durante exposição ao MP e MeHg causam aumento da permeabilidade da BHE	25
5.2. Exposição individual e conjunta a MP e MeHg causa aumento de marcadores de dano oxidativo em diferentes tecidos cerebrais	27

5.3. Aumento do comportamento do tipo ansioso devido a danos causados por MP e MeHg	31
6. Conclusão	32
REFERÊNCIAS	34
ANEXO A – Figuras	45

1. Introdução

Henri Braconnot, um francês, foi creditado pela invenção da nitrocelulose, a qual é predecessora do plástico. Em 1868, a produção industrial desta substância começou nos Estados Unidos, liderada pelos irmãos Hyatt, que a utilizaram para fabricar bolas de bilhar. No entanto, a nitrocelulose foi posteriormente substituída por plástico sintético. Entre as duas Guerras Mundiais, surgiram os principais tipos de plásticos sintéticos: Celofane em 1913, policloreto de vinila em 1927, poliestireno e nylon em 1938, e polietileno em 1942. Inicialmente, o plástico foi usado como substituto do marfim (Chalmin et al., 2019)

No entanto, o seu uso intensivo durante diversos anos se deve, principalmente, pela sua versatilidade que vai desde sacolas plásticas e roupas, a itens médicos e eletrônicos, juntamente com o descarte inadequado. Porém, isto tem levado ao acúmulo de resíduos em aterros e oceanos, causando um impacto significativo em diferentes ambientes naturais terrestres e para a vida marinha. A quantidade crescente de partículas plásticas exerce uma carga significativa sobre o ecossistema. Sem ações significativas, projeta-se que a deposição de resíduos plásticos nos ecossistemas aquáticos quase triplique até 2040, com sérios impactos sociais, econômicos e ecológicos negativos (PNUMA, 2021). Apesar da reciclagem ser uma estratégia importante para gerenciar os resíduos plásticos, ela sozinha não consegue acompanhar a quantidade de resíduos gerados. A reciclagem de plásticos enfrenta vários desafios, incluindo a separação eficaz dos diferentes tipos de plásticos e a possibilidade de reutilização, uma vez que a toxicidade do plástico é ampliada com sua reciclagem. Juntamente com a durabilidade, o plástico resultou em riscos potenciais para a economia, a saúde humana e o ambiente (Greenpeace., 2023).

O consenso atual para a definição de microplásticos (MPs) é que eles podem ser considerados partículas plásticas menores que 5 mm, sendo divididos em dois grupos dependentes de sua origem. Os MPs primários que são liberados diretamente para o meio ambiente como pequenas partículas, sendo que as principais fontes são a lavagem de roupas sintéticas (35%), a abrasão de pneus de veículos automóveis durante a condução (28%) e os MPs adicionados

intencionalmente a produtos de higiene pessoal, como por exemplo microesferas em esfoliantes faciais (2%) (European Parliament, 2018). Já os MPs secundários são gerados no ambiente natural e resultam da degradação de matrizes plásticas maiores que usualmente têm sua origem em material incorretamente descartado ou abandonado, como por exemplo sacos de plástico, garrafas de plástico ou redes de pesca (European Parliament., 2018, Rochman, Brookson et al., 2019). Uma vez que as partículas geradas (primária ou secundariamente) a partir destes produtos são despejadas no meio ambiente elas se tornam passíveis de serem ingeridas pelos organismos independentemente do seu nível trófico na cadeia alimentar (Lusher, Welden et al. 2017). Desta forma, a concentração de MPs tende a aumentar ao longo de toda a cadeia trófica, resultado da bioacumulação e, mais tarde, da biomagnificação destas partículas nos níveis superiores da cadeia alimentar, contribuindo, inevitavelmente, para a exposição em humanos e assim passível de causar dano a todo ecossistema e a saúde humana (Rochman, Brookson et al. 2019; Kokalj et al., 2018)

Os resíduos plásticos inevitavelmente chegam ao meio ambiente, e podem ser divididos pelo seu tamanho, em grandes plásticos (>2,5 cm), plásticos médios (tamanho da partícula = 0,5-2,5 cm), microplásticos (MPs) (1 μm –5 mm) e nanoplásticos (NPs) (<1 μm). Todas estas partículas continuam a ser degradadas no ambiente através de vários processos físico-químicos, como intemperismo, radiação ultravioleta (UV) e atividades humanas (Huang et al., 2021). Estima-se que o número total de MPs seja responsável por 92,4% dos detritos plásticos marinhos, e a poluição por MP esteja amplamente distribuída em oceanos, rios, lagos e lavouras (Carr et al., 2016; Wang et al., 2021; Yuan et al., 2020). Os MPs tornaram-se um ponto focal em pesquisas recentes de poluentes devido à sua ampla ocorrência e potenciais riscos ecológicos e também à saúde humana (Law e Thompson, 2014; Thompson et al., 2004). Collard (2019) e Koongolla (2020) coletaram grandes quantidades de dados sobre a poluição de MPs em peixes de água doce e detectaram acúmulo de MPs em mais de 200 espécies. O acúmulo excessivo de MPs tem sido associado a efeitos adversos no sistema digestivo de peixes (Koongolla et al., 2020; Collard et al., 2019), e também alterações no sistema reprodutivo e desenvolvimento larval (Li et al., 2018). Além disso, outros estudos já demonstraram que o acúmulo de MPs pode reduzir a taxa de eclosão em peixes,

além de causar inchaço intestinal e alterações histopatológicas (Choi et al., 2018; Jin et al., 2018).

A carga elétrica, a alta área superficial específica e a hidrofobicidade dos MPs os tornam portadores ideais de outros poluentes (Carr et al., 2016). Isso torna os animais aquáticos especialmente propensos à exposição química, incluindo produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs), produtos químicos desreguladores endócrinos (EDCs), éteres difenílicos polibromados (PBDEs) e poluentes orgânicos persistentes (POPs) em solução aquosa, todos os quais também podem entrar na cadeia alimentar e causar sérios problemas ambientais e de saúde humana (Carr et al., 2016; Liu et al., 2018). Dessa forma desencadeando efeitos catastróficos no ambiente, na biota marinha e alcançando níveis tróficos superiores. Além dos efeitos tóxicos do microplástico na biota aquática, os organismos terrestres também estão suscetíveis a tal poluição, através da inalação e ingestão de alimentos contaminados (Olivatto et al., 2018). O acúmulo de MPs no intestino de aves causa danos físicos e toxicidade química, resultando em deficiência nutricional, deposição de gordura e perda de peso (Zhao et al., 2016). Além disso, já foi relatado por Ragusa et al. e Schwabl et al. à presença de MPs em placenta e em fezes humanas (Ragusa et al., 2021; Schwabl et al., 2019). Leslie et al. (2022) também encontraram e dosaram microplásticos em sangue humano onde a concentração das partículas atingiu uma média de 1,6 microgramas por mililitro (Leslie et al., 2022). Outro estudo produzido no Reino Unido com material coletado através de cirurgias relatou que microplásticos estão presentes em todas as regiões dos pulmões humanos sendo as fibras de polipropileno e polietileno tereftalato as mais abundantes (Jenner et al. 2022).

A presença de microplásticos é uma preocupação crescente devido à sua capacidade de atrair e se ligar a íons metálicos, incluindo o mercúrio. A superfície dos microplásticos pode apresentar cargas elétricas que atraem íons metálicos presentes na água. Além disso, características físicas dos microplásticos, como poros e fendas podem servir como locais de alojamento para esses íons. Devemos levar em conta que seu tamanho também interfere na capacidade de adsorção (Horton et al., 2017; Olivatto et al., 2018). Quando os microplásticos e o mercúrio coexistem em um ambiente aquático, é altamente provável que ocorra uma ligação entre eles. Isso é preocupante, pois pode levar à bioacumulação de mercúrio na

cadeia alimentar aquática, o que pode resultar na transferência do mercúrio ligado aos microplásticos para esses organismos e, eventualmente, ao longo da cadeia alimentar. Isso ressalta a necessidade de estudos mais aprofundados e medidas preventivas para mitigar a poluição por microplásticos nos ecossistemas aquáticos (Torres et al., 2021).

As principais fontes de emissão do mercúrio para o meio ambiente podem ser naturais (desgaseificação da crosta terrestre e atividade vulcânica) e antropogênicas (atividades industrial e agrícola, queima de combustível fóssil, mineração, etc.) (WHO., 1989). Em ambientes naturais, o mercúrio é mais comum na forma de compostos organometálicos com um ou dois carbonos, sendo a forma mais tóxica o metilmercúrio (MeHg) (Brito et al., 2021), um organometálico de cadeia curta com um carbono no radical $[CH_3HgX]$, onde X pode ser um grupo brometo, cloreto, nitrato ou acetato. Sutton (2002) já demonstrou que o metilmercúrio é absorvido através do trato gastrointestinal e acumulado pelos glóbulos vermelhos através do plasma e é responsável por efeitos nocivos para a saúde humana (Olivero-Verbel e Johnson Restrepo., 2004; Sutton et al., 2002).

A taxa de metilação do mercúrio pode influenciar na bioacumulação do elemento uma vez que a concentração de metilmercúrio nos organismos aumenta com a concentração deste na coluna d'água (Watras et al., 1998). O MeHg tem alta capacidade de incorporação pelas células e normalmente encontra-se ligado aos grupos sulfidril da das proteínas, agindo como inibidor e modificador das atividades proteicas (Neathery & Miller., 1975). Além de se acumular nos organismos, o MeHg presente no ambiente pode sofrer biomagnificação, resultando em altas concentrações de mercúrio nos organismos de topo de cadeia (Kasper et al., 2007). Os peixes piscívoros, por exemplo, apresentam maiores concentrações de mercúrio quando comparados aos peixes de menor nível trófico (Palermo et al., 2004; Kasper et al., 2007). O metilmercúrio é distribuído de forma geral após ser absorvido mas possui uma alta afinidade pelo tecido cerebral, onde ele é capaz de difundir para diversas regiões do sistema nervoso e também podendo cruzar a barreira hemato-encefálica (Aschner & Clarkson., 1998; Zareba et al., 2007). Alguns mecanismos como estresse oxidativo, dano mitocondrial, perturbação na função de neurotransmissores e na atividade GABAérgica foram propostos para tentar explicar os efeitos deste composto que é responsável por provocar neurotoxicidade

acumulada e mal desenvolvimento do sistema nervoso central (Espitia-Pérez et al., 2018a; 2018b).

Através dos mecanismos explicados acima, e possivelmente outros, a presença de MPs no ambiente marinho não só representa uma ameaça direta ao ecossistema marinho, mas também pode potencializar a toxicidade de outros contaminantes, como os metais tóxicos, ao atuar como seus vetores. Isso destaca a necessidade de mais pesquisas e medidas para mitigar a poluição por MPs. Apesar das citações anteriores, o potencial sinérgico do microplástico e metilmercúrio em alterar funções cerebrais e causar dano a macromoléculas ainda é pouco estudado.

Desse modo, o presente trabalho tem como objetivos avaliar o possível efeito sinérgico da exposição a micropartículas plásticas de poliestireno e ao metilmercúrio em parâmetros de neurotoxicidade em ratos Wistar. Isso será feito através da análise da permeabilidade do tecido cerebral e de importantes moléculas da junção estreita do cérebro, e também associando a quantificação de marcadores de estresse oxidativo em diferentes estruturas do SNC com os dados comportamentais obtidos.

2. Metodologia

2.1. Animais

Nesse trabalho foram utilizados 56 ratos Wistar machos com 30 dias de idade oriundos da colônia do CREAL-UFRGS. Os animais foram recebidos com 21 dias de idade e foram climatizados e manipulados por sete dias antes do início da exposição para habituação com os pesquisadores.

Com 30 dias de vida se deu início à exposição dos animais, estes foram divididos em quatro grupos:

- 1) Grupo Controle 8+6= 14 animais**
- 2) Exposição individual de microplástico 8+6= 14 animais**
- 3) Exposição individual de metilmercúrio 8+6= 14 animais**
- 4) Exposição associado de microplástico e metilmercúrio 8+6= 14 animais**

Total: 56 animais

Todas as exposições foram realizadas com a mesma metodologia durante oito semanas e a exposição combinada consistiu na mesma dose das exposições individuais, porém com os dois compostos presentes na água, dessa maneira sendo possível avaliar a ocorrência de adsorção do metilmercúrio às partículas plásticas e se isso influenciou em uma maior absorção destes no organismo.

4 animais de cada grupo e que receberam o corante azul de Evans foram eutanasiados através de perfusão para realizar as análises de permeabilidade. 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, O cérebro e fígado foram então dissecados sob gelo e pesados em balança de precisão e armazenados em -80°C para posterior normalização e quantificação do corante.

Os animais destinados às análises redox foram eutanasiados por decapitação utilizando guilhotina e a fim de evitar alterações nos parâmetros bioquímicos avaliados os animais não foram anestesiados. Foram tomadas todas as medidas necessárias para minimizar o estresse e desconforto dos animais antes, durante e depois do procedimento. Os órgãos foram dissecados e separados por tecido sob gelo e para esse estudo utilizamos o córtex total, cerebelo e córtex pré-frontal, posteriormente foram armazenados em -80°C até as análises.

Todas as diretrizes de acordo com a resolução Nº 57, de 6 de dezembro de 2022 e de acordo com a lei 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 seguidas para evitar o sofrimento e o desconforto animal. O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) sob número: **36530**.

2.2. Exposição**2.2.1. Microplástico**

Foram utilizados **MP** da empresa Sphero Tech, código #SPHE-PP5010 de 50 micrômetros (μm) de tamanho e oferecidos na dose de 2000 $\mu\text{g/L}$ que foi elaborada baseado nos trabalhos de Lu et al (2018) e Luo et al (2019). A dose escolhida para

ser utilizada apresentou os efeitos mais evidentes no trabalho de Lu, et al (2018) e segundo os autores ela apresenta cerca de 1.456×10^4 partículas por litro sendo uma concentração ambientalmente relevante. A exposição com **MPs** foi feita através da diluição destes na água disponível nas garrafas dos animais. Brevemente, 2000µg gramas de **MP** foram diluídos em 1 Litro de água que foi a única água disponibilizada para os animais *ad libitum*.

2.2.2. Metilmercúrio

A exposição de metilmercúrio ocorreu através da diluição na água disponível nas garrafas dos animais. A dose de metilmercúrio escolhida é a de 0,5 mg/Kg, 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. Técnicas

3.1. Azul de Evans

Para avaliar a permeabilidade das barreiras fisiológicas, como a barreira hematoencefálica, mediante exposição aos contaminantes foi realizado o ensaio do corante Azul de Evans. O Azul de Evans se liga à albumina tornando o animal azul algumas horas após a aplicação do corante. Sendo a albumina uma proteína relativamente grande, 65-70kDa, quando esta transpassa para tecidos através de barreiras fisiológicas, podemos inferir que há a passagem de outras moléculas menores. O corante foi preparado em solução salina na concentração de 12%, injetada na cavidade peritoneal do animal e verificada a difusão completa algumas horas após a aplicação. Após a eutanásia por perfusão e pesagem dos tecidos de interesse o corante pode ser detectado por homogenização com ácido tricloroacético 50%, e detectada por absorbância de fluorescência em espectrofotômetro a 620nm / 680nm de excitação e emissão, respectivamente (Goldim et al. 2019).

3.2. Bradford

O ensaio de Bradford é uma técnica utilizada para a quantificação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este

método foi utilizado para ponderar todas as amostras para as técnicas utilizadas, o qual é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm. Ao estabelecer uma curva de calibração com base em concentrações padrão de proteínas, podemos determinar a concentração de uma proteína desconhecida em uma solução, medindo a absorbância da solução após a introdução de um corante (Bradford, 1976).

3.3. Western Blotting

Por meio de marcação do imunoconteúdo através da técnica de Western blotting, as proteínas Claudina-5 (#4C3C2) e Ocludina (#OC-3F10) foram semi-quantificados utilizando a β -actina (MA5-15739-D800) como controle *housekeep*. As amostras foram preparadas em tampão RIPA contendo o inibidor de proteases fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) e o inibidor de fosfatases ortovanadato de sódio. Após a ponderação, foi adicionado às amostras tampão Laemli com 10% de beta-mercaptoetanol na proporção de 1:1 e as amostras foram aquecidas à 90° por 5 minutos. As amostras foram então adicionadas ao gel em quantidade de 60 ug por poço. A eletroforese foi feita em 80v por 20 min e posteriormente 60 min a 120v para o gel de stacking e corrida respectivamente. Após a corrida, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através de uma unidade transblotting semi-seca da marca Biorad®. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com albumina a 5% por 60 min, removido o excedente por lavagem com TTBS 4 vezes sob agitação por 15 min. As membranas foram então incubadas com o anticorpo primário de interesse na diluição 1:2000, de acordo com o fabricante, e anticorpo secundário específico também na diluição de 1:2000. Para revelação foi utilizado o Kit SuperSignal com número de catálogo 34578 da empresa Thermo Fisher. As bandas foram quantificadas utilizando o software ImageJ® e ponderadas por B-actina.

3.4. Marcadores de dano oxidativo

Alguns marcadores de estresse oxidativo foram avaliados em diferentes estruturas do sistema nervoso por meio de ensaios espectrofotométricos para se quantificar o dano oxidativo a biomoléculas nestas estruturas, como: -SH protéico e não-protéico e grupamentos carbonila para avaliar o dano a proteínas e aminoácidos; formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e formação de 4-hidroxinonenal, para avaliar a peroxidação lipídica; e formação de nitrotirosina para avaliar brevemente o estresse por espécies reativas de nitrogênio; além disso, foi também avaliada a formação de carboximetilisina, um composto de glicação avançado.

3.4.1 Conteúdo tiólico ou grupamentos -SH

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 realizada e a placa lida no momento 0 usando 412 nm. Após 1 hora de incubação, a absorbância 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).

3.4.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme descrito por Esterbauer e Chessman (1990). A reação do ácido tiobarbitúrico com lipoperóxidos presentes em meio ácido aquecido a 100° C confere às amostras uma coloração rosa que pode ser lida por espectrofotometria. Resumidamente, 1 mg de proteína das amostras foi precipitado utilizando TCA na concentração final de 20% e centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos. Após isso, o sobrenadante foi coletado e 100 µL transferidos para uma placa de espectrofotometria, 100 µL de ácido tiobarbitúrico 0,67% foram adicionados a cada poço e a placa foi aquecida a 100°C por 20 minutos em

dryblock. A placa foi lida no comprimento de onda de 532 nm usando um espectrofotômetro (SpectraMaxI3). Uma curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano, um padrão de lipoperóxido, foi utilizada para quantificação. Os resultados são expressos como nmol TBARS/mg de proteína.(Esterbauer & chessman., 1990)

3.4.3 Carbonila

Os grupos carbonila foram medidos conforme descrito anteriormente por Levine et al (1990) para avaliar o dano oxidativo às proteínas Este método foi baseado na reação da dinitrofenilhidrazina com grupos carbonila das proteínas nas amostras. Resumidamente, foram preparados dois tubos, um tubo branco e um tubo DNPH. Para cada tubo, 1 mg de proteína de amostras de órgãos foi precipitado utilizando TCA na concentração final de 20% e centrifugado a 4000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão com NaOH 0,2 M. Os tubos brancos foram incubados com HCl 2M e os tubos DNPH foram incubados com DNPH 10mM, ambos por 1h sob gelo e agitação a cada 15 minutos. Em seguida, as amostras foram precipitadas novamente com TCA na concentração final de 20%, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado três vezes com 500 µL de solução de etanol/acetato de etila (1:1); após completa evaporação da solução de etanol/acetato de etila, os pellets foram ressuspensos utilizando 1mL de Uréia 8M (pH 2,3). Ao final, 200 µL foram transferidos dos tubos para uma microplaca e a absorbância foi lida a 370 nm utilizando um espectrofotômetro SpectraMax I3. Os valores da amostra em branco foram deduzidos a partir de amostras de DNPH e os resultados são expressos como µmol carbonil/mg de proteína.

3.4.4 E.L.I.S.A.

Foram utilizadas placas de 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 Thermo Fisher e diluídos na concentração de 1:4000 para uso. Os números de catálogo dos anticorpos são os seguintes:

Nitrotirosina (#Ab7048), 4-Hidroxinonenal (#Ab46545) e Carboximetilisina (#Ab27684).

As amostras foram homogeneizadas e normalizadas em tampão fosfato 50 mM (K₂HPO₄, pH 7,4). A concentração final utilizada para todas as amostras foi de 10 µg/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 µL de anticorpo primário (1:4000) 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 ligado à peroxidase adquirido da Merck (AP#132P) numa concentração de 1:2000 durante 2 horas. Após lavar a placa três vezes com tampão de lavagem, 100 µL de solução de substrato (kit de detecção espectrofotométrica ELISA TMB) foram adicionados a cada poço e incubados por 10 min. A reação foi finalizada com 50 µL/poço de reagente de parada ácido sulfúrico 2 M e a absorbância lida a 450 nm em espectrofotômetro (SpectraMax® i3). Os resultados são expressos em porcentagem relativa aos grupos controle.

3.5. Comportamento

3.5.1. Campo aberto

Para o teste de campo aberto, a tarefa foi realizada em uma arena de 40 x 50 cm cercada por paredes pretas e foscas de 50 cm de altura. Todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação, permitindo que “conheçam” o aparato livremente por 2 minutos. Para o teste efetivo, os animais foram postos por 10 minutos após o tempo de habituação na arena e além de comportamentos do tipo *rearing* e *grooming* alguns parâmetros foram levados em conta como a locomoção total do animal, tempo e distância percorrida na área central, tempo e distância percorrida na periferia e tempo de imobilidade. Após a gravação das imagens, os vídeos obtidos foram analisados através do software *anymaze* (Estrela et al. 2021).

3.5.2. Labirinto de cruz elevada

O labirinto de cruz elevado é um teste utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansioso nos animais. O teste utiliza um aparato elevado em forma de cruz, com dois braços fechados e dois braços abertos e se baseia na aversão de roedores por espaços abertos. Alguns parâmetros são utilizados como medidas para avaliar esse tipo de comportamento, como o tempo decorrido nos braços abertos e nos braços fechados, assim como o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, distância percorrida e tempo de imobilidade. Após a gravação das imagens, os vídeos obtidos foram analisados através do software *anymaze* (Pellow et al, 1985).

4. Resultados

4.1. Permeabilidade de membrana e quantificação de imunoconteúdo de Claudina-5 e Ocludina em tecido cerebral

O ensaio do azul de Evans (Figura 1) é utilizado para se verificar a permeabilidade de barreiras fisiológicas irrigadas pela circulação sanguínea através da ligação do corante com a albumina. Durante a quantificação do corante em homogenato de fígado (A) verificamos que existe uma maior presença do corante nos animais expostos à MP+MeHg ($p=0,0195$) quando comparados ao grupo Controle. As demais exposições não elevaram a permeabilidade no fígado dos animais. Também houve um aumento da permeabilidade ao corante no homogenato de cérebro total (B) dos animais expostos ao MP ($p=0,0476$), e também dos animais que receberam a coexposição ($p=0,0139$) quando comparadas ao grupo Controle. A exposição individual ao MeHg não levou à uma maior permeabilidade ao corante ($p=0,2619$).

A técnica de Western blotting foi utilizada neste estudo para investigar as alterações no imunoconteúdo das proteínas de junção estreita, ocludina e claudina-5 no cerebelo dos animais expostos (Figura 2&3). Os resultados indicaram uma diminuição significativa no imunoconteúdo de ocludina (A) em todas as condições de exposição (MP: $p=0,0061$, MeHg: $p=0,0074$, MP+MeHg: $p=0,0132$), comparadas a grupo Controle. Além disso, observou-se também uma diminuição no

imunoconteúdo de claudina-5 (B) durante a exposição a MeHg ($p=0,0149$) e a coexposição à MP + MeHg ($p=0,0185$), comparadas ao grupo Controle. No entanto, não foi observada diminuição na quantidade de claudina-5 na exposição isolada à MP ($p=0,3030$).

4.2. Marcadores de dano oxidativo em córtex total

Na Figura 4 está representada a quantificação de diferentes marcadores de dano oxidativo a macromoléculas em homogenato de córtex total. Foram quantificados os níveis de grupamentos -SH totais (A) e -SH não-protéicos (B), TBARS (C) foi utilizado como um marcador de lipoperoxidação, e também quantificamos a oxidação de proteínas por meio do ensaio de Carbonil (D). Aqui observou-se que os grupos MeHg ($p=0,0002$) e MP + MeHg ($p=0,0004$) exibiram uma diminuição expressiva nos grupamentos -SH totais. Esta redução também foi vista nos grupos MeHg ($p=0,0004$) e MP + MeHg ($p=0,0332$) quando comparados ao grupo MP. Por outro lado, a análise dos grupamentos -SH não protéicos revelou um aumento em sua quantidade após exposição ao MP ($p=0,0082$) e durante a coexposição ($p=0,0028$). Além disso, foi observado um aumento significativo nas quantidades de espécies reativas ao TBA no grupo MP ($p=0,0338$), no grupo MeHg ($p=0,0185$) e um aumento na exposição à MP + MeHg ($p=0,0094$). Os grupamentos carbonila apresentaram um aumento nas exposições à MP ($p=0,0181$) e MP+MeHg ($p=0,0054$) quando comparadas ao grupo Controle e a exposição ao MeHg não apresentou alterações significativas na quantidade de grupamentos carbonila em córtex total ($p>0,05$).

Na Figura 5 está representada a quantificação de outros marcadores de dano oxidativo a macromoléculas por meio do ensaio de E.L.I.S.A. em córtex total. Foi observado um aumento nos níveis de nitrotirosina (A) somente na exposição conjunta de MP+MeHg ($p=0,0022$) quando comparado ao Controle. O grupo MP+MeHg ($p<0,0001$) apresentou o aumento mais significativo na quantidade de 4-HNE (B) quando comparado ao Controle e também apresentou diferença significativa quando comparado individualmente com o grupo MP ($p=0,0375$) e também com o grupo MeHg ($p=0,0494$). Foi observado um aumento na quantidade de carboximetilisina (C) durante a exposição ao MeHg ($p=0,0068$) quando comparado ao grupo Controle. Também foi demonstrado esse aumento no grupo

MeHg quando comparado às outras exposições MP vs MeHg ($p=0,0241$) e MeHg vs MP + MeHg ($p=0,0362$), mas essas diferenças não estão representadas.

4.3. Marcadores de dano oxidativo em cerebelo

Foram quantificados os mesmos marcadores de dano oxidativo no cerebelo destes animais, estes resultados estão representados na Figura 6. Quando comparados ao Controle, os grupamentos -SH totais (A) se apresentaram significativamente menores durante a coexposição a MP + MeHg ($p=0,003$). Além disso, individualmente as exposições também foram capazes de reduzir os níveis de -SH total, MP ($p=0,0317$) e MeHg ($p=0,0053$). A quantificação de -SH não protéicos (B) indica que o grupo MP + MeHg causa uma perda significativa dos níveis desse marcador quando comparado com o grupo Controle ($p=0,0092$) e ao grupo MeHg ($p=0,0016$), mas não quando comparado ao MP ($p>0,05$). O grupo MP + MeHg apresentou aumento significativo nas quantidades de TBARS (C) em relação aos grupos Controle ($p<0,0001$), MP ($p=0,0249$) e MeHg ($p=0,0092$). Os grupos MP ($p=0,0090$) e MeHg ($p=0,0132$) também estavam significativamente elevados em relação ao grupo Controle. Os Grupamentos carbonila (D) tiveram aumento significativo em suas quantidades nas exposições a MP ($p=0,0428$), MeHg ($p=0,0339$) e na coexposição a MP + MeHg ($p=0,0038$).

Os resultados das análises por ELISA do cerebelo dos animais testados (Figura 7) indicam que as exposições à MeHg ($p=0,0009$) e ao MP + MeHg ($p=0,0002$) aumentaram significativamente a quantidade de nitrotirosina (A), a exposição conjunta também apresentou significância quando comparada ao grupo MP ($p=0,017$). Observou-se aumento na quantidade de 4-HNE (B) nas exposições à MP ($p=0,0197$), MeHg ($p=0,0003$) e durante a coexposição a MP+MeHg ($p=0,0013$). A carboximetilisina (C) apresentou-se elevada durante a exposição individual a MeHg ($p=0,0471$), mas seu aumento mais significativo foi observado na coexposição a MP + MeHg ($p<0,0001$). A carboximetilisina também mostrou significâncias das análises quando comparado os grupos MP vs MP + MeHg ($p=0,0069$) e MeHg vs MP + MeHg ($p=0,0134$).

4.4. Marcadores de dano oxidativo em córtex pré frontal

A Figura 8 apresenta os resultados da quantificação de marcadores de dano oxidativo no córtex pré-frontal dos animais expostos. Para os grupamentos -SH totais (A) e grupamentos -SH (B) não protéicos não foi observado relações significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Os grupos MeHg ($p = 0,0135$) e MP+MeHg ($p = 0,0088$) apresentaram aumento significativo nas quantidades de TBARS (C). Também foi observado um aumento dos grupamentos carbonila (D) nas exposições a MP ($p = 0,0453$), à MeHg ($p = 0,0175$) e durante a coexposição de MP + MeHg ($p = 0,0065$) quando comparados ao Controle.

Na Figura 9 está representada a quantificação dos marcadores avaliados por ELISA no córtex pré-frontal dos animais expostos. Não fomos capazes de observar uma alteração nos níveis de nitrotirosina (A), 4-HNE (B), ou carboximetilisina (C) entre as exposições quando comparadas entre si ou quando comparadas com o Controle.

4.5. Parâmetros comportamentais em animais expostos a MP e MeHg

4.5.1. Campo Aberto

Antes da eutanásia, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto. Os dados coletados foram analisados pelo software Anymaze e os gráficos demonstrados na Figura 10 foram construídos utilizando o Graphpad Prism. Durante a exposição à MP + MeHg ($p = 0,0101$), os animais apresentaram uma diminuição da distância total percorrida (A), as outras exposições não alteraram a distância total. Observou-se aumento no tempo de imobilidade (E) quando expostos a MP ($p = 0,0368$) e MP + MeHg ($p = 0,0066$) se comparados ao grupo Controle. Para distância total percorrida na periferia (F) observou-se um aumento da distância nos grupos expostos a MeHg ($p = 0,0257$) e a MP+MeHg ($p = 0,0263$) quando comparados ao Controle. Nos demais parâmetros comportamentais não foram observadas correlações significativas ($p > 0,05$).

4.5.2. Labirinto de cruz elevada

O teste de labirinto em cruz elevada apresentado na figura 11, nos evidenciou um aumento na distância total percorrida (A) nos grupos expostos a MP ($p=0,0286$) e MP + MeHg ($p=0,0199$), quando comparados ao controle, a exposição MeHg não apresentou alterações significativas ($p>0,05$). Observou-se também aumento no tempo de estadia nos braços fechados (B) para as exposições a MP ($p=0,0422$), à MeHg ($p=0,0055$) e para a coexposição MP + MeHg ($p=0,0064$), comparadas ao controle. Em relação ao tempo no braço aberto (C), as exposições a MP ($p=0,0376$), à MeHg ($p=0,0002$) e a coexposição MP + MeHg ($p=0,0099$) apresentaram redução no tempo de estadia, comparadas ao grupo Controle. Os grupos MeHg ($p=0,0394$) e MP+MeHg ($p=0,0485$) apresentaram um maior número de entradas no braço fechado (E) quando comparadas ao grupo Controle. Obtivemos também redução significativa nas entradas no braço aberto (F) para os grupos expostos a MP ($p=0,0243$) e a MP + MeHg ($p=0,0072$), comparadas ao grupo Controle. Não observou-se significância no tempo total de permanência na área central (D) ($p>0,05$).

5. Discussão

5.1. Perda do conteúdo de Claudina-5 e Ocludina durante exposição ao MP e MeHg causam aumento da permeabilidade da BHE

As proteínas de junção estreita da barreira hematoencefálica (BHE) são vitais para manter a integridade das células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos cerebrais. A presença desses complexos proteicos no espaço entre as células endoteliais cria um microambiente dinâmico, altamente regulado e restritivo que é vital para a homeostase neural. Ao limitar a difusão de material entre o sangue e o cérebro, as proteínas de junção estreita fornecem uma barreira protetora que impede a passagem de material indesejado (Vieira et al. 2013). A perda da integridade da BHE pode levar à disfunção da homeostase hídrica, edema e facilita a entrada de mediadores inflamatórios no sistema nervoso central (SNC), assim como anticorpos, proteínas plasmáticas e séricas e anafilatoxinas, culminando em neuroinflamação (Zlokovic., 2008). Sua disfunção tem sido associada a várias

doenças neurológicas (Abbott et al., 2010). Um estudo mostrou que os MPs podem translocar (dependendo de sua hidrofiliçidade) e atingir a circulação, especialmente durante a inflamação devido ao aumento da permeabilidade tecidual (Browne et al., 2008). Yang (2022) observou que MPs podem atravessar o trato intestinal e que partículas de Poliestireno aumentam o risco potencial de distúrbios neurobiológicos (Yang et al., 2022). De forma geral, nossos resultados indicam que MP e o MeHg podem comprometer a integridade das junções estreitas, aumentando a permeabilidade da BHE ao corante azul de Evans.

Observamos uma redução no conteúdo de Claudina-5 e Ocludina juntamente com o aumento da permeabilidade ao corante azul de Evans (Figuras 1&2). Aqui nós demonstramos que ambos os contaminantes, mas particularmente a coexposição, são capazes de alterar a permeabilidade e adesão no tecido cerebral e possivelmente a arquitetura do tecido, porém este último não está presente neste estudo e é um dos pontos fracos desse trabalho. Alguns outros estudos já demonstraram a elevada biodisponibilidade de partículas NPs quando comparadas com MPs (Browne et al., 2008). Schirinzi et al (2017) estudaram a citotoxicidade de nanomateriais e MPs comumente usados em células humanas cerebrais e epiteliais. Seus resultados indicam que as partículas de poliestireno causam maior estresse oxidativo do que as partículas de polietileno e atribuíram isso ao menor tamanho do poliestireno em comparação com as partículas de polietileno (Schirinzi et al., 2017). Também foi observado a permeabilidade da barreira hematoencefálica para nanopartículas de poliestireno in vivo (Yang et al., 2004). Não obstante, o potencial do NP de causar efeitos cerebrais já foi descrito em conjunto com alguns quadros, como o Parkinson (Liu et al., 2023], e a encefalopatia hepática causada pela contaminação por ferro (Liu, X, et al., 2022) e possivelmente outros contaminantes e poluentes orgânicos. É evidente, que haja alguma espécie de efeito neurotóxico observado durante a contaminação por NP e MP, porém ainda não são claros os mecanismos pelos quais esse processo se desenvolve e qual a contribuição, se existe, destas partículas durante o desenvolvimento ou seu efeito com outros contaminantes.

5.2. Exposição individual e conjunta a MP e MeHg causa aumento de marcadores de dano oxidativo em diferentes tecidos cerebrais

Até o nosso conhecimento, poucos trabalhos avaliaram de forma completa o perfil oxidativo durante a exposição com MP e nenhum utilizando a combinação de MP e MeHg. Nas Figuras de 4-9 nós utilizamos diferentes técnicas e marcadores de oxidação a macromoléculas para avaliar o dano oxidativo a algumas estruturas cerebrais, o que até onde sabemos não foi feito extensivamente por nenhum outro trabalho.

Após a contaminação por metilmercúrio, ele é absorvido pelo sistema gastrointestinal, o metilmercúrio então sofre uma conjugação com a hemoglobina, uma proteína intracelular predominante nos eritrócitos, e é subsequentemente introduzido na circulação via porta-hepática. A distribuição subsequente do metilmercúrio ocorre em todo o organismo, onde se observa uma afinidade particular pela cisteína, um aminoácido que é um componente integral da maioria das proteínas (Hong et al., 2012). Esta associação é facilitada pela proeminente afinidade que o metilmercúrio demonstra pelos grupos sulfidril (-SH). Isso resulta na formação do complexo metilmercúrio-cisteína, que facilita o transporte para diversas células e confere a capacidade de transpor tanto a barreira hematoencefálica quanto a placentária (UNEP., 2008). A capacidade desta forma química do mercúrio de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) é atribuída à sua lipofilia acentuada e à existência de transportadores neutros de aminoácidos. A eficiência do transporte por meio desses transportadores é assegurada pela similaridade estrutural entre o complexo metilmercúrio-cisteína e a metionina (Carocci et al., 2014; Roos et al., 2012). Os mecanismos de neurotoxicidade do MeHg são bastante complexos e muitos desconhecidos, mas podemos citar a interação com os grupos tióis (-SH) e a ligação à glutathiona (GSH). O metilmercúrio exibe uma afinidade significativa para os grupos -SH, o que facilita a ligação deste composto químico a diversos peptídeos presentes no organismo. Isso induz alterações nas proteínas, que podem resultar na inativação de certas enzimas vitais para a manutenção do equilíbrio redox (Bernhoft ., 2012). Além disso, a constante ligação do metilmercúrio à cisteína diminui a biodisponibilidade deste aminoácido, por exemplo, nos astrócitos. Como demonstrado pelos nossos resultados o MeHg causou diminuição nas quantidades de -SH total em córtex total e cerebelo (Figura

4&6). Estas células da glia têm a função de ceder cisteína aos neurónios para que estes consigam sintetizar a glutathiona (Antunes et al., 2016). Já se acredita que o sistema nervoso central é o alvo principal da ação tóxica do MeHg, através do mecanismo de mimetismo molecular o MeHg pode combinar-se com grupos de proteínas e aminoácidos, facilitando sua passagem pela barreira hematoencefálica através de transporte ativo se ligando a cisteína. Isto forma o complexo metilmercúrio-cisteína, sendo esta uma forma de maior deposição cerebral (Hoffmeyer et al., 2006; Espitia et al., 2018a). Além da deposição cerebral e ação neurotóxica, o MeHg também é descrito como teratogênico, imunotóxico, mutagênico e carcinogênico, podendo levar a um desenvolvimento deficiente, debilidade generalizada e morte prematura (Clarkson et al., 2003).

Como indicado por nossos resultados, não só os MPs têm a possibilidade de acarretar um aumento da permeabilidade tecidual e dano oxidativo, mas o MeHg também possui potencial de produzir danos em muitos sistemas, estando o ser humano e várias espécies animais sensíveis a tal composto. Particularmente no período de vida fetal e neonatal (Fagundes et al., 2022). Níveis totais de -SH são utilizados para indicar no contexto do estresse oxidativo, excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) uma vez que os grupamentos tiois podem ser oxidados, resultando em uma forma modificada da molécula. Essa oxidação pode ser um indicador do status redox. Nossos resultados indicam uma perda dos níveis de -SH total em córtex total nos grupos MeHg e MP+MeHg e em cerebelo para todos os grupos expostos, mas que não foi significativa no córtex pré-frontal. Grupamentos -SH não-proteicos são em quase sua totalidade GSH (Farina et al., 2019). Aqui observamos uma perda dos níveis GSH causado por um possível aumento de ROS, como observado no cerebelo (Fig.6B), em contraponto a exposição a MP e a coexposição apresentaram um aumento na quantidade de GSH em córtex total (Fig.4B). A glutathiona é um componente integral do sistema antioxidante endógeno, desempenhando um papel crucial na proteção do nosso organismo contra o estresse oxidativo, ao neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS) em elementos inertes. Por exemplo, a glutathiona reduzida (GSH), por meio da ação da glutathiona peroxidase e do selênio, converte o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (H₂O). No entanto, devido à presença de cisteína na estrutura da GSH, o metilmercúrio tem a capacidade de se ligar facilmente a este antioxidante, inibindo sua atividade. A perda de grupamentos -SH no presente estudo, tanto para as

exposições a MP e MeHg quanto para a coexposição (Figura 4A&6A), é um indício de que o MP pode causar perda na quantidade de resíduos de cisteína, talvez por mecanismos não diretos como a dano a moléculas através do aumento de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio como expresso pelas análises de nitrotirosina (Figura 5A&7A), como também pela captação desses resíduos quando em sinergia com o MeHg.

Aqui não foram avaliadas ou quantificadas as atividades enzimáticas de algumas enzimas antioxidantes, como SOD e Catalase por exemplo, o que é outro ponto fraco do trabalho. Entretanto, o dano a macromoléculas pelos marcadores utilizados aqui já é indicativo da perda da homeostase oxidativa e incorreto funcionamento destas enzimas de detoxificação redox ou de vias de expressão de fatores de transcrição responsáveis pela produção destas enzimas. Por outro lado, um estudo indicou que em fígado de camundongos, MPs causam alterações dose-dependentes no metabolismo energético (diminuição dos níveis de ATP, aumento da atividade de LDH) e estresse oxidativo (aumento de GSH-Px e SOD, diminuição da CAT). Curiosamente, a atividade da acetilcolinesterase no fígado aumentou, enquanto alterações metabólicas também sugeriram possíveis alterações nos níveis de neurotransmissores, porém o tecido cerebral não foi estudado (Deng et al., 2017). Deste modo é possível que partículas MP se acumulem no tecido neural, juntamente com outros poluentes como o MeHg, que também possui capacidade de bioacumulação, e, dessa forma, venham a causar danos a nível celular, através de dano oxidativo proveniente de espécies reativas de oxigênio (ROS). A revisão de Torres-Agullo et al (2021) cita que o estresse oxidativo é produzido quando os microplásticos interagem com o indivíduo ou transportam espécies oxidantes, tais como metais adsorvidos, gerando assim, espécies reativas de oxigênio, tendo como consequência a liberação de citocinas pró-inflamatórias e mediadores fibrogênicos, como resultado da saturação da resposta protetora antioxidante (Torres-Agullo et al., 2021).

TBARS é utilizado como um marcador não específico de lipoperoxidação, uma vez que pode reagir com aldeídos e outros compostos. Observamos um aumento deste em córtex total (figura 4C), cerebelo (figura 6C) e em córtex pré-frontal (figura 8C). O 4-HNE também foi utilizado como um segundo marcador de dano oxidativo a lipídios. Os outros marcadores de dano oxidativo, incluindo 4-HNE, nitrotirosina e carboximetilisina, também apresentaram alterações

significativas após a exposição ao MP e ao MeHg em diferentes estruturas cerebrais e que foram mais proeminentes na coexposição a MP + MeHg (Figura 5C&7C), não sendo observadas em córtex pré-frontal (Figura 9B). O estresse oxidativo é um mecanismo conhecido de toxicidade do MeHg (Farina et al., 2011). No entanto, o aumento do estresse oxidativo durante a coexposição a MP e MeHg sugere um possível efeito sinérgico entre essas duas substâncias.

A quantificação de grupamentos carbonila pode ser usada para análises redox juntamente com a carboximetilisina e a nitrotirosina para se observar mecanismos de danos a proteínas como os causados por AGEs e que são observados em doenças relacionadas à neurodegeneração, como o Alzheimer e o Parkinson. Foram observados níveis significativamente aumentados de AGEs intracelulares na maioria dos neurônios de pacientes com doença de Alzheimer hereditário. Nesses indivíduos, níveis intraneuronais mais elevados de AGEs foram observados mais cedo do que em pacientes com doença de Alzheimer esporádica (Krautwald et al., 2010; Münch et al., 2002). Os AGEs foram encontrados também em astrócitos em cérebros mais velhos de indivíduos saudáveis e pacientes com doença de Alzheimer, enquanto este não foi o caso em indivíduos controles jovens (Chambers et al., 2020; Krautwald et al., 2010).

Em resumo, os resultados sugerem que a exposição ao MP e ao MeHg podem ter efeitos prejudiciais no cérebro de ratos Wistar, possivelmente através do aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, da disfunção das junções estreitas e do aumento do estresse oxidativo. No entanto, são necessárias mais pesquisas para entender completamente os mecanismos subjacentes a esses efeitos e para determinar se esses resultados são aplicáveis a outras espécies, incluindo humanos. Com isso em mente, também foram avaliadas possíveis alterações comportamentais, através do ensaio de Campo Aberto e do Labirinto de Cruz Elevada, que pudessem ser explicativas de algum comportamento típico, oriundo desse dano observado nas diferentes estruturas cerebrais dos animais expostos e que possam ser relacionados com problemas neurológicos.

5.3. Aumento do comportamento do tipo ansioso devido a danos causados por MP e MeHg

Enquanto o cerebelo é uma estrutura responsável pela coordenação motora e equilíbrio, o Córtex é responsável pelo comportamento e emoção, e danos a cadeias proteicas e perda de cisteína nestes tecidos podem ser indicativos, no contexto do cerebelo de sintomas como a ataxia cerebelar, um distúrbio do movimento que pode afetar o equilíbrio e a marcha, o movimento dos membros, o controle oculomotor, bem como a cognição e o afeto. Esses sintomas impactam significativamente na capacidade funcional e na qualidade de vida (Zhang et al., 2023). E para o córtex total podemos citar mudanças comportamentais ocasionadas por disfunções executivas uma vez que o córtex como um todo pode desempenhar funções variadas (Dos Santos., 2024).

O resultado do teste comportamental de campo aberto sugere que os animais expostos percorrem uma menor distância total (Fig.10A), principalmente durante a coexposição e que animais expostos ao MP e ao MP + MeHg apresentaram um maior número de tempo imóvel (Fig.10D), clássico do comportamento típico de *freezing* observado em roedores. Além dos animais terem percorrido uma distância menor, a análise dos vídeos dos grupos MeHg e MP + MeHg também indicaram que estes animais percorreram uma maior distância na periferia da arena sem terem passado menos tempo nessa região (Fig.10F&G), índices de comportamento de tipo ansioso (Prut et al., 2003). Alterações na locomoção como elevado tempo imóvel durante o teste de campo aberto e a tendência de roedores de seguirem um objeto sólido por longas distâncias (tigmotaxia), como as paredes da arena por exemplo, podem ser um indicativo de perda do comportamento exploratório típico causado por danos neurológicos que refletem uma função cerebral anormal (Kraeuter et al., 2019a).

Pode-se dizer, que a ansiedade está associada com a percepção do perigo, com sentimentos de apreensão em expectativa à uma ameaça em potencial. O teste do Labirinto de Cruz Elevada permite que se compare o tempo e número de entradas em braços fechados e abertos do aparato, e se baseia na tendência natural de roedores em evitar espaços abertos ou elevados, contrabalançado com sua curiosidade inata em explorar algo novo, em teoria um animal menos ansioso explora os braços expostos mais frequentemente do que um animal com

comportamento típico ansioso (Kraeuter et al., 2019b). Apesar de não significativo para o grupo MeHg, a análise dos vídeos do teste do Labirinto de Cruz Elevada nos indicaram que todos os animais expostos apresentaram uma maior distância percorrida (Fig.11A) durante o teste que o Controle. Além disso, os animais dos três grupos expostos passaram mais tempo no braço fechado e menos tempo no braço aberto (Fig.11B-C). O número de entradas no braço fechado também foi maior nos animais no grupo MeHg e no grupo MP + MeHg (Fig.11E) e o número de entradas no braço aberto menor apenas nos grupos MP e MP + MeHg (Fig.11F).

É importante notar, que ambos estes testes são demonstrativos de comportamentos típicos em roedores e não necessariamente podem ser utilizados como uma medida definitiva de um sintoma neurológico, como ansiedade ou depressão por exemplo. Desse modo, eles devem ser utilizados em conjunto com outros parâmetros para se afirmar com precisão possíveis condições patofisiológicas que possam afetar os indivíduos. Não obstante, estudos anteriores também relataram alterações comportamentais em animais expostos ao MP (Estrela et al., 2021; Newland., 2004). Além disso, a avaliação de outras estruturas como hipocampo, bulbo olfatório, tálamo e o emprego de outros testes comportamentais como o teste de preferência de objetos, ou testes de novidade social e preferência social podem ser desenvolvidos para melhor compreensão da relação contaminante/comportamento.

6. Conclusão

Diversos poluentes persistentes são extensivamente estudados há alguns anos e possuem seus efeitos mais elucidados, a contaminação por plástico, entretanto, vêm recebendo atenção apenas nos anos recentes. Dessa forma, é importante que possamos explorar o papel de contaminantes plásticos de diferentes matrizes e todos os desdobramentos de seus efeitos, sejam os mecanismos moleculares, os efeitos sinérgicos com outros contaminantes e seu possível papel no desenvolvimento de outras doenças.

Em resumo, o presente estudo observou diminuição do imunoconteúdo de Ocludina e Claudina-5 em cerebelo e aumento de permeabilidade de membrana em cérebro total e fígado de ratos Wistar. Foi notada também a capacidade de danos sinérgicos de MP e MeHg em cerebelo, córtex total e pré frontal demonstrado pela

bateria de testes redox que evidenciaram diminuição de grupos -SH, aumento quantidade de TBARS, aumento na quantidade de nitrotirosina e carbonila. Apesar dos esforços para elucidação dos danos causados por Microplástico e Metilmercúrio, mais estudos precisam ser desenvolvidos para corroborar as hipóteses citadas por trabalhos já existentes. Os danos por estresse oxidativo evidenciados em nossas análises demonstram que o efeito sinérgico dos contaminantes estudados, aumentaram a lipoperoxidação em cerebelo, córtex total e pré-frontal, a carbonilação em córtex total, cerebelo e córtex pré-frontal também demonstrou alterações, observou-se também aumento da nitrotirosina em córtex total e cerebelo demonstrando danos causados por espécies reativas de nitrogênio (RNS), não só por efeito sinérgico que o MPs tem a capacidade de causar dano oxidativo a lipídios, carbonilação de proteínas e aumentar a glicação avançada (AGEs), mas também de forma isolada.

Apesar de utilizarmos da hipótese de dano sinérgico para os resultados obtidos, a possibilidade de dano aditivo não foi descartada, pois algumas análises demonstraram dano não somente pela coexposição mas também pelos contaminantes de forma isolada.

Em nosso modelo, utilizamos animais de idade relativamente nova (30 dias) e que foram analisados na forma juvenil (90 dias) enquanto alguns dos trabalhos referenciados aqui utilizaram animais de idade um pouco mais avançada ou o estudo de Liu (2022) que avaliou o papel destas partículas e da contaminação por Ferro junto ao envelhecimento. Acreditamos que isso seja um ponto forte de nosso trabalho, uma vez que é justamente durante esse período de desenvolvimento inicial e da infância que algumas populações estão expostas aos contaminantes e que os efeitos tóxicos podem acarretar em condições para a vida toda.

Apoio e Financiamento

Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq), Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) e Fundação de amparo à pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflitos de interesse

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

Referências :

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Antunes dos Santos, A., Appel Hort, M., Culbreth, M., López-Granero, C., Farina, M., Rocha, J. B. T., & Aschner, M. (2016). Methylmercury and brain development: A review of recent literature. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 38, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.001>
- Aschner, M., & Clarkson, T. W. (1988). Uptake of methylmercury in the rat brain: effects of amino acids. *Brain Research*, 462(1), 31–39. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90581-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90581-1)
- Bernhoff, R. A. (2012). Mercury toxicity and treatment: A review of the literature. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/460508>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5026–5031. <https://doi.org/10.1021/es800249a>
- Carocci, A., Rovito, N., Sinicropi, M. S., & Genchi, G. (2014). Mercury toxicity and neurodegenerative effects. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 1–18). Springer International Publishing.

Carr, S. A., Liu, J., & Tesoro, A. G. (2016). Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Research*, *91*, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.002>

Chambers, A., Bury, J. J., Minett, T., Richardson, C. D., Brayne, C., Ince, P. G., Shaw, P. J., Garwood, C. J., Heath, P. R., Simpson, J. E., Matthews, F. E., & Wharton, S. B. (2020). Advanced glycation end product formation in human cerebral cortex increases with Alzheimer-type neuropathologic changes but is not independently associated with dementia in a population-derived aging brain cohort. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *79*(9), 950–958. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlaa064>

Chalmin, P. (2019). The history of plastics: from the Capitol to the Tarpeian Rock. *Field Actions Science Reports, Special19*, 6–11. <http://journals.openedition.org/factsreports/5071>

Choi, J. S., Jung, Y.-J., Hong, N.-H., Hong, S. H., & Park, J.-W. (2018). Toxicological effects of irregularly shaped and spherical microplastics in a marine teleost, the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Marine Pollution Bulletin*, *129*(1), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.039>

Clarkson, T. W., Magos, L., & Myers, G. J. (2003). The toxicology of mercury — current exposures and clinical manifestations. *The New England Journal of Medicine*, *349*(18), 1731–1737. <https://doi.org/10.1056/nejmra022471>

Collard, F., Gasperi, J., Gabrielsen, G. W., & Tassin, B. (2019). Plastic particle ingestion by wild freshwater fish: A critical review. *Environmental Science & Technology*, *53*(22), 12974–12988. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03083>

Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., & Ren, H. (2017). Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep46687>

Dos Santos, R. O. (n.d.). *Estrutura e Funções do Córtex Cerebral*. Uniceub.Br. Retrieved January 27, 2024, from <https://repositorio.uniceub.br/jspui/bitstream/123456789/2421/2/9713912.pdf>

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

Environment, U. N. (2021, October 20). *From Pollution to Solution: A global assessment of marine litter and plastic pollution*. UNEP - UN Environment Programme.

<https://www.unep.org/resources/pollution-solution-global-assessment-marine-litter-and-plastic-pollution>

Espitia-Pérez, P., Albino, S. M., da Rosa, H. T., Silveira, A. K., Espitia-Pérez, L., Brango, H., Moraes, D. P., Hermann, P. R. S., Mingori, M., Barreto, F., Kunzler, A., Gelain, D. P., Schnorr, C. E., & Moreira, J. C. F. (2018a). Effects of methylmercury and retinol palmitate co-administration in rats during pregnancy and breastfeeding: Metabolic and redox parameters in dams and their offspring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 603–615. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.093>

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

Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants* (Vol. 186, pp. 407–421). Elsevier.

Estrela, F. N., Guimarães, A. T. B., Araújo, A. P. da C., Silva, F. G., Luz, T. M. da, Silva, A. M., Pereira, P. S., & Malafaia, G. (2021). Toxicity of polystyrene nanoplastics and zinc oxide to mice. *Chemosphere*, 271(129476), 129476. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129476>

Fagundes, B. H. F., Nascimento, P. C., Aragão, W. A. B., Chemelo, V. S., Bittencourt, L. O., Eiró-Quirino, L., Silva, M. C. F., Freire, M. A. M., Fernandes, L. M. P., Maia, C. do S. F., Crespo-Lopez, M. E., & Lima, R. R. (2022). Methylmercury exposure during prenatal and postnatal neurodevelopment promotes oxidative stress associated with motor and cognitive damages in rats: an environmental-experimental toxicology study. *Toxicology Reports*, 9, 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.02.014>

Farina, M., & Aschner, M. (2019). Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced neurotoxicity: An intriguing interplay. *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects*, 1863(12), 129285. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.01.007>

Farina, M., Aschner, M., & Rocha, J. B. T. (2011). Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(3), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.001>

Goldim, M. P. de S., Della Giustina, A., & Petronilho, F. (2019). Using Evans blue dye to determine blood-brain barrier integrity in rodents. *Et al [Current Protocols in Immunology]*, 126(1). <https://doi.org/10.1002/cpim.83>

Gregory, T. (2023, May 24). *Forever Toxic: The science on health threats from plastic recycling*. Greenpeace USA - We Fight for a Greener, More Peaceful World. <https://www.greenpeace.org/usa/reports/forever-toxic/>

Hoffmeyer, R. E., Singh, S. P., Doonan, C. J., Ross, A. R. S., Hughes, R. J., Pickering, I. J., & George, G. N. (2006). Molecular mimicry in mercury toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 19(6), 753–759. <https://doi.org/10.1021/tx0503449>

Hong, Y.-S., Kim, Y.-M., & Lee, K.-E. (2012). Methylmercury exposure and health effects. *Yebang Uihakhoe Chi [Journal of Preventive Medicine and Public Health]*, 45(6), 353–363. <https://doi.org/10.3961/jpmp.2012.45.6.353>

Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E., & Svendsen, C. (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *The Science of the Total Environment*, 586, 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.190>

Huang, D., Tao, J., Cheng, M., Deng, R., Chen, S., Yin, L., & Li, R. (2021). Microplastics and nanoplastics in the environment: Macroscopic transport and effects on creatures. *Journal of Hazardous Materials*, 407(124399), 124399. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124399>

Jenner, L. C., Rotchell, J. M., Bennett, R. T., Cowen, M., Tentzeris, V., & Sadofsky, L. R. (2022). Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy. *The Science of the Total Environment*, 831(154907), 154907. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154907>

Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., & Fu, Z. (2018). Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 235, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.088>

Júnior Pereira Brito, W., Silva de Holanda, B., da Silva de Andrade Moreira, F., Conte da Silva, J. C., & Rodrigues Fernandes, A. (2021). Mercúrio no meio ambiente: uma revisão sobre seus efeitos toxicológicos e as principais fontes de emissão. *Revista DAE*, 69(230), 127–139. <https://doi.org/10.36659/dae.2021.036>

Kasper, D., Botaro, D., Palermo, E. F. A., & Malm, O. (2007). MERCURY ON FISH -- SOURCES AND CONTAMINATION. *Oecologia Australis*, 11(2), 228–239. <https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/view/5667>

Kokalj, A. J., Kunej, U., & Skalar, T. (2018). Screening study of four environmentally relevant microplastic pollutants: Uptake and effects on *Daphnia magna* and *Artemia franciscana*. *Chemosphere*, 208, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.172>

Koongolla, J. B., Lin, L., Pan, Y.-F., Yang, C.-P., Sun, D.-R., Liu, S., Xu, X.-R., Maharana, D., Huang, J.-S., & Li, H.-X. (2020). Occurrence of microplastics in gastrointestinal tracts and gills of fish from Beibu Gulf, South China Sea. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 258(113734), 113734. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113734>

Krautwald, M., & Münch, G. (2010). Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins – A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's

disease? *Experimental Gerontology*, 45(10), 744–751.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.001>

Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019b). The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 69–74). Springer New York.

Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019a). The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 99–103). Springer New York.

Law, K. L., & Thompson, R. C. (2014). Microplastics in the seas. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6193), 144–145. <https://doi.org/10.1126/science.1254065>

Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International*, 163(107199), 107199. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.-W., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants* (Vol. 186, pp. 464–478). Elsevier.

Li, J., Liu, H., & Paul Chen, J. (2018). Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research*, 137, 362–374. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.056>

Liu, M., Lu, S., Song, Y., Lei, L., Hu, J., Lv, W., Zhou, W., Cao, C., Shi, H., Yang, X., & He, D. (2018). Microplastic and mesoplastic pollution in farmland soils in suburbs of Shanghai, China. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 242, 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.051>

Liu, X., Yang, H., Yan, X., Xu, S., Fan, Y., Xu, H., Ma, Y., Hou, W., Javed, R., & Zhang, Y. (2022). Co-exposure of polystyrene microplastics and iron aggravates cognitive decline in aging mice via ferroptosis induction. *Ecotoxicology and*

Environmental Safety, 233(113342), 113342.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113342>

Liu, Z., Sokratian, A., Duda, A. M., Xu, E., Stanhope, C., Fu, A., Strader, S., Li, H., Yuan, Y., Bobay, B. G., Sipe, J., Bai, K., Lundgaard, I., Liu, N., Hernandez, B., Bowes Rickman, C., Miller, S. E., & West, A. B. (2023). Anionic nanoplastic contaminants promote Parkinson's disease-associated α -synuclein aggregation. *Science Advances*, 9(46). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adi8716>

Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., & Jin, Y. (2018). Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *The Science of the Total Environment*, 631–632, 449–458.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.051>

Luo, T., Wang, C., Pan, Z., Jin, C., Fu, Z., & Jin, Y. (2019). Maternal polystyrene microplastic exposure during gestation and lactation altered metabolic homeostasis in the dams and their F1 and F2 offspring. *Environmental Science & Technology*, 53(18), 10978–10992. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03191>

Lusher, A. L., Welden, N. A., Sobral, P., & Cole, M. (2017). Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods: Advancing Methods and Applications*, 9(9), 1346–1360.
<https://doi.org/10.1039/c6ay02415g>

Microplastics: sources, effects and solutions. (2018, November 22). Europa.Eu.
<https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/society/20181116STO19217/microplastics-sources-effects-and-solutions>

Münch, G., Shepherd, C. E., McCann, H., Brooks, W. S., Kwok, J. B. J., Arendt, T., Hallupp, M., Schofield, P. R., Martins, R. N., & Halliday, G. M. (2002). Intraneuronal advanced glycation endproducts in presenilin-1 Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 13(5), 601.
https://journals.lww.com/neuroreport/abstract/2002/04160/intraneuronal_advanced_glycation_endproducts_in.13.aspx

- Neathery, M. W., & Miller, W. J. (1975). Metabolism and toxicity of cadmium, mercury, and lead in animals: A review. *Journal of Dairy Science*, *58*(12), 1767–1781. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(75\)84785-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(75)84785-0)
- Newland, M. (2004). Gestational exposure to methylmercury retards choice in transition in aging rats. *Neurotoxicology and Teratology*, *26*(2), 179–194. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2003.12.004>
- Olivero-Verbel, J., Johnson-Restrepo, B., Mendoza-Marín, C., Paz-Martinez, R., & Olivero-Verbel, R. (2004). Mercury in the aquatic environment of the Village of caimito at the mojana region, north of Colombia. *Water, Air, and Soil Pollution*, *159*(1), 409–420. <https://doi.org/10.1023/b:wate.0000049162.54404.76>
- Palermo, Elisabete & Kasper, Daniele & Reis, Talita & Nogueira, Sylvia & Branco, Christina & Malm, Olaf. (2004). Mercury Level increase in Fish Tissues Downstream the Tucuruí Reservoir, Brazil. 10.13140/2.1.2890.4644
- P. Olivatto, G., Carreira, R., Luiz Tornisielo, V., & C. Montagner, C. (2018). Microplastics: Contaminants of global concern in the anthropocene. *Revista Virtual de Química*, *10*(6), 1968–1989. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180125>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*(3), 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, *463*(1–3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x)
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, *146*(106274), 106274. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>

Rochman, C. M., Brookson, C., Bikker, J., Djuric, N., Earn, A., Bucci, K., Athey, S., Huntington, A., McIlwraith, H., Munno, K., De Frond, H., Kolomijeca, A., Erdle, L., Grbic, J., Bayoumi, M., Borrelle, S. B., Wu, T., Santoro, S., Werbowski, L. M., ... Hung, C. (2019). Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(4), 703–711. <https://doi.org/10.1002/etc.4371>

Roos, D., Seeger, R., Puntel, R., & Vargas Barbosa, N. (2012). Role of calcium and mitochondria in MeHg-mediated cytotoxicity. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/248764>

Schirinzi, G. F., Pérez-Pomeda, I., Sanchís, J., Rossini, C., Farré, M., & Barceló, D. (2017). Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research*, 159, 579–587. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.043>

Schwabl, P., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsics, T., Trauner, M., Reiberger, T., & Liebmann, B. (2019). Detection of various microplastics in human stool: A prospective case series. *Annals of Internal Medicine*, 171(7), 453–457. <https://doi.org/10.7326/m19-0618>

Sutton, D., Tchounwou, P., Ninashvili, N., & Shen, E. (2002). Mercury induces cytotoxicity and transcriptionally activates stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 3(9), 965–984. <https://doi.org/10.3390/i3090965>

Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., McGonigle, D., & Russell, A. E. (2004). Lost at sea: Where is all the plastic? *Science (New York, N.Y.)*, 304(5672), 838–838. <https://doi.org/10.1126/science.1094559>

Torres, F. G., Dioses-Salinas, D. C., Pizarro-Ortega, C. I., & De-la-Torre, G. E. (2021). Sorption of chemical contaminants on degradable and non-degradable microplastics: Recent progress and research trends. *The Science of the Total Environment*, 757(143875), 143875. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143875>

Torres-Agullo, A., Karanasiou, A., Moreno, T., & Lacorte, S. (2021). Overview on the occurrence of microplastics in air and implications from the use of face masks during

the COVID-19 pandemic. *The Science of the Total Environment*, 800(149555), 149555. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149555>

UNEP DTIE CHEMICALS BRANCH AND Z. AND F. D. WHO DEPARTMENT OF FOOD SAFETY - Guidance for Identifying Populations At Risk From Mercury Exposure IOMC (Inter-Organization Program. Sound Manag. Chem. Acooperative Agreem. among UNEP, ILO, FAO, WHO, UNIDO, UNITAR OECD (2008) 176.

Vieira, G. de D., & Sousa, C. M. de. (2013). Aspectos celulares e fisiológicos da Barreira Hematoencefálica. *Journal of Health & Biological Sciences*, 1(4), 166. <https://doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v1i4.38.p166.2013>

Wang, J., Li, J., Liu, S., Li, H., Chen, X., Peng, C., Zhang, P., & Liu, X. (2021). Distinct microplastic distributions in soils of different land-use types: A case study of Chinese farmlands. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 269(116199), 116199. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116199>

Watras, C. J., Back, R. C., Halvorsen, S., Hudson, R. J. M., Morrison, K. A., & Wente, S. P. (1998). Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *The Science of the Total Environment*, 219(2–3), 183–208. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(98\)00228-9](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(98)00228-9)

Without dramatically reducing plastic production, it will be impossible to end plastic pollution and eliminate the health threats from chemicals in plastics. (n.d.). Greenpeaceusa.info. Retrieved January 27, 2024, from https://prod.greenpeaceusa.info/usa/wp-content/uploads/2023/05/GreenpeaceUSA_ForeverToxic_ENG.pdf

World Health Organization. Office of External Coordination, & United Nations Economic and Social Council Regular Session of 1990. (2nd: 1990: Geneva). (1990). *Summary of the work of the World Health Organization in 1989*. World Health Organization.

Yang, C.-S., Chang, C.-H., Tsai, P.-J., Chen, W.-Y., Tseng, F.-G., & Lo, L.-W. (2004). Nanoparticle-based in vivo investigation on Blood–Brain barrier permeability following ischemia and reperfusion. *Analytical Chemistry*, 76(15), 4465–4471. <https://doi.org/10.1021/ac035491v>

Yang, D., Zhu, J., Zhou, X., Pan, D., Nan, S., Yin, R., Lei, Q., Ma, N., Zhu, H., Chen, J., Han, L., Ding, M., & Ding, Y. (2022). Polystyrene micro- and nano-particle coexposure injures fetal thalamus by inducing ROS-mediated cell apoptosis. *Environment International*, 166(107362), 107362. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107362>

Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y., & Yu, F. (2020). Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. *The Science of the Total Environment*, 715(136968), 136968. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136968>

Zareba, G., Cernichiari, E., Hojo, R., Nitt, S. M., Weiss, B., Mumtaz, M. M., Jones, D. E., & Clarkson, T. W. (2007). Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: comparison with methyl mercury. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 27(5), 511–518. <https://doi.org/10.1002/jat.1272>

Zhang, P., Duan, L., Ou, Y., Ling, Q., Cao, L., Qian, H., Zhang, J., Wang, J., & Yuan, X. (2023). The cerebellum and cognitive neural networks. *Frontiers in Human Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2023.1197459>

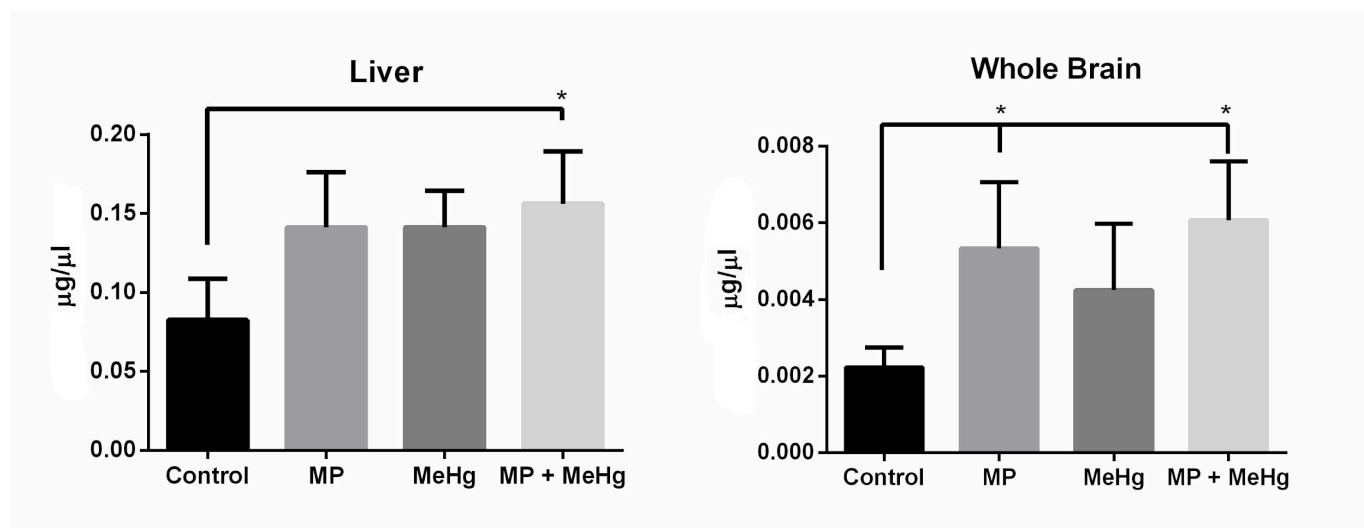
Zhao, S., Zhu, L., & Li, D. (2016). Microscopic anthropogenic litter in terrestrial birds from Shanghai, China: Not only plastics but also natural fibers. *The Science of the Total Environment*, 550, 1110–1115. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.112>

Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>

ANEXO A

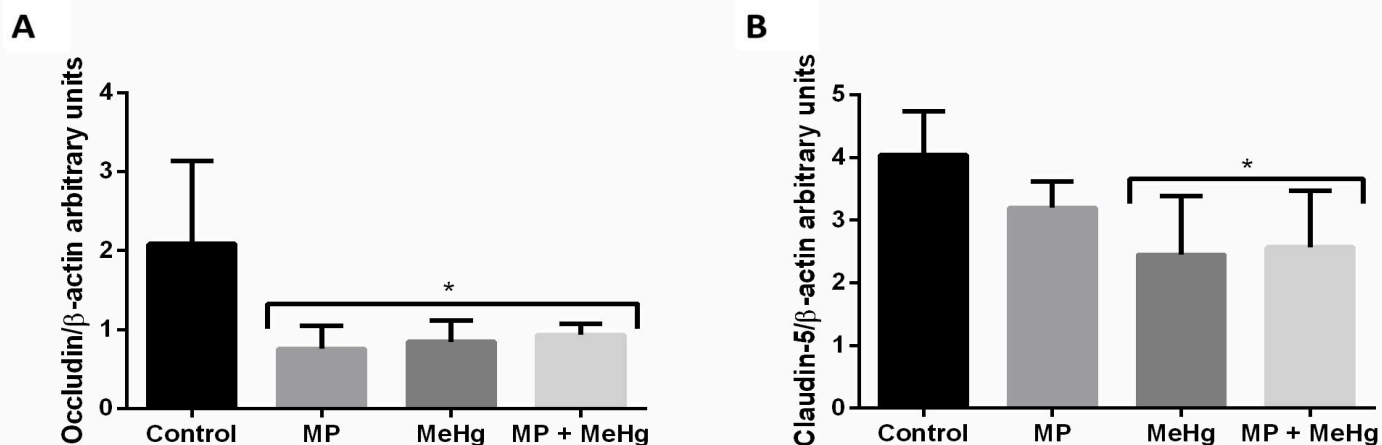
Figuras

Figura 1 :



Legenda: Quantificação do corante azul de Evans no fígado e cérebro total dos animais expostos, as unidades de concentração estão em ug/uL. A esquerda representada pelo gráfico está a análise de fígado e a direita a análise de cérebro total. 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 : Quantificação de proteínas de junção em cerebelo através de western blotting, a quantificação das bandas se deu através do software ImageJ e estão representadas por unidades arbitrarias ponderadas pela banda de β -actina. Em (A) está representada a quantificação de Ocludina e em (B) está representada a quantificação de Claudina-5. 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 3 :

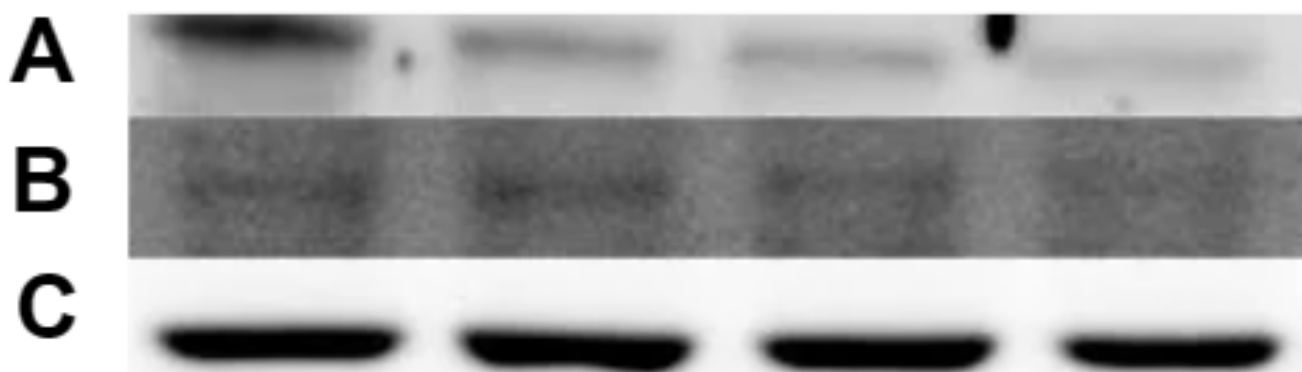
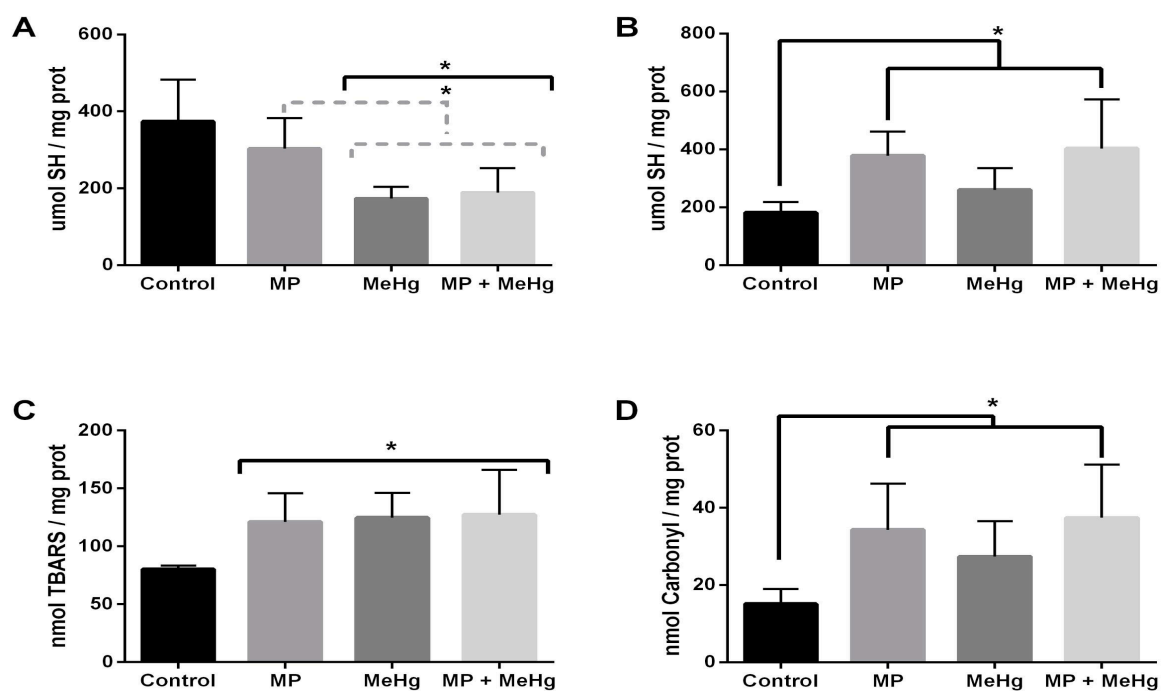


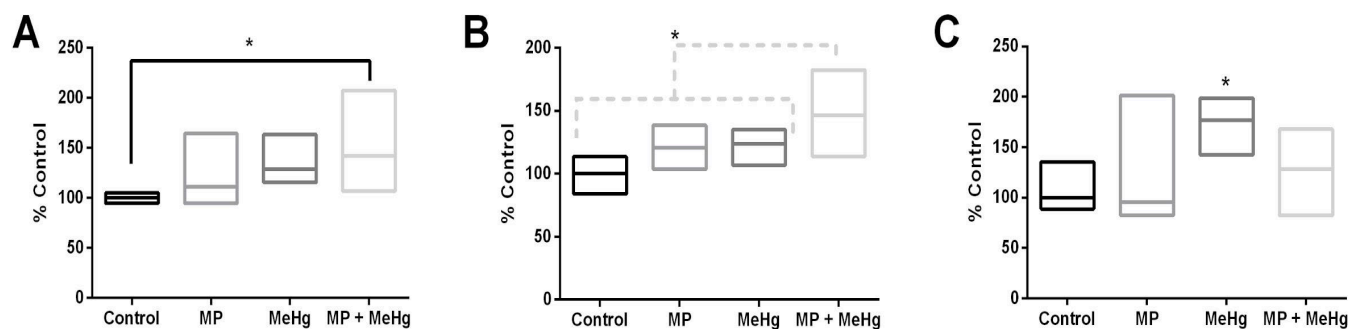
Figura 3 : Imagens representativas das bandas de Ocludina (A), Claudina-5 (B) e B-actina (C). Obtidas através de fotodocumentador marca G&E Healthcare® e posteriormente quantificadas no software ImageJ.

Figura 4 :



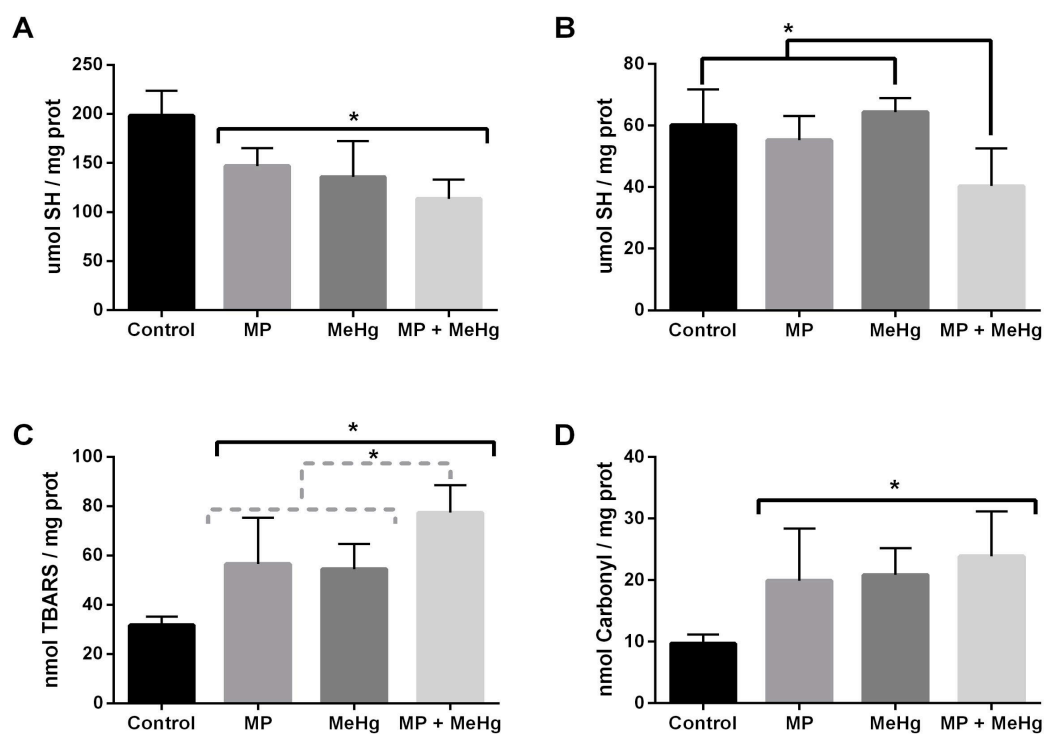
Legenda : Quantificação de marcadores de dano oxidativo a diferentes macromoléculas, como grupamentos tiólicos, lipídios e proteínas, em córtex total . Em (A) está representado o -SH total, em (B) -SH não protéico, (C) apresenta a quantificação de TBARS, (D) quantificação carbonila utilizada para danos a proteínas. As médias foram analisadas através de ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas estão representadas por * quando $p < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

Figura 5 :



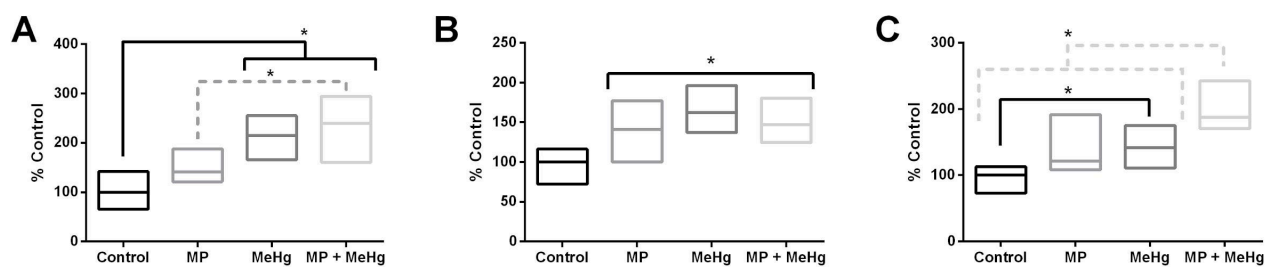
Legenda : Quantificação de marcadores dano oxidativo em macromoléculas de córtex total, através de análises obtidas pelo método de ELISA. Em (A) indica a quantidade de Nitrotirosina, em (B) 4-hidroxinonenal, em (C) quantidades de carboximetilisina. Resultados estão expressos por porcentagem do Controle. 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 6 :



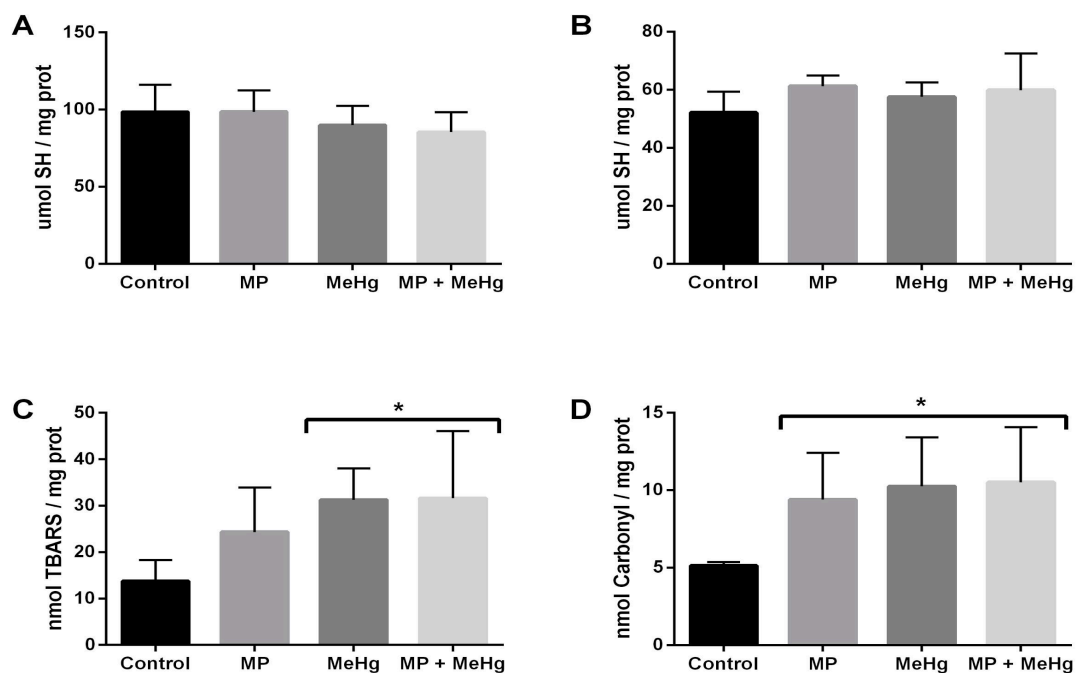
Legenda: Quantificação de marcadores de dano oxidativo a diferentes macromoléculas, como grupamentos tiólicos, lipídios e proteínas, de cerebelo . Em (A) está representado o -SH total, em (B) -SH não protéico, (C) apresenta a quantificação de TBARS, (D) quantificação carbonila utilizada para danos a proteínas. As médias foram analisadas através de ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas estão representadas por * quando $p < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

Figura 7 :



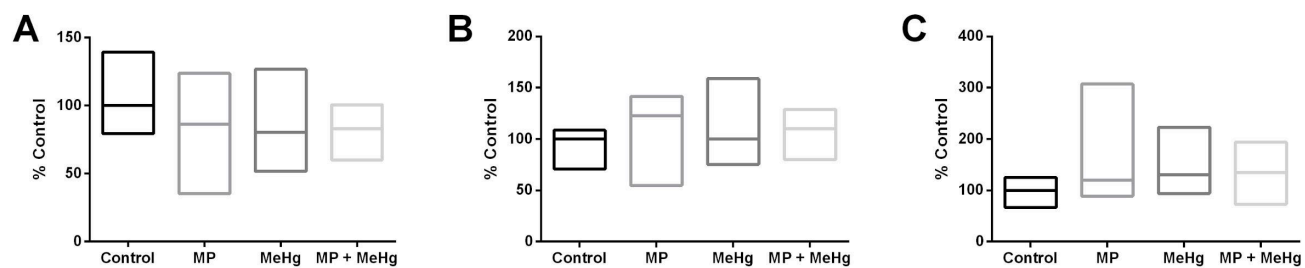
Legenda: Quantificação de marcadores dano oxidativo em macromoléculas de cerebello, através de análises obtidas pelo método de ELISA. Onde, (A) indica a quantidade de Nitrotirosina, em (B) 4-hidroxinonenal, em (C) quantidades de carboximetilisina. As médias foram comparadas entre si e analisadas por 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 8 :



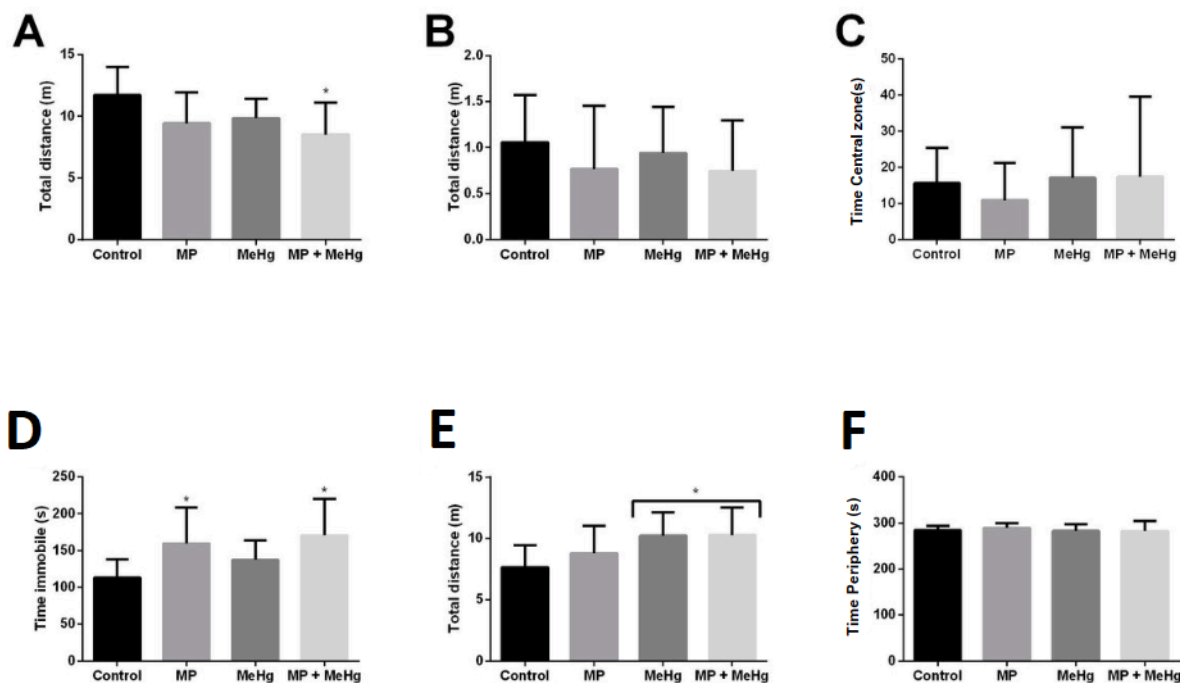
Legenda: Quantificação de marcadores de dano oxidativo a diferentes macromoléculas, como grupamentos tiólicos, lipídios e proteínas, em de córtex pré-frontal. Em (A) está representado o -SH total, em (B) -SH não protéico, (C) apresenta a quantificação de TBARS, (D) quantificação carbonila utilizada para danos a proteínas. As médias foram analisadas através de ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas estão representadas por * quando $p < 0,05$. Média \pm desvio padrão.

Figura 9 :



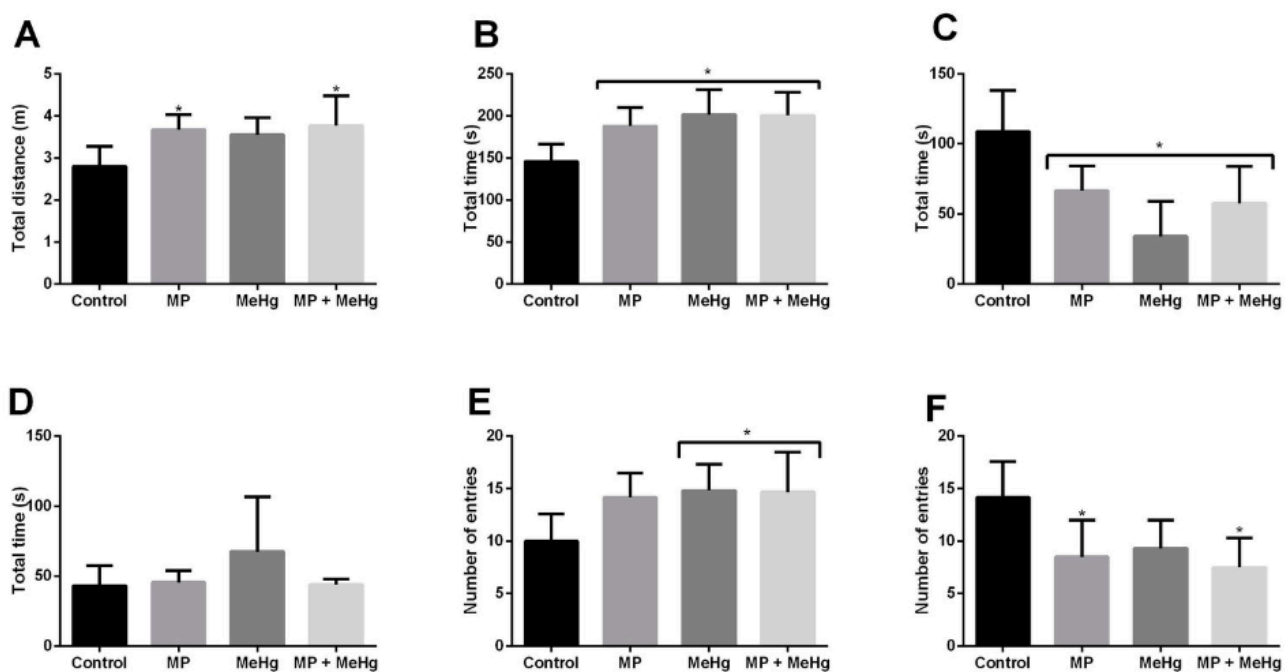
Legenda : Quantificação de marcadores dano oxidativo em macromoléculas de córtex pré-frontal, através de análises obtidas pelo método de ELISA. Onde , (A) indica a quantidade de Nitrotirosina, em (B) 4-hidroxinonenal, em (C) quantidades de carboximetilisina. As médias foram comparadas entre si e analisadas 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 10 :



Legenda :Dados comportamentais para o teste de Campo Aberto analisado através do software Anymaze, as distâncias estão representadas em metros e o tempo por região está representado por segundos. Em (A) distância total percorrida, (B) distância total na área central, (C) tempo na área central, (D) tempo total de imobilidade, (E) distância total na região periférica, e (F) tempo total na área periférica. Com os dados obtidos do software, 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 11 :



Legenda : Dados comportamentais para o teste Labirinto de Cruz Elevada analisados pelo software Anymaze; Em (A) distância total percorrida, (B) tempo no braço fechado, (C) tempo no braço aberto, (D) tempo na região central, (E) entradas no braço fechado, (F) entradas no braço aberto. 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.