

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Thaís Victória Pires De Almeida

**TOXICIDADE DE SEDIMENTOS CONTAMINADOS POR REJEITOS DA
MINERAÇÃO NO RIO DOCE EM EMBRIÕES DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Belo Horizonte

2022

Thaís Victória Pires De Almeida

**TOXICIDADE DE SEDIMENTOS CONTAMINADOS POR REJEITOS DA
MINERAÇÃO NO RIO DOCE EM EMBRIÕES DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

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

Orientadora: Dr. Elizete Rizzo

Belo Horizonte
2022

043

Almeida, Thaís Victória Pires de.

Toxicidade de sedimentos contaminados por rejeitos da mineração no Rio Doce em embriões do Zebrafish (*Danio rerio*) [manuscrito] / Thaís Victória Pires de Almeida. – 2022.

62 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dr. Elizete Rizzo.

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

1. Biologia Celular. 2. Barragens. 3. Metais Pesados. 4. Proteínas de Choque Térmico HSP70. 5. Caspase 3. 6. Acetilcolinesterase. 7. Metalotioneína. I. Bazzoli, Elizete Rizzo. 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 DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE THAIS VICTORIA PIRES DE ALMEIDA

Às nove horas do dia **22 de dezembro de 2022**, 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: "**TOXICIDADE DE SEDIMENTOS CONTAMINADOS POR REJEITOS DA MINEIRAÇÃO NO RIO DOCE EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH (DANIO RERIO)**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Elizete Rizzo Bazzoli**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Elizete Rizzo Bazzoli	UFMG	APROVADA
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	APROVADA
Dr. Rafael Magno Costa Melo	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 22 de dezembro de 2022.**

Dr^a. Elizete Rizzo Bazzoli (Orientadora)

Dr^a. Erika Cristina Jorge

Dr. Rafael Magno Costa Melo

https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2138388&infra_sistema... 1/2 28/12/2022 11:58 SEI/UFMG - 1986994 - Ata

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Elizete Rizzo Bazzoli, Professora do Magistério Superior**, em 22/12/2022, às 16:54, 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 **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 22/12/2022, às 17:36, 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 **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 23/12/2022, às 10:20, 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 28/12/2022, às 11:25, 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, informando o código verificador **1986994** e o código CRC **08C61CF3**.

Referência: Processo nº 23072.274841/2022-27SEI

nº

1986994

https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2138388&infra_sistema... 2/2

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a orientação da Profa. Dra. Elizete Rizzo.

APOIO FINANCEIRO E INSTITUCIONAL:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Fundação Renova

Esse trabalho é dedicado as 19 pessoas que perderam suas vidas no rompimento da barragem de Fundão, a todas famílias atingidas e a todos organismos afetados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades concedidas e pela coragem e paciência para superar obstáculos.

A Professora Elizete, pela confiança e orientação durante esse período.

A minha família, em especial minha irmã Jade e minha mãe Nádia que sacrificou toda sua vida para nós dar suporte.

Aos meus amigos, que me acompanharam até aqui, em especial a Isabela Meneghelli me auxiliou durante o mestrado.

Ao Professor Rafael e a todos os colegas do laboratório de Ictiohistologia, em especial a Camila Salles, Thaís Sobjak, Yves e Davidson que me auxiliaram tecnicamente.

Aos colegas da Biologia Celular

Aos professores, coordenadores, técnicos e funcionário do departamento de Morfologia.

A todos que de alguma forma direta ou indireta fizeram parte e contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, meus sinceros agradecimentos

Resumo

Apesar de sua importância econômica, a mineração é responsável por diversos problemas socioambientais, sendo considerada uma das principais atividades antrópicas que contribuem para a poluição com metais de bacias hidrográficas. Os metais pesados oriundos de rejeitos minerários possuem grande potencial de bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar sendo responsáveis por causar efeitos citotóxicos e genotóxicos nos organismos. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da exposição aguda a sedimentos do Rio Doce contaminados por rejeitos minerários da barragem do Fundão. Para isso, foram realizados ensaios de contato com embriões de *Danio rerio* durante 96 h de exposição. Foram utilizados sedimentos de 3 pontos contaminados do rio Doce e um ponto do rio Piranga, não contaminado pelo rejeito (ponto referência). Para controle negativo, um grupo foi exposto ao sedimento inerte, não contaminado, totalizando 5 grupos. Foram avaliadas taxas de mortalidade, malformações e eclosão dos embriões, parâmetros sensoriais, fisiológicos e esqueléticos, metalotioneína (MT), proteína de choque térmico (HSP) 70, acetilcolinesterase (AChE), proliferação e morte celular, e caspase-3. A análise de metais mostrou a presença de As, Cr, Cu, Hg e Ni acima dos limites recomendados pelo CONAMA. Os embriões expostos ao sedimento apresentaram taxa de mortalidade significativamente maior que o controle e taxa de eclosão dos ovos significativamente menor. Alterações esqueléticas, fisiológicas e sensoriais, efeitos neurotóxicos, aumento da atividade da AChE e redução de movimentos espontâneos foram observados principalmente nos pontos mais próximos a barragem. Além disso, a contaminação aumentou significativamente a imunoexpressão de MT, HSP70 e alterou as atividades de proliferação e morte celular. Esses resultados mostram que o sedimento do rio Doce permanece citotóxico mesmo após 6 anos do rompimento da barragem do Fundão, afetando negativamente o desenvolvimento embrionário do zebrafish, e, em consequência, poderá comprometer a estrutura das populações de peixes da bacia do Rio Doce.

Palavras-chave: barragem de Fundão, metais pesados, MT, HSP70, AChE e CASP-3

Abstract

Despite its economic importance, mining is responsible for several socio-environmental problems, being considered one of the main human activities that contribute to metal pollution in watersheds. Heavy metals from mining waste have great potential for bioaccumulation and biomagnification in the food chain, being responsible for causing cytotoxic and genotoxic effects in organisms. The objective of the study was to evaluate the effects of acute exposure to sediments from the Rio Doce contaminated by mining tailings from the Fundão dam. For this, contact tests were carried out with *Danio rerio* embryos during 96 h of exposure. Sediments from 3 contaminated points on the Doce River and one point on the Piranga River, not contaminated by tailings (reference point), were used. For negative control, one group was exposed to inert, uncontaminated sediment, totaling 5 groups. Mortality rates, malformations and hatching of embryos, sensory, physiological and skeletal parameters, metallothionein (MT), heat shock protein (HSP) 70, acetylcholinesterase (AChE), cell proliferation and death, and caspase-3 were evaluated. Metal analysis showed the presence of As, Cr, Cu, Hg and Ni above the limits recommended by CONAMA. Embryos exposed to sediment showed a significantly higher mortality rate than the control and a significantly lower hatching rate. Skeletal, physiological and sensory alterations, neurotoxic effects, increased AChE activity and reduced spontaneous movements were observed mainly at the points closest to the dam. Furthermore, contamination significantly increased MT, HSP70 immunoexpression and altered cell proliferation and death activities. These results show that the Doce river sediment remains cytotoxic even 6 years after the Fundão dam rupture, negatively affecting the embryonic development of zebrafish, and, consequently, could compromise the structure of fish populations in the Doce river basin.

Keywords: Fundão dam, heavy metals, MT, HSP70, AChE and CASP-3

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição das barragens inseridas no Plano Nacional de Segurança de Barragens (PNSB) por estado, segundo a classificação de critério de risco (ANM, 2022).	15
Figura 2. Infográfico Barragem a montante e Rompimento barragem a montante	16
Figura 3. Barragem do Fundão após o rompimento 06/11/2015.....	17
Figura 4. Toxicidade de metais pesados e vias de sinalização	20
Figura 5. Degradação de acetilcolina (ACh) pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE)	21
Figura 6. Vias apoptóticas	23
Figura 7. Exemplar de <i>Danio rerio</i>	24
Figura 8. Fases do desenvolvimento embrionário, a 28 °C.....	25
Figura 9. Mapa mostrando a localização da barragem do Fundão e dos quatro pontos de amostragem na bacia do Rio Doce em Minas Gerais.....	29
Figura 10. Design experimental.....	30
Figura 11. Design experimental de acordo com ‘Fish Embryo Toxicity’	31
Figura 12. Taxa de mortalidade, taxa de eclosão e taxa de malformações em embriões de <i>Danio rerio</i> expostos ao ensaio agudo de contato com sedimento da bacia do Rio Doce.....	37
Figura 13. Larvas recém eclodidas de <i>Danio rerio</i> sem alterações, encontradas principalmente no grupo controle e malformações encontradas nos grupos expostos ao sedimento contaminado do Rio Doce.....	38
Figura 14. Secções histológicas de embriões de <i>Danio rerio</i> com 96 hpf expostos ao controle e ao sedimento do contaminado do Rio Doce.....	40
Figura 15. Expressão proteica de MT, HSP70 e PCNA e Western blot representativo para MT, HSP70, PCNA e Actina (proteína constitutiva) em embriões de <i>Danio rerio</i> expostos ao sedimento da bacia do rio Doce.....	41

Figura 16. Reação imunohistoquímica para HSP70, MT e PCNA de *Danio rerio* expostos ao sedimento da bacia do rio Doce e ao controle..... 42

Figura 17. Atividade enzimática da caspase-3 e da acetilcolinesterase, AChE (B) em embriões de *Danio rerio* expostos ao sedimento da bacia do rio Doce..... 43

Lista de tabelas

Tabela 1. Trechos de amostragem ao longo da bacia do Rio Doce em Minas Gerais 29

Tabela 2. Anticorpos primários e suas respectivas diluições..... 33

Tabela 3. Metais e semimetais encontrados no sedimento de quatro pontos de amostragem na bacia do Rio Doce em setembro de 2021 35

Tabela 4. Dados biométricos e parâmetros fisiológicos das larvas recém eclodidas de *Danio rerio* expostas ao sedimento controle (sílica) e sedimento da bacia do Rio Doce durante 96 h. 39

Abreviaturas e siglas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ACT	Acetiltiocolina
Ag	Prata
Al	Alumínio
As	Arsênio
Ba	Bário
β-ACTINA	Beta actina
BChE	Butirilcolinesterase
BSA	Albumina sérica bovina
CASP-3	Caspase-3
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
CEUA	Comitê de ética e uso de animais
ChE	Colinesterase
COBEA	Colégio brasileiro para experimentação animal
CONAMA	Conselho nacional do meio ambiente
COPASA	Companhia de saneamento de minas gerais
DAB	Diaminobenzidina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Faz	Receptor do fator de necrose tumoral
Fe	Ferro
FET	Fish embryo toxicity
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione peroxidase
HE	Hematoxilina-eosina
Hg	Mercúrio
hpf	Horas após fertilização
HSP	Proteínas de choque térmico
Mn	Manganês
MT	Metalotioneínas
Pb	Chumbo
PBS	Tampão fosfato salina
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PNSB	Política nacional de segurança de barragens
SIGBM	Sistema integrado de gestão de segurança de barragens de mineração
SOD	Superóxido dismutase
Sr	Estrôncio
Ti	Titânio
TNF	Fator de necrose tumoral
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O rompimento da barragem de Fundão em Mariana/MG.....	16
1.2 Toxicidade por metais.....	18
1.3 Biomarcadores da contaminação ambiental.....	20
1.4. Zebrafish como modelo de estudo.....	24
1.5 Desenvolvimento embrionário do <i>Danio rerio</i>	24
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.1 Objetivos específicos.....	27
4. METODOLOGIA.....	28
4.1 Amostragem e processamento do sedimento.....	28
4.2 Ensaio de contato	30
4.3 Histologia.....	32
4.4 Imunohistoquímica.....	32
4.5 Western blotting.....	32
4.6 Análise enzimática da Caspase – 3.....	33
4.7 Análise enzimática da colinesterase.....	33
4.8 Análises estatísticas.....	33
5. RESULTADOS.....	35
5.1 Análise de metais no sedimento do Rio Doce.....	35
5.2 Análises biométricas e morfológicas.....	36
5.3 Expressão proteica de MT, HSP70 e PCNA.....	40
5.4 Atividade enzimática da Caspase-3.....	43
5.5 Acetilcolinesterase.....	43
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÕES.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

A mineração é uma das atividades mais antigas da civilização, indispensável para o desenvolvimento industrial e socioeconômico ao longo da história (ANM, 2022). O setor mineral tem grande importância econômica no Brasil, e em 2021 registrou arrecadação de 339,1 bilhões de reais, correspondente a 2% do PIB nacional, sendo o minério de ferro responsável por 73,7% desse faturamento (IBRAM, 2022). Entretanto, a atividade mineradora é responsável por diversos problemas provocados no meio ambiente, sendo historicamente considerada uma das principais atividades antrópicas que contribuem para a poluição de metais em bacias hidrográficas (Queiroz *et al.*, 2018).

A principal causa da poluição é o processo de beneficiamento do minério que produz uma enorme quantidade de resíduos estocados em barragens de rejeitos. Todas as técnicas de descarte e gerenciamento de resíduos da exploração mineral implicam em graus variáveis de riscos ambientais, incluindo a utilização de barragens (Roche *et al.*, 2017). No Brasil existem 922 barragens de rejeitos de minérios registradas no Sistema Integrado de Gestão de Segurança de Barragens de Mineração (SIGBM), sendo que a maior concentração ocorre no estado de Minas Gerais, que possui 353 barragens (ANA, 2022). Das 922 barragens registradas no SIGBM, 459 são cadastradas na Política Nacional de Segurança de Barragens (PNSB), no qual 53 são classificadas na categoria com alto risco de acidentes, sendo 48% devido ao estado de conservação (ANM, 2022) (**Fig.1**).

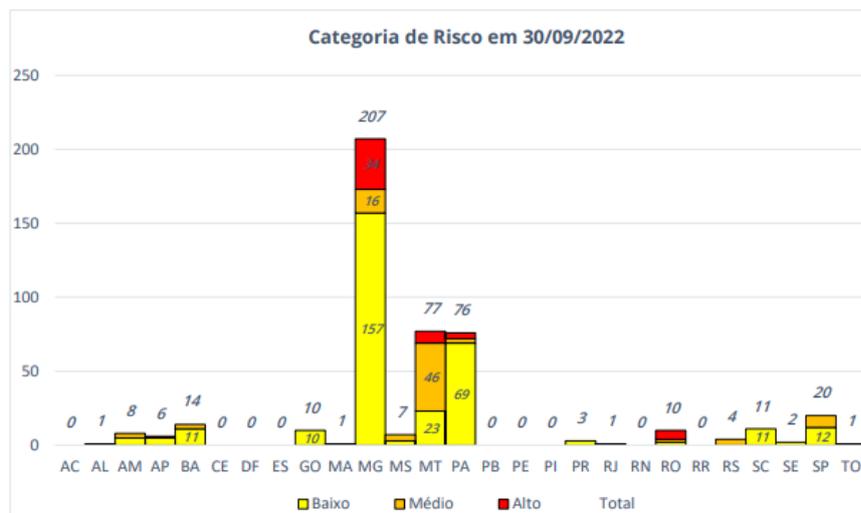


Figura 1. Distribuição das barragens inseridas na Política Nacional de Segurança de Barragens (PNSB) por estado, segundo a classificação de critério de risco (ANM, 2022). Disponível em: <https://www.gov.br/anm/pt-br/assuntos/barragens/boletim-de-barragens-de-mineracao/arquivos/boletim-mensal-setembro-2022.pdf>

Rompimentos de barragens não são eventos frequentes, porém, nos últimos 25 anos, apenas em Minas Gerais, ocorreram 9 rompimentos causados por falhas na barragem de contenção que refletem em processos de degradação ambiental e perdas socioeconômicas (Santos e Wanderley, 2016). Entre o fim de 2015 e o início de 2019, o Brasil registrou os dois maiores desastres do século XXI envolvendo barragens de mineração, o rompimento da barragem de Fundão em Mariana e o rompimento da barragem B1 em Brumadinho, ambas em Minas Gerais. As barragens que se romperam eram classificadas no critério de risco baixo e o modelo tecnológico de construção utilizado foi alteamento a montante (Freitas e Silva, 2019). A técnica de barragem a montante consiste em depositar o rejeito em degraus e após isso, lançar o rejeito na linha de simetria do dique, que servirá de base para o próximo alteamento (Fig. 2). O método de construção de barragens a montante é o mais econômico e antigo, porém é o menos seguro, representando 76% dos incidentes em barragens (Araujo, 2006; Freitas e Silva, 2019).

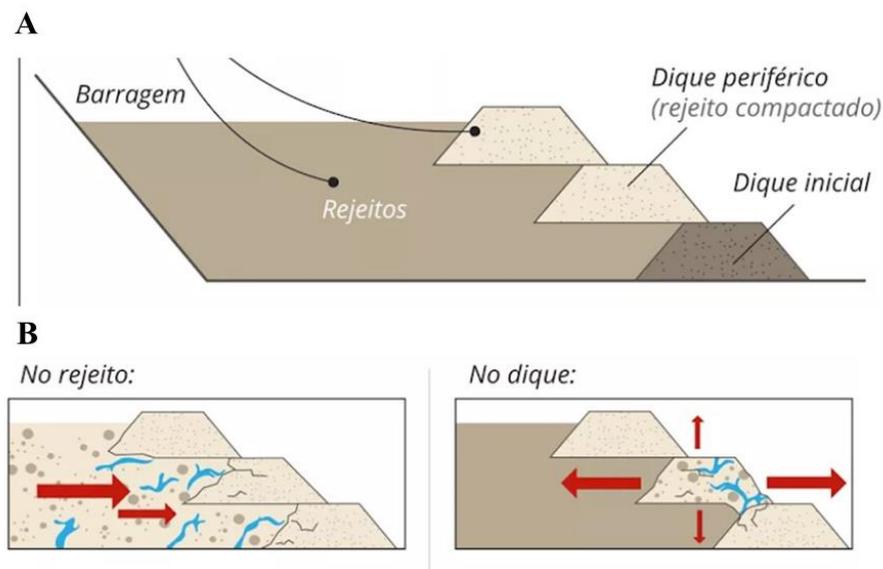


Figura 2. Infográfico (A) Barragem a montante (B) Rompimento barragem a montante (Adaptado de G1, 2015. Disponível em: <https://g1.globo.com/mg/minas-gerais/noticia/2019/02/07/entenda-o-que-e-a-liquefacao-fenomeno-que-pode-levar-barragens-ao-colaso.ghtml>)

1.1 O rompimento da barragem de Fundão em Mariana/MG

O maior desastre ambiental da história do Brasil e do setor de mineração mundial, tanto em volume de rejeitos despejados quanto em magnitude dos danos, ocorreu em 5 de novembro de 2015, no município de Mariana, estado de Minas Gerais (Carmo *et al.*, 2017). A barragem de Fundão, pertencente à mineradora Samarco S.A., rompeu e liberou mais de 50 milhões de metros cúbicos de rejeitos de minério para o meio ambiente (Escobar, 2015; IBAMA, 2015) (Fig.3). O fluxo de lama intenso e repentino foi transportado pelos rios Gualaxo do Norte, rio

do Carmo e rio Doce por mais de 650 km até chegar ao Oceano Atlântico e impactou fortemente o equilíbrio dos ecossistemas atingidos (Gomes *et al.*, 2017, Foesch *et al.*, 2020).



Figura 3. Barragem do Fundão após o rompimento 06/11/2015 - Agencia O Globo - Disponível em: <https://oglobo.globo.com/brasil/mp-de-minas-gerais-ve-falhas-em-licenciamento-da-barragem-de-fundao-18494612>

A bacia do rio Doce é uma importante área socioeconômica e ambiental no Brasil, compreendendo uma área de 86.711 km² distribuídos nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. A bacia é fonte de recursos hídricos para uso público, abastecimento, agricultura, indústria e geração de energia, além de ser uma área de elevada importância econômica, principalmente no que diz respeito à atividade agrícola, mineração e atividades industriais, com a presença do maior complexo siderúrgico da América Latina (CBH-DOCE, 2017; PIRH-DOCE, 2010).

O rompimento da barragem de Fundão causou danos não só à infraestrutura, à economia e à organização social local, mas também causou a morte de 19 pessoas, a realocação de mais de 320 famílias, deixou desalojados, desabrigados, feridos e doentes (Freitas *et al.*, 2019; Neves *et al.* 2016). No meio ambiente, a lama contaminada por rejeitos gerou desequilíbrio no ecossistema, tornou o solo infértil, destruiu 1469 hectares de Mata Atlântica, causou a contaminação de rios da bacia do Rio Doce e a morte de toneladas de peixes e outros animais, incluindo espécies endêmicas e da lista de animais ameaçados de extinção (Gomes *et al.*, 2017). Além das consequências imediatas, o derramamento de rejeitos tem potencial de contaminar o sedimento dos rios e os lençóis freáticos (Fields, 2001, Simón *et al.*, 2001, Garcia *et al.*, 2017).

O lançamento de rejeitos minerários contendo alta carga de metais pesados altera a composição do sedimento, devido ao seu alto potencial para acumular contaminantes (Mahiques *et al.*, 2016). A contaminação por metais é uma preocupação em ecossistemas aquáticos, pois tende a se adsorver a matéria orgânica particulada, solo e partículas de sedimentos (Tjahjono e Suwarno 2018). Uma vez contaminados, os sedimentos podem servir como sumidouros e fontes secundárias para metais pesados, podendo liberar esses contaminantes sob certas condições físicas, químicas e biológicas (Li *et al.*, 2019). Nas áreas mais próximas à barragem de Fundão, 6 meses após o desastre, foi detectado no sedimento alumínio (Al), ferro (Fe), mercúrio (Hg) manganês (Mn), bário (Ba), estrôncio (Sr), chumbo (Pb), arsênio (As) e cádmio (Cd) (Duarte *et al.* 2020), sendo que Cd, As, Fe, Hg e Mn excederam as diretrizes de qualidade de sedimentos do Conselho Nacional do Meio Ambiente resolução 454/2012 (CONAMA) (Duarte *et al.*, 2020, Hatje *et al.*, 2017). Além disso, testes de extração mostraram que Ba, Pb, As, Sr, Fe, Mn e Al têm alto potencial de mobilização do sedimento para água, podendo se tornar ainda mais biodisponíveis (Segura *et al.*, 2016).

Em geral, os metais podem ser classificados biologicamente como essenciais e não essenciais. Os metais não essenciais como Al, Cd, Hg e Pb não têm função biológica comprovada (também chamados de xenobióticos), e sua toxicidade aumenta com o aumento da concentração. Metais essenciais como Cu, Zn, Cr, Ni e Fe, têm um papel biológico conhecido, e a toxicidade ocorre em deficiências metabólicas ou em altas concentrações (Sfakianakis *et al.* 2015).

Muitos organismos pelágicos, epibentônicos e demersais dependem do sedimento como fonte de alimento e substrato para reprodução, entrando em contato direto com esses metais (Burton, 1991). Como os metais não são degradados naturalmente e não são metabolizados pelos seres vivos, eles bioacumulam nos órgãos e tecidos dos organismos aquáticos, causando efeitos citotóxicos e genotóxicos, podendo resultar em diversos danos à saúde, ao crescimento e à reprodução (Savassi *et al.*, 2020). Além disso, os metais são biomagnificados na cadeia alimentar, persistindo no ambiente e permitindo que seus efeitos se deem de forma contínua ou a longo prazo, mesmo após cessadas as emissões.

1.2 Toxicidade por metais

O mecanismo de toxicidade por metais geralmente ocorre por inativação de enzimas, uma vez que alguns metais podem competir ou interagir com elementos celulares essenciais e substituí-los no metabolismo enzimático. Os metais pesados também podem levar ao desequilíbrio na homeostase redox da célula a favor da superprodução de radicais livres,

levando a uma condição de estresse oxidativo que está associada a danos celulares (Paithankar *et al.*, 2020) (**Fig.4**).

A indução do estresse oxidativo na presença dos metais resulta em várias alterações moleculares e ultraestruturais em vários órgãos importantes, sendo o fígado um dos mais afetados. Os radicais livres quando em excesso apresentam efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana e degradação de proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, que levam a diferentes lesões, como danos hepáticos, lesões renais, distúrbios relacionados ao sistema cardiovascular e doenças relacionadas à inflamação (Renu *et al.*, 2021). Seus efeitos nocivos podem ser neutralizados ou inibidos por enzimas do sistema antioxidante, como Glutathione peroxidase (GSH), Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD) e de fatores não enzimáticos como proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), controlando assim os riscos, porém, os efeitos tóxicos induzidos por metais pesados podem, às vezes, interromper esse mecanismo de defesa (Barreiros *et al.*, 2006).

O processo detoxificação ocorre em duas etapas, a primeira através da enzima SOD, que realiza a conversão de ânion superóxido para peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e, logo após, a enzima CAT, realiza a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio. O peróxido de hidrogênio não expressa grande reatividade na ausência de metais, entretanto, quando estes estão presentes (geralmente Cu e o Fe), é metabolizado pela reação redox em radicais hidroxila ($OH\cdot$), as quais podem reagir com diversos componentes das células e causar danos severos (Barreiros *et al.*, 2006).

Os radicais livres produzidos pelos metais alteram o equilíbrio redox no retículo endoplasmático rugoso, causando comprometimento do enovelamento proteico, induzindo a ativação de proteínas chaperonas e interrompendo processo de tradução (Renu *et al.*, 2021). A membrana celular também pode ser atacada pelos radicais livres gerados pelos metais, levando à instabilidade da membrana celular, bem como à sua desintegração devido à peroxidação lipídica, causando à perda da capacidade da membrana plasmática de atuar como uma barreira permeável, além de poder gerar uma descarga de conteúdo citoplasmático que leva a morte celular e a indução de respostas inflamatórias (Renu *et al.*, 2021).

Além disso, as espécies reativas de oxigênio (EROs) também podem causar a inibição de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 e aumento de genes pró-apoptóticos como Bak e Bax que levam a ativação das caspases e conseqüentemente a apoptose, também causam alterações em fatores de transcrição como Nrf2 responsável pelo aumento das defesas antioxidantes e NF- κ B que causa a produção de citocinas que geram respostas inflamatórias (Renu *et al.*, 2021).

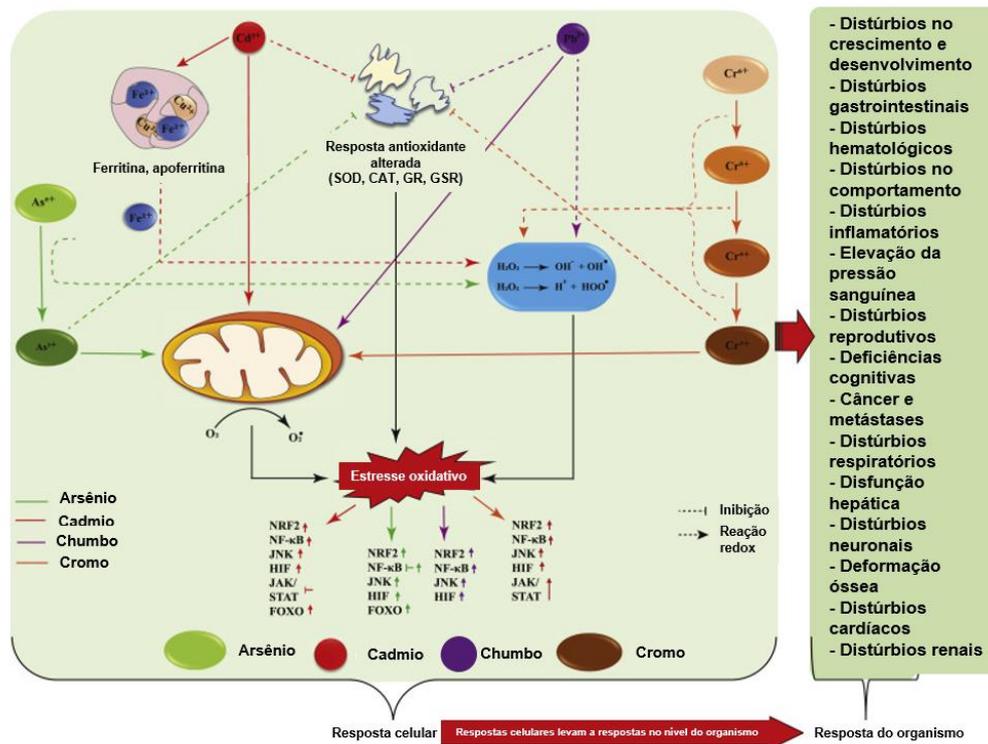


Figura 4. Toxicidade de metais pesados e vias de sinalização (Adaptado de Paithankar *et al.*, 2020).

1.3 Biomarcadores da contaminação ambiental

Estudos de toxicologia ambiental frequentemente utilizam biomarcadores para avaliar a resposta biológica de organismos a exposição a metais pesados e outros xenobióticos. Os biomarcadores são medidas quantitativas de alterações moleculares, em vias metabólicas e componentes celulares, que podem sinalizar os efeitos da exposição dos organismos à compostos tóxicos, podendo apontar impactos ambientais antes que estes atinjam níveis biológicos mais elevados, como populações e ecossistemas (Van der Oost *et al.*, 2003). Os biomarcadores podem ser divididos em três categorias: a) biomarcadores de exposição, que permitem a detecção de uma substância exógena ou o produto da interação do agente xenobiótico dentro do organismo; b) biomarcadores de efeito, que são as alterações fisiológicas nos tecidos ou fluidos corporais que estão associadas ao estado de saúde de um organismo, suas possíveis deficiências ou doenças; c) biomarcadores de suscetibilidade, que refletem a capacidade de um organismo em responder à exposição a uma substância específica, incluindo fatores genéticos e alterações em receptores celulares que alteram a susceptibilidade e a capacidade de resposta do organismo (Nordberg, 2010).

A associação de vários tipos de biomarcadores é indicada para uma eficaz avaliação da degradação ambiental, visto que o estresse por determinados contaminantes desencadeia uma

cascata de respostas que envolve diferentes vias metabólicas (McCarthy *et al.*, 1991; Triebkorn *et al.*, 2001; Galloway *et al.*, 2004). Os biomarcadores moleculares, bioquímicos e celulares são sensíveis aos poluentes ambientais e fornecem respostas precoces sobre os efeitos adversos que poderão afetar a longo prazo as populações, as comunidades e todo o ecossistema (Triebkorn *et al.*, 2003). Entre os biomarcadores de exposição, uma das respostas de biomarcadores mais investigadas em zebrafish expostos a sedimentos está relacionada ao metabolismo de xenobióticos determinado pela expressão de genes que codificam proteínas ou enzimas bem estabelecidas na detoxificação de compostos exógenos (Saiki *et al.*, 2021).

Assim, para a determinação de toxicidade por metais pesados são avaliadas a expressão de metalotioneínas (MT) devido à sua especificidade e capacidade de se ligar a íons metálicos (Rajeshkumar *et al.*, 2013). As MTs são proteínas citosólicas, de baixo peso molecular (6 – 7 kDa), ricas em cisteína que se ligam aos íons metálicos evitando seus efeitos tóxicos na célula (Aoki *et al.*, 1991). A indução da expressão de MT ocorre quando o animal é exposto aos metais, prevenindo sua ação tóxica e aumentando a tolerância dos organismos, sendo o primeiro sistema de defesa da célula. No entanto, quando a quantidade de estresse por metal excede a capacidade de ligação da MT, o metal causará danos celulares (Castaldo *et al.*, 2020; Bian e Gao *et al.*, 2021).

Outro biomarcador de exposição ao metal frequentemente usado é a ativação de colinesterases (ChEs), como a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), as quais apresentam diferenças na seletividade de substrato (Santana *et al.*, 2021). A AChE hidrolisa a acetilcolina nas terminações nervosas, evitando disparos nervosos contínuos, o que é vital para o funcionamento normal dos sistemas sensoriais e neuromusculares, e é um dos mais utilizados biomarcadores de neurotoxicidade (Payne *et al.*, 1996) (**Fig.5**). A BChE é uma enzima menos seletiva, tendo uma especificidade de substrato mais ampla, hidrolisando o substrato butirilcolina e acetilcolina em uma taxa comparativamente menor (Santana *et al.*, 2021).

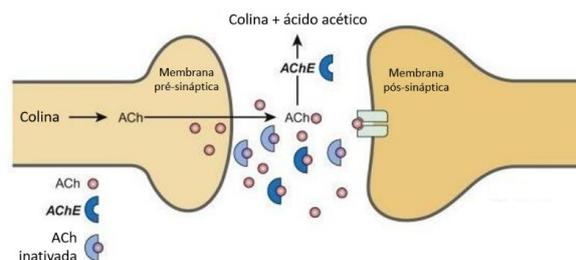


Figura 5. Degradação de acetilcolina (ACh) pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Adaptado de Aboughazala *et al.*, 2020).

Os biomarcadores de efeito não são específicos de um contaminante e atuam em sítios ativos que podem ser alterados por um variado número de estressores, os quais podem se relacionar a diversos efeitos fisiológicos, tais como taxa de crescimento, processos reprodutivos de um organismo e outros (Mc Carthy *et al.*, 1991, Nordberg, 2010). Dentre os principais marcadores deste tipo temos os relacionados ao estresse oxidativo. Sedimentos ligados a poluentes podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) causando danos oxidativos em proteínas, lipídios e DNA, levando à morte celular (Lushchak, 2011). Para prevenir os danos celulares, os mecanismos de defesa são geralmente ativados, como as proteínas de choque térmico (HSP) e o sistema antioxidante, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Lushchak, 2011). Entre os mecanismos citados, as HSPs são marcadores sensíveis de exposição ao estresse em estudos toxicológicos, incluindo toxicologia reprodutiva e de desenvolvimento de vertebrados (Krone *et al.*, 2003; Kosmehl *et al.*, 2012). Entre as diferentes famílias de HSPs, a HSP70 é uma proteína constitutiva, altamente conservada, onipresente e um dos primeiros a ser induzido em resposta a diversos fatores estressantes gerados pelo ambiente sobre os organismos (Somasundaram *et al.*, 2018). A HSP70 atua como uma chaperona molecular que promove o desdobramento de proteínas que se organizam de maneira incorreta, sua síntese é aumentada em situações de estresse, elevando a capacidade da célula de lidar com altas concentrações de proteínas malformadas, protegendo as células dos efeitos deletérios de uma série de estresses proteotóxicos (Sreedhar e Csermely, 2004). Os metais pesados se acumulam nas células vivas e podem interagir com o grupo tiol das proteínas, induzindo a formação de proteínas anormais, as quais sinalizam para a indução de genes hsp70 (Somasundaram *et al.*, 2018). A HSP70 também pode regular a via apoptótica inibindo diretamente a caspase-3 (CASP-3), porém em condições de estresse pode ocorrer expressão de HSP70 e aumento da apoptose (Iamsaard *et al.*, 2020).

A morte celular programada ou apoptose é um processo fisiológico regulado geneticamente que ocorre nos tecidos visando a manter um número apropriado de células, importante para a homeostase de organismos multicelulares. Apesar de ser um processo fisiológico, a morte celular programada também pode ser induzida por estressores ambientais, sendo o estresse oxidativo, induzido por fatores ambientais tóxicos, o principal elemento regulador no desencadeamento de vias apoptótica (Hengartner, 2000; Cole e Ross 2001). A apoptose é um processo muito conservado durante a evolução e requer uma maquinaria especializada envolvendo uma família de proteases denominadas de caspases (Kerr *et al.*,

1972). As caspases ativam endonucleases dependentes de íons $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, que clivam proteínas e fragmentam o DNA (Huettenbrenner *et al.*, 2003). A caspase-3 é uma enzima efetora chave na cascata apoptótica, é amplamente distribuída por toda a célula, está envolvida nos estágios finais da apoptose e desempenha um papel na clivagem de inúmeras proteínas alvo, resultando nas alterações morfológicas que são características da apoptose (Yamashita *et al.*, 2008).

Existem duas vias para a ativação da caspase-3: a) via de sinalização intrínseca onde o estresse celular causa a liberação do citocromo c mitocondrial que leva a ativação da caspase-9, e b) via de sinalização extrínseca em que é iniciada por sinais externos a célula, esses sinais ativam o promotor de caspase-8 através da estimulação do receptor do fator de necrose tumoral (Fas) ou receptores de ligantes indutores de apoptose relacionados ao fator de necrose tumoral (TNF) (Hengartner, 2000) (**Fig.6**).

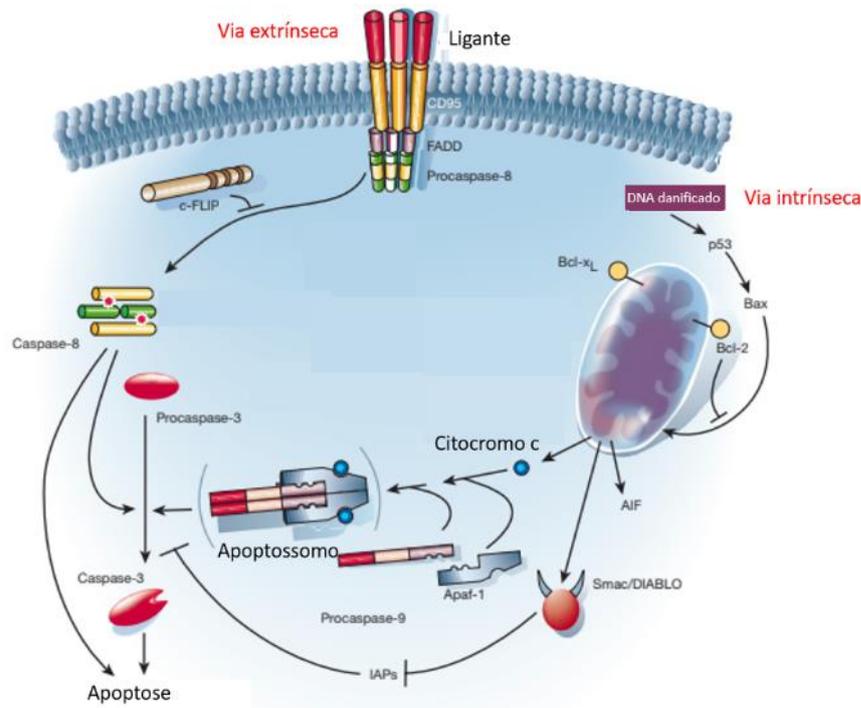


Figura 6. Vias apoptóticas (Adaptado de Hengartner, 2000)

O desenvolvimento dos tecidos depende de um intrincado equilíbrio entre proliferação celular e apoptose, regulando o número de células e a homeostase em embriões e larvas (Fuchs e Steller, 2011). Em contraste com a caspase-3, a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma ferramenta útil para identificar a proliferação celular e o reparo do DNA durante a embriogênese, sendo um importante marcador de células em divisão celular (Loppion *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2015). O PCNA é expresso em todas as células durante o desenvolvimento inicial (Naryzhny e Lee, 2007) e interage com proteínas envolvidas na

progressão do ciclo celular, desempenhando um importante papel na replicação do DNA e no reparo por excisão, sendo constitutivamente expresso em células em crescimento ativo, podendo ser um importante sinalizador de alterações no desenvolvimento embrionário causada por poluentes ambientais (Kelman *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2022).

1.4. Zebrafish como modelo de estudo

O zebrafish (*Danio rerio*) (Fig.7) é um teleósteo de água doce originário da Ásia. Essa espécie possui muitas vantagens como organismo modelo tamanho pequeno, fácil manuseio em laboratório, maturidade sexual rápida, dimorfismo sexual marcante e ciclo reprodutivo curto. A espécie também possui outras vantagens como fertilização externa com ovos translúcidos, que permitem a avaliação do desenvolvimento dos embriões e alterações morfológicas, além do genoma totalmente sequenciado e disponibilizado (Segner, 2009). A sensibilidade a diferentes poluentes tais como metais pesados, desreguladores endócrinos e poluentes orgânicos faz com que o zebrafish seja um organismo modelo ideal para monitoramento ambiental (Dai *et al.*, 2013).



Figura 7. Exemplar de *Danio rerio*.

Devido à importância do sedimento para o ecossistema aquático, diversos estudos utilizam o ensaio de contato de sedimentos para identificar contaminações ambientais (Hollert *et al.*, 2003). Esse teste permite a avaliação integrada a partir de abordagens químicas e ecotoxicológicas utilizando embriões de peixe, especialmente zebrafish (Viganò *et al.*, 2020, Massei *et al.*, 2019, Thellmann *et al.*, 2014, Rocha *et al.*, 2011, Hallare *et al.*, 2005).

1.5 Desenvolvimento embrionário do *Danio rerio*

A embriogênese nos peixes compreende eventos morfogenéticos sensíveis e ordenados que ocorrem desde a fertilização do ovo até a eclosão da larva. Durante esse período o embrião passa por sete estágios, consistindo no zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, farínghula e período de incubação (Kimmel *et al.*, 1995) (Fig.8). O zigoto se desenvolve em um embrião completo por meio de uma rápida proliferação de células, durante a qual as células totipotentes se tornam pluripotentes pelo processo de diferenciação celular. Em zebrafish, esses eventos ocorrem em aproximadamente 96 h a temperatura de 28°C. As clivagens iniciam-se 40

min após a fertilização no polo animal, seguida pela fase de blástula onde ocorre a formação de espaços irregulares entre as células, constituindo o blastoderma. Durante a gastrulação ocorre a formação dos folhetos embrionários e ao final da epibolia, desenvolvem-se os somitos. Ao completar 48 h o embrião completa a morfogênese primária dos órgãos e a partir de 72 h ocorre a eclosão (Kimmel *et al.*, 1995).

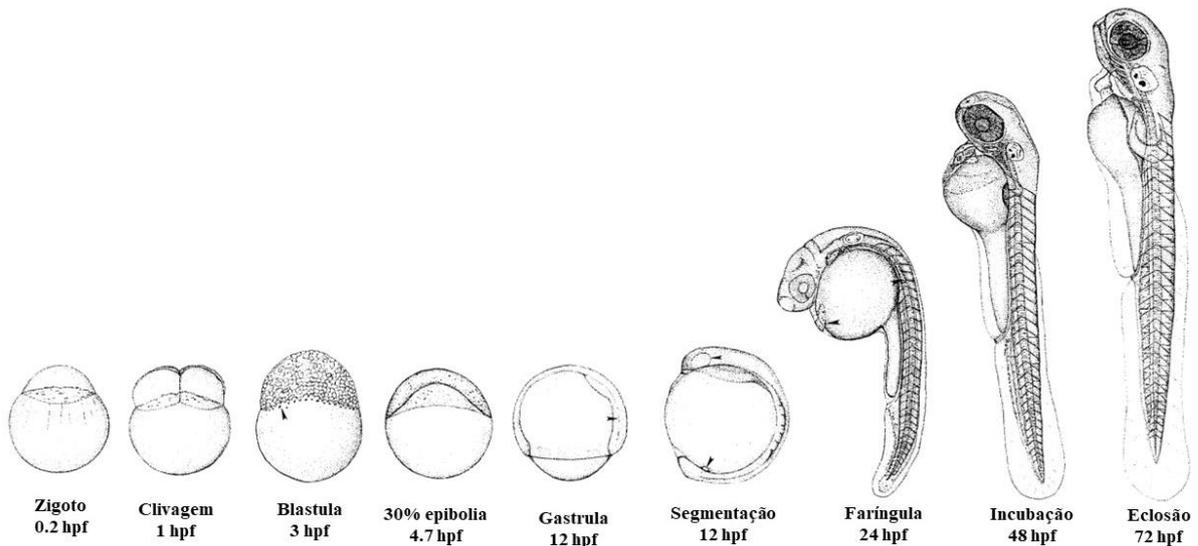


Figura 8. Fases do desenvolvimento embrionário, a 28 °C (Adaptado de Kimmel *et al.*, 1995).

O desenvolvimento inicial dos peixes é particularmente o período mais susceptível a contaminação por metais pesados, pois eles são prontamente absorvidos pelos ovos e larvas, podendo prejudicar a organogênese, o crescimento, o metabolismo, a absorção do vitelo e a homeostase de íons (Finn, 2006). Imediatamente após a fertilização, ocorre a formação do espaço perivitelino pela absorção de água, permitindo a entrada de íons metálicos que causam mudanças na estrutura e na permeabilidade do córion, reduzindo a hidratação do ovo e afetando todo o desenvolvimento embrionário. Os ovos que não hidratam o suficiente são muito pequenos e não permitem a mudança de posição do embrião (Jeziarska *et al.*, 2009). Os metais também causam anomalias durante a clivagem, causando divisões celulares irregulares, má distribuição dos blastômeros e deformação da blástula, além de atrasos na organogênese e gastrulação. Tais alterações podem resultar em malformações cardiovasculares, esqueléticas e cranianas, reduzindo a sobrevivência dos embriões. A eclosão também pode ser alterada por metais pesados, podendo ser atrasada por cádmio ou acelerada por cobre e chumbo (Jeziarska *et al.*, 2009). Além disso, essa exposição pode causar danos ao DNA, distúrbios no desenvolvimento, mortalidade embrionária e mutações hereditárias que podem influenciar diretamente a estrutura e tamanho das populações (Strmac *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de decorridos sete anos do desastre, os danos ocasionados pelo rompimento da barragem do Fundão ainda não foram completamente investigados, principalmente levando-se em consideração seus desdobramentos a longo prazo. Alguns estudos recentes em diferentes espécies de peixes demonstraram bioacumulação por metais e efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos causados pela contaminação do rio Doce em peixes adultos (Gomes *et al.*, 2018, Ferreira *et al.*, 2020, Passos *et al.*, 2020, Weber *et al.*, 2020, Vergilio *et al.*, 2021), porém nenhum estudo analisou os efeitos da contaminação no desenvolvimento embrionário dos peixes. A utilização de embriões de peixes em estudos de toxicologia ambiental é fundamental, pois estes indivíduos são mais sensíveis aos efeitos de contaminantes, se comparados a jovens e adultos, podendo sofrer alterações que podem levar a mortalidade, influenciando diretamente a estrutura e tamanho de suas populações (Strmac *et al.*, 2002). Além disso, ensaios de toxicidade com embriões de zebrafish são recomendados para o monitoramento de efluentes e sedimentos, em substituição ao ensaio de toxicidade aguda com peixes adultos, reduzindo o tempo e os custos das avaliações ecotoxicológicas (Lammer, 2006).

Os biomarcadores são amplamente usados para comprovar a contaminação ambiental, podendo servir como base para a extrapolação de efeitos biológicos nas espécies em seus diferentes níveis de organização (Triebkorn *et al.*, 2003). As respostas de múltiplos biomarcadores é uma forma de avaliar o impacto ambiental de misturas, como as encontradas no sedimento contaminado, e de analisar os efeitos interativos, como sinergismo, antagonismo e efeitos aditivos entre os contaminantes (Ribeiro *et al.*, 2020).

A exposição direta de um organismo teste a uma amostra ambiental que se assemelha as condições naturais, possui grande relevância ecológica (Hafeli *et al.*, 2011). Tendo em vista que a maioria dos estudos experimentais com metais pesados abordam apenas um metal específico e desconsideram a complexidade das misturas ambientais, o presente estudo busca responder a seguinte pergunta: a exposição a sedimentos do rio Doce contaminados a jusante do rompimento da barragem de Fundão são responsáveis por efeitos deletérios durante o desenvolvimento inicial do zebrafish?

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição aguda a sedimentos da bacia do Rio Doce contaminados por rejeitos minerários no desenvolvimento inicial de *Danio rerio*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a concentração de metais pesados em amostras de sedimento de 4 pontos da bacia do rio Doce: 1) Rio Piranga, município de Ponte Nova, 2) Rio Doce, município de Rio Doce, 3) Rio Doce, município de Sem Peixe e 4) Rio Doce, município de São Jose do Goiabal;
- Detectar as principais alterações morfológicas e nas taxas de mortalidade e eclosão dos embriões após a exposição ao sedimento contaminado;
- Analisar a expressão proteica de MT, HSP70, PCNA, AChE e CASP-3 nas larvas recém eclodidas após a exposição ao sedimento contaminado;
- Imunolocalizar MT, HSP70 e PCNA nas larvas recém-eclodidas após a exposição ao sedimento contaminado;
- Comparar estatisticamente os resultados obtidos nos embriões expostos aos sedimentos contaminados com o grupo controle.

4. METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido atendendo a CHAMADA FAPEMIG 10/2018 que trata da ‘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, estando incluído na Linha temática V- Ecotoxicidade. O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética e uso de animais (CEUA) da UFMG, protocolo 69/2021, com Licenças para coleta de material do IEF e do SISBIO-IBAMA (nº 77634)

4.1 Amostragem e processamento do sedimento

Para a realização do experimento, em setembro de 2021, amostras do sedimento foram coletadas, em triplicata, na superfície da região marginal do rio em três trechos hidrográficos ao longo do rio Doce, localizados a jusante da barragem de Fundão e que receberam a contaminação por rejeitos da mineração, e um ponto de referência que não recebeu a lama com os rejeitos da mineração no rio Piranga (**Tabela 1**) (**Fig. 9**)

As amostras de sedimento foram armazenadas em potes de vidro âmbar a 4°C e transportadas para o laboratório, onde foram liofilizadas em um liofilizador K105 por 48 h sob vácuo de 100 mmHg, peneiradas para a separação da fração mais fina, em uma peneira de malha de 500 µm e foram armazenadas refrigeradas a 4°C no escuro. As amostras foram então submetidas à quantificação de 10 metais por Espectrometria de Absorção Atômica pelo equipamento Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES), seguindo o método 3120 B descrito por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (SMWW) (Rice *et al.*, 2012). Os valores obtidos em cada ponto de amostragem foram comparados com os parâmetros de referência de sedimento Classe 1, definidos na resolução N° 454/2012 do CONAMA (Conama, 2005).

Tabela 1. Trechos de amostragem ao longo da bacia do Rio Doce em Minas Gerais.

Trecho amostral	Município	Coordenadas	Distância da barragem
P1 (referência) - Rio Piranga	Ponte Nova	20°19'54"S 42°53'53"W	-
P2- Rio Doce recém-formado	Rio Doce	20°16'18.7"S 42°55'12.9"W	50 km
P3- Rio Doce	Sem peixe	20°03'05"S 42°45'55"W	75 km
P4- Rio Doce	São Jose do Goiabal	19°58'22.7"S 42°38'35.8"W	90 km

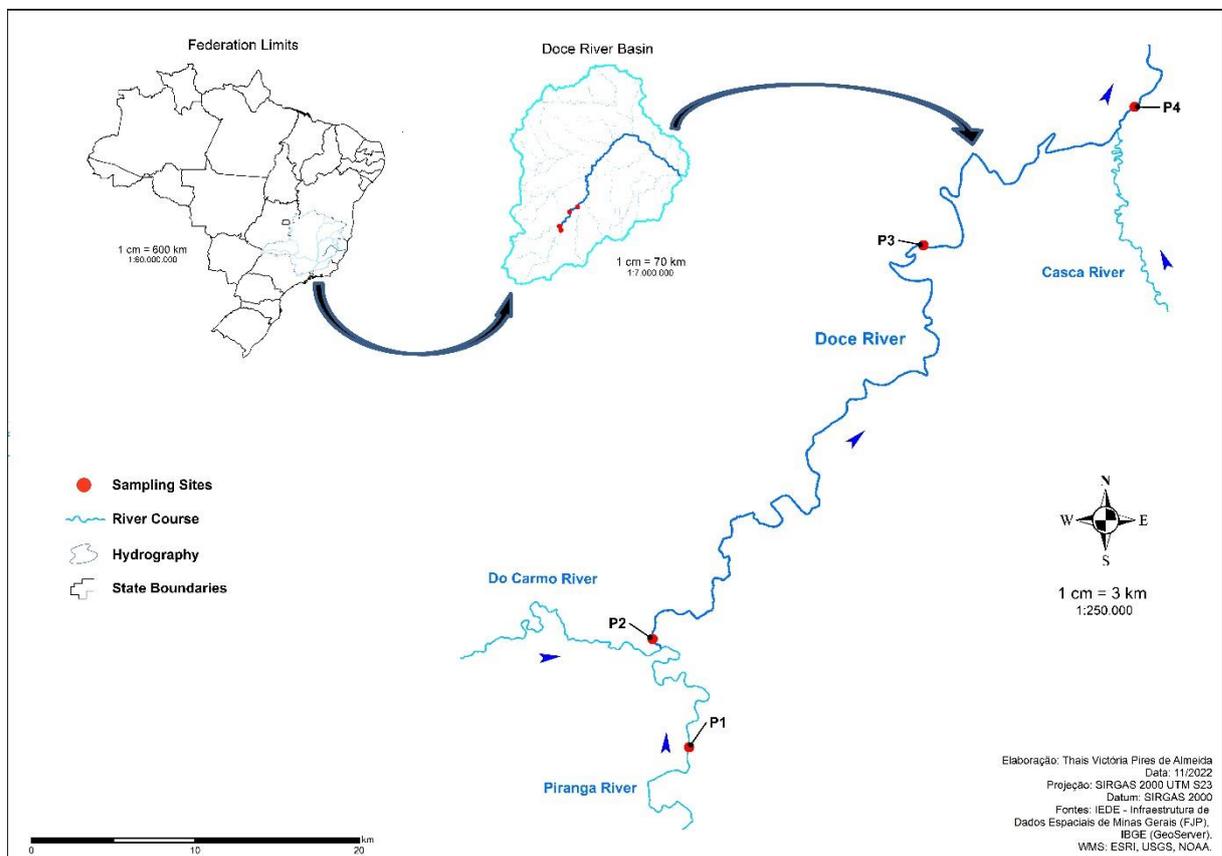
Mapa: pontos de amostragem no Rio Doce

Figura 9. Mapa mostrando a localização da barragem do Fundão e dos quatro pontos de amostragem na bacia do Rio Doce em Minas Gerais. **P1:** Rio Piranga, município Ponte Nova **P2:** Rio Doce recém-formado, município Rio Doce, **P3:** Rio Doce, município Sem Peixe e **P4:** Rio Doce, município São José do Goiabal.

4.2 Ensaio de contato

Para analisar os efeitos da exposição aguda ao sedimento, foi realizado o teste de toxicidade em embriões de peixe, baseado no protocolo 236 da OECD “Fish Embryo Toxicity” (FET) (OECD, 2013), e nos ensaios de contato descrito por Hollert *et al.* (2003) e Hallare *et al.* (2005). As amostras de sedimento foram transferidas para 6 placas de 24 poços por grupo, sendo 20 poços preenchidos com 0,5g de sedimento e 2 ml de água e 4 poços apenas com água, sem sedimento, para o controle interno de placa. Nas placas do grupo controle, os poços foram preenchidos com 0,5 g de sílica e 2 ml de água (**Fig.10**). As placas ficaram em repouso por 24h para decantação do sedimento. A água disponibilizada pela Companhia de Saneamento de Minas Gerais (Copasa) sem cloro foi utilizada nos ensaios. Tanto a sílica, como a água usada nos ensaios foram também submetidos à análise de metal.

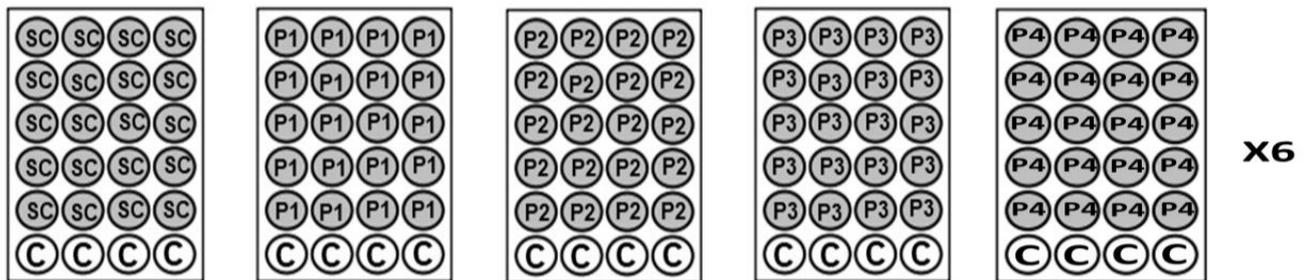


Figura 10. Design experimental. C: controle interno de placa, SC: sílica controle. Pontos de amostragem do sedimento: **P1**: Rio Piranga, município Ponte Nova **P2**: Rio Doce recém-formado, município Rio Doce, **P3**: Rio Doce, município Sem Peixe e **P4**: Rio Doce, município São José do Goiabal.

Para reprodução e obtenção dos ovos, foram utilizados exemplares sexualmente maduros de *Danio rerio*. As matrizes foram mantidas em aquários de 25 L (20 L de volume útil) na densidade de 1 peixe para cada 2 L de água, a 28°C com a utilização de termostatos e o fotoperíodo foi controlado a 12 h Luz:12 h Escuro. Os peixes foram alimentados com dieta comercial com 40% de proteína bruta, manuseados conforme o Guia para Experimentação Animal estabelecido pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pelo CEUA - UFMG 115/2020.

Para estimular a reprodução dos peixes, na noite anterior foi colocado no aquário uma caixa de reprodução, o qual possui um fundo falso com fendas por onde os ovos fertilizados passam e depositam-se no fundo da caixa. Os ovos viáveis foram identificados pela sua transparência, selecionados na fase de blástula (cerca de 3 h pós-fertilização com 30% de epibolia) e colocados individualmente em cada poço das placas de cultura (**Fig.11**). Os

embriões foram expostos ao sedimento durante 96 h em estufa a 28 °C. A cada 24 h, foi avaliada a taxa de mortalidade (definida por: coagulação de ovos, ausência de formação de somitos, ausência de destacamento da cauda e ausência de batimentos cardíacos) e a taxa de eclosão, seguindo as instruções da OECD (2013).

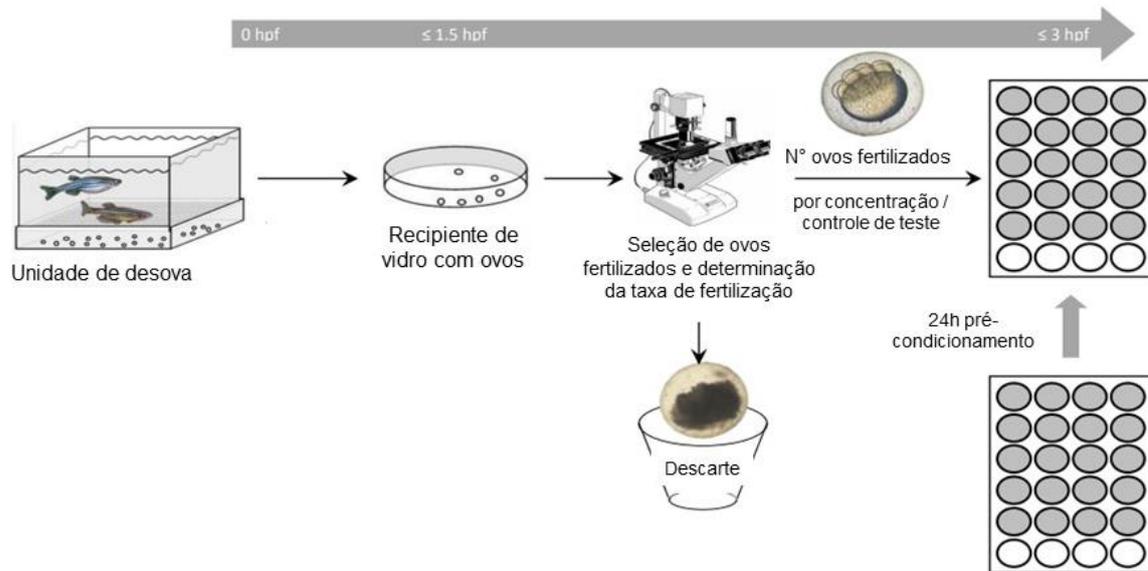


Figura 11. Design experimental de acordo com ‘Fish Embryo Toxicity’ (Adaptado de OECD 2013).

Ao completar 24 h após fertilização (hpf) foi medida a taxa de movimentos espontâneos por minuto para determinar a neurotoxicidade e com 96 hpf foi medida a frequência cardíaca por contagem dos batimentos cardíacos durante 1 minuto em 20 embriões por tratamento em um microscópio de luz para determinar a cardiotoxicidade.

Ao final das 96 h de exposição, os embriões foram anestesiados por resfriamento rápido em gelo e em seguida fixados em solução de formol neutro a 4%. Os animais foram fotografados e medidos utilizando o sistema de análise de imagem Zeiss Axiovision E64 acoplado a um microscópio de luz. Os parâmetros morfométricos foram divididos em três categorias de acordo com Ribeiro *et al* (2020): 1. Sensorial (área ocular; distâncias máxima e mínima entre os olhos); 2. Fisiológicos (área da bexiga natatória, área do saco vitelino e área do pericárdio); 3. Estrutura esquelética (comprimento total, altura, largura e profundidade da cabeça). Os animais foram também analisados quanto a sua morfologia externa utilizando um estereomicroscópio.

Para análises moleculares, 5 pools contendo 10 animais por tratamento foram homogeneizados utilizando homogeneizador PotterS (Braun, Melsungen, Alemanha) em tampão de lise com inibidores de protease, a solução obtida foi centrifugada a 10.000 rpm

durante 10 min a 4°C, a dosagem proteica foi realizada no sobrenadante seguindo o método de Bradford (1976) e as amostras foram aliqüotadas e armazenadas a - 80°C.

4.3 Histologia

Para análises histológicas e imunohistoquímicas, 20 embriões por tratamento foram fixados em líquido de Bouin durante 12 h, embebidos em parafina e seccionados com 5 µm de espessura. Os embriões foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para examinar o estágio de desenvolvimento, alterações histológicas da organogênese e malformações. Para isso, foram obtidas imagens digitais representativas de 5 embriões/tratamento utilizando-se sistema de análise de imagens Zeiss Axiovision E64 acoplado a um microscópio de luz, com ampliação de 25X.

4.4 Imunohistoquímica

Os embriões fixados (N = 5/por tratamentos) foram submetidos à imunohistoquímica para avaliação dos biomarcadores MT, PCNA e HSP70. Para bloqueio da peroxidase endógena, as secções foram incubadas com H₂O₂ 3% em tampão fosfato salina (PBS) por 30 min a temperatura ambiente. Os cortes foram submetidos à reativação antigênica com tampão citrato 10mM pH 6 por 25 min a 90°C. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com albumina sérica bovina (BSA) a 2% em tampão PBS por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (**Tabela 2**) em câmara úmida a 4°C overnight. Posteriormente, os cortes foram incubados em solução de polímero Dako EnVision+dual link System HRP (DakoCytomation Carpinteria USA) contendo anticorpo secundário marcado com peroxidase (HRP) por 30 min. A reação da peroxidase foi revelada com diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, USA) e contra-corada com hematoxilina. Para controle negativo, o anticorpo primário foi omitido da reação imunohistoquímica em uma das lâminas em cada reação imunohistoquímica. A imunolocalização foi feita a partir de imagens digitais utilizando sistema de análise de imagens Zeiss Axiovision E64 acoplado a um microscópio de luz, com ampliação de 400X.

4.5 Western blotting

A quantificação das proteínas MT, PCNA e HSP70 foram determinadas por Western blotting em 5 amostras congeladas a -80°C por grupo. A quantidade de proteínas correspondente a concentração de 100µg de cada amostra congelada foi misturada ao tampão de amostra e adicionado ao gel de eletroforese 15%, sendo posteriormente transferido para membrana de nitrocelulose. Após a transferência, as reações inespecíficas foram bloqueadas e a membrana

incubada overnight com um dos anticorpos primários (**Tabela 2**). Em seguida, a membrana foi lavada com PBS e incubada com anticorpos secundários específicos conjugados com peroxidase (IgG, 1:1500) por 2 horas e a reação revelada pelo diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich). As membranas foram posteriormente analisadas e quantificadas por comparações diretas de bandas por densitometria com o auxílio do software ImageJ, utilizando actina como proteína constitutiva.

Tabela 2. Anticorpos primários e suas respectivas diluições

Anticorpo	Natureza	Marca	Diluição
HSP70	Monoclonal, camundongo	Sigma	1:300
PCNA	Monoclonal, camundongo	Sigma	1:150
MT	Policlonal, coelho	Biosense	1:100
β – ACTINA	Monoclonal, camundongo	Sigma	1:100

(HSP70) proteína do choque térmico 70, (PCNA) antígeno nuclear de proliferação celular, (MT) metalotioneína, β – ACTINA: beta actina.

4.6 Análise enzimática da Caspase – 3

Para detecção da apoptose, a atividade enzimática da caspase-3 foi avaliada utilizando Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit (Biovision, USA). O conteúdo de 5 pools contendo 10 animais congelados a - 80°C de cada grupo foram incubados com o substrato para caspase-3 (DEVD-pNA) por 2 h a 37 °C. A absorbância de cada amostra foi registrada a 405 nm e o nível da atividade da caspase-3 foi diretamente proporcional à cor da reação.

4.7 Análise enzimática da colinesterase

A atividade enzimática da colinesterase (ChE) foi avaliada por meio do método de Ellman *et al.* (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). Para isso, 5 amostras congeladas a - 80°C de cada grupo foram incubadas com 0,05mM de ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e 1,5mM de Acetilcolina (ACT). A reação foi mensurada a partir da produção da tiocolina quando a acetilcolina é hidrolisada gerando uma cor amarelada, o qual foi medida sua absorbância a 405 nm a cada 30s durante 5 min.

4.8 Análises estatísticas

Os softwares BioEstat e GraphPad Prisma 5.0 foram usados nas análises estatísticas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Lilliefors para verificação da normalidade. Os

resultados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para comparação entre os grupos. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão e a diferença entre as médias foi considerada significativa com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise de metais no sedimento do Rio Doce

As concentrações de metais encontradas no sedimento coletado nos 4 pontos de amostragem, estão apresentadas na **tabela 3**. A análise comparativa mostrou que o sedimento coletado no ponto 1 apresentou concentrações de As e Fe significativamente superior ao ponto 2 ($p < 0,05$). O sedimento do ponto 2 apresentou concentrações de Al e Hg significativamente superior ao ponto 4 e Pb significativamente superior ao ponto 3 ($p < 0,05$). No sedimento do ponto 3, Mn foi maior significativamente que no ponto 2 ($p < 0,05$), enquanto Cu, Cr e Ni foram encontrados em concentrações significativamente superior ao ponto 4 ($p < 0,05$). O Cd não apresentou diferença significativa entre os grupos (**Tabela 3**). Na água utilizada no experimento nenhum metal apresentou concentrações que atingissem os limites de quantificação, já na sílica, usada como sedimento inerte (controle), apenas Al ($14,65 \pm 3,75$ mg/kg), Cd ($0,105 \pm 0,005$ mg/kg) e Fe ($143,5 \pm 29,5$ mg/kg) alcançaram os limites de quantificação, porém, os valores foram muito abaixo do encontrado no ambiente.

Comparados com os limites estabelecidos pela resolução N°454/2012 do CONAMA alguns metais foram encontrados em níveis de contaminação acima do recomendado, sendo eles: As nos pontos 1, 3 e 4, Cu no ponto 3, Cr nos pontos 1, 2, 3 e 4, Hg no ponto 2 e Ni nos pontos 1, 2 e 3 (**Tabela 3**). Cd e Pb estavam dentro dos limites recomendados pelo CONAMA. Al, Fe e Mn não possuem limites determinados pela resolução do CONAMA. Esses níveis aumentados enfatizam a possibilidade do sedimento induzir efeitos adversos nos organismos, pois além do contato direto com os elementos depositados, o sedimento de fundo pode ser eventualmente remobilizado para a coluna d'água, ficando disponível para incorporação de metais na cadeia trófica.

Tabela 3. Metais e semimetais encontrados no sedimento de quatro pontos de amostragem na bacia do Rio Doce em setembro de 2021

	LQ	P1	P2	P3	P4	CONAMA
Alumínio mg/kg	2	17090 ± 934^{ab}	28930 ± 1059^a	20850 ± 685^{ab}	12480 ± 487^b	ND
Arsênio mg/kg	0,1	$53,5 \pm 1,6^{a*}$	$2,2 \pm 0,14^b$	$12,8 \pm 0,29^{ab*}$	$14,6 \pm 0,23^{ab*}$	5,9
Cádmio mg/kg	0,1	$0,12 \pm 0,011^a$	$0,1 \pm 0,003^a$	$0,14 \pm 0,041^a$	$0,1 \pm 0,006^a$	0,6
Chumbo mg/kg	1	$9,54 \pm 0,54^{ab}$	$14,8 \pm 0,08^a$	$5,65 \pm 0,49^b$	$6,95 \pm 0,09^{ab}$	35

Cobre mg/kg	0,7	26,27 ± 0,23 ^{ab}	33 ± 0,49 ^{ab}	45,2 ± 0,20 ^{a*}	18 ± 0,92 ^b	35,7
Cromo mg/kg	1	56,83 ± 1,3 ^{ab*}	89 ± 2,4 ^{ab*}	98,8 ± 0,7 ^{a*}	40 ± 2,5 ^{b*}	37,3
Ferro mg/kg	10	64390 ± 3712 ^a	43560 ± 3712 ^b	55380 ± 3712 ^{ab}	45420 ± 3712 ^{ab}	ND
Manganês mg/kg	2	726 ± 4,7 ^{ab}	620 ± 12,5 ^a	1270 ± 5,2 ^b	719 ± 30,4 ^{ab}	ND
Mercúrio mg/kg	0,05	0,14 ± 0,005 ^{ab}	0,17 ± 0,11 ^{a*}	0,11 ± 0,023 ^{ab}	0,05 ± 0,01 ^b	0,17
Níquel mg/kg	10	20,37 ± 0,4 ^{ab*}	31,7 ± 1,0 ^{ab*}	54 ± 0,36 ^{a*}	13 ± 0,92 ^b	18

Valores expressos em média ± erro padrão. (P1) ponto referência, Rio Piranga, município de Ponte Nova, (P2) Rio Doce, município de Rio Doce), (P3) Rio Doce, município de Sem Peixe e (P4) Rio Doce, município de São Jose do Goiabal. Em cada linha, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Asteriscos indicam valores acima dos limites estabelecidos pela resolução CONAMA N° 454/2012 para sedimento nível 1. **LQ**: limite de quantificação, **ND**: não descrito.

5.2 Análises biométricas e morfológicas

Ao final das 96 h de exposição, a taxa de mortalidade do grupo controle não ultrapassou 10% ($5,9 \pm 0,9\%$), o que é considerado normal em testes de toxicidade. Os grupos expostos ao sedimento coletado na bacia do rio Doce apresentaram mortalidade superior a 10%, sendo o grupo P1 ($21,82 \pm 2,8\%$), P2 ($35 \pm 4,9\%$) e P3 ($26,36 \pm 3\%$) significativamente maiores que o controle ($p < 0,0001$). O grupo P4 ($9,5 \pm 1,2\%$) não apresentou diferença significativa comparado ao controle (**Fig.12A**).

A taxa de eclosão foi significativamente menor nos animais expostos ao sedimento dos pontos 1 ($77,08 \pm 3,16\%$), 2 ($63,7 \pm 4,28\%$) e 3 ($70,4 \pm 6,01\%$) ($p < 0,001$) quando comparados ao controle ($93,7 \pm 0,95\%$). A maioria dos embriões eclodiu entre 48 e 72 hpf, porém os animais do grupo P4 tiveram alta taxa de eclosão antes das 48 hpf ($41,6 \pm 5,71\%$), sendo significativamente maior quando comparada aos outros grupos ($p < 0,05$), posteriormente essa taxa se estabilizou ($87,9 \pm 1,79\%$) e a eclosão total foi semelhante ao grupo controle (**Fig. 12B**).

As malformações nas larvas foram significativamente maiores no grupo P2 ($p < 0,0001$), no qual 15% apresentavam alguma alteração (**Fig.12C**). No grupo controle, a maioria das larvas (99,17%) tinha morfologia normal, sem malformações visíveis macroscopicamente (**Fig. 13A**). Nos grupos expostos ao sedimento, as malformações da coluna foram as mais comuns, correspondendo a 33,09% dos casos, incluindo cifose, lordose e escoliose (**Fig. 13B-D**). Também foram encontradas alterações como edema no pericárdio (24,57%), edema no saco

vitelino (17,79%), malformação da cabeça (15,25%), malformação dos olhos (6,77%), ausência da cauda (1,69%) e malformação dos somitos (0,84%) (Fig.13 E-M).

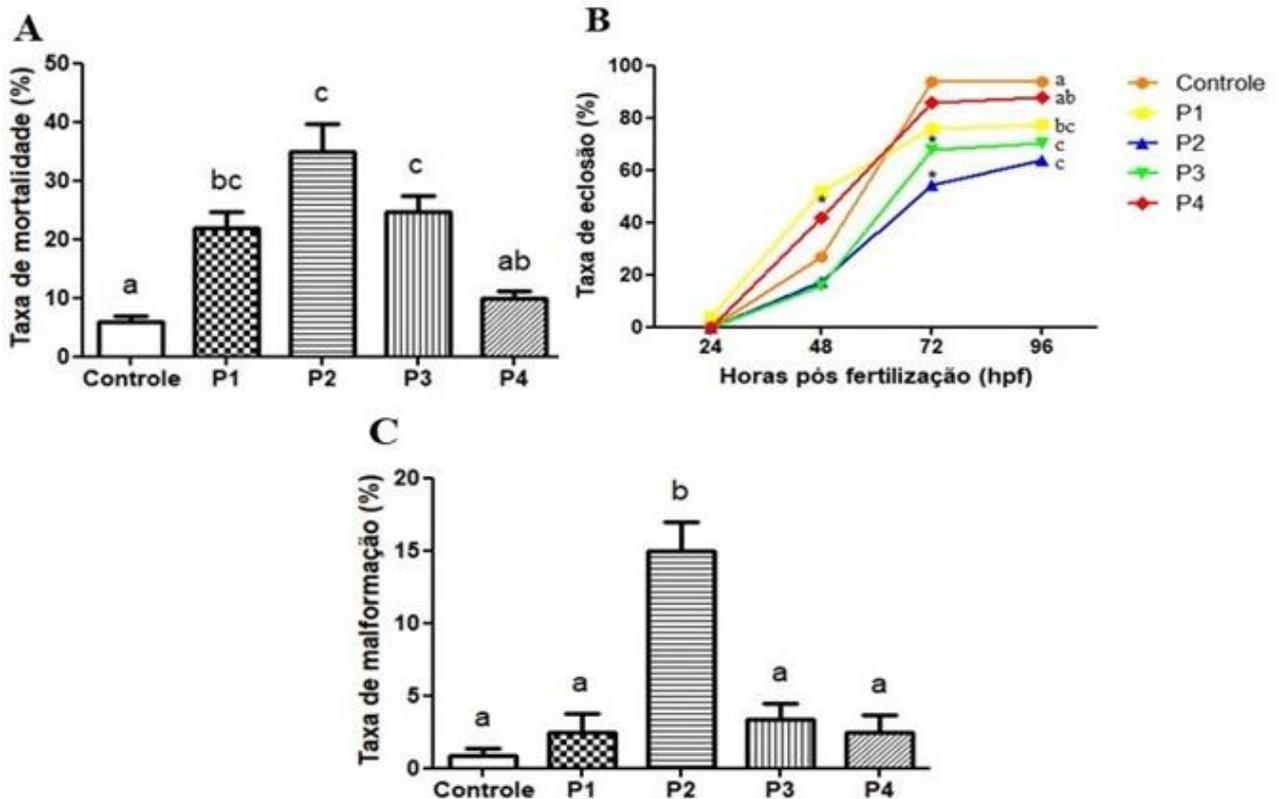


Figura 12. (A) Taxa de mortalidade, (B) Taxa de eclosão e (C) Taxa de malformações em embriões de *Danio rerio* expostos ao ensaio agudo de contato com sedimento da bacia do Rio Doce. **P1:** Rio Piranga, município de Ponte Nova, ponto referência, **P2:** Rio Doce, município de Rio Doce, **P3:** Rio Doce, município de Sem Peixe e **P4:** Rio Doce, município de São Jose do Goiabal. Valores expressos em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

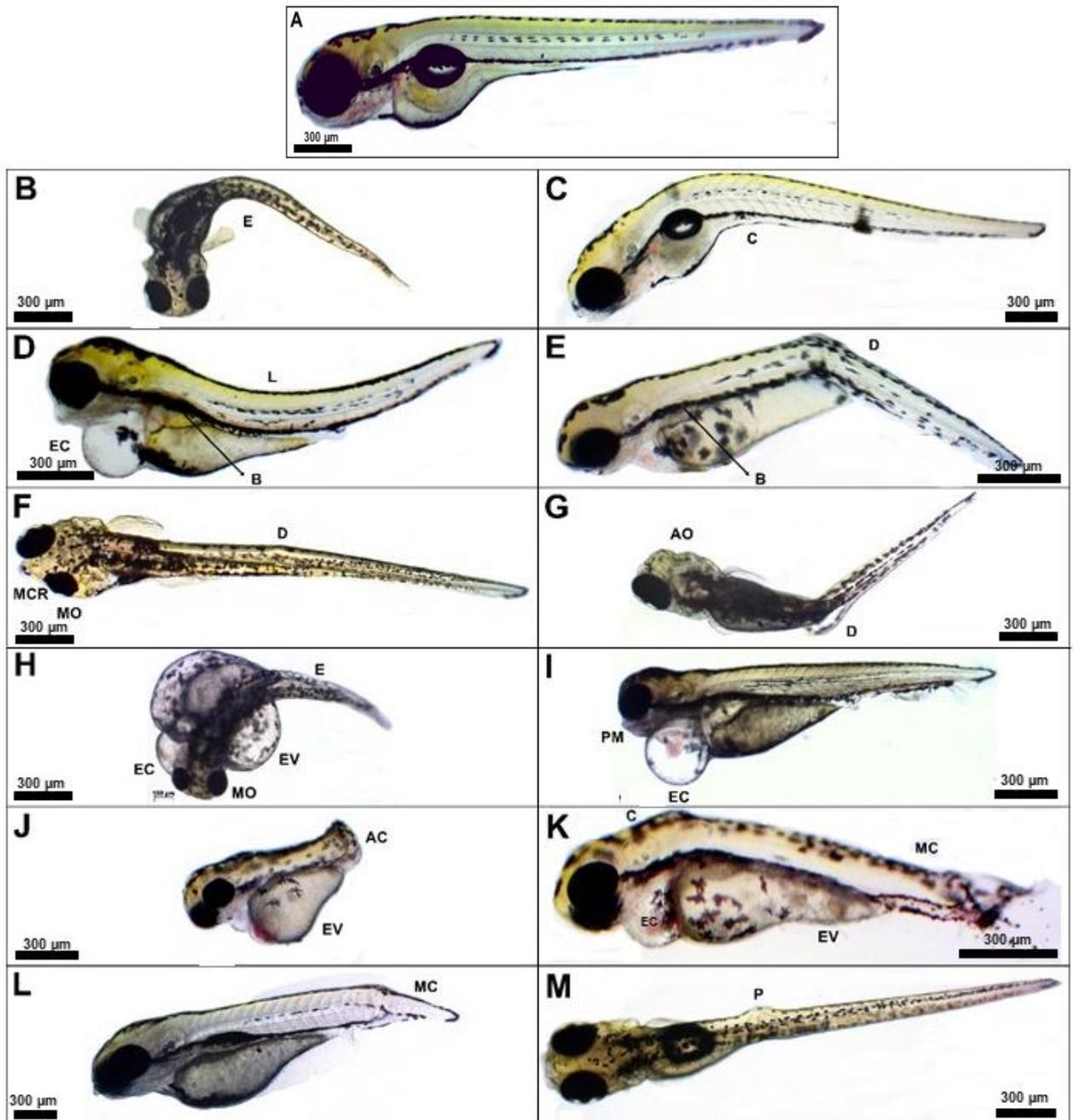


Figura 13. Larvas recém eclodidas de *Danio rerio* sem alterações, encontradas principalmente no grupo controle (A) e malformações encontradas nos grupos expostos ao sedimento contaminado do Rio Doce (B-M): escoliose (E), cifose (C), dobra do corpo (D), lordose (L), bexiga natatória não inflada (B), ausência do olho (AO), malformação do crânio (MCR), malformações do olho (MO), edema cardíaco (EC), edema no saco vitelino (EV), protuberância maxilar (PM), ausência de cauda (AC), malformação da cauda (MC), protuberância do corpo (P).

Os valores das medidas morfométricas são apresentados na **tabela 4**. Ao analisar o resultado da morfometria foi visto que os parâmetros estruturais como comprimento foi

significativamente menor no ponto 2 comparado ao controle, pontos 1, 3 e 4 ($p < 0,0001$), enquanto a profundidade da cabeça e a altura da cabeça foi menor significativamente nos pontos 2 e 3 comparados com o controle ($p < 0,05$). Nas medições dos parâmetros sensoriais a área dos olhos foi significativamente menor no ponto 2 comparada aos pontos 3 e 4, e a distância interocular máxima também foi significativamente menor no ponto 2 comparada aos grupos controle, pontos 1 e 3 ($p < 0,05$). Parâmetros fisiológicos como a bexiga natatória foi significativamente menor no ponto 2 comparado ao controle e o ponto 1 ($p < 0,05$) (**Fig.14**). A área do coração foi significativamente maior nos pontos 3 e 4 comparados ao controle e a área do saco vitelino foi significativamente maior no ponto 2, 3 e 4 comparados ao controle ($p < 0,05$) (**Fig.14**). Os demais dados biométricos não tiveram diferenças significativas (**Tabela 4**).

A frequência cardíaca dos embriões variou entre 74 bpm e 132 bpm, sendo reduzida significativamente apenas no ponto 2 ($95,6 \pm 2,9$) quando comparado ao controle ($113,5 \pm 2,1$) e ao ponto 1 ($117,7 \pm 1,85$) ($p = 0,0016$). A taxa de movimentos espontâneos/min variou entre 0 e 30 movimentos/min, sendo reduzida significativamente em todos os grupos expostos ao sedimento da bacia do rio Doce ($p < 0,0001$) (**Tabela 4**).

Sendo assim, os animais expostos ao sedimento contaminado pelo rompimento da barragem do Fundão, especialmente ponto 2 e 3, apresentaram menor taxa de eclosão, maiores taxas de mortalidade e de malformação, alterações esqueléticas, fisiológicas e sensoriais, tiveram tendência a ter tamanho reduzido, hipoatividade e bradicardia, além de maior área do pericárdio e do saco vitelino. O ponto 1, localizado no rio Piranga, ponto não contaminado pelo rompimento da barragem, apesar de ter mortalidade elevada dos embriões, apresentou características morfológicas similares ao grupo controle, exposto ao sedimento artificial (sílica), enquanto o ponto 4, ponto mais distante do rompimento da barragem apresentou menos alterações no desenvolvimento embrionário.

Tabela 4. Dados biométricos e parâmetros fisiológicos das larvas recém eclodidas de *Danio rerio* expostas ao sedimento controle (sílica) e sedimento da bacia do Rio Doce durante 96 h.

	Controle	P1	P2	P3	P4
Comprimento (mm)	$4,031 \pm 0,02^a$	$3,995 \pm 0,04^a$	$3,592 \pm 0,05^b$	$3,963 \pm 0,04^a$	$3,943 \pm 0,04^a$
Profundidade da cabeça (mm)	$0,79 \pm 0,06^a$	$0,7697 \pm 0,02^a$	$0,630 \pm 0,01^b$	$0,675 \pm 0,01^b$	$0,702 \pm 0,01^{ab}$
Largura da cabeça (mm)	$0,58 \pm 0,03^a$	$0,55 \pm 0,01^a$	$0,528 \pm 0,01^a$	$0,545 \pm 0,01^a$	$0,556 \pm 0,01^a$
Altura da cabeça (mm)	$0,569 \pm 0,01^a$	$0,553 \pm 0,02^{ab}$	$0,464 \pm 0,01^b$	$0,463 \pm 0,02^b$	$0,536 \pm 0,01^{ab}$

Área dos olhos (mm ²)	44,31 ± 1,44 ^{ab}	45,69 ± 1,4 ^{ab}	30,67 ± 5,29 ^a	48,13 ± 3,09 ^b	48,45 ± 2,41 ^b
Distância interocular mínima (mm)	0,117 ± 0,01 ^a	0,1156 ± 0,01 ^a	0,0996 ± 0,01 ^a	0,0928 ± 0,01 ^a	0,111 ± 0,01 ^a
Distância interocular máxima (mm)	0,692 ± 0,06 ^a	0,6454 ± 0,01 ^a	0,5665 ± 0,01 ^b	0,5901 ± 0,01 ^a	0,6319 ± 0 ^{ab}
Área da bexiga natatória (mm ²)	26,07 ± 1,2 ^a	29,10 ± 1,09 ^a	13,61 ± 2,73 ^b	21,48 ± 2,58 ^{ab}	22,61 ± 2,03 ^{ab}
Área do coração (mm ²)	16,35 ± 0,71 ^a	23,92 ± 1,91 ^{ab}	22,56 ± 1,71 ^{ab}	33,63 ± 3,1 ^b	33,32 ± 3,54 ^b
Área do saco vitelino (mm ²)	103,6 ± 5,09 ^a	110,1 ± 8,26 ^{ab}	164,4 ± 12,69 ^c	133,4 ± 8,18 ^{bc}	141,7 ± 6,95 ^{bc}
Frequência cardíaca (bpm)	113,5 ± 2,19 ^a	117,7 ± 1,85 ^a	95,63 ± 2,98 ^b	104,1 ± 2,25 ^a	108,8 ± 4,69 ^{ab}
Movimentos espontâneos/min	3 ± 0,72 ^a	2 ± 0,43 ^a	1 ± 0,21 ^b	1 ± 0,24 ^b	0 ± 0,11 ^c

Pontos de amostragem do sedimento: (**P1**) Rio Piranga, município de Ponte Nova, (**P2**) Rio Doce, município de Rio Doce, (**P3**), Rio Doce, município de Sem Peixe e (**P4**) Rio Doce, município de São Jose do Goiabal. Valores expressos em média ± erro padrão. Em cada linha, as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

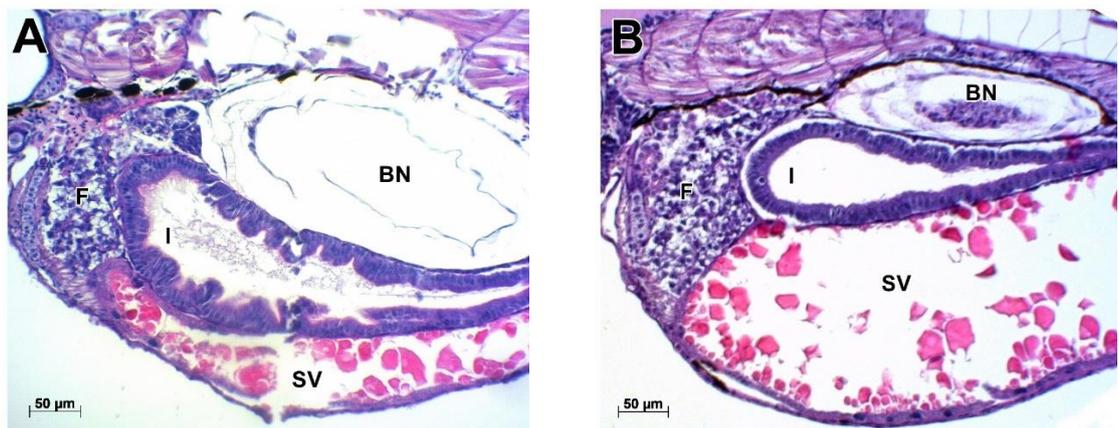


Figura 14. Secções histológicas de embriões de *Danio rerio* com 96 hpf expostos ao controle (A) e ao sedimento do contaminado do Rio Doce (B). Observe desenvolvimento da bexiga natatória (BN), intestino (I), fígado (F) e saco vitelino (SV).

5.3 Expressão proteica de MT, HSP70 e PCNA

A reação do Western Blot para metalotioneína (MT) foi maior nos grupos expostos ao sedimento da bacia do Rio Doce, entretanto foi significativamente maior apenas no ponto 2 ($p = 0,0329$) quando comparados ao controle (**Fig.15A**). Um resultado semelhante a MT foi observado na expressão de HSP70, onde foram encontrados valores maiores nos grupos expostos ao sedimento, porém apenas o ponto 2 apresentou diferença significativa ($p = 0,0407$) comparado ao controle (**Fig.15B**). A expressão de PCNA também foi aumentada apenas no ponto 2 ($p = 0,0226$) (**Fig.15C**).

A HSP70 é uma chaperona constitutiva e sua expressão pode ocorrer em todas as células, como evidenciado pela marcação de imunohistoquímica (**Fig 16A-B**), porém, em situações de estresse sua síntese pode ser aumentada como detectado no ponto 2 (**Fig.16B**). A imunohistoquímica mostrou que a expressão de MT é concentrada nas células do fígado, onde ocorre a síntese dessa proteína (Fig. **16C-D**). Para PCNA, a imunohistoquímica mostrou marcações mais frequentes nas regiões das brânquias e do intestino no ponto 2 (**Fig.16E-H**).

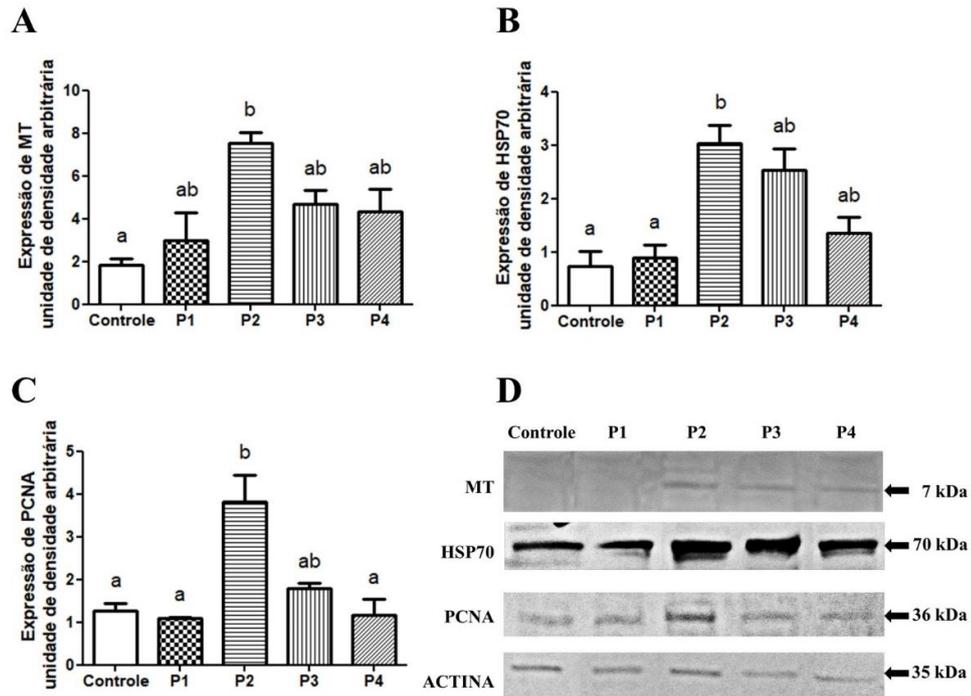


Figura 15. Expressão proteica de MT (A), HSP70 (B) e PCNA (C) e Western blot (D) representativo para MT, HSP70, PCNA e Actina (proteína constitutiva) em embriões de *Danio rerio* expostos ao sedimento da bacia do rio Doce: (P1) Rio Piranga, município de Ponte Nova, (P2) Rio Doce, município de Rio Doce, (P3), Rio Doce, município de Sem Peixe e (P4) Rio Doce, município de São Jose do Goiabal. Valores expressos em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

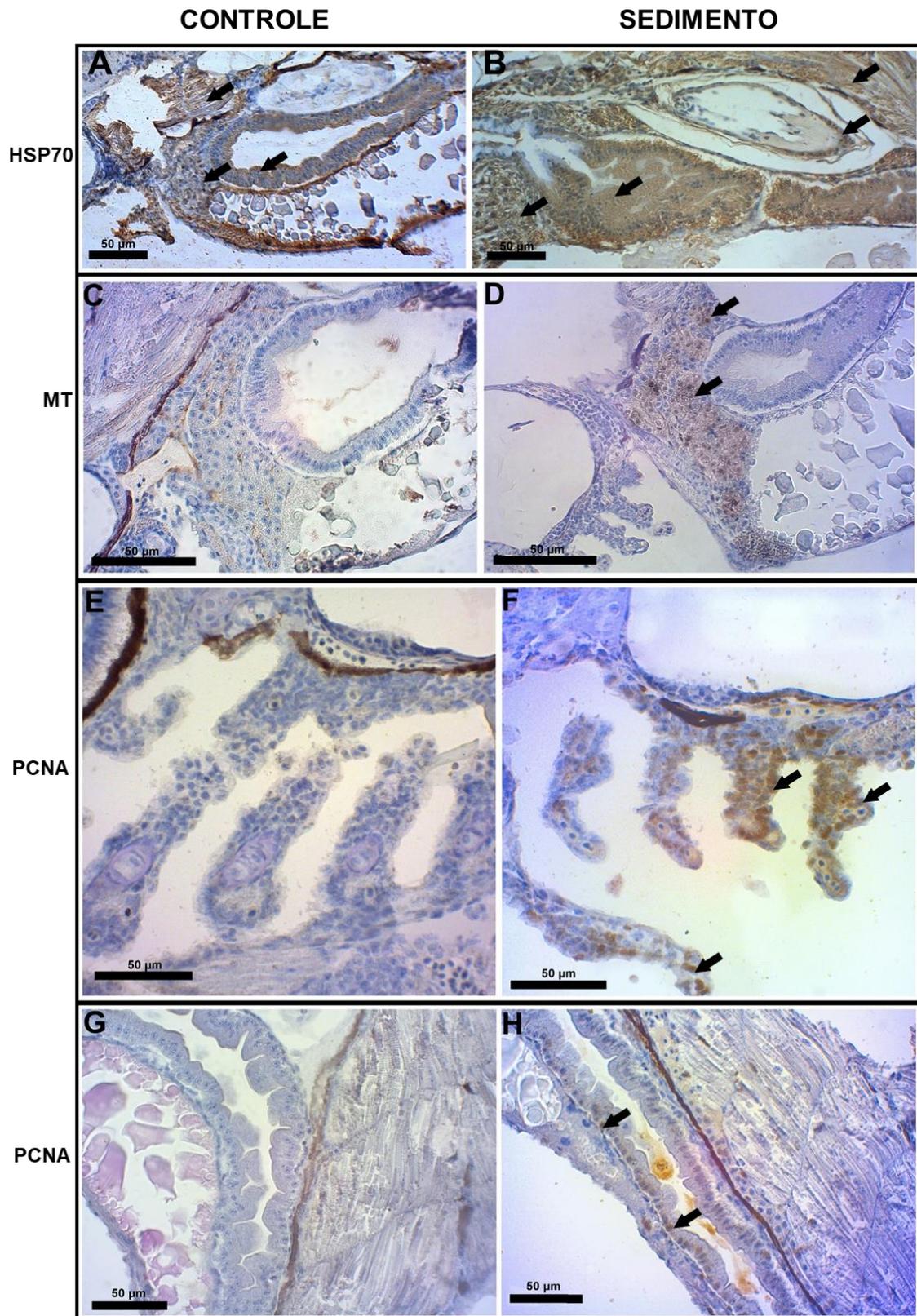


Figura 16. Reação imunohistoquímica para HSP70 (A-B), Metalotioneína, MT (C-D) e PCNA (E-H) de *Danio rerio* expostos ao sedimento da bacia do rio Doce e ao controle. Contra-coloração com hematoxilina. Observe marcação para HSP70 em todas as células (A-B), para MT no fígado (C-D) e para PCNA nas brânquias e intestino (E-H)

5.4 Atividade enzimática da Caspase-3

A atividade enzimática da caspase-3, como biomarcador da apoptose, aumentou nos embriões de grupos expostos ao sedimento da bacia do Rio Doce (**Fig.17A**). Os pontos 1 ($0,11 \pm 0,01$), 3 ($0,11 \pm 0,003$) e 4 ($0,12 \pm 0,008$) apresentaram aumento significativo quando comparados com o grupo controle ($0,03 \pm 0,01$) ($p < 0,001$). O ponto 2 ($0,08 \pm 0,002$) apesar de apresentar aumento da atividade de caspase-3 não apresentou diferença significativa em comparação com o controle (**Fig.17A**).

5.5 - Acetilcolinesterase

Houve um aumento significativo da atividade da enzima acetilcolinesterase nos embriões do grupo P2 ($112,8 \pm 20,76$) e P3 ($118,3 \pm 27,11$) ($p < 0,01$) comparados ao controle ($9,331 \pm 4,1$) (**Fig.17 B**). O grupo P4 ($59,97 \pm 15,26$), apesar de apresentar resultados 5x maiores do que o controle, não houve diferença estatística. Esses resultados associados a alteração dos movimentos espontâneos (**Tabela 4**) indicam neurotoxicidade causada pela exposição ao sedimento.

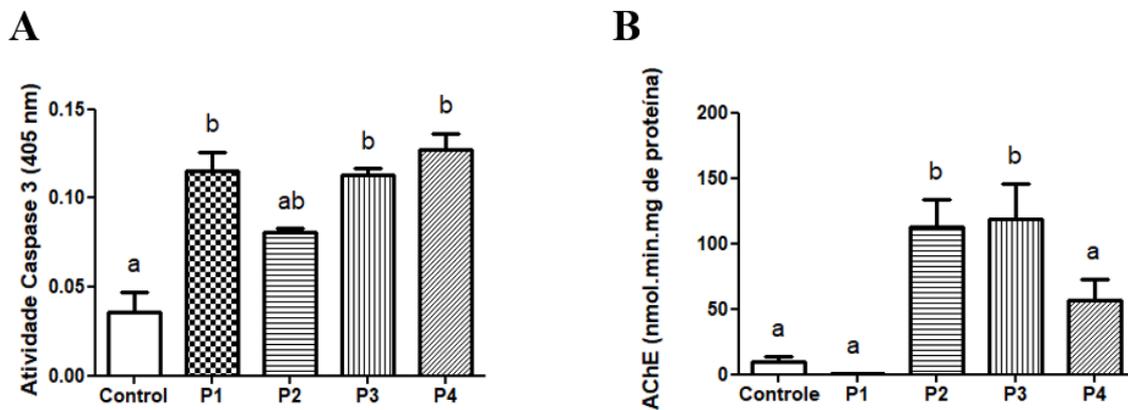


Figura 17. Atividade enzimática da caspase-3 (A) e da acetilcolinesterase, AChE (B) em embriões de *Danio rerio* expostos ao sedimento da bacia do rio Doce: (P1) Rio Piranga, município de Ponte Nova, (P2) Rio Doce, município de Rio Doce, (P3), Rio Doce, município de Sem Peixe e (P4) Rio Doce, município de São Jose do Goiabal. Valores expressos em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, MG, foi o maior desastre ambiental do Brasil e maior desastre minerário do mundo (Cordeiro *et al.*, 2019). Além do dano imediato causado pelo derramamento de lama contaminada, a concentração de metais aumentou rapidamente e se sedimentou no fundo do rio, que serve agora como fonte secundária de contaminação (Gomes *et al.*, 2017). No presente estudo, utilizou-se pela primeira vez o ensaio de contato para avaliar os efeitos do sedimento contaminado com rejeitos minerários liberados pela barragem de Fundão no desenvolvimento embrionário em peixes, utilizando diferentes biomarcadores morfológicos, celulares e moleculares. A caracterização toxicológica dos sedimentos é uma tarefa essencial para monitorar a qualidade dos ambientes aquáticos, já que a presença de diversos metais, pode induzir efeitos interativos em toda biota aquática.

Os rejeitos de minério despejados pelo rompimento da barragem do Fundão possuem grande capacidade de retenção de metais pesados (Pires *et al.*, 2003). Estudos feitos logo após o desastre mostraram que metais como Al, Fe, Cd e As se encontravam em concentrações elevadas no sedimento (Cordeiro *et al.*, 2019; Duarte *et al.*, 2020; Richard *et al.*, 2020). Outros estudos que compararam as concentrações antes e logo após o desastre, indicaram aumentos de até 20 vezes em relação aos valores basais de Fe, Mn, Cr, Ni, Cu, Zn, As, Pb e Hg (Gomes *et al.*, 2017; Aguiar *et al.*, 2020; Reis *et al.*, 2017; Queiroz *et al.*, 2018). Essas concentrações se mantêm elevadas porque os óxidos de ferro presentes no rejeito possuem uma alta capacidade de retenção e com o passar do tempo os metais contidos no sedimento são liberados aumentando suas concentrações no ambiente. Ao ser mobilizado, os metais podem migrar do sedimento para a água e se tornar mais biodisponível durante seu transporte ao longo do rio (Queiroz *et al.*, 2018; Bernardino *et al.*, 2019; Aguiar *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2020; Gabriel *et al.*, 2020). Além disso, as chuvas e processo erosivos também podem remobilizar os resíduos sólidos de rejeitos, que estão armazenados no sedimento (Gabriel *et al.*, 2020). Nossos resultados mostram que os sedimentos coletados no rio Doce (pontos 2 e 3) apresentam níveis elevados de contaminação com metais, como também reportado em estudos prévios (Hatje *et al.*, 2017; Bernardino *et al.*, 2019; Gabriel *et al.*, 2020). Esses resultados caracterizam uma contaminação crônica, já que esses metais estão constantemente biodisponíveis, eles também não são metabolizados pelos animais sendo bioacumulados e biomagnificados ao longo da teia trófica.

No presente estudo, as concentrações de As, Cu, Cr, Hg e Ni excederam as diretrizes de qualidade de sedimento estabelecidas pela resolução 454/2012 do CONAMA (valores do Conama obtidos das Diretrizes Canadenses de Qualidade Ambiental). A extrapolação dos limites de As, Hg e Pb também foi constatado por Hatje e colaboradores em 2017. A

contaminação por Hg e As podem ser associadas às atividades de mineração de ouro, pelo seu uso nos processos de amalgamação (Duarte *et al.*, 2020; Hatje *et al.*, 2017). A alta concentração de Ni pode estar ligada à contaminação agrícola na área, e a alta concentração de Cu está relacionada com a litologia do local (Reis *et al.*, 2017). Esses metais provavelmente já estavam presentes antes do desastre ambiental devido às características do Quadrilátero ferrífero, e sua concentração aumentou devido remobilização de sedimentos, porém liberação de metais para ambientes aquáticos por atividades antrópicas é muito maior do que as observadas por processos naturais (AnvariFar *et al.*, 2018).

As concentrações de metais pesados encontrado no sedimento mesmo após 6 anos do rompimento da barragem como detectado nesse estudo evidencia a necessidade de estudos contínuos que monitorem ambientes impactados. Um estudo que acompanhou a concentração de metais no sedimento durante 10 anos após o rompimento de uma barragem de pirita em Aznalcóllar, na Espanha, mostrou que houve uma redução inicial da concentração de metais seguida de uma estabilização, mantendo a contaminação mesmo após a remoção de 90% do rejeito (Macklin *et al.*, 1999; Olía *et al.*, 2012). Estudos como esses indicam a necessidade de medidas de contenção de danos mais rápidas e efetivas e apontam a necessidade de estudos com esses sedimentos para observar os efeitos de tais estressores na biota aquática ao longo dos anos.

Uma vez que a resolução do CONAMA estabelece níveis de qualidade do sedimento apenas para o gerenciamento de materiais a ser dragado e não considera a qualidade do sedimento para a garantia de sua função ecológica, os ensaios biológicos como realizado no presente estudo são necessários para estabelecer medidas de conservação das comunidades aquáticas e preservação do equilíbrio ambiental. Assim, nesse estudo, a exposição ao sedimento contaminado pelos rejeitos da barragem de Fundão prejudicou o desenvolvimento inicial do *Danio rerio* ao diminuir a taxa de sobrevivência, induzindo anormalidades morfológicas e retardando a taxa de eclosão. De fato, os estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes são particularmente sensíveis à poluição da água. Os metais pesados podem afetar vários processos de desenvolvimento durante o período embrionário, resultando na redução da quantidade e qualidade da prole (Jezińska *et al.*, 2009). Ao realizar o teste de contato com embriões de *D. rerio* foi observada uma maior taxa de mortalidade nos grupos expostos ao sedimento contaminado comparados ao controle, principalmente nos grupos 2 e 3 mais próximo ao rompimento da barragem. No ponto 4, localizado a maior distância do rompimento da barragem, foi observado menos efeitos letais do sedimento, o que não necessariamente indica a qualidade do ambiente, evidenciando a necessidade do uso de diversos biomarcadores de

avaliação ambiental. Por outro lado, o ponto 1, localizado no Rio Piranga não recebeu a contaminação da barragem do Fundão, mas apresentou efeitos letais similares aos pontos contaminados pela mineração, evidenciando outros tipos de contaminação na bacia do Rio Doce. Similarmente, um estudo que avaliou a toxicidade do sedimento do Rio Doce em *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Danio rerio* também verificou que os ambientes mais próximos ao rompimento da barragem de Fundão apresentaram maior toxicidade (Mendes *et al.*, 2020). A exposição de *D. rerio* adultos ao sedimento contaminado pelo rompimento da barragem de Brumadinho também causou alta taxa de mortalidade, além da bioacumulação de metais pesados nos seus tecidos musculares (Vergilio *et al.*, 2020). Os mesmos autores mostraram que o rompimento da barragem de Brumadinho liberou rejeitos de minério com características semelhantes ao rejeito despejado pelo rompimento da barragem de Fundão, no qual o sedimento era mais tóxico que a água. A redução da sobrevivência também foi observada em outros estudos em que embriões de peixes foram expostos a sedimentos contaminados por mistura de metais em outros ambientes aquáticos (Hallare *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2020). Essa alta taxa de mortalidade pode ser suficiente para causar um declínio significativo em toda a população. Além disso, dentro de cenários reais, os efeitos tóxicos dos sedimentos podem ser aumentados pela interação de outros fatores, por exemplo, predadores, temperatura extrema, baixo nível de oxigênio, entre outros (Hallare *et al.*, 2005). Assim, a mortalidade aqui observada pode ser uma subestimação de um nível de mortalidade muito mais alta no ambiente, o que pode desestabilizar a população natural em escala ainda maior.

No presente estudo, os embriões expostos ao sedimento do ponto 2 também apresentaram maior taxa de malformações caracterizada por alterações morfológicas. Essas alterações podem ser relacionadas a ações conjunta de diversos metais sob o desenvolvimento embrionário. As principais anormalidades morfológicas encontradas nesse estudo foram malformações esqueléticas, uma vez que metais como Pb, Cu, Cd e Zn podem competir de maneira antagônica ao cálcio levando a hipocalcemia aguda e conseqüentemente redução do crescimento e malformações como escoliose, cifose e lordose (Brannen *et al.*, 2010, Sfakianakis *et al.*, 2015). As deformidades nos peixes, especialmente as esqueléticas, são bastante incapacitantes, pois interferem na capacidade de natação, comprometendo a interação do organismo com o meio ambiente (Sfakianakis *et al.*, 2015).

Além da alta taxa de mortalidade e malformações, os ovos expostos ao sedimento dos pontos 1, 2 e 3, também apresentaram atraso na taxa de eclosão, que ocorre entre 48 e 72 hpf, e todos os embriões devem estar eclodidos após 96 hpf (Kimmel *et al.*, 1995; Hellfeld *et al.*,

2020). A eclosão é uma etapa chave na transformação de embriões em larvas e é um dos índices mais importantes para avaliar a toxicidade durante desenvolvimento em zebrafish (Nguyen, *et al.*, 2020). Falha na eclosão pode ocorrer devido a vários mecanismos que incluem (1) diminuição da atividade do embrião; (2) desativação das enzimas proteolíticas e (3) incapacidade das larvas de romper a casca do ovo (Hallare *et al.*, 2005). A eclosão tardia também foi observada em estudos onde Cu, Cd e Pb inibiram a produção da corionase, enzima responsável por romper o córion durante o processo de eclosão (Jeziarska *et al.*, 2008). O mesmo efeito foi observado em embriões de zebrafish expostos individualmente ou misturas de diversos metais (Ansari e Ansari, 2015; Fu *et al.*, 2014; Hallare *et al.*, 2005; Mane *et al.*, 2021; Nabinger *et al.*, 2018; Toma *et al.*, 2021).

O atraso na eclosão está provavelmente associado ao atraso no desenvolvimento já que os animais expostos ao sedimento contaminado apresentaram menor tamanho, maior saco vitelino e falha na insuflação da bexiga natatória. O comprimento do corpo é um importante indicador do crescimento do embrião e a exposição a metais pode alterar esse parâmetro, como observado em embriões expostos ao sedimento do ponto 2. O menor tamanho pode ser explicado pela ação dos metais pesados que ativam processos de detoxificação que consomem grandes quantidades de energia, assim, os peixes expostos têm menos energia disponível para ser usada durante o crescimento (Jeziarska *et al.*, 2019). O menor tamanho também foi observado em diversas espécies de peixes expostos a sedimentos contaminados por metais pesados provenientes de mineração, como em *Cyprinella monacha*, *Galaxias maculatus*, *Galaxias brevipinnis*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis*, tais efeitos foram atribuídos ao estresse elevado (Cavanagh *et al.*, 2014; Sutherland e Meyer 2007; Sigler *et al.*, 1984; Sweka e Hartman 2001; Affandi *et al.*, 2019).

O saco vitelino desempenha um papel importante durante o desenvolvimento inicial dos peixes, pois é a única fonte de nutrição para os embriões (Zhang *et al.*, 2015). O vitelo é absorvido durante o desenvolvimento embrionário e a sua redução torna-se particularmente evidente a partir de 96 hpf, quando os embriões começam a esgotar suas reservas nutricionais (Hellfeld *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2015), período quando ocorre o desenvolvimento do sistema digestório, seguido pelo início da alimentação exógena (Kimmel, 1995). O tamanho aumentado do saco vitelino dos embriões dos grupos P2, P3 e P4 do presente estudo pode indicar uma falha na absorção do vitelo levando a alterações no metabolismo energético (Zhang *et al.*, 2015; Nguyen, *et al.*, 2020). A falta de nutrientes pode atrasar e prejudicar o crescimento dos embriões levando a um menor tamanho, além de afetar o desenvolvimento adequado dos embriões (Nguyen, *et al.*, 2020; Gonçalves *et al.*, 2020).

O tamanho da bexiga natatória também é um biomarcador que indica atraso no desenvolvimento, já que sua insuflação é essencial para a natação após a eclosão, ajudando os peixes a equilibrar a pressão hidrostática e reduzir o gasto energético da natação (Jönsson *et al.*, 2012; Hellfeld *et al.*, 2020). Em um estudo em que embriões de *D. rerio* foram tratados com tetraciclina, foi vista uma associação entre atrasos significativos no desenvolvimento, retardo na absorção do saco vitelino e bexiga natatória não inflada (Zhang *et al.*, 2015), corroborando com os resultados encontrados nesse estudo, principalmente no ponto 2. O atraso no desenvolvimento de ovos ou larvas pode levar a alevinos menores que são menos capazes de competir por recursos ambientais do que os maiores que passaram pelo desenvolvimento normal, comprometendo toda estrutura da espécie e causando uma perda populacional (Affandi *et al.*, 2019).

Nesse estudo, os embriões expostos ao sedimento contaminado por rejeitos também apresentaram alterações fisiológicas como redução dos batimentos cardíacos e redução dos movimentos espontâneos. A frequência de batimentos cardíacos por minuto em embriões é um importante biomarcador para analisar a cardiotoxicidade (Ribeiro *et al.*, 2020). Outro sinal de disfunção cardíaca é a ocorrência de edema pericárdio (Ali *et al.*, 2011), caracterizado pelo acúmulo de líquido no pericárdio, que altera a frequência cardíaca por causar aumento na pressão intrapericárdica (Spodick *et al.*, 2003). A redução dos batimentos cardíacos associados ao maior tamanho do coração e a maior incidência de malformações cardíacas dos embriões expostos ao sedimento do ponto 2 deste estudo, indicam que os metais podem estar causando alterações circulatórias que podem refletir no seu desenvolvimento. Esses danos podem impedir que o coração bombeie o sangue de forma correta para todo corpo e então afetar o transporte de energia e nutrientes, influenciando ainda mais o desenvolvimento e crescimento dos embriões (Qian *et al.*, 2018; Nguyen, *et al.*, 2020).

A taxa de movimentos espontâneos medidos com 24 hpf é um marcador de alteração fisiológica e um importante indicador de neurotoxicidade (Ribeiro *et al.*, 2020). A redução no número de movimento da cauda como ocorreu nesse estudo nos embriões expostos aos sedimentos contaminados pelos rejeitos (P2, P3 e P4) é um indicativo de falha no desenvolvimento muscular e nervoso dos embriões (García-Camero *et al.*, 2019). Esse fato pode levar ao comprometimento da capacidade de natação podendo reduzir a capacidade de alimentação dos peixes, e pode levar a importantes consequências ecológicas devido à alteração da relação predador-presa e à diminuição da capacidade competitiva (Domingues *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2020).

Além da redução dos movimentos, embriões expostos ao sedimento contaminado nos pontos 2 e 3 deste estudo também mostraram aumento da atividade da AChE. A atividade aumentada da AChE pode estar associada a uma maior degradação da acetilcolina e redução da estimulação de seus receptores, influenciando diretamente no tempo de contração muscular, movimento e respiração (Moraes *et al.*, 2007; Wessler *et al.*, 2019). Interessantemente, em peixes adultos do gênero *Astyanax* expostos ao sedimento contaminado pelo rompimento da barragem de Fundão houve diminuição da atividade da AChE. Apesar de alguns estudos mostrarem que xenobióticos causam a inibição de AChE (Barboza *et al.*, 2018a; Roda *et al.*, 2020; Santana *et al.*, 2021), outros estudos mostram que a exposição a metais causam aumento da atividade dessa enzima, como em camundongos expostos ao Al, em *Barbus conchoni* expostos ao Cd e em *Danio rerio* expostos ao Fe e Cu (Gill *et al.*, 1991; Kaizer *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2013). Isso poderia ocorrer devido a um mecanismo de compensação de estresse causado pela exposição ao composto exógeno, aumentando a atividade colinesterásica (Miron *et al.*, 2005). Além disso, estudos com exposição a metais mostraram que existe uma associação entre o aumento da atividade da AChE e redução da atividade locomotora em embriões de *D. rerio* (Senger *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2022), mostrando que os efeitos são distintos dependendo do tipo de material exposto e da fase de vida de cada animal.

Durante o desenvolvimento, embriões de peixes podem entrar em contato com estressores de complexidades variadas em seu ambiente. Esses contaminantes podem ter como alvo proteínas celulares que desempenham papéis críticos no desenvolvimento, servindo como biomarcados (Hallare *et al.*, 2005). Entre esses biomarcadores, HSP70 é um dos primeiros a ser induzido em resposta a diversos fatores estressantes gerados pelo ambiente, como metais, sobre o organismo, permitindo a detecção de alterações moleculares e celulares antes das mudanças morfológicas nos embriões e larvas tornam-se aparentes. (Krone *et al.*, 2003; Kampinga e Craig 2010). Nossos resultados indicam que a presença de metais, como detectado nesse estudo, provavelmente afetou a síntese proteica, evidenciada pelo aumento significativo na expressão de HSP70 principalmente no ponto 2, corroborando com vários estudos que indicam uma ligação entre a indução da expressão de HSP70 e a exposição de embriões de peixes a sedimentos contaminados por metais (Hallare *et al.*, 2005; Redelstein *et al.*, 2015; Kosmehl *et al.*, 2012; Krone *et al.*, 2003). A HSP70 é uma chaperona molecular – ATP dependente que assiste a síntese de proteínas, auxiliando nos dobramentos corretos e reparo de uma variedade de proteínas nas células sendo importante componentes no controle de qualidade das proteínas (Mayer 2005).

Como proteínas de resposta ao estresse, HSPs e MTs conferem proteção celular contra uma ampla variedade de fatores estressantes, enquanto a síntese de HSP70 parece ser uma resposta geral ao estresse, as MTs são relatadas como sendo especificamente induzidas em resposta ao tratamento com metais pesados (Dorts *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016.). No presente estudo, a expressão proteica de HSP70 e MT foram significativamente aumentadas pela exposição ao sedimento contaminado do ponto 2. As MTs são proteínas que se ligam a metais e podem detoxificar o excesso de íons metálicos, desempenhando um papel importante na defesa antioxidante. Já foi demonstrado que a expressão de genes de metalotioneína ocorre durante a embriogênese do zebrafish a partir do estágio de uma célula (Chen *et al.*, 2004). Assim, como já foi observado por outros autores em embriões expostos por 96h a prata (Ag), titânio (Ti) e zinco (Zn) (Osborne *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2004). Nesse estudo MT foi expressa por imunohistoquímica principalmente no fígado, região do corpo onde ocorre o processamento de compostos xenobióticos. Os níveis de MT hepática podem estar relacionados à ação de vários metais atuando em conjunto, como reportado em peixes de rios poluídos por metais (Linde-Arias *et al.*, 2008; Paschoalini *et al.*, 2019, Weber *et al.*, 2020). Vários estudos mostram que a exposição a metais como Cd, Hg, Pb, Zn, Cu e Ag causam aumento da expressão de MT em embriões de peixes (Bian e Gao, 2021; Zhang *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2019; Dorts *et al.*, 2016; Brun *et al.*, 2014; Osborne *et al.*, 2012 Redelstein *et al.*, 2015;). Além disso, Chan e colaboradores (2006) mostraram que o Hg, metal encontrado em maior concentração no ponto 2, pode ser até 50x mais indutor de produção de MT em embriões de *D. rerio*.

Embriões em estágio inicial de desenvolvimento são mais sensíveis a alterações ambientais devido as grandes mudanças na diferenciação, proliferação e migração celular necessária para formar tecidos e órgãos (Feng *et al.*, 2013). O desenvolvimento é altamente coordenado e requer comunicações específicas entre as células, portanto, a exposição a substâncias tóxicas durante esse período crítico pode perturbar essas interações, afetando o desenvolvimento (Feng *et al.*, 2013).

O PCNA, componente do maquinário de replicação e reparo do DNA, é normalmente expresso em todas as células durante o desenvolvimento inicial e sua atividade proliferativa é regulada durante a morfogênese e diferenciação (Naryzhny e Lee, 2007, Kelman, 1997). Em embriões de peixes, a exposição a metais como Ag e Cu aumenta a expressão de PCNA, indicando a ocorrência de um processo de renovação celular ou reparo de DNA, provavelmente em consequência de mecanismos de resposta homeostática para compensar a exposição aos metais (Garcia-Käufer *et al.*, 2014, Santos *et al.*, 2020 Eryilmaz *et al.*, 2017). Em nosso estudo, aumento de PCNA nos embriões do grupo 2 ocorreu especialmente no intestino e brânquias,

principais regiões por onde são absorvidos os metais (Kennedy, 2011), e onde as taxas de renovação celular são mais elevadas. Além disso, o aumento da atividade proliferativa no grupo 2 pode ser também resultado de diferenças no desenvolvimento dos embriões. Assim, em *Acipenser gueldenstaedtii*, o índice de proliferação celular foi mais alto em larvas recém-eclodidas, mas em seguida essa atividade diminuiu (Kamaszewski *et al.*, 2014). Do mesmo modo, embriões de *D. rerio* também apresentaram menor expressão de PCNA em estágios mais avançados de desenvolvimento (Nowakowska *et al.*, 2020). Assim, o aumento da atividade proliferativa no grupo 2 desse estudo também poderia ser relacionado ao atraso do desenvolvimento dos embriões.

O estresse oxidativo celular induzido por fatores ambientais tóxicos como os metais, tem sido apontado como o principal elemento regulador no desencadeamento de vias apoptóticas (Franco e Panayiotidis 2010). Em nosso estudo detectamos maior atividade da caspase-3 nos grupos expostos ao sedimento contaminado, principalmente nos pontos 1, 3 e 4 onde foram encontradas as maiores concentrações de As. A apoptose pode ser ativada pelo As pelos mecanismos de estresse oxidativo, fragmentação do DNA e alterações funcionais dos canais iônicos que levam a ativação da cascata de caspases (Alamolhodaei *et al.*, 2015). Em alguns estudos a exposição de *D. rerio* ao As também inibiu significativamente a sobrevivência das larvas e aumentou significativamente a transcrição de Caspase-3, levando a apoptose (Zhao *et al.*, 2021; Selvaraj *et al.*, 2015). Durante o desenvolvimento embrionário a apoptose pode ser regulada com o propósito de eliminar células desnecessárias após a diferenciação celular, desempenhando um papel crítico na sobrevivência de embriões de peixes em condições normais e de estresse (Yamashita *et al.*, 2008).

Em conjunto, o presente estudo indica que a exposição de embriões de *Danio rerio* ao sedimento contaminado pelo rompimento da barragem de Fundão influencia negativamente o desenvolvimento inicial, causando aumento da mortalidade, malformações, atraso na taxa de eclosão, alterações esqueléticas, fisiológicas e sensoriais, efeitos neurotóxicos e cardiotoxicos. Além disso, a carga de metais encontrada no rio Doce alterou a expressão de MT, HSP70 e as atividades de proliferação celular e apoptose, principalmente nos pontos mais próximos ao rompimento da barragem. Danos causados durante os estágios iniciais de vida diminuem a capacidade de competição, sucesso reprodutivo e sobrevivência, afetando a dinâmica populacional que pode resultar em desordens ecológicas. Desta forma, os resultados obtidos indicam a necessidade de ações contínuas para remediação do impacto causado pela presença de metais no Rio Doce, restaurando o leito do rio e permitindo a recuperação das espécies locais.

7. CONCLUSÕES:

- Após 6 anos do rompimento da barragem do Fundão, o sedimento do Rio Doce, no trecho com até 90 km a jusante do acidente, apresenta As, Cr, Cu, Hg e Ni acima dos limites recomendados pelo CONAMA, além da presença de Al, Cd, Pb, Mn e elevados níveis de Fe;
- Apesar de não contaminado pelo rompimento da barragem do Fundão, o sedimento do rio Piranga (ponto referência) também apresenta contaminação com As, Cr e Ni acima dos limites do CONAMA além de presença dos outros metais;
- O sedimento contendo rejeitos minerários da barragem do Fundão influencia negativamente o desenvolvimento embrionário de *D. rerio*, causando, malformações, atraso do desenvolvimento, redução da taxa de eclosão e aumento da mortalidade dos embriões;
- Os embriões expostos ao sedimento dos pontos contaminados apresentam alterações esqueléticas, fisiológicas e sensoriais, além de efeitos neurotóxicos e cardiotóxicos, que comprometem o desenvolvimento inicial dos peixes;
- A contaminação do rio Doce com rejeitos minerários afeta a expressão de MT, HSP70 e as atividades de proliferação e morte celular nos embriões;
- A toxicidade do sedimento do Rio Doce diminui com cerca de 90 km a jusante da barragem do Fundão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUGHAZALA, Laila M *et al.* Study on Serum Cholinesterase as Marker of Chronic Liver Disease. **Journal for Research and Studies**, v. 2, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21608/AUJV.2020.10672>
- AFFANDI, Farhana Ahmad *et al.* Impacts of suspended sediment and metal pollution from mining activities on riverine fish population—a review. **Springer Verlag**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05137-7>
- AGUIAR, Valquíria Maria de Carvalho *et al.* Bioavailability and ecological risks of trace metals in bottom sediments from Doce river continental shelf before and after the biggest environmental disaster in Brazil: The collapse of the Fundão dam. **Journal of Environmental Management**, v. 272, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111086>
- ALAMOLHODAEI, Nafiseh Sadat *et al.* Arsenic cardiotoxicity: An overview. **Elsevier B.V.**, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.030>
- ALI, Shaukat *et al.* Large-scale analysis of acute ethanol exposure in zebrafish development: A critical time window and resilience. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020037>
- ANA - Agência Nacional de Águas (2018) Relatório de segurança de Barragens 2017. Ministério do Meio Ambiente
- ANM- Agência Nacional de Mineração – Relatório estatística da mineração no Brasil 2022
- ANSARI, S., ANSARI, B.A., Effects of heavy metals on the embryo and larvae of zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae). **Sch. Acad. J. Biosci.** **1B**, 52–56 2015.
- ANVARIFAR, Hossein *et al.* Environmental pollution and toxic substances: Cellular apoptosis as a key parameter in a sensible model like fish. **Aquatic Toxicology**, v. 204, p. 144–159, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.010>
- AOKI, Yasunobu *et al.* A Western blotting procedure for detection of metallothionein **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. 1991.
- ARAUJO, C. B. Contribuição ao estudo do comportamento de barragens de rejeito de mineração de ferro. 2006. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 2006.
- BARREIROS, André L B S *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo **Quim. Nova**, 2006.
- BERNARDINO, Angelo F. *et al.* Chronic trace metals effects of mine tailings on estuarine assemblages revealed by environmental DNA. **PeerJ**, v. 2019, n. 11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.8042>
- BIAN, Xiaoxue; GAO, Yongfei. DNA methylation and gene expression alterations in zebrafish embryos exposed to cadmium. [Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12691-6>]/Published
- BRANNEN, Kimberly C. *et al.* Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 66–77, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bdrb.20223>
- BRAUNBECK, Thomas *et al.* OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 236-Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/255968359>.

- BRUN, Nadja Rebecca *et al.* Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: Importance of zinc ions. **Science of the Total Environment**, v. 476–477, p. 657–666, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.053>
- BURTON, G. Allen. Assessing the toxicity of freshwater sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, n. 12, p. 1585–1627, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.5620101204>
- CARMO, Flávio Fonseca do *et al.* Fundação tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 15, n. 3, p. 145–151, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.06.002>
- CASTALDO, G *et al.* Investigating the effects of a sub-lethal metal mixture of Cu, Zn and Cd on bioaccumulation and ionoregulation in common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquatic Toxicology**, v. 218, n. November 2019, p. 105363, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105363>
- CAVANAGH JE, Harding JS (2014). Effects of suspended sediment on freshwater fish. Landcare Research. Lincoln, New Zealand. West Coast Regional Council. Landcare Research. 1-29.
- CBH-DOCE, 2017. Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Doce [WWW Document]. A Bacia. URL <http://www.cbhdoce.org.br/institucional/a-bacia>
- CHAN, King Ming *et al.* Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. **Marine Environmental Research**, v. 62, n. SUPPL. 1, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.04.012>
- CHEN, Wen Ya *et al.* Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 69, n. 3, p. 215–227, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.05.004>
- COLE, L K; ROSS, L S. Apoptosis in the Developing Zebrafish Embryo., v. 142, p. 123–142, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0432>
- 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.
- CORDEIRO, Marcelle C. *et al.* Insights on the freshwater microbiomes metabolic changes associated with the world's largest mining disaster. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 1209–1217, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.112>
- COSTA, Pedro M. *et al.* Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 654, n. 1, p. 29–37, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.04.007>
- DAI, Yu Jie *et al.* Zebrafish as a model system to study toxicology. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.2406>
- DOMINGUES, I. *et al.* Effects of ivermectin on *Danio rerio*: a multiple endpoint approach: behaviour, weight and subcellular markers. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 491–499, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1607-5>
- DORTS, Jennifer *et al.* DNA methyltransferases and stress-related genes expression in zebrafish larvae after exposure to heat and copper during reprogramming of DNA methylation. **Scientific Reports**, v. 6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep34254>

DUARTE, Eduardo Baudson *et al.* Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. **Chemosphere**, v. 262, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>

ERYILMAZ, Oğuz *et al.* Evaluation of the interaction between proliferation, oxidant–antioxidant status, Wnt pathway, and apoptosis in zebrafish embryos exposed to silver nanoparticles used in textile industry. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbt.22015>

ESCOBAR, Herton. Mud tsunami wreaks ecological havoc in Brazil. **Science**, v. 350, n. 6265, p. 1138–1139, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.350.6265.1138>

FENG, Dao Fu *et al.* Analysis of chorion changes in developmental toxicity induced by polymer microspheres in Zebrafish embryos. **RSC Advances**, v. 3, n. 39, p. 17880–17886, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3ra41503a>

FERREIRA, Frederico Fernandes *et al.* Impacts of the Samarco Tailing Dam Collapse on Metals and Arsenic Concentration in Freshwater Fish Muscle from Doce River, Southeastern Brazil. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 16, n. 5, p. 622–630, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ieam.4289>

FIELDS S (2001) Tarnishing the earth: gold mining’s dirty secret. *Environ Heal* 474–481

FINN, Roderick Nigel. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.12.021>

FOESCH, Meri Diana Strauss *et al.* River water contamination resulting from the Mariana disaster, Brazil. **Floresta e Ambiente**, v. 27, n. 4, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.013218>

FRANCO, Rodrigo; PANAYIOTIDIS, Mihalis I. Cell death or survival: The double-edged sword of environmental and occupational toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 265–266, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.06.002>

FREITAS, Carlos Machado; SILVA, Mariano Andrade. Work accidents which become disasters: Mine tailing dam failures in Brazil. **Associacao Nacional de Medicina do Trabalho**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5327/Z1679443520190405>

FU, Jie *et al.* Heavy metals in seawater, sediments, and biota from the coastal area of Yancheng City, China. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 8, p. 1697–1704, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.2575>

FUCHS, Yaron; STELLER, Hermann. Review Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742–758, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033>

GABRIEL, Fabrício *et al.* Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. **PeerJ**, v. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.10266>

GALLOWAY, Tamara S. *et al.* A Multibiomarker Approach to Environmental Assessment. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 1723–1731, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es030570+>

GARCÍA-CAMBERO, J. P. *et al.* The added value of a zebrafish embryo-larval model in the assessment of wastewater tertiary treatments. **Environmental Science: Water Research and Technology** v. 5, n.12, p. 2269–2279, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c9ew00411d>

GARCIA-KÄUFER, M. *et al.* Genotoxic and teratogenic effect of freshwater sediment samples from the Rhine and Elbe River (Germany) in zebrafish embryo using a multi-endpoint testing strategy. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16341–16357, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3894-4>

GARCIA, Leticia Couto *et al.* Brazil's worst mining disaster: Corporations must be compelled to pay the actual environmental costs: Corporations. **Ecological Applications**, v. 27, n. 1, p. 5–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eap.1461>

GILL, Tejendra S *et al.* In vivo and in vitro effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish barbus conchonus ham. (rosy barb) **Camp. Biochem. Physiol.** 1991.

GOMES, L. C. *et al.* Genotoxicity effects on Geophagus brasiliensis fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 4, p. 659–664, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.188086>

GOMES, Luiz Eduardo de Oliveira *et al.* The impacts of the Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, Eastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 120, n. 1–2, p. 28–36, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.056>

GONÇALVES, Íris Flávia Sousa *et al.* Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. **Springer**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07902-5>

HÄFELI, Nadja *et al.* Embryotoxic and genotoxic potential of sewage system biofilm and river sediment in the catchment area of a sewage treatment plant in Switzerland. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1271–1279, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.008>

HALLARE, A. V. *et al.* Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Science of the Total Environment**, v. 347, n. 1–3, p. 254–271, 2005a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.002>

HALLARE, A. V. *et al.* Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, n. 1, p. 7–17, 2005b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.06.002>

HATJE, Vanessa *et al.* The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11143-x>

HENGARTNER, Michael O. The biochemistry of apoptosis. 2000. Disponível em: www.nature.com.

HOLLERT, Henner *et al.* A New Sediment Contact Assay to Assess Particle-bound Pollutants Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. 2005

HU, Shengchao *et al.* Impact of co-exposure to titanium dioxide nanoparticles and Pb on zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 233, p. 579–589, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.009>

HUETTENBRENNER, Simone *et al.* The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 235–249, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00110-2)

IAMSAARD, Sitthichai *et al.* Effect of chronic stress on expression and secretion of seminal vesicle proteins in adult rats. n. July, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/and.13800>

IBAMA, 2015. Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais

IBRAM - Mineração Brasil, Instituto Brasileiro de Mineração – Mineração em números – dados econômicos 2022

JEZIERSKA, Barbara *et al.* The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9284-4>

KAIZER, Rosilene R. *et al.* Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *In:* , 2005. **Journal of**

Inorganic Biochemistry. Elsevier Inc., 2005. p. 1865–1870. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.06.015>

KAMASZEWSKI, Maciej *et al.* Effects of artemia sp. Enrichment with essential fatty acids on functional and morphological aspects of the digestive system in *Acipenser gueldenstaedtii* larvae. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** v. 14, n. 4, p. 929–938, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_4_12

KAMPINGA, Harm H.; CRAIG, Elizabeth A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm2941>

KELMAN, Zvi. PCNA: structure, functions and interactions. 1997.

KENNEDY, C. J. Toxicology | The Toxicology of Metals in Fishes. **Elsevier Inc.**, 2011. v. 3 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00236-7>

KIMMEL, Charles B *et al.* Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. 1995.

KOSMEHL, Thomas *et al.* A combined DNA-microarray and mechanism-specific toxicity approach with zebrafish embryos to investigate the pollution of river sediments. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 245–253, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.01.005>

KOSMEHL, Thomas *et al.* A NOVEL CONTACT ASSAY FOR TESTING GENOTOXICITY OF CHEMICALS AND WHOLE SEDIMENTS IN ZEBRAFISH EMBRYOS **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2006.

KRONE, Patrick H. *et al.* Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. **Elsevier Ltd**, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcedb.2003.09.018>

LAMMER, E. *et al.* Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196–209, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>

LI, Mingyue *et al.* Heavy metals in surface sediments in the trans-Himalayan Koshi River catchment: Distribution, source identification and pollution assessment. **Chemosphere**, v. 244, p. 125410, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125410>

LIMA, Daína *et al.* Invitro and invivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 45–51, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.005>

LINDE-ARIAS, Ana Rosa *et al.* Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 974–979, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.05.006>

LUSHCHAK, Volodymyr I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

MACKLIN, Mark G *et al.* Physical stability and rehabilitation of sustainable aquatic and riparian ecosystems in the rio guadiamar, spain, following the aznalc6llar mine tailings dam failure. **IMW A Congress**, 1999. Disponível em: www.IMWA.info.

MAHIQUES, Michel Michaelovitch *et al.* Mud depocentres on the continental shelf: a neglected sink for anthropogenic contaminants from the coastal zone. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, n. 1, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4782-z>

JÖNSSONA, Maria E. *et al.* Ahr2-dependance of PCB126 effects on the swimbladder in relation to expression of CYP1 and cox-2 genes in developing zebrafish. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.09.023>.Ahr2-dependance

MAÑE, Ana M. *et al.* Exposure to Landfill Leachates Affects the Embryonic Development of Zebrafish, *Danio rerio*: A Case Study in Yucatan, Mexico. **Bulletin of Environmental Contamination and**

Toxicology, v. 108, n. 3, p. 526–531, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03237-0>

MASSEI, Riccardo *et al.* Toxicity and neurotoxicity profiling of contaminated sediments from Gulf of Bothnia (Sweden): a multi-endpoint assay with Zebrafish embryos. **Environmental Sciences Europe**, v. 31, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0188-y>

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism., 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>

McCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. (1990). Production in: Biomarkers of environmental contamination / edited by John F. McCarthy, Lee R. Shugart Lewis Publishers, Chelsea.

MELO, Luis Henrique *et al.* Low salinity negatively affects early larval development of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Insights from skeletal muscle and molecular biomarkers. **Zygote**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0967199419000431>

MENDES, Lucas Bueno *et al.* Ecotoxicological Assessment of the Doce River Surface Water After the Fundão Dam Collapse. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 16, n. 5, p. 608–614, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ieam.4291>

MORAES, Bibiana Silveira *et al.* Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 68, n. 8, p. 1597–1601, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.006>

NABINGER, Débora Dreher *et al.* Nickel exposure alters behavioral parameters in larval and adult zebrafish. **Science of the Total Environment**, v. 624, p. 1623–1633, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.057>

NARYZHNY, Stanislav N; LEE, Hoyun. Characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) isoforms in normal and cancer cells : There is no cancer-associated form of PCNA. v. 581, p. 4917–4920, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.09.022>

NEVES Filho, Hilton *et al.* Responsabilidade civil por dano ambiental decorrente do rompimento das barragens do Fundão , em Mariana , Minas Gerais Civil liability for environmental damage caused by the disruption of the Fundão dams in Mariana , Minas Gerais. n. Mdl, 2017.

NGUYEN, Thu Hang *et al.* Developmental toxicity of *Clerodendrum cyrtophyllum* turcz ethanol extract in zebrafish embryo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113538>

NORDBERG, Gunnar F. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. **Toxicology Letters**, v. 192, n. 1, p. 45–49, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.06.859>

NOWAKOWSKA, Karolina *et al.* Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: Bioaccumulation, physiological and histological changes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 229, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108670>

OECD Guidelines O, The FOR, Of T (2013) OECD guidelines for testing of chemicals. Dermatotoxicology 509–511. <https://doi.org/10.3109/9781841848570-66>

OLÍAS, Manuel *et al.* Groundwater contamination evolution in the Guadiamar and Agrio aquifers after the Aznalcóllar spill: Assessment and environmental implications. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 6, p. 3629–3641, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2212-6>

OSBORNE, Olivia J. *et al.* Effects of particle size and coating on nanoscale Ag and TiO₂ exposure in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 8, p. 1315–1324, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.737484>

PAITHANKAR, Jagdish Gopal *et al.* Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. **Chemosphere**, v. 262, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128350>

PASCHOALINI, A. L. *et al.* Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, n. November 2018, p. 539–550, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.047>

PASSOS, Larissa Souza *et al.* Is the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) three years after the Samarco mining dam collapse? **Science of the Total Environment**, v. 736, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139644>

PAYNE, J F *et al.* Acetylcholinesterase, an Old Biomarker with a New Future? Field Trials in Association with Two Urban Rivers and a Paper Mill in Newfoundland **Marine Pollution Bulletin**. 1996.

PIRES, José Maurício Machado *et al.* Potencial poluidor de resíduo sólido da Samarco Mineração: estudo de caso da barragem de Germano. **Revista Árvore**, v. 27, n. 3, p. 393–397, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-67622003000300017>

PIRH-DOCE, 2010. Plano integrado de recursos hídricos da bacia hidrográfica do rio Doce e planos de ações para as unidades de planejamento e gestão de recursos hídricos no âmbito da bacia do rio Doce. <http://www.cbhdoce.org.br/pirh-parh-pap/pirh>

QIAN, Le *et al.* Mechanisms of developmental toxicity in zebrafish embryos (*Danio rerio*) induced by boscalid. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 478–487, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.012>

QUEIROZ, Hermano M. *et al.* The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? **Science of the Total Environment**, v. 637–638, p. 498–506, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.370>

RAJESHKUMAR, Sivakumar *et al.* Ecotoxicology and Environmental Safety Effects of heavy metals on antioxidants and expression of HSP70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 8–18, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.029>

REDELSTEIN, R. *et al.* Bioaccumulation and molecular effects of sediment-bound metals in zebrafish embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16290–16304, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5328-3>

REIS, Deyse Almeida *et al.* Influence of environmental and anthropogenic factors at the bottom sediments in a Doce River tributary in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 7456–7467, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8443-5>

RENU, Kaviyarasi *et al.* Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity – A review. **Chemosphere**, v. 271, p. 129735, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129735>

RIBEIRO, Renan Xavier *et al.* Ecotoxicological assessment of effluents from Brazilian wastewater treatment plants using zebrafish embryotoxicity test: A multi-biomarker approach. **Science of the Total Environment**, v. 735, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139036>

RICE, Eugene W. *et al.* Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (SMWW), 23^o Edição, 2017,

RICHARD, Eduardo da Cunha *et al.* Water and Sediment Quality in the Coastal Zone Around the Mouth of Doce River After the Fundão Tailings Dam Failure. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 16, n. 5, p. 643–654, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ieam.4309>

ROCHA, Paula Suares *et al.* Sediment-contact fish embryo toxicity assay with Danio rerio to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p. 1951–1959, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.009>

ROCHE C, Thygesen K, Baker E (2017) Mine Tailings Storage: Safety Is No Accident. UNEP Rapid Response Assessment. **United Nations Environment Programme** <https://www.grida.no/publications/383>

RODA, Jéssica Fernanda Bernardes *et al.* Microplastics and copper effects on the neotropical teleost Prochilodus lineatus: Is there any interaction? **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 242, n. December 2019, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110659>

SAIKI, Patrícia *et al.* Sediment toxicity assessment using zebrafish (Danio rerio) as a model system: Historical review, research gaps and trends. **Elsevier B.V.**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148633>

SANTANA, Manuela S. *et al.* Pesticide effects on fish cholinesterase variability and mean activity: A meta-analytic review. **Science of the Total Environment**, v. 757, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143829>

SANTOS, Dércia *et al.* Microplastics and copper induce apoptosis, alter neurocircuits, and cause behavioral changes in zebrafish (Danio rerio) brain. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113926>

SANTOS Miron, Denise *et al.* Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (Rhamdia quelen) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 3, p. 398–403, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.019>

SANTOS RSP, WANDERLEY LJ. Dependência de barragem, alternativas tecnológicas e a inação do Estado: repercussões sobre o monitoramento de barragens e o licenciamento do Fundão. Antes fosse mais leve a carga: reflexões sobre o desastre da Samarco/ Vale/BHP Billiton. Marabá: iGuana; 2016. p.87-139.

SAVASSI, Lourenço Almeida. **BIOMARCADORES DE IMPACTO AMBIENTAL EM PEIXES DA BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO, MG**, 2019.

SEGNER, Helmut. Zebrafish (Danio rerio) as a model organism for investigating endocrine disruption. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 187–195, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.099>

SEGURA, Fabiana Roberta *et al.* Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, v. 218, p. 813–825, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>

SELVARAJ, Vellaisamy *et al.* Arsenic trioxide (As₂O₃) induces apoptosis and necrosis mediated cell death through mitochondrial membrane potential damage and elevated production of reactive oxygen species in PLHC-1 fish cell line. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1201–1209, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.039>

- SENGER, Mario Roberto *et al.* Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Cell Biology and Toxicology**, v. 27, n. 3, p. 199–205, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9181-y>
- SFAKIANAKIS, D. G. *et al.* Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. **Academic Press Inc.**, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.014>
- SIMON, M *et al.* Contaminación del suelo por oxidación de relaves del derrame tóxico de una mina de pirita. **The Science of the Total Environment**, v. 279, p. 6374, 2001.
- SIGLER John W. *et al.*, (1984) Effects of chronic turbidity on density and growth of steelheads and coho salmon. **Trans Am Fish Soc** 113(May):142–150. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1984\)113<142:EOCTOD>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1984)113<142:EOCTOD>2.0.CO;2)
- SOMASUNDARAM, Sripoorna *et al.* Cellular and molecular basis of heavy metal-induced stress in ciliates. **Current Science**, v. 114, n. 9, p. 1858–1865, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.18520/cs/v114/i09/1858-1865>
- SPODICK, D. H. Acute pericarditis: current concepts and practice. **JAMA**, v. 289, n. 9, p. 1150-3, 2003.
- SREEDHAR, Amere Subbarao; CSERMELY, Peter. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis : new strategies in tumor therapy **A comprehensive review.**, v. 101, p. 227–257, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.11.004>
- STRMAC, M. Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. 1, p. 24–38, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jfbi.2002.1919>
- THELLMANN, Paul *et al.* Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16405–16416, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3785-8>
- TJAHJONO, Agus; SUWARNO, Djoko. The spatial distribution of heavy metal lead and cadmium pollution and coliform abundance of waters and surface sediment in demak. **Journal of Ecological Engineering**, v. 19, n. 4, p. 43–54, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.12911/22998993/89715>
- TOMA, Nusrat Jahan *et al.* Lead and lead–arsenic combined exposure induces mortality and developmental impairments in zebrafish embryos: a study using wild-caught zebrafish from Bangladesh Pages 2833–2842 2021 <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.1996594>
- TRIEBSKORN, Rita *et al.* Biomarkers as Diagnostic Tools for Evaluating Effects of Unknown Past Water Quality Conditions on Stream Organisms. 2002.
- TRIEBSKORN, Rita *et al.* The project VALIMAR (VALIdation of bioMARkers for the assessment of small stream pollution): Objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, [s. l.], v. 8, n. 3–4, p. 161–178, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1012902209178>
- VAN DER OOST, Ron *et al.* Soil Quality Field Kit: Part II. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 13, n. February, p. 57–149, 2016.
- VERGILIO, Cristiane dos Santos *et al.* Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62700-w>
- VIGANÒ, Luigi *et al.* Embryo/larval toxicity and transcriptional effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to endocrine active riverbed sediments. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 10729–10747, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07417-8>
- VON HELLFELD, Rebecca *et al.* Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*)

embryos. **Environmental Sciences Europe**, v. 32, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00398-3>

WEBER, André Alberto *et al.* 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**, v. 190, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>

WESSLER, Leticia B. *et al.* Acute exposure to leucine modifies behavioral parameters and cholinergic activity in zebrafish. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 78, p. 222–226, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.10.001>

YAMASHITA, Michiaki *et al.* Extensive apoptosis and abnormal morphogenesis in pro-caspase-3 transgenic zebrafish during development. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 12, p. 1874–1881, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.012690>

ZHANG, Qiang *et al.* Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 4, p. 707–719, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1417-9>

ZHANG, Qun Fang *et al.* Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 181, p. 76–85, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.029>

ZHAO, Wen Jun *et al.* Environmentally relevant concentrations of arsenic induces apoptosis in the early life stage of zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 227, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112883>