

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

Gustavo Vinícius Maia Peixoto

**AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DO FÍGADO DE DUAS  
ESPÉCIES DE PEIXES (*Oligosarcus argenteus* E *Hoplias intermedius*) EM  
AMBIENTES IMPACTADOS PELO ROMPIMENTO DA BARRAGEM  
DO FUNDÃO NA BACIA DO RIO DOCE**

Belo Horizonte

2024

Gustavo Vinícius Maia Peixoto

**AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DO FÍGADO DE DUAS  
ESPÉCIES DE PEIXES (*Oligosarcus argenteus* E *Hoplias intermedius*) EM  
AMBIENTES IMPACTADOS PELO ROMPIMENTO DA BARRAGEM  
DO FUNDÃO NA BACIA DO RIO DOCE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Rafael Magno Costa Melo

Belo Horizonte

2024

043

Peixoto, Gustavo Vinícius Maia.

Avaliação morfofisiológica do fígado de duas espécies de peixes (*oligosarcus argenteus* e *hoplias intermedius*) em ambientes impactados pelo rompimento da barragem do fundão na bacia do Rio Doce [manuscrito] / Gustavo Vinícius Maia Peixoto. – 2024.  
48 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Rafael Magno Costa Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Peixes. 3. Metais Pesados. 4. Patologia. 5. Estresse Oxidativo.  
I. Melo, Rafael Magno Costa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO DISCENTE

**GUSTAVO VINÍCIUS MAIA PEIXOTO**

Às **quatorze horas** do dia **22 de março de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DO FÍGADO DE DUAS ESPÉCIES DE PEIXES (HOPLIAS INTERMEDIUS E OLIGOSARCUS ARGENTEUS) EM AMBIENTES IMPACTADOS PELO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO NA BACIA DO RIO DOCE**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Rafael Magno Costa Melo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Rafael Magno Costa Melo	UFMG	Aprovado
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	Aprovado
Dr. Alessandro Loureiro Paschoalini	PUC-MG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **Aprovado**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 22 de março de 2024.**

Dr. Rafael Magno Costa Melo

Dr<sup>a</sup>. Erika Cristina Jorge

Dr. Alessandro Loureiro Paschoalini



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 25/03/2024, às 08:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Magno Costa Melo, Professor do Magistério Superior**, em 25/03/2024, às 10:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Alessandro Loureiro Paschoalini, Usuário Externo**, em 25/03/2024, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3135666** e o código CRC **449873D4**.

---

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a orientação do Professor Dr. Rafael Magno Costa Melo.

**APOIO FINANCEIRO E INSTITUCIONAL:**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Fundação Renova

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao professor Rafael Magno, pela orientação e suporte durante este processo.
- A minha família, em especial aos meus pais, Marcelo e Daniela, e minha madrinha, Sulamita, por todo apoio e incentivo.
- A professora Elizete Rizzo e todos colegas do laboratório de Ictiohistologia, em especial a Camila Sales por todo conhecimento e apoio técnico durante a execução deste trabalho.
- A todos professores e coordenadores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

## RESUMO

O rompimento da barragem do Fundão em Mariana-MG foi responsável pela maior contaminação por rejeitos minerários em ecossistemas aquáticos no mundo. Foram observados impactos imediatos na fauna de peixes residente da bacia do rio Doce, como mortalidade de peixes, entretanto a biota residente de áreas contaminadas pelo rejeito enfrenta uma exposição crônica aos resíduos minerários acumulados no sedimento e margem do rio. A exposição crônica dos peixes aos metais pesados derivados do rejeito pode desencadear alterações metabólicas e celulares, que podem gerar patologias graves em órgãos vitais das espécies. O objetivo deste estudo foi avaliar a morfofisiologia do fígado e os possíveis efeitos patológicos em duas espécies de peixes (*Oligosarcus argenteus* e *Hoplias intermedius*) coletadas em ambientes impactados pelo rompimento da barragem de Fundão na bacia do Rio Doce. Para isso, foram realizadas uma coleta piloto e quatro amostragens trimestrais durante o período de um ano em dois trechos impactados no Rio Doce e um trecho referência no Rio Piranga, não impactado pelo rejeito proveniente do rompimento da barragem. Amostras de fígado, água e sedimento foram analisadas quanto suas concentrações de metais em seus respectivos pontos amostrais. O fígado dessas espécies foi analisado quanto a histopatologias e expressão de moléculas biomarcadoras para metais (metalotioneína), xenobióticos (citocromo P4501A), estresse oxidativo (catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase) e morte celular por apoptose (caspase-3) e necrose (HMGB1). A análise de metais demonstrou variações significativas de Fe e Mn na água, As, Fe e Mn no sedimento e As, Fe e Hg no fígado de *O. argenteus* e Cd, Fe e Hg no fígado de *H. intermedius* nos pontos impactados pelo rejeito. Espécimes amostrados nos pontos impactados apresentaram grande número de histopatologias no fígado e maiores valores para seus respectivos índices de alteração histopatológica, em especial para *H. intermedius*. As proteínas biomarcadoras avaliadas no fígado das espécies apresentaram características de resposta a estresse oxidativo e variações significativas quanto a suas expressões nos trechos impactados pelo rejeito minerário. Os resultados do presente estudo demonstram as alterações moleculares e os efeitos da bioacumulação e biomagnificação provenientes de metais pesados oriundos do rompimento da barragem do Fundão.

**Palavras-chaves:** peixes, metais pesados, fígado, histopatologias, estresse oxidativo

## ABSTRACT

The collapse of the Fundão dam in Mariana-MG was responsible for the greatest contamination by mining waste in aquatic ecosystems in the world. Immediate impacts were observed on the fish fauna residing in the rio Doce basin, such as fish mortality, however the biota residing in areas contaminated by the tailings is chronically exposed to mining residues accumulated in the sediment and river bank. Chronic exposure of fish to heavy metals derived from waste can trigger metabolic changes that result in cellular and oxidative stress, which can generate serious pathologies in various organs of the species subjected to this exposure in the ecosystem. The objective of this study was to evaluate the morphophysiology of the liver and the possible pathological effects in two species of fish (*Oligosarcus argenteus* and *Hoplias intermedius*) collected in environments impacted by the collapse of the Fundão dam in the Rio Doce basin. A pilot sampling and four quarterly samplings were carried out over a period of one year at three points in the Doce River basin and a reference stretch on the Piranga River, not impacted by waste from the collapse of the Fundão dam. Liver, water and sediment samples were analyzed for their metal concentrations at their respective sampling points. The liver of these species was analyzed for histopathologies and expression of biomarker molecules for metals (metallothionein), xenobiotics (cytochrome P4501A), oxidative stress (catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase) and cell death by apoptosis (caspase-3) and necrosis (HMGB1). Metal analysis demonstrated variations in Fe and Mn in the water, As, Fe and Mn in the sediment and variations in As, Fe and Hg in the liver of *O. argentes* and Cd, Fe and Hg in the liver of *H. intermedius* collected at the points impacted by waste. Furthermore, specimens collected from impacted points showed higher values for their respective indices of histopathological alteration. The biomarker molecules evaluated showed characteristics of response to oxidative stress and variations in their respective densitometry at points impacted by mining waste. The results of the present study demonstrate the molecular alterations and the effects of bioaccumulation and biomagnification resulting from exposure by heavy metals from the collapse of the Fundão dam.

**Keywords:** fish, heavy metals, liver, histopathology, oxidative stress

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécies analisadas no presente estudo. .... 19
- Figura 2.** Análise histopatológica do fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius*. .... 31
- Figura 3.** Imunofluorescência, imunoblotting e densitometria de MT-1 e CYP1A no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* na bacia do Rio Doce. .... 32
- Figura 4.** Imunofluorescência, imunoblotting e densitometria de catalase, GPx-1 e SOD-1 no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* na bacia do Rio Doce. .... 34
- Figura 5.** Imunofluorescência, imunoblotting e densitometria de CASP-3 e HMGB1 no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* na bacia do Rio Doce. .... 35

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Coordenadas e características dos três trechos amostrais na bacia do Rio Doce. .... 21
- Tabela 2.** Estágios progressivos de comprometimento histopatológico hepático. .... 24
- Tabela 3.** Anticorpos primários usados no presente estudo. .... 25
- Tabela 4.** Parâmetros da água dos três pontos amostrais na bacia do Rio Doce durante 2021 e 2022. .... 27
- Tabela 5.** Metais analisados na água (mg/L) e no sedimento (mg/kg) dos locais de amostragem e no fígado (mg/kg) de *Oligosarcus argenteus* e *Hoplias intermedius* na bacia do Rio Doce durante 2021 e 2022. .... 28
- Tabela 6.** Número de exemplares e parâmetros biológicos de *Oligosarcus argenteus* e *Hoplias intermedius* nos três locais de amostragem na bacia do Rio Doce. .... 29

## ABREVIATURAS

<b>AhR</b>	Receptor aril-hidrocarboneto
<b>As</b>	Arsênio
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Beta actina
<b>CASP</b>	Caspase
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Cd</b>	Cádmio
<b>CONAMA</b>	Conselho nacional do meio ambiente
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>ERO</b>	Espécie reativa de oxigênio
<b>Fe</b>	Ferro
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>GPx</b>	Glutathione peroxidase
<b>Hg</b>	Mercúrio
<b>HMGB1</b>	Proteína de alta mobilidade do grupo Box-1
<b>IAH</b>	Índice de alterações histopatológicas
<b>Mn</b>	Manganês
<b>MRE</b>	Elemento de resposta a metal
<b>MT</b>	Metalotioneína
<b>MTF</b>	Fator de transcrição regulador de metal
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salina
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>XRE</b>	Elementos de resposta a xenobióticos

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Mineração e o rompimento da barragem de Fundão .....	13
1.2 Toxicidade por metais .....	14
1.3 Biomarcadores .....	15
1.3.1 Metais .....	15
1.3.2 Xenobióticos.....	16
1.3.3 Estresse oxidativo .....	17
1.3.4 Apoptose.....	17
1.3.5 Necrose .....	18
1.4 Modelos de estudo.....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	19
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	20
3.1 Objetivo geral .....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	21
4.1 Amostragem dos peixes.....	21
4.2 Análises de metal na água, sedimento e fígado.....	22
4.3 Análises morfológicas e histopatológicas .....	23
4.4 Imunohistoquímica.....	24
4.5 Western Blot.....	25
4.6 Análises estatísticas .....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	26
5.1 Parâmetros da água.....	26
5.2 Análise de metais na água, sedimento e fígado.....	27
5.3 Índices biológicos e histopatologias.....	29
5.5 Proteínas biomarcadoras.....	30

<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Mineração e o rompimento da barragem de Fundão

A partir do final do século XX, o setor minerário brasileiro demonstrou grande influência política e econômica em todo território nacional (Meira et al., 2016). O quadrilátero ferrífero, um importante polo econômico do estado de Minas Gerais, é responsável pela produção anual de aproximadamente 254 milhões de toneladas de minério de ferro, além da mineração de outros elementos importantes para o desenvolvimento industrial e aplicações tecnológicas, como ouro e manganês (Segura et al., 2016; Hatje et al., 2017). Entretanto, dentre as diversas atividades antrópicas que estão relacionadas com alterações do caráter físico-químico de ecossistemas aquáticos, a mineração destaca-se como maior contribuinte em poluição de bacias hidrográficas em todo o mundo (Hatje et al., 2017; Queiroz et al., 2018; Sumudumali & Jayawardana, 2021).

Comumente empregada na contenção do rejeito proveniente da extração de minério, a metodologia de barragens apresenta sérios riscos ambientais quando não supervisionadas, uma vez que armazenam grandes volumes de rejeito minerário com alto potencial de dispersão (Meira et al., 2016; Hatje et al., 2017). O relatório emitido pela Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico no ano de 2023 apontou 83 barragens enquadradas na Política Nacional de Segurança que possuem dano potencial associado de grau alto ou médio, representando risco ambiental, humanitário e/ou econômico em caso de rompimento. Destas 83 barragens, 69 também foram classificadas como categoria de risco alto (ANA, 2023).

Nas últimas décadas, acidentes relacionados a barragens de rejeito se tornaram mais frequentes em todo o mundo (Rico et al., 2008; Lyu et al., 2019; Guimarães et al., 2022). Neste mesmo período, o Brasil enfrentou dois dos maiores desastres ambientais associados ao rompimento de barragens de rejeito: o rompimento da barragem do Fundão e o rompimento da barragem B1, ambas no estado de Minas Gerais (Carmo et al., 2017, Thompson et al., 2020). Em novembro de 2015, a barragem do Fundão, localizada no município de Mariana, rompeu-se resultando na liberação de aproximadamente 55 milhões de m<sup>3</sup> de rejeitos minerários, deixando 17 mortos e 600 pessoas desabrigadas (Hatje et al., 2017; Oliveira Gomes et al., 2017; Queiroz et al., 2018; Quadra et al., 2019). O rejeito atingiu 1469 hectares de vegetação natural e afetou diretamente a bacia do Rio Doce, se espalhando por aproximadamente 600 quilômetros onde atingiu o Oceano Atlântico no litoral do estado de

Espírito Santo, afetando 38 cidades pelo trajeto e gerando graves danos ambientais e socioeconômicos (Fernandes et al., 2016).

## 1.2 Toxicidade por metais

Os metais pesados e metaloides são elementos metálicos que possuem densidade relativamente alta em comparação a água (Fergusson, 1990). Estes elementos são classificados em dois grupos: metais essenciais, que desempenham funções em processos bioquímicos e fisiológicos, podendo induzir efeitos citotóxicos em tecidos e órgãos quando em altas concentrações (Sivaperumal et al., 2007), e metais não essenciais, que não possuem função biológica comprovada, demonstrando efeitos citotóxicos quando acumulados em tecidos e órgãos (Authman et al., 2015).

Como são os principais consumidores em cadeias tróficas de ambientes aquáticos, os peixes tornam-se mais susceptíveis aos efeitos da bioamplificação de metais pesados (Garai et al., 2021). O órgão ou tecido afetado varia de acordo com o modo de exposição, o mecanismo de absorção, a regulação e a excreção (Jarić et al., 2011; Souza et al., 2018). Os peixes podem absorver os metais pesados através de diversas vias como a ingestão de alimentos, material particulado em suspensão na água, interação com o sedimento e troca de íons metálicos através das brânquias e tecido epitelial (Isangedighi & David, 2019). Após a absorção, tais elementos são transportados pela corrente sanguínea para vários órgãos e, caso não sejam excretados, se acumulam nos tecidos (Malik & Maurya, 2014).

A mitocôndria é responsável pela maior produção endógena de radicais livres através da respiração celular, onde são geradas espécies reativas de oxigênio (ERO's) (Sevcikova et al., 2011). Fatores exógenos são os principais responsáveis pelo desequilíbrio nos níveis de ERO's e outros radicais livres (Souza et al., 2018; Weber et al., 2020). Uma vez acumulados, os metais pesados podem produzir radicais livres através de reações redox e interferir nos sistemas de defesa celular antioxidante, aumentando o estresse celular (Sevcikova et al., 2011). No geral, os radicais livres podem ser classificados como moléculas de número ímpar de elétrons que doam ou aceitam um elétron de outras moléculas, reduzindo ou oxidando seu alvo (Martemucci et al., 2022).

Quando a produção de radicais livres pelos íons metálicos supera o equilíbrio homeostático promovido pelo sistema antioxidante, que inclui as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx), ocorre estresse oxidativo, onde diversos componentes celulares se tornam susceptíveis a dano (Lushchak, 2011). As

modificações promovidas pelos radicais livres podem ocorrer: a nível de DNA, que sofre hidroxilação; nas membranas celular e de organelas, que sofrem peroxidação lipídica; e em diversas proteínas envolvidas em cascatas metabólicas críticas, que são desnaturadas. Quando essas alterações ocorrem em larga escala, a nível tecidual, podem resultar no desencadeando de quadros histopatológicos que podem comprometer o funcionamento de órgãos (Martínez-Álvarez et al., 2005).

Devido a suas propriedades metabólicas de desintoxicação, o fígado é um dos órgãos mais afetados pelo acúmulo de poluentes (Amaral et al., 2002; Omar, 2014). A bioacumulação de metais pesados no fígado está associada a patologias graves, como a necrose, fibrose e inflamação hepática, apresentando dilatação dos capilares sinusoidais, infiltração de células imunológicas e centros melanomacrofágicos próximos a veias e artérias. Estudos também relatam amorfismo nas principais células residentes do fígado, os hepatócitos, como a vacuolização citoplasmática, alterações morfológicas no núcleo e hipertrofia (Bernet et al., 1999; Arantes et al., 2016; Anvarifar et al., 2018; Macêdo et al., 2020; Savassi et al., 2020; Weber et al., 2020).

### **1.3 Biomarcadores**

Os biomarcadores são moléculas que podem ser mensuradas em processos biológicos normais, patogênicos ou em respostas a exposição ou intervenção (García-Gutiérrez et al., 2020). Devido a sua sensibilidade a exposição ou efeito tóxico de xenobióticos, diversos biomarcadores são utilizados como ferramentas metodológicas em estudos ecotoxicológicos (Braunbeck & Streit, 1998; Gutiérrez et al., 2020). A utilização de biomarcadores é fundamental para a compreensão de adversidades na relação entre organismos e seus respectivos ecossistemas, fornecendo informações de como as alterações no habitat podem influenciar indivíduos e suas populações (Triebkorn et al., 2002).

#### **1.3.1 Metais**

As metalotioneínas (MT) são proteínas com baixo peso molecular e ricas em cisteína, o que as confere alta afinidade por íons metálicos livres, sequestrando-os e reduzindo seus potenciais citotóxicos através de quelação (Linde et al, 2001; Coimbra et al., 2013; Ahmed et al., 2013; Gobi et al., 2018). Estas proteínas estão envolvidas em diversos mecanismos celulares, desempenhando um papel fundamental na homeostase de metais essenciais, mas

também atuam em mecanismos celulares de defesa a intoxicação de metais não essenciais (Gabriel et al., 2020).

Um dos principais mecanismos de regulação transcricional das MT's ocorre através do Fator de Transcrição Regulador de Metal (MTF), que é funcionalmente ativo na presença de metais, que, ao se ligar na sequência regulatória Elemento Responsivo a Metal (MRE), induzem a transcrição destas proteínas (Ziller & Fraissinet-Tachet, 2018). Além disso, a ligação de íons metálicos à MT's é responsável por conferir maior resistência a proteólise por enzimas citosólicas ou por catepsinas presentes em lisossomos (Coimbra, 2008).

As MT's apresentam correlação direta entre seus níveis de expressão e bioacumulação de metais pesados nos tecidos de peixes (Wang et al., 2014). Sua ampla distribuição de suas isoformas nos diversos tipos celulares, alta expressão durante estímulos exógenos e afinidade por íons metálicos são características fundamentais para que estas proteínas sejam utilizadas como biomarcadoras de contaminação ambiental por metais (Coimbra, 2008; Weber et al., 2020).

### 1.3.2 Xenobióticos

Abundantes no fígado, Citocromo P450 (CYP) representa uma família de monooxigenases microsossomais responsáveis por impedir a bioacumulação de diversos xenobióticos através da biotransformação (Esteves et al., 2021). A regulação transcricional destas proteínas ocorre através receptor aril-hidrocarboneto (AhR), que, no citoplasma, encontra-se associado a um complexo protéico formado pela proteína chaperona Hsp 90, a proteína cochaperona p23 e a proteína XAP2 que, mediante a ligação de se respectivo ligante no citoplasma, translocam-se ao núcleo celular, onde AhR se heterodimeriza em seu translocador nuclear, Arnt, possibilitando assim a interação entre Arnt e a uma sequência específica do DNA, presente no gene de CYP, intitulada Elementos de Respostas a Xenobióticas (XRE's), promovendo assim sua transcrição (Kaminsky, 2006).

Estudos de biomonitoramento comumente utilizam o citocromo P450 1A, ou CYP1A, como indicador da presença de compostos xenobióticos, como metais pesados, em organismos aquáticos (Weber et al., 2020). Além dos XRE's, estudos identificaram regiões de MRE's no gene codificante de CYP1A, sugerindo modulação transcricional desta proteína por metais pesados (Lewis et al., 2006). Diversos íons metálicos, através da ativação do receptor AhR, podem interferir na cascata transcricional de CYP1A (Hinton et al., 2008; Liu et al., 2022).

### 1.3.3 Estresse oxidativo

SOD compreende um grupo de enzimas formados por complexos proteicos homodiméricos ou tetraméricos que atuam como primeira linha de defesa contra o superóxido, catalisando a dismutação de duas moléculas de  $O_2$  em oxigênio e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), impedindo a formação de radicais de hidroxila por esta ERO (Halliwell e Gutteridge, 2015). Embora essa catalização iniba a capacidade do superóxido de produzir radicais de hidroxila, a interação de  $H_2O_2$  com íons metálicos de valências variáveis também é responsável pela geração radicais de hidroxila extremamente reativos (Hoseinifar et al., 2020). O  $H_2O_2$  pode ser neutralizado por CAT, um tetrâmero de quatro cadeias polipeptídicas que contém quatro grupos heme de porfirina, o que permite que a mesma interaja com o  $H_2O_2$ , o decompondo em  $H_2O$  e  $O_2$  (Kaushal et al., 2018, Hoseinifar et al., 2020). Outra via de neutralização de  $H_2O_2$  envolve a enzima dependente de selênio GPx, que catalisam a redução de  $H_2O_2$  utilizando uma molécula de glutathione reduzida como doadora de elétrons (Margis et al., 2008).

O sistema de defesa antioxidante enzimático se comporta de diferentes formas em quadros de estresse oxidativo ocasionado por íons metálicos, variando a expressão destas proteínas dependendo do íon metálico e sua concentração (Gallego & Tomaro, 2002; Wieloch et al., 2012; Jan et al., 2015). Além disso, vias indiretas podem comprometer a atividade destas proteínas, um exemplo é a diminuição dos níveis intracelulares de GPx devido a peroxidação de membrana celulares por ERO's, que favorecem a depleção de glutathione (Pulido & Parrish, 2003; Eroglu et al., 2015).

### 1.3.4 Apoptose

As principais modificações promovidas pelos radicais livres, uma vez superada as barreiras de defesa celular, podem ocorrer: a nível de DNA, que sofre hidroxilação; nas membranas celular e de organelas, que sofrem peroxidação lipídica; e em diversas proteínas envolvidas em cascatas metabólicas críticas, que são desnaturadas, acionando assim os programas de morte celular (Foret et al., 2020; Recknagel et al., 2020; Villalpando-Rodriguez & Gibson, 2021; Fujii et al., 2022). Neste contexto, a apoptose pode ser ativada por diversos mecanismos. A via extrínseca, por exemplo, pode ser ativada através de interações dos íons metálicos e radicais livres com proteínas e/ou material genético, alterando os níveis de proteínas próapoptóticas e anti-apoptóticas (Jia et al., 2020; Luo et al., 2023). Já a via

intrínseca (mitocondrial), pode ser ativada através da peroxidação da membrana mitocondrial, onde o citocromo-c é liberado para o citoplasma, culminando na ativação das caspases efetoras 3 e 9, que são comumente utilizadas como biomarcadores para apoptose (Yamashita et al., 2008; Chandel et al., 2015; Gao et al., 2020; Sun et al., 2020). Destaca-se a caspase-3 (Casp-3) devido a sua capacidade de clivar uma vasta gama de proteínas alvos nos estágios finais do apoptose (Yamashita et al., 2008).

### 1.3.5 Necrose

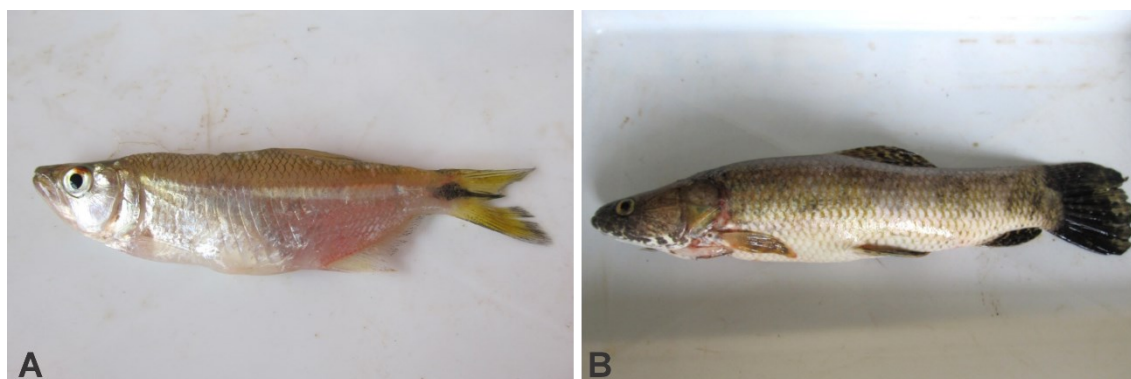
Estudos recentes evidenciam a presença de moléculas regulatórias no processo de morte celular por necrose, demonstrando que este processo pode não se resultar apenas por estresses celulares físico-químicos acidentais (Berghe et al., 2014). Além da independência de caspases, a necrose se diferencia da morte celular por apoptose pelo dano irreversível na membrana plasmática com o subsequente extravasamento do conteúdo intracelular para o meio extracelular (Syhtichaki & Tavernarakis, 2002; Christofferson & Yuan, 2010).

Após a lise, diversas moléculas sinalizam um processo inflamatório, dentre elas a proteína de alta mobilidade do grupo Box-1 (HMGB1), presente no núcleo celular associada às histonas, com alto potencial de recrutamento de células mononucleares no ambiente extracelular, podendo servir também de sinalização para células vizinhas durante o processo de necrose (Andersson, et al., 2002; Dumitriu et al., 2005; Festjens et al., 2006; Christofferson & Yuan, 2010). No núcleo, HMGB1 atua associado ao DNA em processos de transcrição (Raucci & Bianchi, 2007) e, durante o processo de apoptose, HMGB1 permanece associado a cromatina através de uma forte ligação com as histonas (Scaffidi et al., 2002). Em contraste, no processo de necrose celular, a desintegração nuclear permite que HMGB1 se libere de forma passiva da célula.

## 1.4 Modelos de estudo

Mais de 200 espécies de peixes já foram registradas quanto sua ocorrência na bacia do Rio Doce (Sarmiento-Soares et al., 2022). As espécies de peixes que persistem nos trechos impactados pelo rompimento da barragem do Fundão interagem continuamente com o rejeito mineral acumulado no leito dos corpos hídricos, sendo ótimos modelos para avaliação referente aos impactos crônicos desencadeados deste evento (Weber et al., 2020).

O gênero *Oligosarcus* sp. compreende 19 espécies de peixes de pequeno e médio porte que ocorrem na América do Sul em ambientes lóticos e lênticos (Matt et al., 2009). *Oligosarcus argenteus* (Fig. 1A), popularmente conhecido como lambari-bocarra, apresenta comportamento onívoro, onde, além de se alimentar de outras espécies de peixes menores e insetos (Barros et al., 2015; González et al., 2018).



**Figura 1.** Espécies analisadas no presente estudo. (A) *Oligosarcus argenteus*, (B) *Hoplias intermedius*.

O gênero *Hoplias* sp. compreende 11 espécies de peixes de água doce distribuídos por toda América do Sul (Costa et al., 2015). *Hoplias intermedius* (Fig. 1B), popularmente conhecido como trairão, é uma espécie bentônica que apresenta comportamento carnívoro, com dieta basicamente composta por outros peixes, onde espécies do gênero *Astyanax* (*Psalidodon*) sp. são suas principais presas naturais (Klingelfus et al., 2017). O comportamento predatório está diretamente relacionado ao acúmulo dos efeitos adversos causados por xenobióticos, o que permite com que esta espécie seja modelo para estudos de biomagnificação destes compostos (Vicari et al., 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

A bacia do Rio Doce encontra-se dentro do bioma Mata Atlântica, um dos 34 hotspots mundiais prioritários para a conservação de biodiversidade devido ao seu alto nível de endemismo correlacionado a grandes perturbações antrópicas (Myers et al., 2000). Logo após o desastre, foram coletadas toneladas de peixes mortos pertencentes a mais de 21 espécies diferentes (IBAMA, 2015). Mesmo com o drástico impacto do rejeito na ictiofauna do Rio Doce, estudos moleculares anteriores relataram a presença de espécies crípticas de peixes ocorrendo na bacia, impossibilitando a avaliação da real da dimensão do impacto na ictiofauna endêmica (Fernandes et al., 2016; Ramirez et al., 2016). Além dos efeitos

imediatos do desastre, a biota residente das áreas afetadas pelo rejeito enfrenta uma exposição crônica aos resíduos minerários que se acumularam no sedimento de fundo e na margem do rio, responsáveis pela transformação ativa do caráter físico-químico deste ecossistema, podendo variar sazonalmente devido aos processos de erosão e ressuspensão (Hatje et al., 2017; Oliveira Gomes et al., 2017; Queiroz et al., 2018; Quadra et al., 2019).

Sete anos após a maior contaminação ambiental por rejeitos minerários em ecossistemas aquáticos do mundo, inúmeros estudos foram realizados a fim de elucidar as alterações e os efeitos desta contaminação sobre a biota aquática e ecossistema, tanto em parâmetros físico-químicos quanto em parâmetros biológicos (Santolin et al., 2015; Hatje et al., 2017; Oliveira Gomes et al., 2017; Weber et al., 2020), entretanto, pouco foi se explorado em relação as alterações moleculares decorrentes desta exposição crônica. Dentro deste contexto, o presente trabalho busca responder a seguinte pergunta: quais os principais efeitos morfofisiológicos provocados pela exposição crônica ao rejeito minerário em populações de peixes endêmicas dos trechos impactados pelo rompimento da barragem do Fundão na bacia do Rio Doce?

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar a morfofisiologia do fígado e os possíveis efeitos histopatológicos em duas espécies de peixes (*O. argenteus* e *H. intermedius*) coletadas em ambientes impactados pelo rompimento da barragem de Fundão na bacia do Rio Doce.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os parâmetros físico-químicos da água e a concentração de metais pesados em amostras de água, sedimento e fígado das espécies de peixes capturadas em cada ponto amostral;
- Avaliar os parâmetros biométricos das espécies e fígado de peixes capturados em cada trecho amostral;

- Analisar e quantificar as características morfológicas e histopatológicas em amostras de fígado das espécies de peixes em cada trecho amostral;
- Detectar e quantificar a expressão de proteínas biomarcadoras de contaminação por metais, estresse oxidativo e morte celular nas amostras de fígado das espécies em cada trecho amostral;
- Comparar estatisticamente os dados obtidos entre os pontos de amostragem e espécies de peixes.

#### 4. METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido atendendo a CHAMADA FAPEMIG 10/2018 ‘‘Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação para Monitoramento da Biodiversidade de Ambientes Aquáticos de Minas Gerais em Áreas Impactadas pelo Rompimento da Barragem de Fundão - Mariana – MG’’, com financiamento FAPEMIG/FUNDAÇÃO RENOVA, incluído na Linha temática V - Ecotoxicidade. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA-UFMG, protocolo 69/2021), e as coletas de peixes foram realizadas com autorizações dos órgãos competentes (IEF-MG e SISBIO-IBAMA).

##### 4.1 Amostragem dos peixes

Para desenvolvimento do trabalho foram realizadas quatro amostragens trimestrais durante o período de novembro de 2021 a outubro de 2022 em três trechos hidrográficos na bacia do Rio Doce em Minas Gerais. Os trechos hidrográficos selecionados compreendem: um trecho referência/ sem contaminação por rejeitos minerários (Rio Piranga) e dois trechos hidrográficos ao longo do Rio Doce, que estiveram envolvidos na contaminação por rejeitos minerários no rompimento da barragem de Fundão (Tabela 1). Os parâmetros físico-químicos da água dos trechos de amostragem foram registrados, em três locais aleatórios em cada trecho amostral e em cada campanha a campo, utilizando um range finder Nikon Prostaff 550 e uma sonda multiparamétrica Horiba U51.

**Tabela 1.** Coordenadas e características dos três trechos amostrais na bacia do Rio Doce.

Locais de amostragem	Características
----------------------	-----------------

---

P1- 20°29'28.2"S 43°00'59.6"W	Rio Piranga, largura entre 83 e 117 m, altitude 490 m, ponto referência que atravessa pequenos municípios desde sua nascente, distante 70 km de P2
P2- 20°16'18.7"S 42°55'12.9"W	Rio Doce, largura 89 e 120 m, altitude 345 m, recém-formado a partir da junção do Rio do Carmo (recebeu rejeitos da barragem Fundão) com Rio Piranga
P3- 19°58'22.7"S 42°38'35.8"W	Rio Doce, largura entre 88 e 131 m, altitude 254 m, localizado 75 km a jusante de P2, nesse trajeto há contribuição de significativo afluente (Rio Casca)

---

Os peixes foram amostrados com auxílio de redes de emalhar, com diferentes tamanhos de malha e esforço de pesca padronizado entre os pontos amostrais, as quais foram armadas no final da tarde e permaneceram na água por aproximadamente 12 horas. Os exemplares capturados vivos foram eutanasiados com imersão em Eugenol 250 mg/L, seguindo princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). De cada exemplar amostrado das espécies *O. argenteus* e *H. intermedius* foram obtidos o comprimento total (CT) e o pesos corporal (PC) e do fígado (PF). Os dados biométricos das espécies foram utilizados para calcular o índice hepatossomático ( $IHS = PF \cdot 100 / PC$ ) e fator de condição de Fulton ( $K = PC \cdot 100 / CT^3$ ). Amostras do fígado de cada exemplar amostrado foram coletadas para o emprego de diversas técnicas descritas a seguir.

#### 4.2 Análises de metal na água, sedimento e fígado

Amostras de água e sedimento foram coletadas em três locais, onde as redes foram armadas para amostragem dos peixes, em cada trecho amostral em novembro/2021 e junho/2022 para análise de arsênio (As), cádmio (Cd), ferro (Fe), manganês (Mn) e mercúrio (Hg). Amostras de água foram analisadas seguindo os métodos 3030E e 3120B para Cd, Fe e Mn, e o método 3125B para As e Hg, descritos por Rice e colaboradores (2012). Amostras de sedimento foram analisadas de acordo com os métodos 3050B/96 para Cd, Fe e Mn, 3050B para As e 7471B para Hg (Rice et al., 2012). As concentrações de Cd, Fe e Mn foram quantificadas no espectrômetro de massas Agilent 720/730 (ICP-OES), e As e Hg no espectrômetro de massas Agilent 8800 (ICP-MS).

Amostras de fígado (N= 5 por espécie/ponto) foram coletadas e congeladas para análise de metais (As, Cd, Fe, Mn e Hg). As amostras foram homogenizadas e analisadas

seguindo os métodos 3111B para Cd, Fe e Mn, 3114A.C para As e 3030J para Hg (Rice et al., 2012). As concentrações de Cd, Fe e Mn foram quantificadas no espectrofotômetro de absorção atômica de chama, As no espectrofotômetro de absorção atômica de chama acoplada ao gerador de hidretos a vapor quente e Hg no espectrofotômetro de absorção atômica de chama acoplada ao gerador de hidretos a vapor frio (espectrofotômetro de absorção atômica Varian AA140).

### 4.3 Análises morfológicas e histopatológicas

Para análise histológica do fígado das espécies *O. argenteus* e *H. intermedius*, amostras foram fixadas em líquido de Bouin por 24h, incluídas em parafina, seccionadas com 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina-eosina. Para morfometria do fígado, a área de hepatócitos foi mensurada (N = 100 por espécie/ponto) com auxílio do software Zeiss AxioVision 4.8 acoplado ao fotomicroscópio Zeiss Axioplan 2.

Para cálculo do índice de alterações histopatológicas (IAH) no fígado, alterações patológicas foram avaliadas em oito campos histológicos para cada exemplar, as quais foram classificadas em estágios progressivos de acordo com comprometimento das funções do órgão (Tabela 2). O valor do IAH foi calculado para cada campo analisado pela fórmula:  $IAH = (1 \cdot SI) + (10 \cdot SII) + (100 \cdot SIII)$ , onde I, II e III correspondem ao grau das lesões e S representa a soma das alterações em cada estágio. O IAH médio foi dividido em quatro categorias: 0-20 = funcionamento normal do tecido; 21-40 = dano tecidual leve a moderado; 41-100 = modificação moderada a grave; maior que 100 = dano tecidual irreparável (adaptado de Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994; Weber et al., 2020).

**Tabela 2.** Estágios progressivos de comprometimento histopatológico hepático.

<b>Grau</b>	<b>Histopatologia</b>
I	Hipertrofia dos hepatócitos
	Núcleo periférico
	Vacuolização citoplasmática
	Deformação do contorno celular
	Alterações arquitetura e estrutura órgão
II	Hepatócitos com núcleo picnótico
	Hiperemia/ aneurisma
	Edema intercelular
	Presença de centros melanomacrofágicos
	Infiltrado inflamatório/ leucocitário
III	Corpo apoptótico
	Necrose (focal ou total)
	Fibrose

#### 4.4 Imunohistoquímica

As proteínas biomarcadoras relacionadas à contaminação por metais (MT-1), estresse celular e oxidativo (CYP1A, CAT, GPx-1, SOD-1), apoptose (CASP-3) e necrose (HMGB1) foram avaliadas através de imunoperoxidase e imunofluorescência. Amostras de fígado das espécies *O. argenteus* e *H. intermedius* foram fixadas em paraformoldeído 4% por 24h, e posteriormente incluídas em parafina, foram seccionadas com 5 µm de espessura em lâminas silanizadas. As secções foram submetidas à reativação antigênica com tampão citrato de sódio a 10 mM pH 6.0 por 20 min a 96 °C. Na imunoperoxidase, as secções foram incubadas em câmara escura com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS por 30 min para inativação da peroxidase endógena. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com albumina bovina a 2% em PBS por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpo primário em câmara úmida a 4 °C overnight, mediante as diluições apresentadas na tabela 2. Para imunoperoxidase, a revelação secundária foi realizada com anticorpo secundário conjugado

com peroxidase (Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP) por 2 h, sendo as marcações reveladas com diaminobenzidina (DAB) (Kit Impact DAB Peroxidase-HRP, Vector Laboratories), contra-coradas com hematoxilina e analisadas no fotomicroscópio Zeiss AxioPlan 2. Na imunofluorescência, as secções foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado Cy5 (1:500, Thermo Fisher Scientific) por 30 min. A marcação do DNA nuclear foi realizada com DAPI (1:2000) e as secções foram analisadas no microscópio Zeiss Axio Imager Z2 - Apotome 2. Em ambas as técnicas, os controles negativos foram realizados omitindo o tratamento com o anticorpo primário.

**Tabela 3.** Anticorpos primários usados no presente estudo.

Anticorpo	Natureza	Origem	Diluição
MT-1	Policlonal, coelho	Cloud-Clone Corp.	1:100
CYP1A	Policlonal, coelho	Biosense Laboratories AS	1:100
CAT	Policlonal, coelho	Boster Bio	1:100
GPx-1	Policlonal, coelho	Boster Bio	1:100
SOD-1	Policlonal, coelho	Cusabio	1:150
CASP-3	Policlonal, coelho	Cusabio	1:100
HMGB-1	Policlonal, coelho	Boster Bio	1:100

MT-1 = metalotioneína-1; CYP1A = Citocromo P450 1A; GPx-1 = glutatona peroxidase-1; SOD-1 = superóxido dismutase-1; CASP-3 = caspase-3; HMGB-1 = proteína de alta mobilidade do grupo Box-1;  $\beta$ -actina = beta actina.

#### 4.5 Western Blot

Amostras de fígado das espécies *O. argenteus* e *H. intermedius* foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C para realização da técnica de Western blotting. Para execução da técnica, as amostras foram lisadas, homogenizadas, em tampão de lise (150 mM NaCl, 0.5% desoxicolato de sódio, 0.1% SDS e 50 mM Tris pH 8.0) com inibidores de protease aprotinina e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e centrifugadas a 15.000 g por 30 min. Posteriormente a dosagem das proteínas foi realizada no sobrenadante pelo método de Bradford. Em cada amostra, 80  $\mu$ g de proteínas foram misturadas ao tampão de amostra, adicionadas ao gel de eletroforese 15%, e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose. Após a transferência, as reações inespecíficas foram bloqueadas com leite em

pó desnatado por 1 h a temperatura ambiente. A membrana foi incubada com os anticorpos previamente listados na secção anterior na concentração de 1:500 overnight a 4 °C. Posteriormente a membrana foi incubada por 3 horas com anticorpo secundário IgG conjugado com peroxidase (1:500, Sigma-Aldrich) sendo a reação revelada através da adição de DAB (Kit Immimpact DAB Peroxidase HRP, Vector Laboratories). A expressão dos biomarcadores no tecido hepático foi quantificada por meio da análise densométrica de cada proteína (N = 9-10 por espécie/ponto), cuja densidade óptica das bandas obtidas no Western blotting foi quantificada, utilizando software ImageJ 1.52, e dividida pela densidade da proteína controle ( $\beta$ -actina, Sigma-Aldrich) obtida para cada espécime.

#### 4.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas com auxílio dos softwares GraphPad Prism 6.03 e BioEstat 5.3. A normalidade dos dados foram avaliadas usando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Dados físico-químicos da água e de metais pesados na água, sedimento e fígado foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* Student-Newman-Keuls para comparar valores entre trechos amostrais. Dados de K e IHS foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* Dunn para comparar valores de cada espécie entre trechos amostrais. Dados de área dos hepatócitos, IAH e densitometria das proteínas foram submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste *post hoc* Tukey para comparar valores de cada espécie entre trechos amostrais. Os valores foram expressos em médias  $\pm$  DP, e os resultados serão considerados significantes em intervalo de confiança de 95%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros da água

No período analisado para área de estudo, a temperatura da água variou de 17,8 a 25,8 °C e não demonstrou diferenças significativas entre os três locais de amostragem ( $p > 0.05$ ). Oxigênio dissolvido foi maior em P1 e P2 ( $p = 0.0014$ ), trechos amostrais com maiores perfis altitudinais que P3. Maiores valores de pH ( $p = 0.0050$ ) e condutividade ( $p < 0.0001$ ) foram observados em P2 e P3, enquanto os maiores valores de potencial de redução ( $p < 0.0001$ ) foram registrados em P1 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros da água dos três pontos amostrais na bacia do Rio Doce durante 2021 e 2022.

	P1	P2	P3
Temperatura (°C)	21,14 ± 0,88 <sup>a</sup>	22,09 ± 0,78 <sup>a</sup>	22,69 ± 0,72 <sup>a</sup>
Oxigênio dissolvido (mg/L)	9,44 ± 0,45 <sup>a</sup>	8,29 ± 0,19 <sup>a</sup>	7,64 ± 0,23 <sup>b</sup>
pH	6,05 ± 0,04 <sup>b</sup>	6,30 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,34 ± 0,07 <sup>a</sup>
Condutividade (µS/cm)	43,50 ± 0,89 <sup>b</sup>	50,51 ± 0,92 <sup>a</sup>	52,33 ± 0,79 <sup>a</sup>
Potencial de redução (mV)	433,83 ± 9,54 <sup>a</sup>	332,83 ± 15,17 <sup>b</sup>	379,25 ± 3,73 <sup>b</sup>

Valores representam média ± E.P. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística nos valores entre locais de amostragem.

## 5.2 Análise de metais na água, sedimento e fígado

Concentração de Fe ( $p = 0.0267$ ) na água foi significativamente maior em P2 em relação a P1, e para Mn ( $p = 0.0032$ ) os níveis foram maiores em P2 e P3 em relação a P1. Concentrações de As, Cd e Hg na água foram detectadas abaixo do limite de quantificação nos três trechos amostrais, exceto para As em P2 (Tabela 5). No sedimento, níveis de As ( $p = 0.0011$ ), Fe ( $p = 0.0222$ ) e Mn ( $p = 0.0031$ ) foram significativamente maiores em P2 e P3 em relação a P1. Concentrações de Cd no sedimento não mostraram diferenças estatísticas entre trechos amostrais ( $p > 0.05$ ), enquanto os níveis de Hg foram detectados abaixo do limite de quantificação (Tabela 5).

No fígado de *O. argenteus* concentração de As ( $p = 0.0029$ ) foi significativamente maior em P2 em relação a P1, para Fe ( $p = 0.0087$ ) foi maior em P2 em relação a P1 e P3, enquanto para Hg ( $p = 0.0341$ ) foi maior em P3 em relação a P2 e P1. Níveis de Cd e Mn no fígado de *O. argenteus* não mostraram diferenças estatísticas entre trechos amostrais ( $p > 0.05$ ) (Tabela 5). No fígado de *H. intermedius* concentrações de Fe ( $p = 0.0045$ ) foram maiores em P2 e P3 em relação a P1, para Cd ( $p = 0.0478$ ) foi maior em P3 em relação a P1, e para Hg ( $p = 0.0122$ ) foi maior em P3 em relação P2 e P1. Níveis de As e Mn no fígado de *H. intermedius* não mostraram diferenças entre trechos amostrais ( $p > 0.05$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Metais analisados na água (mg/L) e no sedimento (mg/kg) dos locais de amostragem e no fígado (mg/kg) de *Oligosarcus argenteus* e *Hoplias intermedius* na bacia do Rio Doce durante 2021 e 2022.

Amostras	Arsênio (As)	Cádmio (Cd)	Ferro (Fe)	Manganês (Mn)	Mercúrio (Hg)
Água – P1	< 0,001	< 0,001	1,26 ± 0,54 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>b</sup>	< 0,0002
Água – P2	0,002 ± 0,01	< 0,001	3,34 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,03 <sup>a</sup>	< 0,0002
Água – P3	< 0,001	< 0,001	3,16 ± 1,04 <sup>ab</sup>	0,27 ± 0,09 <sup>a</sup>	< 0,0002
Sedimento – P1	2,79 ± 0,31 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	31.979 ± 2.009 <sup>b</sup>	228,50 ± 21,89 <sup>b</sup>	< 0,05
Sedimento – P2	29,47 ± 4,77 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	52.001 ± 3.589 <sup>a</sup>	716,0 ± 70,88 <sup>a</sup>	< 0,05
Sedimento – P3	18,15 ± 1,81 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	48.955 ± 6.642 <sup>a</sup>	1.010 ± 268,31 <sup>a</sup>	< 0,05
Fígado <i>O. argenteus</i> – P1	0,008 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,193 ± 0,029 <sup>a</sup>	63,47 ± 4,07 <sup>b</sup>	4,95 ± 0,41 <sup>a</sup>	0,026 ± 0,014 <sup>b</sup>
Fígado <i>O. argenteus</i> – P2	0,085 ± 0,015 <sup>a</sup>	0,191 ± 0,003 <sup>a</sup>	187,51 ± 28,55 <sup>a</sup>	6,46 ± 0,85 <sup>a</sup>	0,027 ± 0,015 <sup>b</sup>
Fígado <i>O. argenteus</i> – P3	0,024 ± 0,004 <sup>ab</sup>	0,251 ± 0,027 <sup>a</sup>	62,80 ± 6,77 <sup>b</sup>	4,45 ± 0,95 <sup>a</sup>	0,117 ± 0,050 <sup>a</sup>
Fígado <i>H. intermedius</i> – P1	0,004 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,211 ± 0,078 <sup>b</sup>	54,20 ± 5,40 <sup>b</sup>	4,77 ± 1,33 <sup>a</sup>	0,063 ± 0,029 <sup>b</sup>
Fígado <i>H. intermedius</i> – P2	0,027 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,283 ± 0,047 <sup>ab</sup>	511,37 ± 26,59 <sup>a</sup>	6,01 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,076 ± 0,014 <sup>b</sup>
Fígado <i>H. intermedius</i> – P3	0,035 ± 0,018 <sup>a</sup>	0,475 ± 0,003 <sup>a</sup>	392,57 ± 52,86 <sup>a</sup>	4,18 ± 0,38 <sup>a</sup>	0,546 ± 0,144 <sup>a</sup>

Valores representam média ± E.P. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os valores ( $P < 0.05$ ).

### 5.3 Índices biológicos e histopatologias

Para ambas as espécies o fator de condição de Fulton não apresentou diferenças significativas entre trechos amostrais ( $p > 0,05$ ). O índice hepatossomático de *O. argenteus* foi significativamente maior em P2 e P3 ( $p < 0,0001$ ), enquanto a área dos hepatócitos foi maior em P2 em relação a P3 e P1 ( $p < 0,0001$ ). O índice hepatossomático de *H. intermedius* não apresentou diferenças estatísticas entre trechos amostrais ( $p > 0,05$ ), enquanto a área de hepatócito foi maior em P2 e menor em P3 ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Número de exemplares e parâmetros biológicos de *Oligosarcus argenteus* e *Hoplias intermedius* nos três locais de amostragem na bacia do Rio Doce.

Espécie	Variáveis	P1	P2	P3
<i>O. argenteus</i>	N	24	26	20
	CT (cm)	15,73 ± 0,58	14,98 ± 0,48	13,13 ± 0,47
	PC (g)	36,70 ± 4,40	31,78 ± 3,10	19,58 ± 1,62
	K	0,85 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,03 <sup>a</sup>
	IHS	0,61 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,01 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,06 <sup>a</sup>
	AH (µm)	48,97 ± 0,44 <sup>c</sup>	59,94 ± 0,47 <sup>a</sup>	55,48 ± 0,47 <sup>b</sup>
<i>H. intermedius</i>	N	10	10	11
	CT (cm)	30,57 ± 3,13	34,96 ± 2,01	40,24 ± 1,63
	PC (g)	355,69 ± 78,35	418,04 ± 58,03	709,95 ± 84,31
	K	0,95 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,02 <sup>a</sup>
	IHS	0,86 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,04 <sup>a</sup>
	AH (µm)	59,89 ± 0,59 <sup>b</sup>	63,90 ± 0,82 <sup>a</sup>	56,10 ± 0,64 <sup>c</sup>

CT= comprimento total, PC= peso corporal, K= fator de condição de Fulton, IHS= índice hepatossomático, AH= área do hepatócito. Valores representam média ± E.P. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística nos valores da espécie entre locais de amostragem ( $P < 0.05$ ).

Espécimes de *O. argenteus* e *H. intermedius* coletados em P1 apresentaram arquitetura morfológica hepática normal, hepatócitos em formato poliédrico com núcleos centralizados e baixa frequência de histopatologias (Fig. 2A-B). Em contraste, peixes coletados nos pontos amostrais impactados pelo rejeito, P2 e P3, apresentaram, para ambas espécies, alterações a nível celular, como hepatócito hipertrófico (Fig. 2C), núcleo periférico (Fig. 2D), vacuolização citoplasmática (Fig. 2E), deformação no

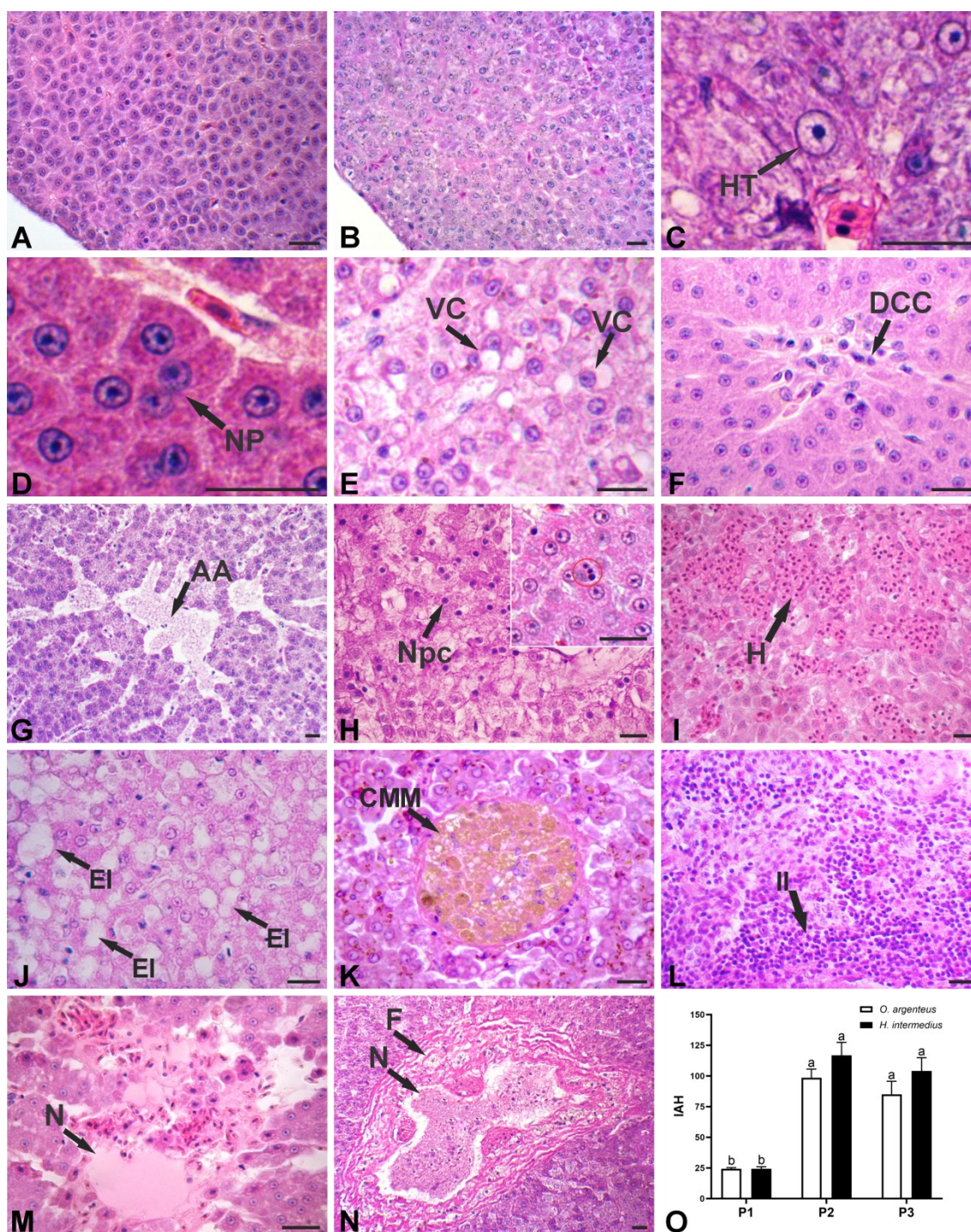
contorno celular (Fig. 2F), núcleo picnótico (Fig. 2H) e corpo apoptótico (Fig. 2H-anexo), e alterações a níveis teciduais, como alteração na arquitetura e estrutura do órgão (Fig. 2G), hiperemia (Fig. 2I), edema intercelular (Fig. 2J), infiltrado inflamatório (Fig. 2L), necrose (Fig. 2M-N) e fibrose (Fig. 2N). Centros melanomacrofágicos foram encontrados apenas no fígado de *H. intermedius* nos pontos impactados pelo rejeito (Fig. 2K).

O cálculo do índice de alteração histopatológica (IAH) mostrou valores significativamente maiores nos pontos impactados pelo rejeito (P2 e P3) em relação ao ponto referência (P1) para *O. argenteus* ( $p < 0,0001$ ) e *H. intermedius* ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 2O). Em P1, *O. argenteus* e *H. intermedius* apresentaram IAH médio inferior a 40, valor classificado como dano tecidual leve a moderado. Em P2 e P3, *O. argenteus* apresentou valores médios entre 41 e 100, valores classificados como modificação moderada a grave do tecido, enquanto *H. intermedius* mostrou valores médios superiores a 100, classificados como dano tecidual irreparável.

### 5.5 Proteínas biomarcadoras

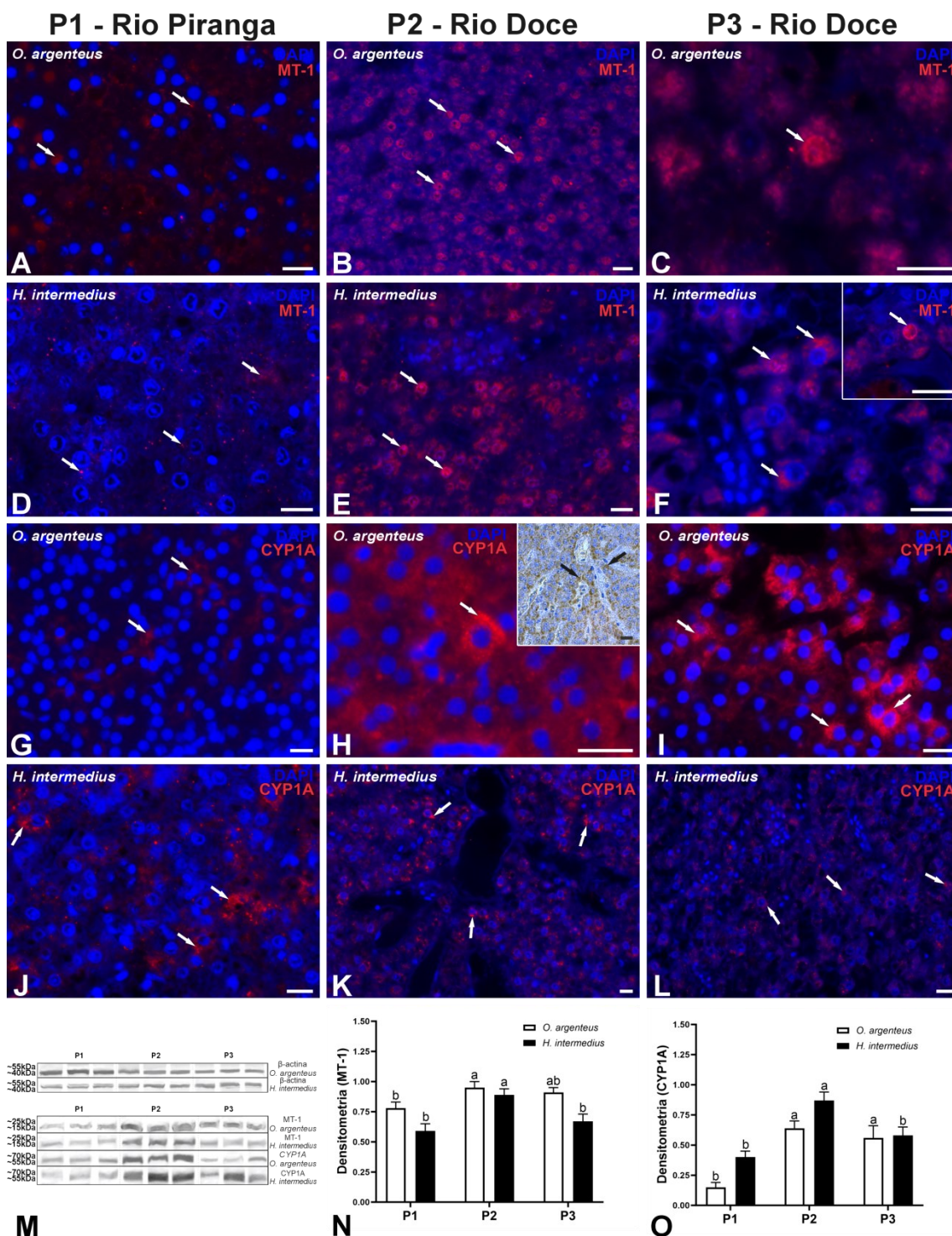
A imunoreatividade de MT-1 no fígado foi detectada de forma granular no citoplasma de hepatócitos e também no núcleo celular para ambas as espécies (Fig. 3A-F). MT-1 foi detectada no peso molecular de ~16 kDa para *O. argenteus* e *H. intermedius* por imunoblotting (Fig. 3M). Exemplos de *O. argenteus* demonstraram maior expressão de MT-1 em P2 quando comparados a P1 ( $p = 0,0479$ ) (Fig. 3N). MT-1 apresentou maior densidade em espécimes de *H. intermedius* coletados em P2 quando comparado a P3 e P1, que não demonstraram diferenças estatísticas entre si ( $p = 0,0018$ ) (Fig. 3N).

CYP1A foi imunolocalizado de forma granular no citoplasma dos hepatócitos em todo parênquima hepático para ambas as espécies (Fig. 3G-L). CYP1A foi detectada no peso molecular de ~59 kDa para ambas as espécies (Fig. 3M). A densitometria de CYP1A em *O. argenteus* demonstrou maiores valores em P2 e P3 em relação a P1 ( $p = 0,0002$ ) (Fig. 3O). Nas amostras de fígado de *H. intermedius*, P1 e P3 não foram diferentes estatisticamente e apresentam menor densidade de expressão para CYP1A em relação a P2 ( $p = 0,0003$ ) (Fig. 3O).



**Figura 2.** Secções histológicas transversais coradas com hematoxilina-eosina do fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* na bacia do Rio Doce. Arquitetura morfológica do fígado de *O. argenteus* [A] e *H. intermedius* [B] em P1. Alterações histopatológicas detectadas no fígado de *O. argenteus* [C, D, G, H, H-encarte, L, M] e *H. intermedius* [E, F, I, J, K, N] em P2 e P3: [C] Hepatócito hipertrófico (HT), [D] Núcleo periférico (NP) em hepatócito, [E] Vacuolização citoplasmática (VC) em hepatócito, [F] Deformação do contorno celular (DCC) em hepatócitos, [G] Alteração na arquitetura e estrutura do órgão (AA) em lóbulo hepático, [H] Núcleos picnóticos em hepatócitos (Npc), [H-encarte] detalhe de corpo apoptótico (círculo vermelho), [I] Hiperemia (H) em lóbulo hepático, [J] Edemas intercelulares (EI) em lóbulo hepático, [K] Detalhe de centro melanomacrofágico (CMM), [L] Infiltrado inflamatório (II) em lóbulo hepático, [M] Necrose (N), [N] Fibrose (F) e necrose (N). [O] Índice de alteração histopatológica (IAH) calculado para *O. argenteus* e *H. intermedius*. Valores representam

média geral para cada espécie  $\pm$  E.P. Letras diferentes em barras da mesma cor indicam diferença estatística para cada espécie entre trechos amostrais ( $p < 0,05$ ). Barra de escala: 10  $\mu$ m.

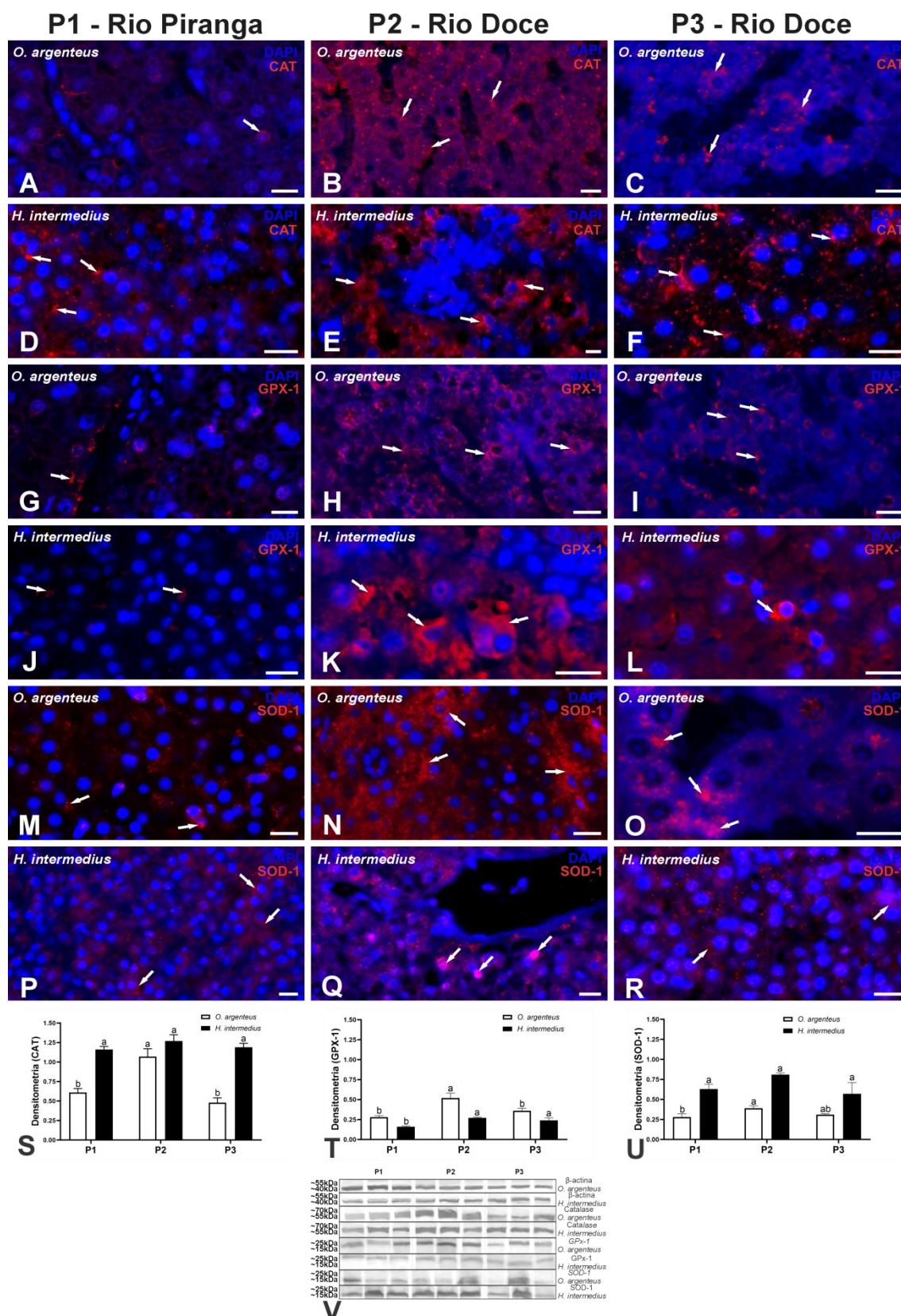


**Figura 3.** Imunofluorescência, imunoblotting e densitometria de MT-1 e CYP1A no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* na bacia do Rio Doce. P1- Rio Piranga [A, D, G, J], P2- Rio Doce [B, E, H, K] e P3- Rio Doce [C, F, I, L]. MT-1 e CYP1A marcados com Cy5 (vermelho/seta branca) e núcleos celulares corados com DAPI (azul). Fígado de *O. argenteus* marcado com MT-1 [A-C]. Fígado de *H. intermedius* marcado com MT-1 [D-F]; detalhe de MT-1 no núcleo celular de hepatócito [F-anexo]. Fígado de *O. argenteus* marcado com

CYP1A [G-I]; detalhe de CYP1A no parênquima hepático pela imunoperoxidase [H- anexo]. Fígado de *H. intermedius* marcado com CYP1A [J-L]. Western blotting do fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* para  $\beta$ -actina, MT-1 e CYP1A [M]. Densitometria da expressão de MT-1 [N] e CYP1A [O] no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius*. Valores representam média  $\pm$  E.P. Letras diferentes em barras da mesma cor indicam diferenças estatísticas para espécie entre trechos amostrais ( $p < 0,05$ ). Barras de escala: 15  $\mu$ m

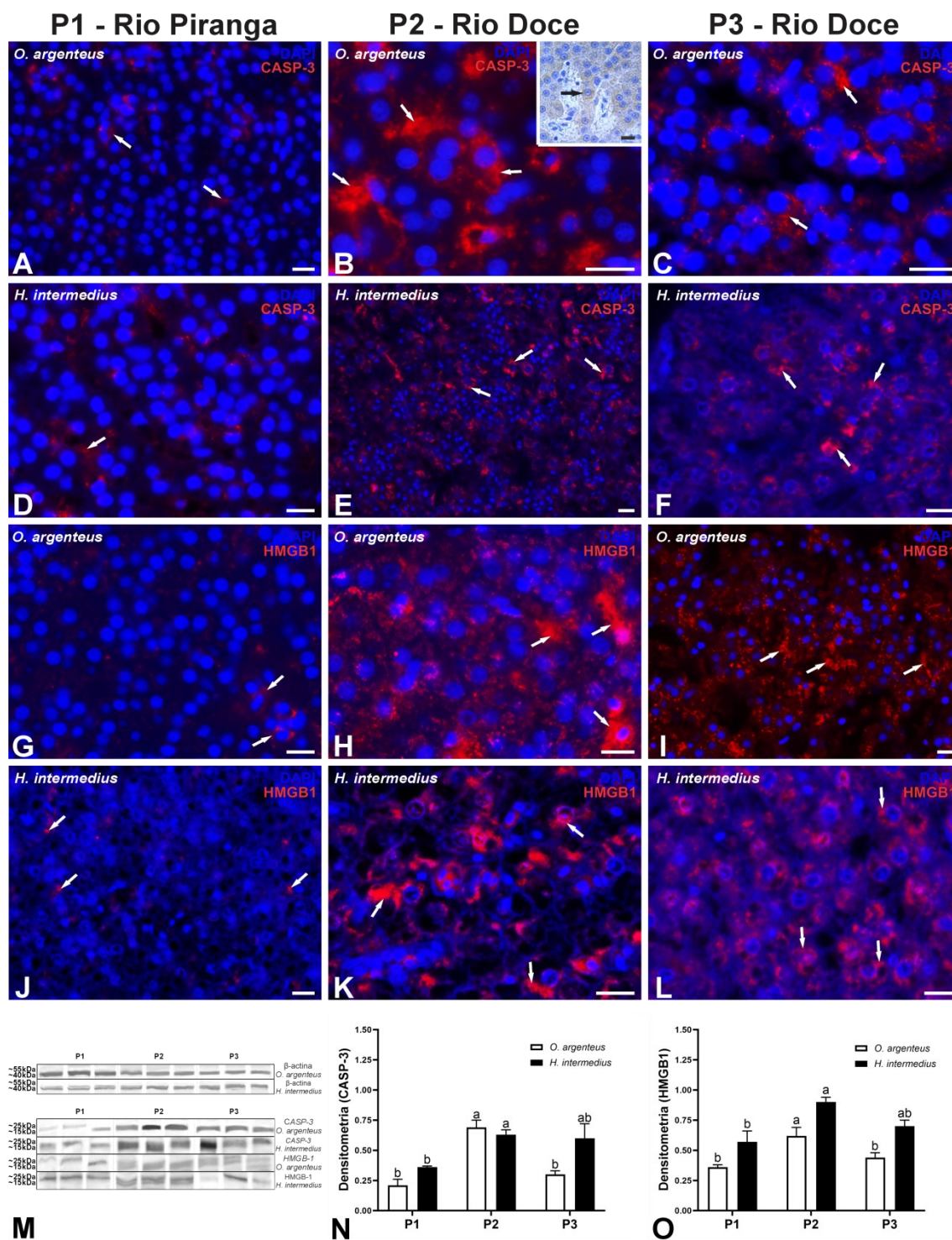
Em ambas as espécies, catalase (Fig. 4A-F) e SOD-1 (Fig. 4M-R) foram imunorreativas de forma granular no citoplasma dos hepatócitos, sendo esta última proteína também imunolocalizada no núcleo dos hepatócitos (Fig. 4Q). GPx-1 mostrou imunoreatividade de forma homogênea no citoplasma dos hepatócitos para as duas espécies (Fig. 4G-L). Catalase, GPx-1 e SOD-1 foram detectadas nos pesos moleculares de  $\sim 60$  kDa,  $\sim 23$  kDa e  $\sim 20$  kDa para ambas as espécies (Fig. 4V). No fígado de *O. argenteus*, catalase (Fig. 4S,  $p < 0,0001$ ), GPx-1 (Fig. 4T,  $p = 0,0015$ ) e SOD-1 (Fig. 4U,  $p = 0,0306$ ) foram significativamente mais expressas em P2 em relação a P1 e P3, exceto para SOD-1 que não mostrou diferença entre P2 e P3. No fígado de *H. intermedius* catalase (Fig. 4S,  $p > 0,05$ ) e SOD-1 (Fig. 4U,  $p > 0,05$ ) não apresentaram diferenças estatísticas na expressão entre os trechos amostrais, enquanto GPx-1 mostrou maior densitometria em P2 e P3 quando comparado a P1 (Fig. 4T,  $p = 0,0050$ ).

A imunoreatividade de CASP-3 foi observada de forma granular no citoplasma de hepatócitos em ambas espécies (Fig. 5A-F). HMGB1 foi reativa no citoplasma de hepatócitos e no meio extracelular no parênquima hepático (Fig. 5G-L). CASP-3 e HMGB1 foram detectadas nos pesos moleculares de  $\sim 17$  kDa e  $\sim 24$  kDa para ambas as espécies (Fig. 5M). No fígado *O. argenteus*, a expressão de CASP-3 (Fig. 5N,  $p < 0,0001$ ) e HMGB1 (Fig. 5O,  $p = 0,0027$ ) foi significativamente maior em P2 quando comparado a P1 e P3. No fígado de *H. intermedius* CASP-3 (Fig. 5N,  $p < 0,0277$ ) e HMGB1 (Fig. 5O,  $p = 0,0040$ ) apresentaram maior densidade de expressão em P2 em relação a P1, enquanto P3 não mostrou diferença estatística para ambos trechos amostrais.



**Figura 4.** Imunofluorescência, imunoblotting e densitometria de catalase, GPx-1 e SOD-1 no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* na bacia do Rio Doce. P1- Rio Piranga [A, D, G, J, M, P], P2- Rio Doce [B, E, H, K, N, Q] e P3- Rio Doce [C, F, I, L, O, R]. Catalase, GPx-1 e SOD-1 marcados com Cy5 (vermelho/seta branca) e núcleos celulares corados com DAPI (azul). Fígado de *O. argenteus* marcado com catalase [A-C]. Fígado de *H. intermedius* marcado com catalase [D-F]. Fígado de *O. argenteus* marcado com GPx-1 [G-I]. Fígado de *H.*

*intermedius* marcado com GPx-1 [J-L]. Fígado de *O. argenteus* marcado com SOD-1 [M-O]. Fígado de *H. intermedius* marcado com SOD-1 [P-R]; detalhe de núcleo marcado SOD-1 [Q]. Densitometria da expressão de catalase [S], GPx-1 [T] e SOD-1 [U] no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius*. Western blotting do fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* para  $\beta$ -actina, catalase, GPX-1 e SOD-1 [V]. Valores representam média  $\pm$  E.P. Letras diferentes em barras da mesma cor indicam diferenças estatísticas para espécie entre trechos amostrais ( $p < 0,05$ ). Barras de escala: 15  $\mu$ m



**Figura 5.** Imunofluorescência, imunoblotting e densitometria de CASP-3 e HMGB1 no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* na bacia do Rio Doce. P1- Rio Piranga [A, D, G, J], P2- Rio

Doce [B, E, H, K] e P3- Rio Doce [C, F, I, L]. CASP-3 e HMGB1 marcados com Cy5 (vermelho/seta branca) e núcleos celulares corados com DAPI (azul). Fígado de *O. argenteus* marcado com CASP-3 [A-C]; detalhe de CASP-3 associado a desorganização tecidual [B-encarte]. Fígado de *H. intermedius* marcado com CASP-3 [D-F]. Fígado de *O. argenteus* marcado com HMGB1 [G-I]. Fígado de *H. intermedius* marcado com HMGB1 [J-L]. Western blotting do fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* para  $\beta$ -actina, CASP-3 e HMGB1 [M]. Densitometria da expressão de CASP-3 [N] e HMGB1 [O] no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius*. Valores representam média  $\pm$  E.P. Letras diferentes em barras da mesma cor indicam diferenças estatísticas para espécie entre trechos amostrais ( $p < 0,05$ ). Barras de escala: 15  $\mu$ m

## 6. DISCUSSÃO

As concentrações de As, Fe e Mn no sedimento foram maiores nos trechos impactados pelos rejeitos minerários da barragem de Fundão em relação ao trecho referência. Os níveis de concentração de As observados nos pontos impactados pelo rejeito excedem os valores estabelecidos pela Resolução CONAMA N°454/2012, apresentando maior probabilidade de efeitos adversos à biota. O As tende a se bioacumular no fígado, órgão onde ocorrem suas principais biotransformações (Cockell et al., 1991; Rossman, 2003). Diversos estudos demonstram que As é capaz de induzir alterações moleculares em baixos níveis de concentração no fígado de peixes (Bhattacharya & Bhattacharya, 2007; Kim & Kang, 2015; Kumari et al., 2017; Sarkar et al., 2017).

Embora a Resolução CONAMA N°454/2012 não estipule valores mínimos para concentrações de Fe e Mn, nossos resultados mostraram maiores valores destes metais na água e sedimento nos trechos impactados pelo rejeito. Estudos comparativos atribuíram o aumento na concentração destes metais na bacia do Rio Doce devido ao rompimento da barragem do Fundão (Oliveira Gomes et al., 2017; Queiroz et al., 2018). A concentração de Fe e Mn também apresentou maiores valores no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* nos pontos impactados pelo rejeito, e maiores valores médios dentre os metais avaliados neste estudo. Ambos são metais essenciais, mas níveis elevados destes metais foram atribuídos a diversas alterações moleculares no fígado em diferentes espécies (Vieira et al., 2012; Mehta, 2018; Ali et al., 2021; Musharraf et al., 2021; Chen et al., 2022).

O fígado das espécies *O. argenteus* e *H. intermedius* apresentou maiores valores do IAH nos trechos impactados pelo rompimento da barragem, indicando que a contaminação causada por estes rejeitos pode induzir histopatologias graves neste

órgão. Diversos estudos reportaram que a exposição a As, Fe ou Mn foi capaz de induzir os mesmos quadros histopatológicos observados em nossas análises (Ahmed et al., 2013; Akbary & Jahanbakhshi, 2019; Wang et al., 2022; Kumar et al., 2023). Destaca-se que os valores médios de IAH para espécimes de *H. intermedius* amostrados em P2 e P3 foram superiores a 100, indicando dano tecidual irreparável. Esta espécie possui comportamento carnívoro restrito, tornando-se mais susceptível a bioacumulação de metais pesados devido aos processos de biomagnificação destes elementos ao longo da teia trófica (Liu et al., 2019; Yang et al., 2023; Saidon et al., 2024). No fígado de *H. intermedius* As e Fe foram detectados em níveis significativamente maiores nos trechos impactados pelo rejeito, enquanto As, Fe e Mn mostraram maiores valores no sedimento. O comportamento predominantemente bentônico de *H. intermedius* também pode explicar a bioacumulação nesta espécie, uma vez que os metais pesados tendem a sedimentar no substrato de ecossistemas aquáticos e a interação com o mesmo torna-se prejudicial para os organismos (Mackintosh et al., 2016; Sheikhzadeh & Hamidian, 2021).

A maior concentração de metais no trecho amostral mais próximo a barragem de Fundão foi evidenciada através da expressão de MT-1, que se mostrou mais elevada neste local quando comparada ao trecho referência. Estudos atribuem a ação de íons metálicos específicos ao desbalanceamento nos níveis de expressão de MT (Coyle et al., 2002; Weber et al., 2020). No presente estudo, a imunolocalização de MT-1 foi detectada no citoplasma e núcleo dos hepatócitos nas duas espécies. Em estudo realizado por Takahashi e colaboradores (2005), a imunolocalização nuclear de MT foi potencializada pelo aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> citoplasmáticos, sugerindo que o tráfego nuclear de MT está relacionado ao estresse oxidativo citoplasmático provocado por ERO's. Nossos resultados para as enzimas do sistema antioxidante corroboram com este mecanismo. Em nossas análises de imunofluorescência para SOD-1, foi observada imunolocalização no citoplasma e núcleo dos hepatócitos para ambas as espécies. Embora a função citoplasmática de SOD-1 esteja relacionada com a dismutação do superóxido, o aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promovem a associação de SOD-1 com a quinase Dun1/Cds1, resultando em sua fosforilação em S60 e S99 e subsequente translocação para o núcleo, onde SOD-1 atua como promotor da expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo (Tsang et al. 2014). Além disso, a expressão de GPx no fígado das duas espécies apresentou maiores valores em P2 quando comparado ao trecho referência. GPx é responsável pela neutralização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da redução de

uma molécula de glutationa (Pulido & Parrish, 2003; Eroglu et al., 2015). Catalase apresentou maiores valores em P2 quando comparado a P1 e P3 para *O. argenteus*, e não mostrou diferenças significativas para *H. intermedius* entre os trechos amostrais. Estudos reportaram que há um aumento nos níveis de expressão de catalase em animais expostos a íons metálicos (Li et al., 2003; Atli et al., 2006; Turan et al., 2020).

No presente estudo CYP1A apresentou maior expressão no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* nos trechos impactos em relação ao trecho referência. Estudo recente relatou a interação de íons metálicos com o ligante AhR da região promotora da enzima CYP1A (Kou et al., 2024). O ciclo de biotransformação de xenobióticos por CYP1A é responsável pela geração de diversos metabólitos que podem apresentar comportamento citotóxico, dentre eles ERO's (Zangar et al., 2004; Bae et al., 2011; Veith & Moorthy, 2018). Sendo assim, mesmo que a regulação positiva de CYP1A possa estar sendo promovida por outros xenobióticos, os altos níveis de CYP1A observados em P2 em ambas espécies podem estar atuando como promotores do estresse oxidativo causado pela exposição crônica aos metais. Outros estudos que avaliaram a exposição de peixes em corpos d'água contaminados por metais pesados também observaram o aumento na expressão de CYP1A (Savassi et al., 2020; Weber et al., 2020).

As consequências do estresse oxidativo no fígado das espécies analisadas podem ser observadas através dos níveis de expressão de CASP-3 e HMGB-1, que foram significativamente maiores em P2 para *O. argenteus* e *H. intermedius*. Estudos demonstram que ERO's podem induzir apoptose através da via intrínseca, devido a peroxidação da membrana mitocondrial e subsequente liberação do citocromo c para o citoplasma (Gottlieb et al., 2000; Kroemer & Reed, 2000; Liu et al., 2020). Outros fatores, como interações entre metais pesados e material genético, também estão relacionadas com alterações nos níveis de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (Yedjou et al., 2012; Luzio, 2013). O aumento de ERO'S induz necrose através de alterações em diversos processos metabólicos, como a peroxidação de membranas lipídicas, o que pode comprometer componentes celulares típicos da necrose (Jagadeesan & Pillai, 2007; Dixon et al., 2012; Berghe et al., 2014). O estresse oxidativo também pode alterar um perfil de apoptose para um perfil de necrose através inativação de CASP's ou pela redução dos níveis de ATP intracelulares pelo comprometimento mitocondrial (Leist et al., 1999; Samali et al., 1999).

## 7. CONCLUSÕES

- Após sete anos do rompimento da barragem de Fundão, trechos impactados no Rio Doce apresentam níveis mais elevados de As, Fe e Mn no sedimento e Fe e Mn na água quando comparados ao trecho referência;
- A exposição crônica a metais pode causar estresse oxidativo e celular nos hepatócitos no fígado de peixes, podendo desencadear histopatologias variadas e acionar programas de morte celular;
- Efeitos patológicos moderados a grave e danos teciduais irreparáveis foram detectados, respectivamente, no fígado de *O. argenteus* e *H. intermedius* nos trechos impactados pelo rejeito;
- Devido a suas características comportamentais, *H. intermedius* foi mais susceptível aos efeitos adversos da bioacumulação e biomagnificação de metais pesados em relação a *O. argenteus*.
- Os efeitos morfofisiológicos detectados no fígado das duas espécies diminuem entre os pontos impactados no contínuo do Rio Doce.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, M. K., Habibullah-Al-Mamun, M., Parvin, E., Akter, M. S., & Khan, M. S. (2013). Arsenic induced toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of freshwater fish, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(6), 903-909.
- Akbary, P., & Jahanbakhshi, A. (2019). Nano and macro iron oxide (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) as feed additives: effects on growth, biochemical, activity of hepatic enzymes, liver histopathology and appetite-related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 510, 191-197.
- Ali, Z., Yousafzai, A. M., Sher, N., Muhammad, I., Nayab, G. E., Aqeel, S. A. M., ... & Khan, H. (2021). Toxicity and bioaccumulation of manganese and chromium in different organs of common carp (*Cyprinus carpio*) fish. *Toxicology Reports*, 8, 343-348.
- Amaral, A. F., Alvarado, N., Marigomez, I., Cunha, R., Hylland, K., & Soto, M. (2002). Autometallography and metallothionein immunohistochemistry in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) after exposure to cadmium and depuration treatment. *biomarkers*, 7(6), 491-500.
- ANA - Agência Nacional de Águas (2023) Relatório de segurança de Barragens 2022. Ministério do Meio Ambiente.
- Andersson, U., Erlandsson-Harris, H., Yang, H., & Tracey, K. J. (2002). HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *Journal of leukocyte biology*, 72(6), 1084-1091.
- AnvariFar, H., Amirkolaie, A. K., Jalali, A. M., Miandare, H. K., Sayed, A. H., Üçüncü, S. İ., ... & Romano, N. (2018). Environmental pollution and toxic substances: Cellular apoptosis as a key parameter in a sensible model like fish. *Aquatic toxicology*, 204, 144- 159.
- Arantes, F. P., Savassi, L. A., Santos, H. B., Gomes, M. V., & Bazzoli, N. (2016). Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88, 137-147.
- Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S., & Canli, M. (2006). Response of catalase activity to Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(2), 218-224.
- Authman, M. M., Zaki, M. S., Khallaf, E. A., & Abbas, H. H. (2015). Use of fish as bioindicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6(4), 1-13.
- Bae, Y. S., Oh, H., Rhee, S. G., & Do Yoo, Y. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and cells*, 32(6), 491-509.
- Barros, L. C., Santos, U., Cioffi, M. D. B., & Dergam, J. A. (2015). Evolutionary divergence among *Oligosarcus* spp. (Ostariophysi, Characidae) from the Sao Francisco and Doce River Basins: *Oligosarcus solitarius* Menezes, 1987 shows the highest rates of chromosomal evolution in the Neotropical Region.
- Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2), 135-147.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*, 22(1), 25-34.

- Bhattacharya, A., & Bhattacharya, S. (2007). Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(2), 178-187.
- Braunbeck, T., Hinton, D. E., & Streit, B. (Eds.). (1998). *Fish ecotoxicology* (Vol. 86). Springer Science & Business Media.
- Carmo, F. F., Kamino, L. H. Y., Junior, R. T., de Campos, I. C., do Carmo, F. F., Silvino, G., ... & Pinto, C. E. F. (2017). Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. *Perspectives in ecology and conservation*, 15(3), 145-151.
- Chandel, N. S. (2015). Evolution of mitochondria as signaling organelles. *Cell metabolism*, 22(2), 204-206.
- Chen, G. H., Song, C. C., Pantopoulos, K., Wei, X. L., Zheng, H., & Luo, Z. (2022). Mitochondrial oxidative stress mediated Fe-induced ferroptosis via the NRF2-ARE pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 180, 95-107.
- Christofferson, D. E., & Yuan, J. (2010). Cyclophilin A release as a biomarker of necrotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 17(12), 1942-1943.
- Cockell, K. A., Hilton, J. W., & Bettger, W. J. (1991). Chronic toxicity of dietary disodium arsenate heptahydrate to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 21(4), 518-527.
- Coimbra, T. M. G. (2008). Análise da expressão da metalotioneína em duas espécies de peixes, *Oreochromis niloticus* e *Prochilodus lineatus*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Coimbra, R. D. S. C., Santos, C. R. S., Saraiva, V. B., & Oliveira, M. M. (2013). Biomarcadores como ferramentas na avaliação da qualidade do pescado contaminado com metais traço. *Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego*, 7, 153- 172.
- CONAMA - Brasil, 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Diário Oficial da União.
- CONAMA - Brasil, 2012. Resolução nº 454, de 1º de novembro de 2012. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Diário Oficial da União, 08 nov. 2012.
- Costa, D. P. C., Monteiro, C. M., & Brasil-Sato, M. C. (2015). Digenea of *Hoplías intermedius* and *Hoplías malabaricus* (Actinopterygii, Erythrinidae) from upper São Francisco River, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24, 129-135.
- Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., & Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59, 627-647.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., ... & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060-1072.
- Dumitriu, I. E., Baruah, P., Manfredi, A. A., Bianchi, M. E., & Rovere-Querini, P. (2005). HMGB1: guiding immunity from within. *Trends in immunology*, 26(7), 381-387.
- Eroglu, A., Dogan, Z., Kanak, E. G., Atli, G. Ü. L. İ., & Canli, M. U. S. T. A. F. A. (2015). Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 3229-3237.

- Esteves, F., Rueff, J., & Kranendonk, M. (2021). The central role of cytochrome P450 in xenobiotic metabolism—a brief review on a fascinating enzyme family. *Journal of xenobiotics*, 11(3), 94-114.
- Fergusson, J. E. (1990). *The heavy elements: Chemistry, environmental impact and health effects*. Pergamon Press, Oxford (UK).
- Fernandes, G. W., Goulart, F. F., Ranieri, B. D., Coelho, M. S., Dales, K., Boesche, N., ... & Soares-Filho, B. (2016). Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza & Conservação*, 14(2), 35-45.
- Festjens, N., Berghe, T. V., & Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(9-10), 1371-1387.
- Foret, M. K., Lincoln, R., Do Carmo, S., Cuello, A. C., & Cosa, G. (2020). Connecting the “dots”: from free radical lipid autoxidation to cell pathology and disease. *Chemical Reviews*, 120(23), 12757-12787.
- Fujii, J., Homma, T., & Osaki, T. (2022). Superoxide radicals in the execution of cell death. *Antioxidants*, 11(3), 501.
- Gabriel, F. Â., Hauser-Davis, R. A., Soares, L., Mazzuco, A. C. A., Rocha, R. C. C., Saint Pierre, T. D., ... & Bernardino, A. F. (2020). Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. *PeerJ*, 8, e10266.
- Gallego, S., Benavides, M., & Tomaro, M. (2002). Involvement of an antioxidant defence system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation*, 36, 267-273.
- Gao, X. Q., Fei, F., Huo, H. H., Huang, B., Meng, X. S., Zhang, T., & Liu, B. L. (2020). Effect of acute exposure to nitrite on physiological parameters, oxidative stress, and apoptosis in *Takifugu rubripes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188, 109878.
- Garai, P., Banerjee, P., Mondal, P., & Saha, N. C. (2021). Effect of heavy metals on fishes: Toxicity and bioaccumulation. *J Clin Toxicol.* S, 18.
- García-Gutiérrez, M. S., Navarrete, F., Sala, F., Gasparyan, A., Austrich-Olivares, A., & Manzanares, J. (2020). Biomarkers in psychiatry: concept, definition, types and relevance to the clinical reality. *Frontiers in psychiatry*, 11, 527209.
- Gobi, N., Vaseeharan, B., Rekha, R., Vijayakumar, S., & Faggio, C. (2018). Bioaccumulation, cytotoxicity and oxidative stress of the acute exposure selenium in *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 162, 147-159.
- González Sagrario, M. A., Rodríguez Golpe, D., La Sala, L., Sanchez Vuichard, G., Minotti, P., & Panarello, H. O. (2018). Lake size, macrophytes, and omnivory contribute to food web linkage in temperate shallow eutrophic lakes. *Hydrobiologia*, 818, 87-103.
- Gottlieb, E., Vander Heiden, M. G., & Thompson, C. B. (2000). Bcl-xL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 20(15), 5680-5689
- Guimarães, R. N., Moreira, V. R., Cruz, J. R., Saliba, A. P., & Amaral, M. C. (2022). History of tailings dam failure: Impacts on access to safe water and influence on the legislative framework. *Science of The Total Environment*, 852, 158536.

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Hatje, V., Pedreira, R. M., de Rezende, C. E., Schettini, C. A. F., de Souza, G. C., Marin, D. C., & Hackspacher, P. C. (2017). The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Scientific reports*, 7(1), 10706.
- Hinton, D. E., Segner, H., Au, D. W., Kullman, S. W., & Hardman, R. C. (2008). Liver toxicity. In *The toxicology of fishes* (pp. 327-400). CRC press.
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., & Carnevali, O. (2020). Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(2), 198-217.
- Ibama, (2015). Brazilian Institute of Environment: Preliminary Technical Report: Environmental Impacts from the Disruption of the Fundão Dam, in Mariana, Minas Gerais. [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo\\_tecnico\\_preliminar\\_Ibama.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_Ibama.pdf). (Accessed 11 July 2022).
- Isangedighi, I. A., & David, G. S. (2019). Heavy metals contamination in fish: effects on human health. *Journal of Aquatic Science and Marine Biology*, 2(4), 7-12.
- Jagadeesan, G., & Pillai, S. S. (2007). Hepatoprotective effects of taurine against mercury induced toxicity in rat. *Journal of Environmental Biology*, 28(4), 753.
- Jan, A. T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., & Haq, Q. M. R. (2015). Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *International journal of molecular sciences*, 16(12), 29592-29630.
- Jarić, I., Višnjić-Jeftić, Ž., Cvijanović, G., Gačić, Z., Jovanović, L., Skorić, S., & Lenhardt, M. (2011). Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal*, 98(1), 77-81.
- Jia, R., Du, J., Cao, L., Feng, W., He, Q., Xu, P., & Yin, G. (2020). Chronic exposure of hydrogen peroxide alters redox state, apoptosis and endoplasmic reticulum stress in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 229, 105657.
- Kaminsky, L. (2006). The role of trace metals in cytochrome P4501 regulation. *Drug metabolism reviews*, 38(1-2), 227-234.
- Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A., & Arya, S. K. (2018). Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 192-199.
- Kim, J. H., & Kang, J. C. (2015). The arsenic accumulation and its effect on oxidative stress responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to waterborne arsenic (As<sup>3+</sup>). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 668-676.
- Klingelfus, T., Lirola, J. R., Silva, L. O., Disner, G. R., Vicentini, M., Nadaline, M. J. B., ... & Cestari, M. M. (2017). Acute and long-term effects of trophic exposure to silver nanospheres in the central nervous system of a neotropical fish *Hoplias intermedius*. *Neurotoxicology*, 63, 146-154.
- Kou, Z., Tran, F., & Dai, W. (2024). Heavy metals, oxidative stress, and the role of AhR signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 482, 116769.
- Kroemer, G., & Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature medicine*, 6(5), 513-519.
- Kumar, N., Thorat, S. T., & Reddy, K. S. (2023). Multi biomarker approach to assess manganese and manganese nanoparticles toxicity in *Pangasianodon hypophthalmus*. *Scientific Reports*, 13(1), 8505.

- Kumari, B., Kumar, V., Sinha, A. K., Ahsan, J., Ghosh, A. K., Wang, H., & DeBoeck, G. (2017). Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. *Environmental chemistry letters*, 15, 43-64.
- Kütter, V. T., Martins, G. S., Brandini, N., Cordeiro, R. C., Almeida, J. P. A., & Marques, E. D. (2023). Impacts of a tailings dam failure on water quality in the Doce river: The largest environmental disaster in Brazil. *Journal of Trace Elements and Minerals*, 5, 100084.
- Leist, M., Single, B., Naumann, H., Fava, E., Simon, B., Kühnle, S., & Nicotera, P. (1999). Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Experimental cell research*, 249(2), 396-403.
- Lewis, N. A., Williams, T. D., & Chipman, J. K. (2006). Functional analysis of a metal response element in the regulatory region of flounder cytochrome P450 1A and implications for environmental monitoring of pollutants. *Toxicological Sciences*, 92(2), 387-393.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., & Liu, J. (2003). Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon*, 42(1), 85-89.
- Linde, A. R., Sanchez-Galan, S., Valles-Mota, P., & Garcia-Vazquez, E. (2001). Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout. *Ecotoxicology and environmental safety*, 49(1), 60-63.
- Liu, H., Guo, H., Jian, Z., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., ... & Zhao, L. (2020). Copper induces oxidative stress and apoptosis in the mouse liver. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Liu, J., Cao, L., & Dou, S. (2019). Trophic transfer, biomagnification and risk assessments of four common heavy metals in the food web of Laizhou Bay, the Bohai Sea. *Science of the total environment*, 670, 508-522.
- Liu, Y., Chen, Q., Li, Y., Bi, L., Jin, L., & Peng, R. (2022). Toxic effects of cadmium on fish. *Toxics*, 10(10), 622.
- Luo, S., Liu, C., Gao, X., Wang, J., Zhang, Y., Ding, J., ... & Zhang, C. (2023). Environmental hypoxia induces apoptosis in large yellow croaker *Larimichthys crocea* via both intrinsic and extrinsic pathways. *Journal of Oceanology and Limnology*, 41(6), 2429-2443.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30.
- Luzio, A., Monteiro, S. M., Fontainhas-Fernandes, A. A., Pinto-Carnide, O., Matos, M., & Coimbra, A. M. (2013). Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. *Aquatic toxicology*, 128, 183-189.
- Lyu, Z., Chai, J., Xu, Z., Qin, Y., & Cao, J. (2019). A comprehensive review on reasons for tailings dam failures based on case history. *Advances in Civil Engineering*, 2019, 1-18.
- Macêdo, A. K. S., Dos Santos, K. P. E., Brighenti, L. S., Windmüller, C. C., Barbosa, F. A. R., de Azambuja Ribeiro, R. I. M., ... & Thomé, R. G. (2020). Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. *Science of the Total Environment*, 735, 139505.
- Mackintosh, T. J., Davis, J. A., & Thompson, R. M. (2016). Tracing metals through urban wetland food webs. *Ecological engineering*, 94, 200-213.
- Malik, D. S., & Maurya, P. K. (2014). Heavy metal concentration in water, sediment, and tissues of fish species (*Heteropneustis fossilis* and *Puntius ticto*) from Kali River, India. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 96(8), 1195-1206.

- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *The FEBS journal*, 275(15), 3959-3970.
- Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and fisheries*, 15, 75-88.
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78.
- Matt, S. L. P. D., Gomes, M. D. L. M., & Andrade, D. R. D. (2009). Reproductive biology of *Oligosarcus argenteus* (Gunther, 1864) adult males and description of the gonadal maturation stages. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 119-126.
- Mehta, K. (2018). Oxidative stress in iron toxicity of the liver. In *The Liver* (pp. 43-54). Academic Press.
- Meira, R. M., Peixoto, A. L., Coelho, M. A., Ponzio, A. P., Esteves, V. G., Silva, M. C., ... & Meira-Neto, J. A. (2016). Brazil's mining code under attack: giant mining companies impose unprecedented risk to biodiversity. *Biodiversity and Conservation*, 25(2), 407-409.
- Musharraf, M., & Khan, M. A. (2021). Dietary manganese requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton) estimated by growth, tissue manganese concentration and hepatic manganese-superoxide dismutase activity. *Aquaculture*, 540, 736734.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Oliveira Gomes, L. E., Correa, L. B., Sá, F., Neto, R. R., & Bernardino, A. F. (2017). The impacts of the Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, Eastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 120(1-2), 28-36.
- Omar, W. A., Saleh, Y. S., & Marie, M. A. S. (2014). Integrating multiple fish biomarkers and risk assessment as indicators of metal pollution along the Red Sea coast of Hodeida, Yemen Republic. *Ecotoxicology and environmental safety*, 110, 221-231.
- Poleksić, V., & Mitrović-Tutundžić, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*, 339-352.
- Pulido, M. D., & Parrish, A. R. (2003). Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 227-241.
- Quadra, G. R., Roland, F., Barros, N., Malm, O., Lino, A. S., Azevedo, G. M., ... & Campos, J. M. S. (2019). Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. *Chemosphere*, 215, 753-757.
- Queiroz, H. M., Nóbrega, G. N., Ferreira, T. O., Almeida, L. S., Romero, T. B., Santaella, S. T., ... & Otero, X. L. (2018). The Samarco mine tailing disaster: a possible time-bomb for heavy metals contamination?. *Science of the Total Environment*, 637, 498-506.
- Ramirez, J. L., Carvalho-Costa, L. F., Venere, P. C., Carvalho, D. C., Troy, W. P., & Galetti Jr, P. M. (2016). Testing monophyly of the freshwater fish *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) through molecular analysis. *Journal of Fish Biology*, 88(3), 1204-1214.

- Raucci, A., Palumbo, R., & Bianchi, M. E. (2007). HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity*, 40(4), 285-289.
- Recknagel, R. O., Glende, E. A., & Britton, R. S. (2020). Free radical damage and lipid peroxidation. In *Hepatotoxicology* (pp. 401-436). CRC press.
- Rico, M., Benito, G., Salgueiro, A. R., Díez-Herrero, A., & Pereira, H. G. (2008). Reported tailings dam failures: a review of the European incidents in the worldwide context. *Journal of hazardous materials*, 152(2), 846-852.
- Rossmann, T. G. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 37-65.
- Saidon, N. B., Szabó, R., Budai, P., & Lehel, J. (2024). Trophic transfer and biomagnification potential of environmental contaminants (heavy metals) in aquatic ecosystems. *Environmental pollution*, 340, 122815.
- Samali, A., Nordgren, H., Zhivotovsky, B., Peterson, E., & Orrenius, S. (1999). A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 255(1), 6-11.
- Santolin, C. V., Ciminelli, V. S., Nascentes, C. C., & Windmöller, C. C. (2015). Distribution and environmental impact evaluation of metals in sediments from the Doce River Basin, Brazil. *Environmental Earth Sciences*, 74, 1235-1248.
- Sarkar, S., Mukherjee, S., Chattopadhyay, A., & Bhattacharya, S. (2017). Differential modulation of cellular antioxidant status in zebrafish liver and kidney exposed to low dose arsenic trioxide. *Ecotoxicology and environmental safety*, 135, 173-182.
- Sarmento-Soares, L. M., Martins-Pinheiro, R. F., & Casagrande, M. D. (2022). Endemicity Analysis of the Ichthyofauna of the Rio Doce Basin, Southeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94.
- Savassi, L. A., Paschoalini, A. L., Arantes, F. P., Rizzo, E., & Bazzoli, N. (2020). Heavy metal contamination in a highly consumed Brazilian fish: immunohistochemical and histopathological assessments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(8), 1-14.
- Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894), 191-195.
- Segura, F. R., Nunes, E. A., Paniz, F. P., Paulelli, A. C. C., Rodrigues, G. B., Braga, G. Ú. L., ... & Batista, B. L. (2016). Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, 218, 813-825.
- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., & Svobodova, Z. (2011). Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Vet Med*, 56(11), 537-546.
- Sheikhzadeh, H., & Hamidian, A. H. (2021). Bioaccumulation of heavy metals in fish species of Iran: a review. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(10), 3749- 3869.
- Sivaperumal, P., Sankar, T. V., & Nair, P. V. (2007). Heavy metal concentrations in fish, shellfish and fish products from internal markets of India vis-a-vis international standards. *Food chemistry*, 102(3), 612-620.
- Souza, I. D. C., Morozesk, M., Bonomo, M. M., Azevedo, V. C., Sakuragui, M. M., Elliott, M., ... & Fernandes, M. N. (2018). Differential biochemical responses to metal/metalloid accumulation in organs of an edible fish (*Centropomus parallelus*) from Neotropical estuaries. *Ecotoxicology and environmental safety*, 161, 260-269.

- Sumudumali, R. G. I., & Jayawardana, J. M. C. K. (2021). A review of biological monitoring of aquatic ecosystems approaches: with special reference to macroinvertebrates and pesticide pollution. *Environmental Management*, 67(2), 263-276.
- Sun, J. L., Zhao, L. L., Liao, L., Tang, X. H., Cui, C., Liu, Q., ... & Yang, S. (2020). Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis. *Fish & shellfish immunology*, 98, 923-936.
- Syntichaki, P., & Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis. *EMBO reports*, 3(7), 604-609.
- Takahashi, Y., Ogra, Y., & Suzuki, K. T. (2005). Nuclear trafficking of metallothionein requires oxidation of a cytosolic partner. *Journal of cellular physiology*, 202(2), 563-569.
- Thompson, F., de Oliveira, B. C., Cordeiro, M. C., Masi, B. P., Rangel, T. P., Paz, P., ... & de Rezende, C. E. (2020). Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. *Science of the Total Environment*, 705, 135914.
- Triebkorn, R., Adam, S., Casper, H., Honnen, W., Pawert, M., Schramm, M., ... & Köhler, H. R. (2002). Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology*, 11, 451-465.
- Tsang, C. K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., & Zheng, X. S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature communications*, 5(1), 3446.
- Turan, F., Eken, M., Ozyilmaz, G., Karan, S., & Uluca, H. (2020). Heavy metal bioaccumulation, oxidative stress and genotoxicity in African catfish *Clarias gariepinus* from Orontes river. *Ecotoxicology*, 29, 1522-1537.
- Veith, A., & Moorthy, B. (2018). Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Current opinion in toxicology*, 7, 44-51.
- Vicari, T., Dagostim, A. C., Klingelfus, T., Galvan, G. L., Monteiro, P. S., da Silva Pereira, L., ... & Cestari, M. M. (2018). Co-exposure to titanium dioxide nanoparticles (NpTiO<sub>2</sub>) and lead at environmentally relevant concentrations in the Neotropical fish species *Hoplias intermedius*. *Toxicology reports*, 5, 1032-1043.
- Vieira, M. C., Torronteras, R., Córdoba, F., & Canalejo, A. (2012). Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicology and environmental safety*, 78, 212-217.
- Villalpando-Rodriguez, G. E., & Gibson, S. B. (2021). Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.
- Wang, W. C., Mao, H., Ma, D. D., & Yang, W. X. (2014). Characteristics, functions, and applications of metallothionein in aquatic vertebrates. *Frontiers in Marine Science*, 1, 34.
- Wang, X., Liu, B. L., Gao, X. Q., Fang, Y. Y., Zhang, X. H., Cao, S. Q., ... & Wang, F. (2022). Effect of long-term manganese exposure on oxidative stress, liver damage and apoptosis in grouper *Epinephelus moara*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂. *Frontiers in Marine Science*, 9, 1000282.
- Weber, A. A., Sales, C. F., de Souza Faria, F., Melo, R. M. C., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2020). Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly

- impacted neotropical river: a case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and environmental safety*, 190, 110165.
- Wieloch, M., Kamiński, P., Ossowska, A., Koim-Puchowska, B., Stuczyński, T., Kuligowska-Prusińska, M., ... & Odrowąż-Sypniewska, G. (2012). Do toxic heavy metals affect antioxidant defense mechanisms in humans?. *Ecotoxicology and environmental safety*, 78, 195-205.
- Yamamoto, F. Y., Pauly, G. F. E., Nascimento, L. S., Fernandes, G. M., Santos, M. P., Figueira, R. C. L., ... & Abessa, D. M. S. (2023). Explaining the persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sources of contamination and a major environmental disaster. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 9, 100250.
- Yamashita, M., Mizusawa, N., Hojo, M., & Yabu, T. (2008). Extensive apoptosis and abnormal morphogenesis in pro-caspase-3 transgenic zebrafish during development. *Journal of Experimental Biology*, 211(12), 1874-1881.
- Yang, R., Feng, M., Liu, Z., & Liu, G. (2023). Trophic transfer and biomagnification of four heavy metals in freshwater food web: a case study of Zhangze Lake. *Chemistry and Ecology*, 39(9), 909-926.
- Yedjou, C. G., Tchounwou, P. B., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, clinical and environmental toxicology*, 133-164.
- Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and applied pharmacology*, 199(3), 316-331.
- Ziller, A., & Fraissinet-Tachet, L. (2018). Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. *Metallomics*, 10(11), 1549-1559.