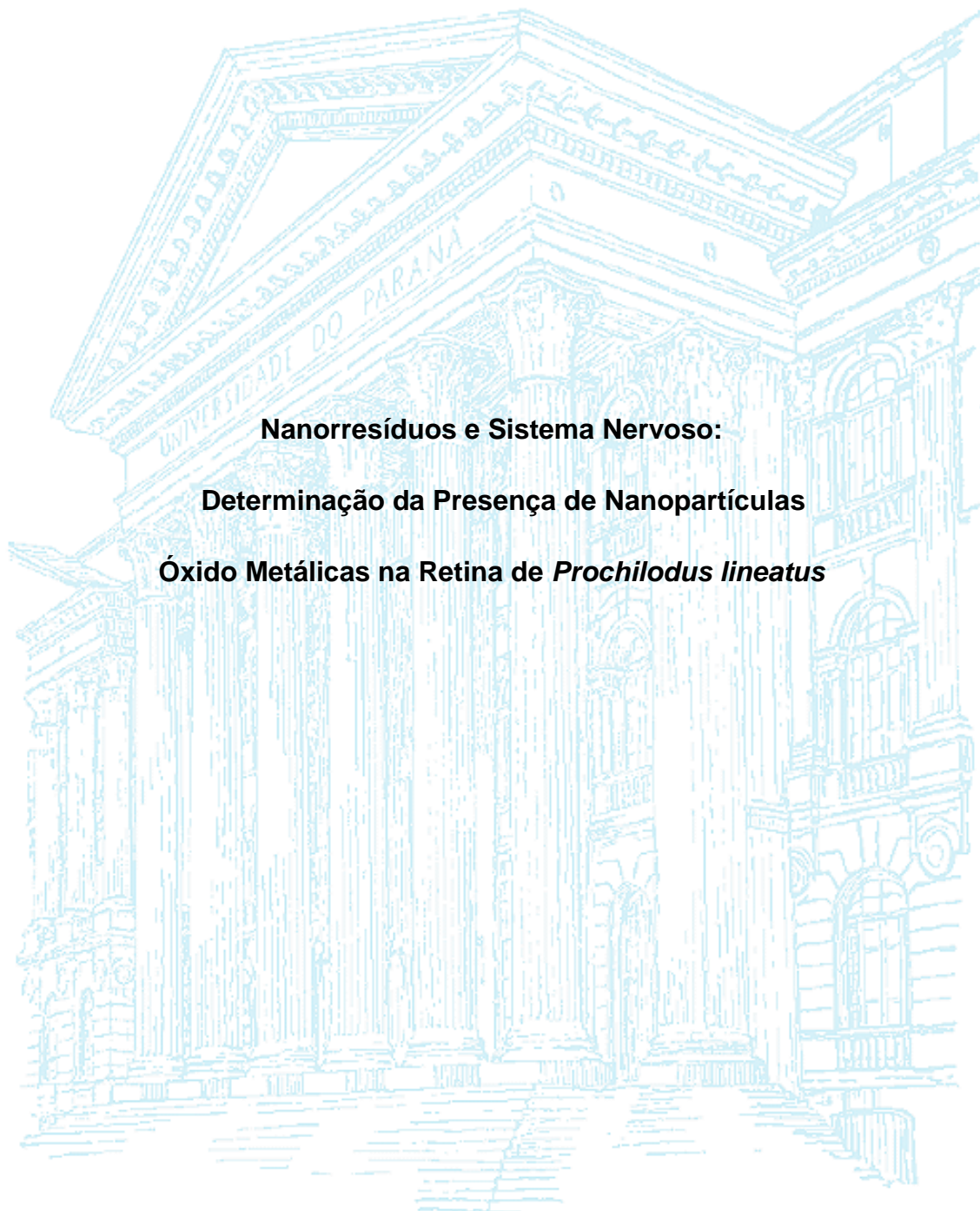


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IZABELA PAULINI DE JESUS



**Nanorresíduos e Sistema Nervoso:  
Determinação da Presença de Nanopartículas  
Óxido Metálicas na Retina de *Prochilodus lineatus***

CURITIBA

2013

IZABELA PAULINI DE JESUS

**Nanorresíduos e Sistema Nervoso:  
Determinação da Presença de Nanopartículas  
Óxido Metálicas na Retina de *Prochilodus lineatus***

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como  
parte dos requisitos para obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Prof. Dr. Sonia Regina Grötzner**

**Coorientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto.**

CURITIBA

2013

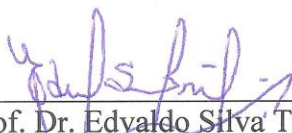
**PARECER DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO  
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DA DISCIPLINA  
DE ESTÁGIO CURRICULAR**

Aos 06 dias do mês de Março de 2013, a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta por Prof<sup>a</sup> Dra. Sonia Regina Grötzner, Prof. Dr. Edvaldo Silva Trindade e Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho, reuniu-se para proceder a avaliação da Monografia intitulada “Nanorresíduos e Sistema Nervoso: Determinação da Presença de Nanopartículas Óxido Metálicas na Retina de *Prochilodus lineatus*” de autoria da acadêmica Izabela Paulini de Jesus.


A Comissão julgou o trabalho e atribui a nota 10,0 (dez)



Prof<sup>a</sup> Dra. Sonia Regina Grötzner  
Prof.(a) Orientador(a)



Prof. Dr. Edvaldo Silva Trindade  
Membro da Comissão



Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho  
Membro da Comissão

Curitiba, 06 de Março de 2013.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, Ivone, Ataíde, Cristiano, Natalia, Gabriela, Tiago e Daiana, em especial a minha Mãe, dedicada, atenciosa, sempre apoiando meus sonhos e planos, não permitindo que eu desistisse. Compartilhando as alegrias e angústias, me ajudando a crescer. Também pelas minestras nos jantares! Muito obrigada Mãe!

À minha orientadora Sonia Regina Grötzner, pela oportunidade de “fazer ciência”, pela amizade, pela atenção, pela paciência, pelo aprendizado, pela experiência, pela confiança. Pelos cafés e pelos abraços. Muito obrigada “Mãe Científica”!

Ao meu coorientador, Francisco Filipak Neto pelos preciosos conselhos, ideias e também pela disponibilidade em me co-orientar em duas monografias. Aos Professores Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro e Dr. Marco Randi pela oportunidade e aprendizado. Obrigada!

Ao meu namorado Thiago, pelo companheirismo, carinho e incentivo nos momentos difíceis. Por me fazer ainda mais feliz. Obrigada!

Aos meus colegas e professores da graduação que direta ou indiretamente ajudaram na construção do meu conhecimento técnico, mas também do interpessoal. Em especial aos colegas Fernanda, Bruna, Vanessa, Jenifer, Rafaela, Ana, Claudia, Daniel, Douglas, Rodrigo, Adriano. Obrigada!

Aos meus colegas de laboratório pelo auxílio e pela troca de ideias. Em especial a Maritana Mela pela contribuição e persistência na padronização da técnica da autometalografia. Também a Renata Rank Miranda e Ana Luisa R. D. Silveira pelo auxílio na manutenção do bioensaio. À Ellie López Barrera pelas ideias, artigos e livros.

Aos técnicos, Luís pelo aprendizado da manipulação do ultramicrotomo do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, e a Alessandra Cristina Santos, pela obtenção de imagens no Escâner de Lâminas. Ao Laboratório de Citogenética Animal da UFPR, pelo uso do sistema de captura de imagem microscópica. À Julia, pelo acolhimento e conselhos, mas também pelos cafés e bolachas. Obrigada!

À Fundação Araucária por financiar este projeto.

À Piscicultura Panamá pelo fornecimento dos peixes.



Disponível em: <<http://www.guardian.co.uk/nanotechnology-world/a-user-s-guide-to-nanotechnology>>  
Acesso em: 08/11/2012

## RESUMO

Várias áreas do conhecimento empregam materiais nanotecnológicos para fabricação ou refinamento de seus produtos e processos. Assim, há um aumento da produção antrópica de nanopartículas e, conseqüentemente, uma maior quantidade de nanorresíduos não-naturais está sendo lançada no ambiente. Já há várias pesquisas mostrando que a interação entre nanorresíduos e animais pode ser prejudicial. Neste trabalho são estudados dois tipos de nanopartículas: as de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e as de óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ). Ambas são fotorreativas, o que pode causar toxicidade na estrutura responsável pela percepção da luz, o olho. Com o objetivo de analisar se essas nanopartículas podem chegar até a retina e outras estruturas oculares de peixes expostos a essas, os seguintes experimentos de exposição subcrônica e aguda foram realizados: 128 *Prochilodus lineatus* (Curimatá) foram acondicionados em 16 aquários de 25 l. Os peixes foram divididos em 8 grupos: controle (o qual não foi exposto à nanopartículas), nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  nas concentrações 0,1, 1 e 10  $\mu\text{g/l}$ , nanopartículas de  $\text{ZnO}$  em 7, 70 e 700  $\mu\text{g/l}$  e uma mistura de ambas as nanopartículas nas concentrações intermediárias. Quanto a caracterização das nanopartículas, a forma foi analisada através do Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) e a dimensão e o potencial zeta foram analisados através do *Zetasizer*. A técnica da autometalografia foi utilizada para verificar se é possível amplificar o sinal dessas nanopartículas para visualização em microscopia de luz e também para localizar as possíveis nanopartículas nos tecidos oculares. Esta tem por princípio detectar metais em tecidos através da precipitação de prata, formando depósitos de prata. Para análise intra e sub-celular, foi utilizado o MET. Os resultados mostram que as nanopartículas estavam irregulares, sob MET. O potencial zeta das nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  foi de -19,2 mV e as de  $\text{ZnO}$  foi de +22,6 mV, indicando que as suspensões estoques estavam instáveis e havia agregados de nanopartículas (nano). A maior quantidade de nano  $\text{TiO}_2$  na suspensão estoque mediam aproximadamente 780 nm e os nano  $\text{ZnO}$  480 nm. A autometalografia mostrou que são formados depósitos de prata sobre agregados de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  e também que, após exposição de 5 dias, há depósitos de prata em todas as camadas da retina analisadas e nervo óptico, independente das concentrações ou dos tipos de nanopartículas. Na exposição subcrônica, além da retina e nervo óptico, a córnea, o cristalino e a cartilagem da esclera também apresentaram depósitos de prata. Apesar disso, análises subjetivas mostram que as camadas nucleares da retina apresentaram mais depósitos de prata, se comparadas às camadas plexiformes. Essa mesma análise mostra ainda que amostras da retina da exposição aguda apresentaram menor quantidade de depósitos de prata do que a exposição subcrônica, também independente de concentração ou de nanopartícula. Os materiais eletrondensos encontrados nas amostras são um forte indício da presença de nano  $\text{TiO}_2$  nas amostras de retina. Os pontos eletrondensos foram observados dentro de vesículas endocíticas possivelmente em células de Müller; no citoplasma, núcleo e axônio de, provavelmente, de células ganglionares; no interior do segmento externo de cones simples e duplos. Mas os materiais eletrodensos não foram visualizados em segmento externo acessório e nos processos calicais das últimas células citadas. Concluímos que, mesmo os agregados de  $\text{TiO}_2$  e de  $\text{ZnO}$  têm a capacidade de penetrar na retina e em outras estruturas oculares de *P. lineatus*.

Palavras-chave: retina; nanopartícula;  $\text{TiO}_2$ ;  $\text{ZnO}$ ; autometalografia;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das áreas do conhecimentos e exemplos de aplicações envolvidos com a Nanociência e Nanotecnologia. ....	12
Figura 2. Esquema que compara as dimensões de uma nanopartículas a célula de mamífero	13
Figura 3. Esquema que indica a relação entre o potencial zeta (em mV) e o estabilidade da dispersão.....	15
Figura 4. Secção sagital do olho humano, com esquema ampliado da retina e direção da entrada da luz nesta estrutura. ....	16
Figura 5. Esquema de um corte sagital de olho de peixe teleósteo.....	17
Figura 6. Estrutura da retina e indicação das dez camadas histológicas, descritas no texto. ....	18
Figura 7. Tipos de fotorreceptores em teleósteos. ....	20
Figura 10. Exemplar juvenil de <i>Prochilodus lineatus</i> (Curimbatá).....	26
Figura 11. Desenho experimental das exposições aguda e sub-crônica.....	29
Figura 12. Princípio da autometalografia.....	31
Figura 13. Lâminas testadas no experimento de teste da marcação de nanopartículas pela autometalografia. ....	33
Figura 14. Eletromicrografias das suspensões de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> e ZnO. ....	34
Figura 15. Distribuição do tamanho das nanopartículas de ZnO.....	35
Figura 16. Distribuição do tamanho das nanopartículas de TiO <sub>2</sub> .....	35
Figura 17 Fotomicrografias do teste de deposição de prata sobre nanopartículas.....	37
Figura 18. Corte histológico do olho de <i>P. lineatus</i> corado com Hematoxilina e Eosina.....	38
Figura 19 Retina de <i>P. lineatus</i> após a técnica de <i>Bleaching</i> , seguida pela coloração por Hematoxilina e Eosina .....	39
Figura 20. Fotomicrografia da retina de <i>P. lineatus</i> do grupo controle, indicando as 10 camadas histológicas e as 6 principais células. ....	40
Figura 21. Camadas da retina de <i>P. lineatus</i> onde foram observados os depósitos de prata....	41

Figura 22 Camadas da retina de <i>P. lineatus</i> . onde foram observados os depósitos de prata.....	42
Figura 23. Retina de <i>P. lineatus</i> . Setas indicam depósitos de prata.....	43
Figura 24. Tecidos com depósitos de prata: nervo óptico, córnea, cristalino e cartilagem .....	44
Figura 25. Retina com pontos eletrodensos, sob MET – axônios.....	45
Figura 26. Retina com pontos eletrodensos, sob MET – microtúbulos e mitocôndrias.....	46
Figura 27. Secção transversal de cone simples da retina de <i>P. lineatus</i> , sob MET .....	46
Figura 28. Cone duplo de retina de <i>P. lineatus</i> , sob MET .....	47
Figura 29. Vesículas endocíticas na retina de <i>P. lineatus</i> , sob MET .....	48



## LISTA DE ABREVIações

MET – Microscópio Eletrônico de Transmissão

Nano TiO<sub>2</sub> – agregados de nanopartículas de dióxido de titânio

Nano ZnO – agregados de nanopartículas de óxido de zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 NANOTECNOLOGIA .....	11
1.2 VISÃO.....	15
1.3 NANOPARTÍCULAS E O SISTEMA NERVOSO.....	22
1.4 ANIMAL EXPERIMENTAL .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	27
2.1. OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
3.1 NANOPARTICULAS: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	28
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL .....	29
3.3 ANÁLISES .....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	34
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS .....	34
4.2 MICROSCOPIA DE LUZ .....	36
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	44
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	49
5.1 BIOENSAIO E NANOPARTÍCULAS.....	49
5.2 MICROSCOPIA DE LUZ .....	50
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	52
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55
<b>APÊNDICES</b> .....	62

## 1. INTRODUÇÃO

A capacidade humana de criar e inovar trouxe, e vem trazendo, inúmeros benefícios para o desenvolvimento das sociedades. Mas, essas produções sempre vêm acompanhadas de inúmeras outras questões, dentre elas, as relacionadas às influências das tecnologias sobre o ambiente. Já a indícios na literatura de que alguns resíduos dessas novas tecnologias têm potenciais efeitos negativos sobre os organismos. Esse conhecimento é necessário para entender melhor quais são os benefícios e malefícios das tecnologias, ponderá-los, e assim regulamentar a utilização e consumo dos materiais tecnológicos.

### 1.1 NANOTECNOLOGIA

A Nanotecnologia nomeia a ação de manipular materiais em dimensões nanométricas, a fim de criar ou melhorar produtos e processos, como mostra a figura 1. Esse conceito foi publicado pela primeira vez por Norio Taniguchi em 1974 em seu artigo intitulado “*On the Basic Concept of Nanotechnology*” (TANIGUCHI, 1974 in RAMSDEN, 2005). Embora Richard Philips Feynman tenha falado sobre esse tema numa palestra da *Sociedade Americana de Física*, em 1959, mas não utilizado o termo *Nanotecnologia* (SHEW, 2008).

Estima-se que a produção global de materiais nanoestruturados seja de 58 mil toneladas por ano entre os anos de 2011 e 2020 (MAYNARD, 2006). Segundo o MCTI<sup>1</sup>, o investimento em Nanotecnologia no Brasil pode chegar a 110 milhões, especialmente nos laboratórios de pesquisa do MCTI, pesquisas de universidades que integram o sistema SisNANO<sup>2</sup>, além de empresas (BRASIL PORTAL, 2012).

---

<sup>1</sup> MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

<sup>2</sup> Sis NANO - Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias

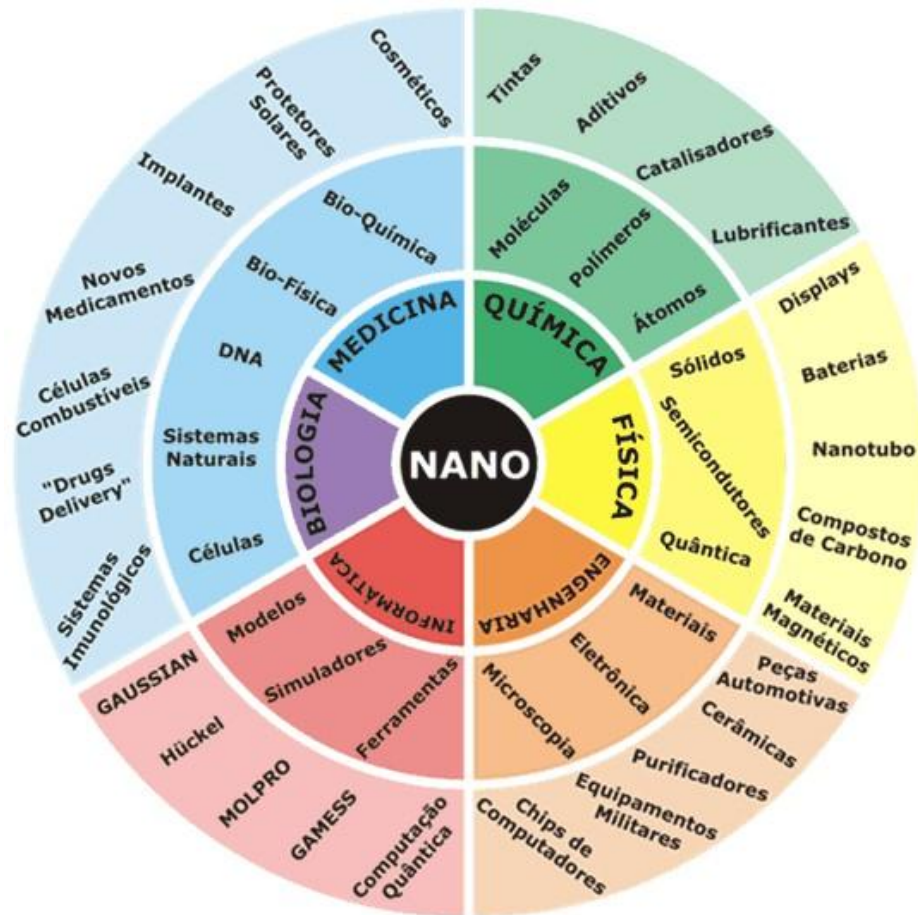


Figura 1. Esquema das áreas do conhecimento e exemplos de aplicações envolvidos com a Nanociência e Nanotecnologia. Disponível em: <[http://nanotech.ica.ele.puc-rio.br/nano\\_introducao.asp](http://nanotech.ica.ele.puc-rio.br/nano_introducao.asp)> Acesso em: 21/01/2013

O termo em inglês *nanowaste* pode ser traduzido como *nanorresíduos*, o qual se refere aos resquícios do consumo e produção de materiais nanotecnológicos. Os nanorresíduos incluem nanopartículas, compósitos, misturas, metais puros e aerossóis solúveis e insolúveis (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA *et al.*, 2009).

Nanopartículas são estruturas com pelo menos uma das dimensões igual ou inferior a 100 nm, segundo a *American Society for Testing and Materials* (2006). Um nanômetro (nm) corresponde à bilionésima parte do metro, ou a milésima parte de um fio de cabelo (FILIPPONI; SUTHERLAND, 2010). Nanopartículas de 10nm apresentam um tamanho bastante reduzido quando comparadas à uma célula de 2

micrometros, à proteínas (figura 2a), aos fosfolipídeos (1-2nm) e à estruturas relacionadas a bicamada lipídica (figura 2b)

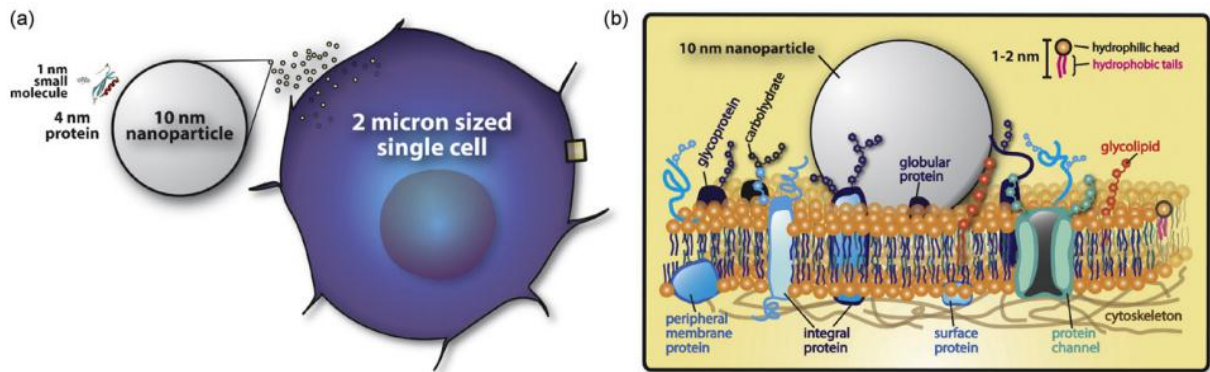


Figura 2. Esquema que compara as dimensões de uma nanopartículas de 10 nm: (a) uma célula de mamífero de 2 µm, pequenas moléculas e proteínas (b) a bicamada lipídica, a um fosfolipídeo e a estruturas associadas a membrana celular. Fonte: SUH, W. H. *et al.*, 2009

As nanopartículas podem ter uma dimensão (por exemplo, filmes), duas dimensões (tubos) ou três dimensões (partículas). As estruturas em escala nanométrica são distintas das em escala superior, também por apresentarem características bastante específicas, mesmo tendo composição química idêntica. Por exemplo, o ouro em macroescala é praticamente inerte, mas quando nanoparticulado torna-se altamente reativo (SERVICE, 2004). Quanto à gênese, as estruturas nanométricas são encontradas naturalmente como produtos de atividade vulcânica e da combustão incompleta, a qual produz nanopartículas de carbono presentes na fuligem. Nanopartículas de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) são encontradas em magnetossomos de bactérias magnetotáticas que se locomovem orientadas por meio do campo magnético da Terra (MATSUNAGA *et al.*, 2007).

Devido as suas propriedades especiais, as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  podem ser produzidas em laboratório para serem exploradas comercialmente. Dentre essas propriedades as que se destacam são a alta reatividade, fotocatalise, ação bactericida e efeito bloqueador de radiação ultravioleta. As nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  podem ser produzidas através dos minerais anatase ou rutilo.

O sucesso das nanopartículas está na alta relação superfície/volume das nanoestruturas, o que confere essas características específicas já citadas. Por

exemplo, uma partícula de 30 nm tem cerca de 10% de suas moléculas na superfície, enquanto que uma partícula de 10 nm e 3 nm essa porcentagem aumenta para 20% e 50%, respectivamente (NEL *et al.*, 2006).

Entre os seis nanomateriais mais utilizados no ano de 2008 estão as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  (WOODROW WILSON INTERNATIONAL CENTRE FOR SCHOLARS, 2008 *apud* MUSEE, 2011). Ambas nanopartículas são utilizadas principalmente na formulação de protetor solar, por oferecerem maior proteção contra os raios UVA e UVB, se comparadas a outros componentes químicos, além de facilitarem a absorção pela pele. Mas ainda não há um consenso quanto à segurança para a saúde dos usuários de protetor solar contendo nanopartículas, principalmente, de  $\text{TiO}_2$  (NEWMAN *et al.*, 2009).

Os resíduos do consumo e produção dos nanomateriais acabam alcançando o solo, o ar e a água (NOWACK; BUCHELI, 2007; BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA *et al.*, 2009; ASCHBERGER *et al.*, 2011) e podem atingir os organismos presentes nestes ambientes.

Há uma classificação qualitativa de nanorresíduos, composta por classes que variam de I (não tóxicos)<sup>3</sup> até a classe V (muito ou extremamente tóxicos)<sup>4</sup> (MUSSE 2011). Segundo esta classificação, os nanomateriais de  $\text{ZnO}$  estão na classe II (perigoso ou tóxico) e podem ser encontrados em alimentos, bebidas, protetores solares e agentes polidores. Já os nanorresíduos de  $\text{TiO}_2$  pertencem a classe I, e além de estarem presentes nos produtos citados anteriormente, também são encontrados na linha de higiene pessoal.

Dentre as nanopartículas mais estudadas<sup>5</sup> nenhuma foi classificada como “não perigosa” em estudos *in vivo*<sup>6</sup> (KAHRU E DUBOURGUIER, 2010).

---

<sup>3</sup> Os nanorresíduos da classe 1 incluem painéis solares, chips de memória, agentes polidores e componentes de televisores.

<sup>4</sup> A classe 5 é composta por pesticidas, protetor solar e alimentos e bebidas contendo fulerenos em suspensão coloidal.

<sup>5</sup> As nanopartículas mais estudadas são  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{CuO}$ ,  $\text{Ag}$ ,  $\text{C}_{60}$ , nanotubos de carbono de parede simples e de multiparedes

<sup>6</sup> As pesquisas utilizaram como modelos biológicos: crustáceos, bactérias, algas, ciliados, nematodos, leveduras e peixes.

Em ambiente aquoso, nanopartículas apresentam a tendência de se atraírem e formar agregados de nanopartículas (CHEN; ELIMELECH, 2006). Embora nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  da ordem de 10-20 nm possam ser produzidas através de técnicas pirogênicas, estas existem, nestas dimensões, apenas por 10-200 milissegundos antes de formarem agregados (EPA, 2010). Uma das formas de averiguar o quanto as partículas de uma dispersão tendem a se agregar, ou a estabilidade de suspensões, é a determinação do potencial zeta: um índice de magnitude de interação entre partículas coloidais<sup>7</sup> (MALVERN INSTRUMENTS, 2007). Se as partículas possuírem um potencial zeta elevado, independente de ser negativo ou positivo, estas vão se repelir, pois há forças suficientes para evitar a aproximação das partículas, o que leva a estabilidade da dispersão. Considera-se uma dispersão estável quando as partículas têm potencial zeta mais positivo que 30 mV ou mais negativo que -30 mV, conforme indicado na figura 3.

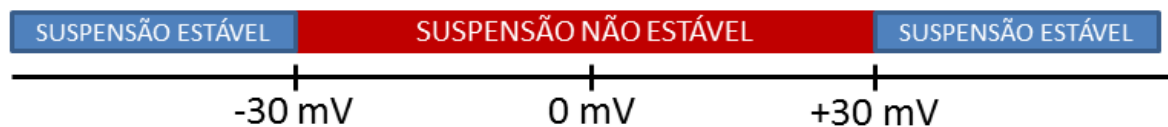


Figura 3. Esquema que indica a relação entre o potencial zeta (em mV) e o estabilidade da dispersão.

Fonte: autor

## 1.2 VISÃO

Os sistemas sensoriais dos animais permitem a percepção e interação destes com o ambiente e com outros indivíduos, possibilitando a sua sobrevivência. A percepção visual é um resultado do funcionamento de várias estruturas em conjunto: olhos, nervo óptico e áreas do encéfalo. Lesões neste sistema podem acarretar dano visual e, conseqüentemente, prejudicar o indivíduo.

Os olhos dos vertebrados possuem estruturalmente os mesmos componentes básicos. Os olhos, como um sensor de luminosidade, parecem estar presentes em organismos desde a era Cambriana, aproximadamente 550 milhões de anos atrás (FERNALD, 2000). Os olhos dos peixe possuem os mesmos

<sup>7</sup> Um sistema coloidal nada mais é do que um dos três estados da matéria (líquido, sólido e gás) finamente disperso em outro

componentes básicos dos vertebrados, como os citados na figura 4, embora haja algumas modificações (figura 5). Os olhos dos teleósteos são caracterizados por uma esclera frágil, uma córnea plana e um cristalino quase globular (KRAAIJ, 2000).

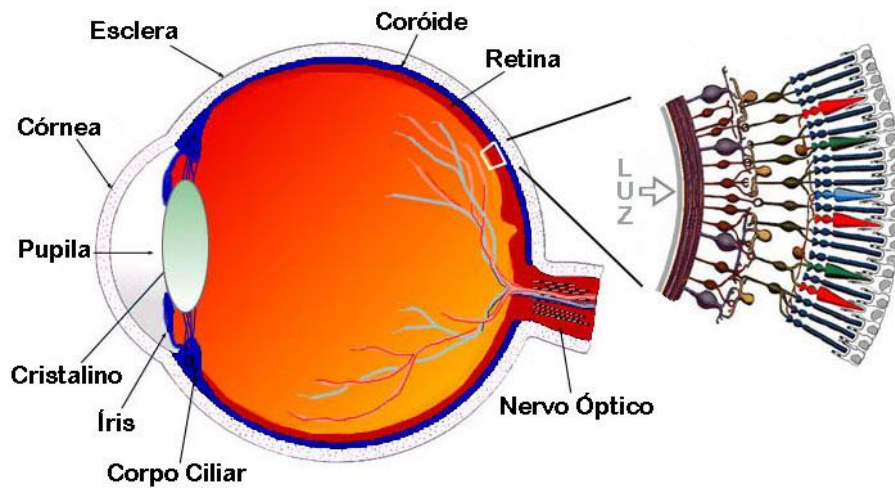


Figura 4. Secção sagital do olho humano, com esquema ampliado da retina e direção da entrada da luz nesta estrutura. Modificado de: <<http://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/introduction/>> Acesso em: 12/02/2011. Tradução nossa.



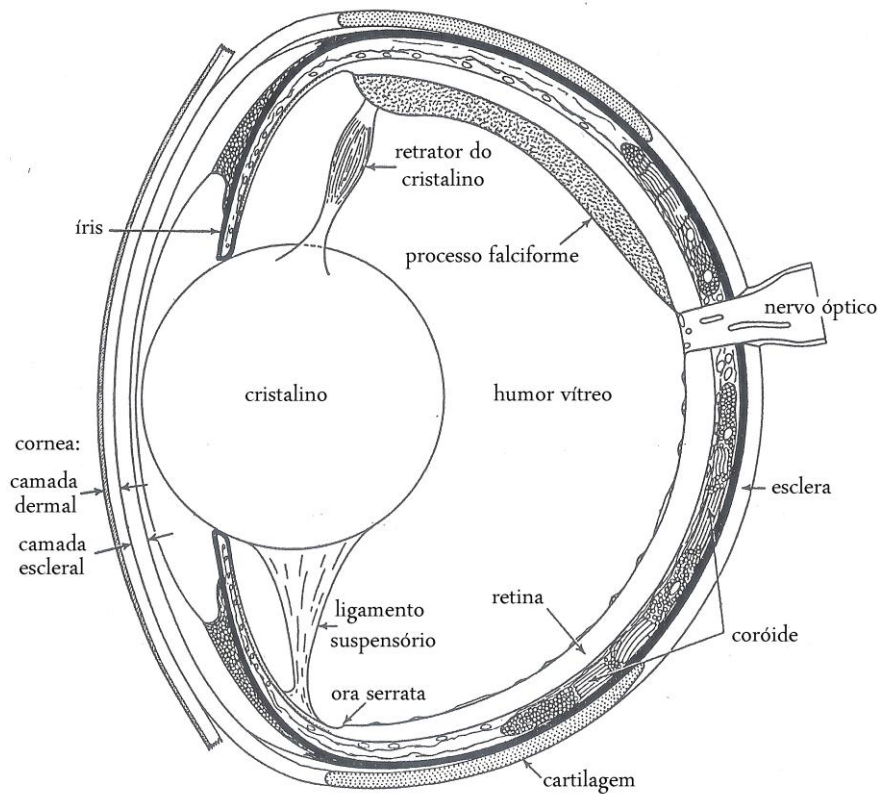


Figura 5. Esquema de um corte sagital de olho de peixe teleosteo. Modificado de WALLS, 1942, p.577, tradução nossa.

Na porção posterior do olho está localizada a retina: uma extensão do Sistema Nervoso Central, responsável pelo processo da fototransdução, isto é, conversão de luz absorvida em impulsos neurais (DOWLING, J. R.; DUBIN, 1984). Este tecido é estruturado em dez camadas histológicas (RAMÓN Y CAJAL, 1983) e nele estão as células fotorreceptoras, os cones e os bastonetes, as quais iniciam o processo descrito anteriormente. Observando a direção da entrada de luz na câmara ocular, entende-se porque a retina precisa ser completamente transparente.

A retina é uma estrutura classicamente dividida em dez camadas histológicas, a partir da estratificação de cinco tipos neuronais. Descrevendo as camadas da retina (figura 6), da região mais externa ao olho para a mais interna, junto ao humor vítreo, temos (1) o epitélio pigmentado, o qual possui células que fagocitam a porção apical dos segmentos externos dos fotorreceptores como processo essencial ao ciclo do ácido retinóico; (2) a camada de fotorreceptores, que contém tanto cones como bastonetes; (3) a membrana limitante externa, constituída pelas porções mais externas dos prolongamentos das células de Müller (glias),

unidas à porção mais interna dos segmentos internos dos fotorreceptores através de desmosomos; (4) a camada nuclear externa, que contém os núcleos dos fotorreceptores; (5) a camada plexiforme externa, onde há sinapses entre os pedículos dos fotorreceptores com as células bipolares e/ou horizontais; (6) a camada nuclear interna, formada pelos núcleos das células horizontais, bipolares, amácrinas e Müller; (7) a camada plexiforme interna, local de sinapses entre bipolares e/ou amácrinas com ganglionares; (8) a camada de células ganglionares, onde também podem ser encontradas células amácrinas deslocadas (RAMÓN Y CAJAL, 1983 *apud* GROTZNER, 2005 ); (9) a camada de fibras nervosas, formadas pelos axônios das células ganglionares, os quais formam o nervo óptico; e por última (10) a membrana limitante interna, constituída pelas porções mais internas dos prolongamentos das células de Müller.

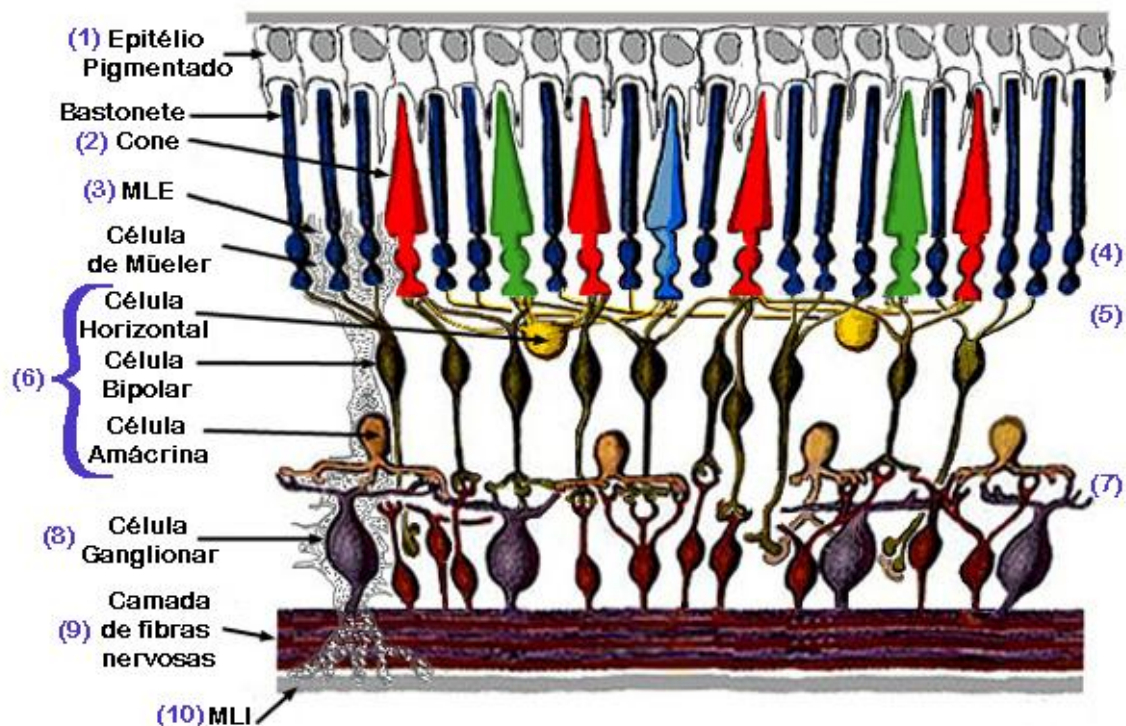


Figura 6. Estrutura da retina e indicação das dez camadas histológicas, descritas no texto. MLE: Membrana Limitante Externa. MLI: Membrana Limitante Interna. Modificada de: <<http://webvision.med.utah.edu/sretina.html>> Acesso em: 10/08/2011. Tradução nossa.

A percepção visual inicia-se com a absorção da luz pelos fotorreceptores (cones e bastonetes) e conversão desta forma de energia em impulsos neurais em um processo denominado de fototransdução (DOWLING & DUBIN, 1984 *apud*

GROTZNER, 2005). Após esse processo a informação visual é propagada através das vias visuais da retina, no sentido dos fotorreceptores para as ganglionares. As células que podem mediar a troca de informações entre os fotorreceptores e as células bipolares são as horizontais. Na maioria dos peixes, quatro tipos de células horizontais foram identificadas (MARSHAK; DOWLING, 1987 *apud* BONCI, 2006). As células bipolares fazem sinapses com os fotorreceptores na camada plexiforme externa e com as células amácrinas e ganglionares na camada plexiforme interna. A maioria das células amácrinas são interneurônios inibitórios, que regulam temporalmente a passagem de informação das bipolares para as ganglionares. O número de tipos diferentes de células amácrinas é estimado entre 30 e 40 morfotipos distintos. As células ganglionares são os últimos neurônios a receber e processar a informação da luz na retina, e disparam potenciais de ação para o nervo óptico e posteriormente para o cérebro, onde será processada a informação visual final.

Os teleósteos possuem 3 principais tipos de fotorreceptores (figura 7.1): bastonetes, cones simples e cones duplos (WALLS, 1942). Estes são constituídos pelas seguintes porções (figura 7.2): segmento externo, repleto de membranas contendo as proteínas visuais, envolvidas no processo da fototransdução; um segmento interno, responsável pela biossíntese; A porção que contém o núcleo da célula; e ,por último, uma terminação sináptica, que contacta os fotorreceptores à célula bipolar e/ou horizontal. Existem diferentes tipos de cones, que diferem tanto na sua morfologia quanto na sua constituição e função. Os cones duplos possuem os dois membros fundidos ao longo do comprimento do segmento interno. Os cones gêmeos são distintos dos cones duplos por serem constituídos por membros do segmento interno estruturalmente indistinguíveis. Apesar da semelhança na estrutura entre os membros do cone gêmeo, os pigmentos visuais podem ser diferentes (LOEW; LYTHGOE, 1978). Já os bastonetes, normalmente apresentam apenas uma variedade. Estes compõem o sistema escotópico enquanto os cones o sistema fotópico.

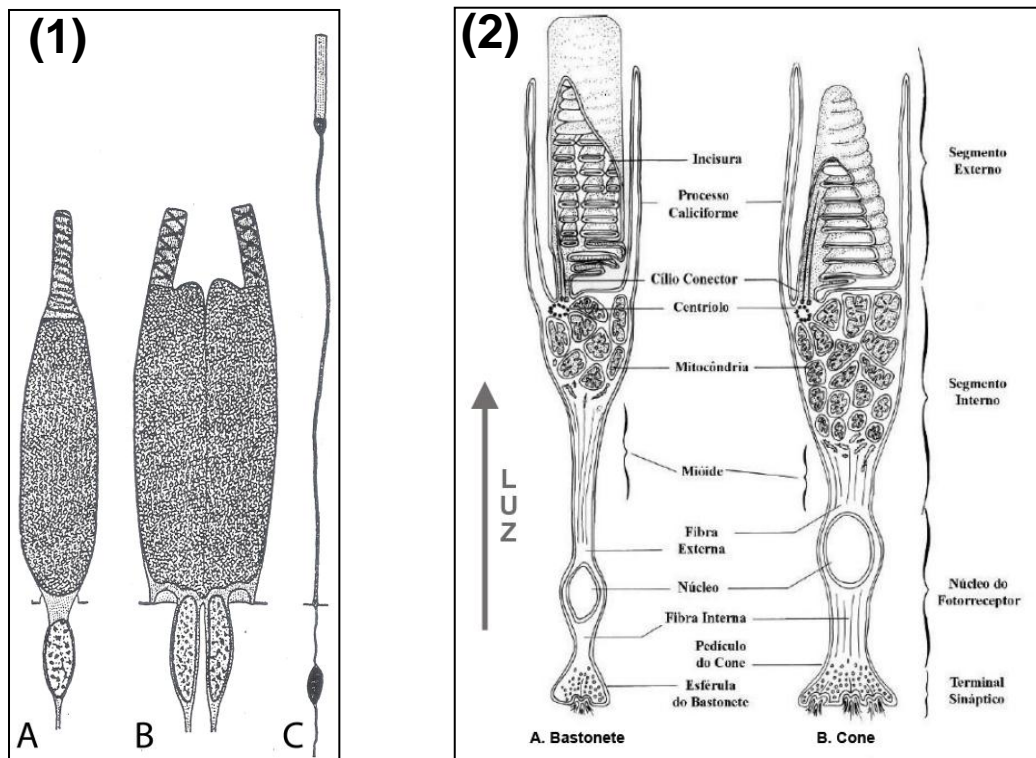


Figura 7. (1) Tipos de fotorreceptores em teleósteos. (A) cone simples; (B) cone pareado; e (C) bastonete (WALLS, 1942) e (2) Estrutura básica de fotorreceptores, (A) bastonetes e (B) cones. Modificado de (ALI, M. A.; KLYNE, 1985 *apud* PRODOCIMO, 2009).

Há ainda alguns adereços nos fotorreceptores, como os processos calicais e o segmento externo acessório (figura 8). Os processos calicais são finos e longos segmentos de membrana que originam-se da região apical dos segmentos internos de cones e bastonetes e se estendem e se ligam aos segmento externo. Sua função pode ser prevenir os movimentos de rotação do segmento externo e seu respectivo cílio (RODIECK, 1973 *apud* FINLAY, 2008). O segmento externo acessório se origina a partir de um centríolo, próximo ao cílio conector no segmento interno, e é conectado ao longo do segmento externo do cone por uma fina ponte citoplasmática (YACOB *et al.*, 1977) É provável que o segmento externo acessório esteja envolvido com as respostas retinomotores.

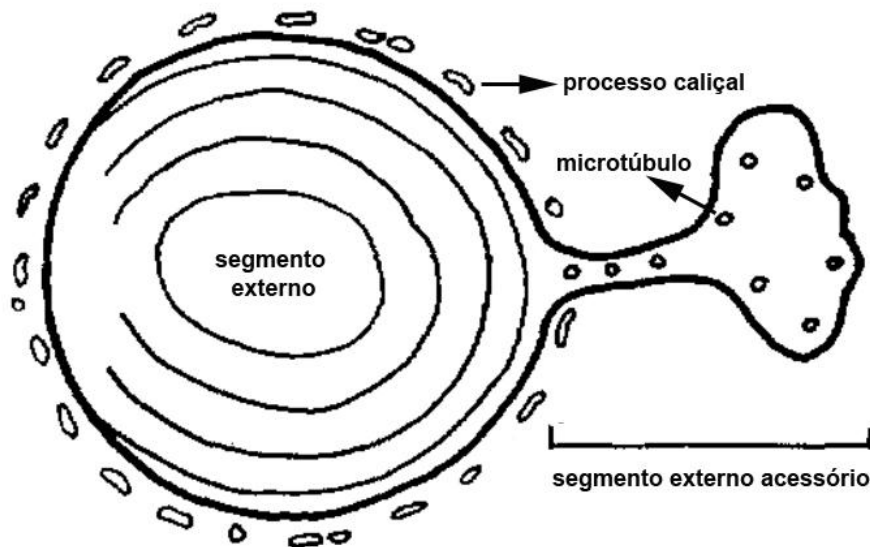


Figura 8. Esquema do corte transversal do segmento externo de um cone simples, indicando a localização dos processos caliciais, ao redor do segmento externo, e o segmento externo acessório. Modificado de YACOB *et al.*, 1977.

O movimento retinomotor acontece em resposta ao ciclo luz/escuro e envolve os fotorreceptores e a melanina do epitélio pigmentado da retina. Em adaptação ao exposição à luz, parte dos grânulos de melanina migram ao longo dos prolongamentos da células epiteliais para a porção dos segmentos externos dos fotorreceptores (figura 9), com a finalidade de absorver o excesso de luz e promover o bom funcionamento da percepção visual. Simultaneamente, os segmentos externos e internos dos cones mudam sua posição para a direção da coróide e os segmentos externos e internos dos bastonetes mudam em direção ao vítreo (PRODOCIMO, 2009).

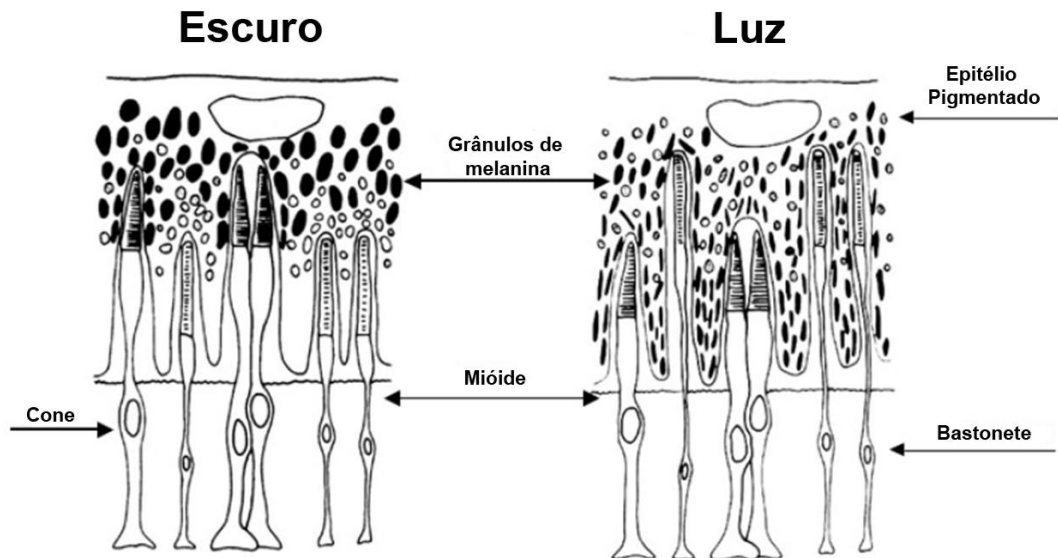


Figura 9. Esquema do movimento retinomotor em adaptação ao ciclo luz/escuro. Modificado de (ALI, M. A.; KLYNE, 1985 *apud* PRODOCIMO, 2009)

A retina possui duas barreiras descritas para humanos: a barreira hematorretiniana e a barreira hemato-ocular. A primeira é subdividida em duas barreiras, a barreira hematorretiniana interna, constituída por junções de oclusão entre as células endoteliais dos capilares sanguíneos, e a barreira hematorretiniana externa, a qual contém junções aderentes entre as células do epitélio pigmentado (PORTUGAL, 2008). A barreira hemato-ocular é formada por junções aderentes entre as células epiteliais do corpo ciliar e as células endoteliais (HOSOYA; TOMI, 2005). A barreira hematorretiniana interna é similar estruturalmente à barreira hematoencefálica, sendo recoberta por pericitos e células de Müller. Essas barreiras têm papel no controle da permeabilidade e nutrição destes tecidos.

### 1.3 NANOPARTÍCULAS E O SISTEMA NERVOSO

Estudos *in vitro* mostram que fuleróis<sup>8</sup> são citotóxicos e fototóxicos para células humanas do epitélio pigmentado da retina e também para células epiteliais humanas do cristalino (WIELGUS *et al.*, 2010). Essas partículas podem acumular

<sup>8</sup> Fulerois são uma forma molecular de carbono constituídos por 60 átomos de carbono (SANTOS *et al.*, 2010).

nestas células e na presença de luz produzirem superóxidos, os quais, em excesso, podem causar fotocitotoxicidade (*idem*).

Já os fulerenos<sup>9</sup> possuem uma grande habilidade em capturar radicais livres gerados no meio biológico, além de serem capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (DUGAN *et al.*, 1996; IMAHORI; UMEYAMA, 2008 ; SANTOS *et al.*, 2010). Fulerenos esféricos de C<sub>60</sub>(OH)<sub>22-26</sub> em cultura de neurônios corticais de camundongo mostram uma ação antioxidante e neuroprotetora diante de danos excitotóxicos e apoptóticos (DUGAN *et al.*, 1996). Dessa forma, esta nanoestrutura pode ser considerada uma agente antioxidante e neuroprotetora.

Patologias no bulbo olfatório e no hipocampo foram detectadas em ratos expostos por 2, 10, 20 ou 30 dias à nanopartículas de TiO<sub>2</sub> do rutilo (80 nm) e de anatase (155 nm) (WANG, JIANGXUE *et al.*, 2008). As de anatase produziram indícios de inflamação, além de um aumento significativo nos níveis do fator de necrose tumoral alfa e interleucinas pró-apoptóticas (*Idem*). Através deste estudo supõe-se que essas nanopartículas podem alcançar o cérebro, principalmente o hipocampo, através do bulbo olfatório. Mesmo uma ligeira alteração no microambiente do fluido cerebral, onde estão imersos neurônios e células da glia, poderia alterar a função cerebral. (SHARMA; WESTMAN, 2004 *apud* SAHU; CASCIANO, 2009).

Agregados de TiO<sub>2</sub> (10-15 µm) injetadas intraperitonealmente em camundongos são translocadas até o cérebro, causando lesões e estresse oxidativo (MA *et al.*, 2010). Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (1mg/l) são capazes de alcançar o cérebro de *Danio rerio* expostos durante 2 meses (CHEN, J. *et al.*, 2011). Nestas pesquisa, verificou se que há cerca de 4 ng/g de nanopartículas no tecido cerebral. Rank-Miranda (2013) encontrou alterações na atividade da acetilcolinesterase do cérebro de *P. lineatus* expostos cronicamente à nanopartículas de ZnO (~ 490.9 nm).

Além das vias de entrada já citadas, as nanopartículas podem acessar o SNC através das terminações nervosas sensoriais epitélio respiratório ou por

---

<sup>9</sup> Fulerenos são nanoestruturas esferoidais estáveis, constituídas exclusivamente por carbono.

terminações nervosas da derme, seguida por translocação dos gânglios ao SNC (WANG, JIANYONG *et al.* 2009 *apud* SAHU; CASCIANO, 2009). Estudo *in vitro* de transporte através da barreira hematoencefálica<sup>10</sup> confirma que nanopartículas de SiO<sub>2</sub> (50 nm) podem ser transportadas através dessa barreira, via transcitose (RAGNAILL *et al.* 2011). Há evidências de alteração na função da barreira hematoencefálica após exposição aguda e crônica à nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (~25,2 nm) *in vitro*<sup>11</sup> (BRUN *et al.* 2012). Partículas pequenas podem penetrar em diferentes barreiras através de pequenos capilares até células individuais (MEDINA *et al.*, 2007). Em suma, nanopartículas possivelmente são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica RAGNAILL *et al.* (2011).

Dados da literatura mostram que algumas nanopartículas podem causar danos em neurônios e glia (RAMSDEN, C. S. *et al.*, 2009). Os neurônios de *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) mostraram alterações nos níveis de Cu e Zn, além de 50% de inibição das bombas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase quando esses animais ingeriram alimentados contendo nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, nas doses de 10 e 100 mg/kg (*idem*). Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (20-45 nm) também induzem ativação da micróglia e causam liberação de fatores pró-inflamatórios, os quais contribuem para a disfunção e citotoxicidade *in vitro* (XUE *et al.* 2012).

A entrada de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> foi verificada *in vitro* em células derivadas do epitélio pigmentado da retina humana (ARPE-19) de forma dose-dependente, por meio do citometro de fluxo e da microscopia de campo escuro (ZUCKER *et al.*, 2010). Essas nanopartículas foram observadas ao redor do núcleo e ao redor do retículo endoplasmático em alta concentração (*idem*).

Apesar das evidências de toxicidade das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> em algumas células de tecidos oculares, uma lente de contato composta por platina-titânio (170 nm platina; 25 nm de titânio) foi projetada para aferir a pressão intraocular em

---

<sup>10</sup> O estudo afirma que o modelo de barreira hematoencefálica possui uma monocamada de células hCMEC/D3 e junções de oclusão entre elas, confirmadas por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

<sup>11</sup> Neste estudo, o modelo de barreira hemaencefálica foi formada a partir do cultivo primário de células epiteliais de cérebro de camundongo. Na monocamada formada havia junções de oclusão, comprovadas pela imunofluorescência de claudina-5 e ZO-1, além de junções de aderência ( $\beta$ -catenina).



pacientes com glaucoma (ZARBIN *et al.* 2013). Como já mencionado, as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> são fotorreativas e quando presentes na retina podem ser fotoativadas, levando a produção de espécies reativas e a neurotoxicidade (BOYES, WILLIAM K *et al.*, 2011).

Apenas dois artigos que avaliam a presença ou toxicidade de nanopartículas metálicas na retina foram encontrados na literatura. No primeiro, nanopartículas de ouro são sintetizadas no próprio laboratório e são filtradas em uma malha de 22 µm. Oito coelhos receberam intravitrealmente uma dose de 67 µmol/ml e outros oito receberam 670 µmol/ml. Os olhos foram coletados após 1 semana e 1 mês, para análise histológica. O autor afirma que por meio da técnica utilizada foi possível afirmar que “não há evidências histológicas de toxicidade na retina ou nervo óptico em nenhuma das seções examinadas. Também não há provas de inflamação ocular ou catarata em nenhum dos tecidos analisados.” Bakri *et al.* (2008).

O segundo consiste numa avaliação da toxicidade das nanopartículas de quitosana e PCEP<sup>12</sup> e também de nanopartículas magnéticas, as quais são utilizadas em técnicas de transfecção<sup>13</sup> (PROW *et al.*, 2008). Dos 13 olhos dos coelhos que receberam, por 7 dias, injeções intravitrealmente ou subretinalmente, 12 deles manifestaram inflamação (*indem*), além disso há indícios de toxicidade como degeneração e espessura da retina ou mudanças nas células do epitélio pigmentado da retina.

#### 1.4 ANIMAL EXPERIMENTAL

O *Prochilodus lineatus* (figura 10) (Valenciennes, 1836) (Pisces: Characiformes: Prochilodontidae), vulgarmente conhecido como Curimba ou Curimbatá, é uma espécie de médio a grande porte (CASTRO; VARI, 2004). Tem sua distribuição

---

<sup>12</sup> (PCEP) - poly{[(cholesteryl oxocarbonylamido ethyl) methyl bis(ethylene) ammonium iodide] ethyl phosphate})

<sup>13</sup> Transfecção é um processo no qual há introdução intencional de ácidos nucleicos, geralmente DNA, em células.

geográfica descrita nos países: Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia (CASTRO; VARI, 2004) além de migrar grandes distâncias ao longo do Rio Paraná. Esta espécie vive em água doce, em regiões bentopelágicas e se alimenta de detritos e sedimentos (FISH BASE, 2012). Desempenha uma importante função na cadeia trófica, pela participação de seus ovos, larvas, alevinos e adultos na dieta de aves aquáticas e peixes predadores (PEREIRA *et al.*, 2004 *apud* SIMONATO *et al.*, 2008). A escolha desta espécie como animal experimental foi baseada: no contato direto dos indivíduos com a água, a qual pode conter nanopartículas; no grande valor comercial da espécie e na fácil manutenção de indivíduos juvenis em laboratório. O Curimbatá já foi utilizado em muitos experimentos de toxicidade de xenobióticos, como a cilindrospermopsina (LIEBEL *et al.*, 2011), o Roundup® (CAVALCANTE *et al.*, 2008), o cobre (CARVALHO; FERNANDES, 2008), o óleo diesel (SIMONATO *et al.*, 2008), entre outros.



Figura 10. Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus* (Curimbatá). Fonte: autor

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  são capazes de atingir a retina e outras estruturas oculares de *P. lineatus* expostos de forma aguda e subcrônica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os possíveis depósitos de nanopartículas nas camadas da retina e outras estruturas oculares através da Autometalografia, sob Microscopia de Luz;
- Avaliar a presença ou ausência das nanopartículas em nível celular e subcelular por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão;
- Determinar a possível via de entrada nas nanopartículas até retina.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 NANOPARTICULAS: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Tanto as nanopartículas de dióxido de titânio –  $\text{TiO}_2$ <sup>14</sup> – quanto a de óxido de zinco –  $\text{ZnO}$ <sup>15</sup> –, foram compradas em pó e posteriormente dispersas em água ultrapura. A suspensão de nanopartículas foi dispersa (frequência 100W, Probe) durante 20 períodos de 2 minutos com intervalo de 1 minuto entre eles. Este procedimento foi repetido 2 vezes em cada suspensão estoque de  $\text{TiO}_2$  (100 mg/l) e de  $\text{ZnO}$  (7g/l).

A dimensão das nanopartículas, além do potencial zeta foram aferidos no *Malvern® Zetasizer nanoZS90*<sup>16</sup>. A forma das nanopartículas na suspensão estoque foi analisada através da MET<sup>17</sup>.

---

<sup>14</sup> Especificações técnicas: *Titanium (IV) oxide, anatase, nanopowder, < 25 nm, 99.7% - área de superfície: 35 - 65 m<sup>2</sup>/g – Sigma Aldrich.*

<sup>15</sup> Especificações técnicas: *Zinc oxide, < 50 nm (MET), > 97% - área de superfície: 15 – 25 m<sup>2</sup>/g - Sigma Aldrich.*

<sup>16</sup> *Malvern® Zetasizer nanoZS90* pertencente ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Esta análise foi realizada pelas pesquisadoras Carmen Lúcia Voigt (Doutoranda em Química Analítica - UEPG), Renata Rank Miranda (Mestre em Biologia Celular - UFPR) e Ellie López Barrera (Doutora em Ecologia e Conservação – UFPR).

<sup>17</sup> Amostras da suspensão estoque e metanol foram colocadas numa telinha de MET, previamente recoberta por carbono. Esta análise foi realizada pelo Prof. Dr. Ciro A. de Oliveira Ribeiro do Departamento de Biologia Celular da UFPR. No MET (JEOL 1200 EXII) do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Um bioensaio subcrônico (30 dias) e um agudo (5 dias) de exposição as nanopartículas foram realizados da seguinte maneira: 128 peixes da espécie *Prochilodus lineatus* (Curimatá), foram acondicionados em 16 aquários de 25 litros de água filtrada. Os peixes juvenis foram obtidos na Piscicultura Panamá (Paulo Lopes - Santa Catarina - Brasil) com tamanho médio de 10 cm. Anteriormente a exposição, as suspensões estoque de nanopartículas foram dispersas 2 vezes da seguinte maneira: 20 períodos de 2 minutos, com intervalo de 1 minuto. Os peixes foram divididos em 8 grupos: controle, nanopartículas de TiO<sub>2</sub> nas concentrações 0,1, 1 e 10 µg/l, nanopartículas de ZnO em 7, 70 e 700 µg/l e uma mistura de ambas as nanopartículas nas concentrações intermediárias (figura 11). Estimativas preveem que na água podem ser encontradas concentrações de 0,7 - 24,5 µg/l de nanomateriais de TiO<sub>2</sub> e 76 µg/l de ZnO (PÉREZ *et al.*, 2009).

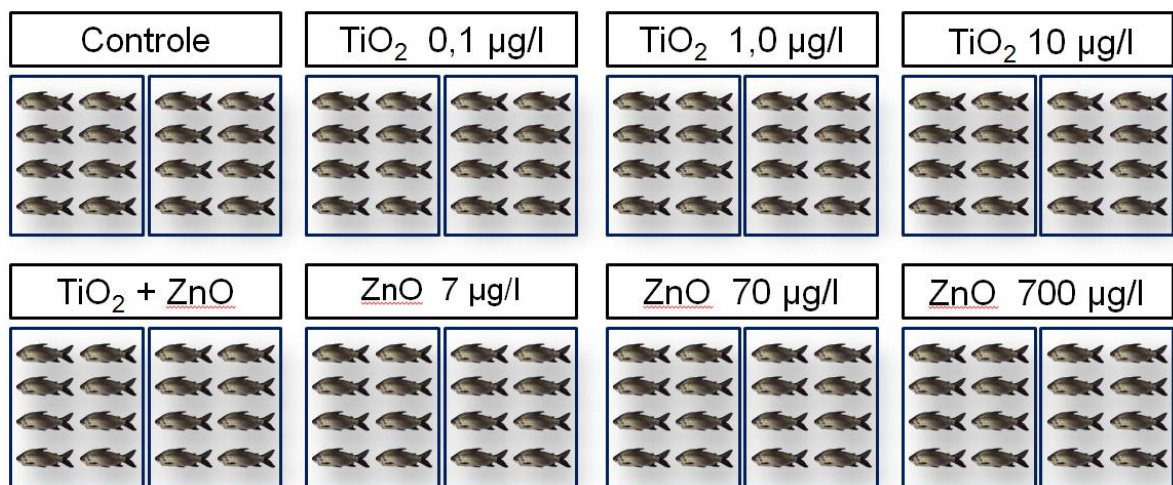


Figura 11. Desenho experimental das exposições aguda e sub-crônica. São 8 grupos de exposição feitos em duplicata. As misturas de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e ZnO são nas concentrações de 1,0 µg/l e 70 µg/l, respectivamente.

Para cada um dos oito grupos experimentais foi feito dois ensaios independentes, ou seja, houve dois aquários com as mesmas condições experimentais. Os peixes foram mantidos em temperatura e fotoperíodo controlados e aeração constante, recebendo alimentação (ração) a cada 48 h. Diariamente, 50% da água dos aquários foi trocada para limpar e diminuir a concentração de amônia e

50% do volume da suspensão de nanopartículas e manter a concentração teórica de nanopartículas foi repostado para manter a concentração teórica durante o experimento. Após o período de exposição, os animais foram anestesiados com MS222 0,02% e mortos por secção medular. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), protocolo n° 490.

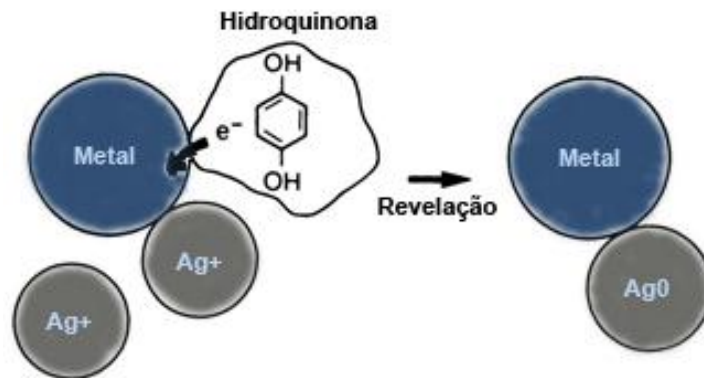
### 3.3 ANÁLISES

Para localizar as nanopartículas nos tecidos através da Microscopia de luz, foram coletados três olhos de diferentes indivíduos em cada grupo e fixados em Fluido de Bouin (Apêndice 1) por 8h. Outros órgãos dos peixes expostos, como o fígado, brânquias, músculo e cérebro, foram coletados pela aluna Renata Rank Miranda do Mestrado em Biologia Celular da UFPR, assim, maximiza-se os resultados obtidos através de um bioensaio. As amostras foram, então, lavadas várias vezes em uma solução de 100 ml de etanol 70% e 4 gotas de hidróxido de amônio (30%), para retirada do excesso de fixador e ácido pícrico. Posteriormente, foram desidratadas numa série crescente de etanóis (1 hora em cada álcool), diafanizadas com xilol e emblocadas em *Paraplast Plus*<sup>®</sup> (Sigma), utilizando o processador de amostras (Thermo Scientific Microm STP120). Após 48 h de secagem da resina, os blocos de parafina foram trimados e seccionados, no micrótomo (Leica RM2145), em cortes histológicos com espessura de 5 µm e acondicionadas em lâminas histológicas. Para adesão dos cortes à lâmina, esta foi coberta com albumina diluída. Os cortes na lâmina foram distendidos em placa aquecedora a aproximadamente 40°C e a lâmina permaneceu em repouso por 24h para secagem completa. Para tornar visíveis as nanopartículas em microscopia de luz, foi utilizada a técnica da autometalografia.

Existem várias metodologias modificadas de Danscher (1984) para a técnica da autometalografia, todas baseadas na precipitação da prata sobre metais (figura12). Essa precipitação confere uma amplificação do sinal, tornando visíveis a localização de metais sob microscópio de luz. A principal variante destes protocolos são os reagentes utilizados para a precipitação da prata, o tipo de sal prata, o tempo de

reação e de lavagens das cortes. Esses testes são feitos porque cada tecido e cada metal apresentam sensibilidades diferentes a essas técnicas. Posteriormente a etapa de reação com a prata, denominada revelação, todas as técnicas seguem o mesmo protocolo de coloração e montagem da lâmina permanente.

Figura 12. Princípio da autometalografia: o metal atua essencialmente como um eletrodo que



recebe elétrons de um agente redutor (hidroquinona) e transfere os a prata iônica ( $\text{Ag}^+$ ), que então tornam-se metálicos ( $\text{Ag}^0$ ). Modificado de DANSCHER; NORGAARD, 1985, p. 709, tradução nossa.

Na primeira metodologia testada (MELA *et al.*, 2010 e 2012), foi utilizada nitrato de prata líquido por 15 minutos como revelador, seguida pelo revelador (Kodak<sup>®</sup>) (10 minutos), ácido acético diluído (1:1) por 1 minuto para parar a revelação e, por fim, fixador (Kodak<sup>®</sup>) por 10 minutos, tudo sob luz monocromática. Esta metodologia foi descartada, pois mesmo deixando pouco tempo no revelador e lavando em água corrente por 2 horas, houve muito precipitado até mesmo na lâmina de vidro.

Na segunda tentativa, o Kit “Silver Enhancer” (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) foi utilizado, sob luz ambiente por 4 minutos. Mas também foi descartado, pois a deposição de prata ocorreu até mesmo em tecidos oriundos de peixes do grupo controle.

O protocolo foi então padronizado com a terceira técnica testada (apêndice 3), na qual são utilizados nitrato de prata (cristais), goma arábica, hidroquinona e tampão citrato por 60 minutos, seguida por lavagem em água destilada (3 vezes por 5 minutos), fixada com tiosulfato de sódio a 2,5% por 2 minutos e novamente lavadas em água destilada. Posteriormente, seguiu-se o protocolo de coloração (Hematoxilina e Eosina). Uma lâmina de cada grupo não foi submetido ao processo de coloração para que as marcações ficassem mais evidentes. Ao menos cortes de 3 olhos de indivíduos diferentes foram analisados em cada grupo.

Para análise da autometalografia, observam-se quais os locais onde há depósitos de prata nos tecidos. Assim, seis camadas da retina foram analisadas: segmento interno de cones, camada nuclear externa, camada plexiforme externa, camada nuclear interna, camada plexiforme interna e camada das células ganglionares (na qual inclui-se a camada das fibras do nervo óptico, quando presente). As membranas limitantes externa e interna não foram qualificadas por não estarem evidentes em todas as amostras. Também foram verificados os tecidos oculares: córnea, cartilagem de esclera; nervo óptico; cristalino, vasos sanguíneos da coróide; e músculos extra-oculares. Estas camadas e tecidos foram selecionados por sempre estarem presentes e evidentes em todos os cortes histológicos.

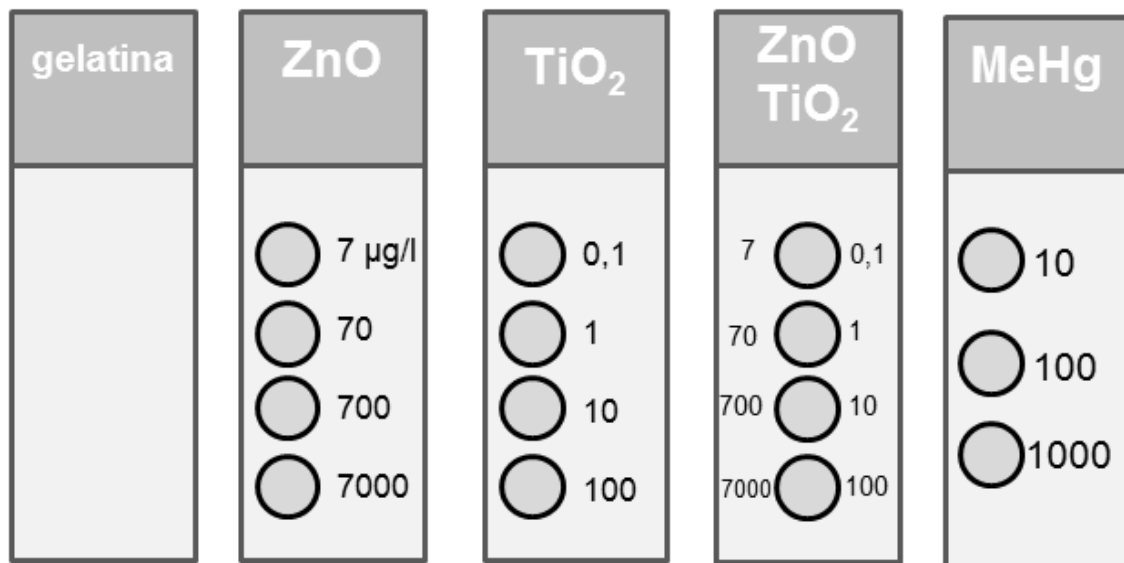
Durante a padronização do protocolo de autometalografia, percebeu-se que a melanina dos segmentos externos dos fotorreceptores poderia mascarar os possíveis depósitos de prata nesta camada. Então na tentativa de remover estes pigmentos foi testado o protocolo de *Bleaching* (ULLMANN *et al.*, 2012). Esta técnica baseia-se na oxidação da melanina, utilizando peróxido de hidrogênio. Os cortes apoiados nas lâminas foram desparafinizados, hidratados e mergulhados na solução de *Bleaching* conforme apêndice 2. Posteriormente o protocolo de autometalografia foi aplicado aos cortes histológicos e em seguida foram corados pela Hematoxilina e Eosina, desidratados e montadas as lâminas permanentes.

Afim de testar se realmente os depósitos de prata oriundos da autometalografia são marcações de nanopartículas, o seguinte experimento foi conduzido: sobre lâminas gelatinizadas (apêndice 4) foram acondicionadas suspensões de agregados de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  (0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{g/l}$ ) e ZnO (7, 70, 700, 7000  $\mu\text{g/l}$ ), além de misturas, partindo da menor concentração de nano $\text{TiO}_2$  junto a nanoZnO, duas a duas, e assim por diante (Figura 13). Como controle negativo da técnica da autometalografia, lâminas apenas gelatinizadas passaram pela técnica e como controle positivo lâminas gelatinizadas receberam soluções de metilmercúrio (MeHg) nas concentrações de 10, 100 e 100  $\mu\text{g/l}$ . A autometalografia já foi utilizada para marcar MeHg presente em tecidos biológicos (MELA *et al.*, 2010 e 2012). Essas lâminas seguiram para a secagem em estufa a 37° C por 3 horas, para que as amostras ficassem aderidas a gelatina. Após secas, metade das lâminas foram hidratadas por 5 minutos e seguiram para a técnica da autometalografia e a outra



metade não passou por esse processo. Enfim, todas elas foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e montadas lâminas permanentes, conforme descrito na parte 3 do Apêndice 3, exceto pela coloração com Hematoxilina e Eosina.

Figura 13. Lâminas testadas no experimento de teste da marcação de nanopartículas pela autometalografia. A lâmina apenas gelatinizada foi o controle negativo; as diferentes concentrações (em  $\mu\text{g/l}$ ) de  $\text{TiO}_2$ , ZnO e as misturas e o controle positivo da técnica com três concentrações de



metilmercúrio (MeHg).

Dois olhos de indivíduos diferentes foram processados para a metodologia da microscopia eletrônica de transmissão (MET) (OLIVEIRA-RIBERO *et al.*, 2012). As amostras foram fixados em Karnovsky (apêndice 5) por 2h, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós fixados, pré contrastados e mantidos em tampão cacodilato de sódio a  $-20^\circ\text{C}$  até o etapa posterior. Em seguida, as amostras foram impregnadas e incluídas em resina PoliEmBed 812. Inicialmente as amostras na resina passaram por vácuo para eliminação de bolhas de ar e posteriormente foram mantidas em estufa ( $60^\circ\text{C}$ ) para secagem completa. Na etapa de obtenção dos cortes do material biológico, os blocos são trimados e cortados no ultramicrótomo. São obtidos cortes semifinos (aproximadamente 500 nm), distendidos com vapor de clorofórmio, acondicionados em lâmina histológica e corados com azul de toluidina a 1%. Já os cortes ultrafinos (aproximadamente 60 nm) são distendidos da mesma forma, mas são dispostos em telinhas de cobre (200 mesh). Este material é

analisado em MET para análise da presença de nanopartículas em nível celular. Afim de que haja menos metais nas amostras, os cortes ultrafinos não foram contrastados. Assim, os pontos eletrondensos nas amostras são indícios fortes da presença de nanopartículas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS

Ambas as nanopartículas possuem formatos irregulares e apresentam-se agregadas sob MET (figura 14).

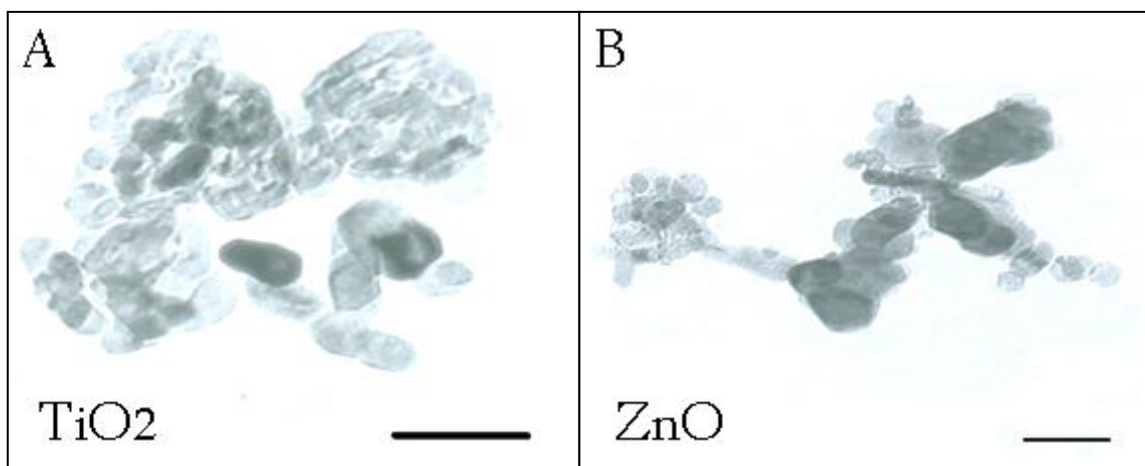


Figura 14. Eletromicrografias das suspensões de nanopartículas de (A)TiO<sub>2</sub> (B) ZnO. Escalas: 50 nm

A grande parte dos agregados de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (nano TiO<sub>2</sub>) na suspensão estoque é de 780 nm, segundo análise no *Zetasizer*, variando de 122 nm e 5560 nm (Figura 15), e 55,5% destes agregados tinham menos de 1000 nm. Já os agregados de ZnO (nano ZnO) têm em média 481 nm, com 2 intervalos que podem ser observados na figura 16: um entre 68 nm e 1990 nm e o outro entre 3580 nm e 5560 nm. Assim, apenas 1,2% da suspensão de ZnO estava com dimensões condizentes com a definição de nanopartículas (<100 nm). Do total, 80,7% dos agregados estavam abaixo de 1 000 nm. Os potenciais zeta do TiO<sub>2</sub> e ZnO. na suspensão foram de -19.2 mV e de +22,6 mV, respectivamente. Isso significa que estas suspensões estão na faixa de instabilidade de modo que os peixes foram expostos principalmente a agregados de nanopartículas.

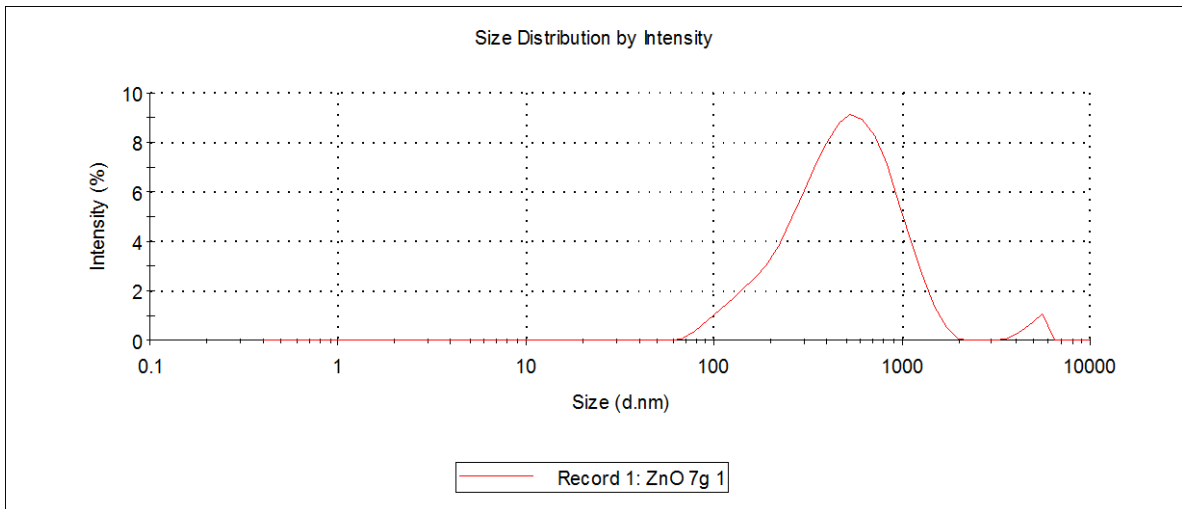


Figura 15. Distribuição do tamanho das nanopartículas de ZnO - 7 g/l

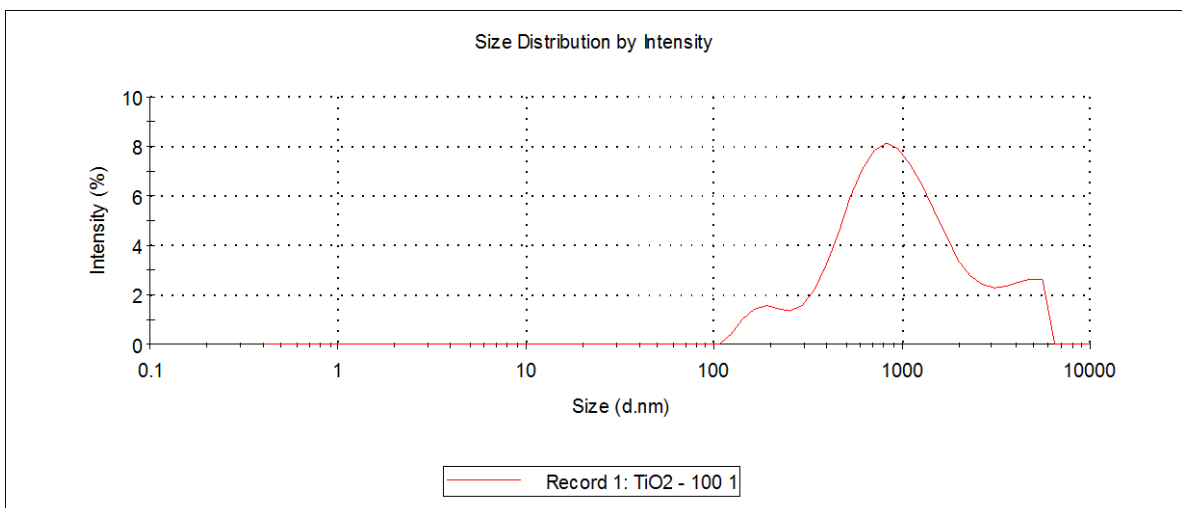


Figura 16. Distribuição do tamanho das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> – 100 mg/l

## 4.2 MICROSCOPIA DE LUZ

Verificou-se que sobre as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  sobre a lâmina de vidro ocorreram depósitos de prata, derivados da técnica de autometalografia (figura 17). Não houve deposição de prata sobre a gelatina e o resultado da lâmina com  $\text{MeHg}$  indicou que a técnica estava funcionando. Não foram verificados depósitos de prata nas duas concentrações mais baixas de ambas os agregados de nanopartículas e respectivas misturas, possivelmente devido a baixa concentração e processamento da lâminas com as amostras. Embora nas duas concentrações mais altas observou-se depósitos de prata sobre os nanopartículas. Assim, entende-se que a técnica de autometalografia é eficiente na amplificação do sinal das nanopartículas, conferida pelos depósitos de prata, sob microscopia de luz.

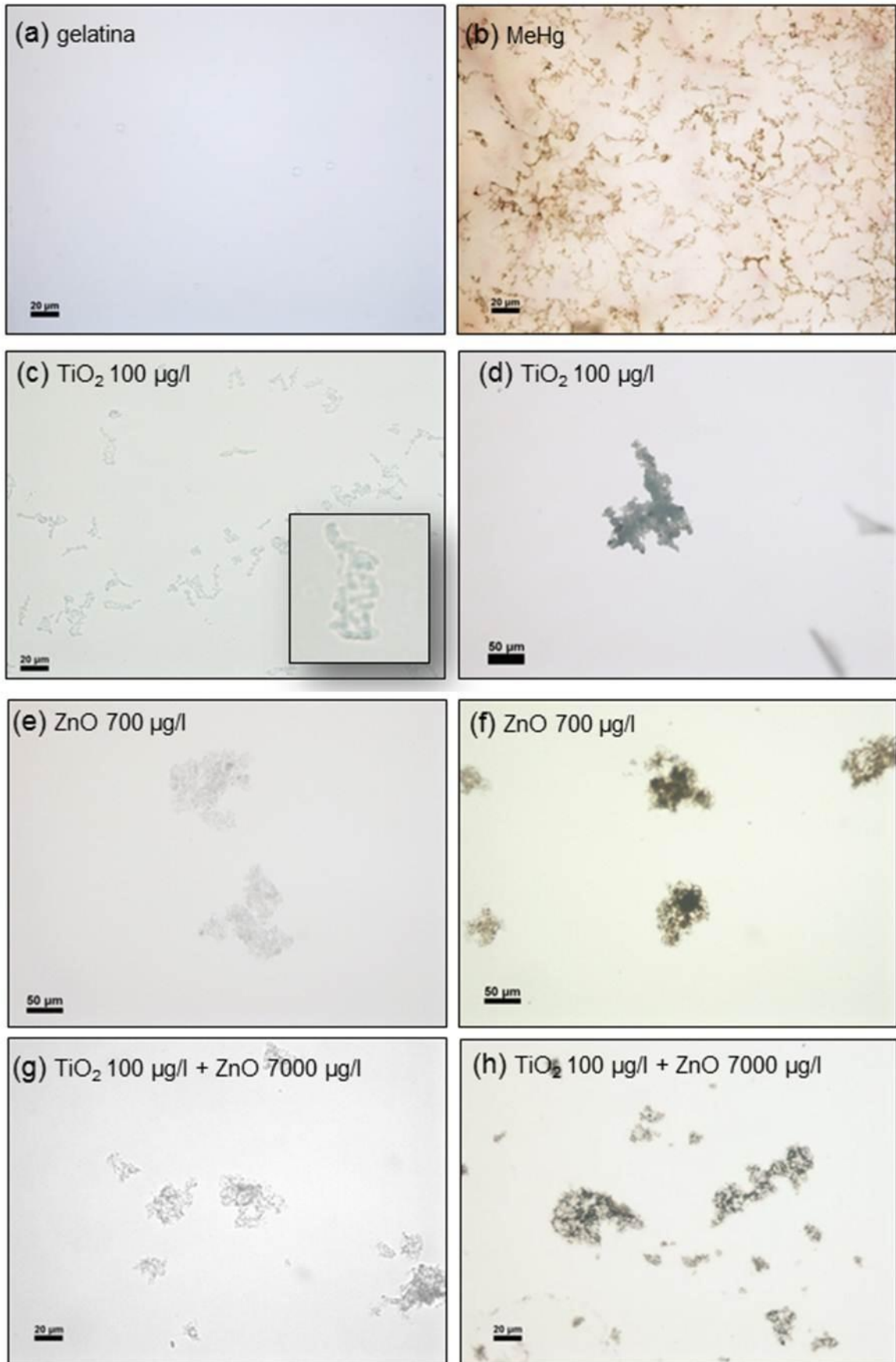


Figura 17 Fotomicrografias do teste de deposição de prata sobre nanopartículas. (a) controle negativo e (b) positivo da técnica da autometalografia. (c,e,g) agregados de nanopartículas sem autometalografia e (d,f,h) com autometalografia.

Os tecidos oculares analisados quanto a deposição de prata oriunda da autometalografia são: cartilagem, córnea, cristalino, músculo, nervo óptico, retina, vaso sanguíneo da coroide (figura 18).

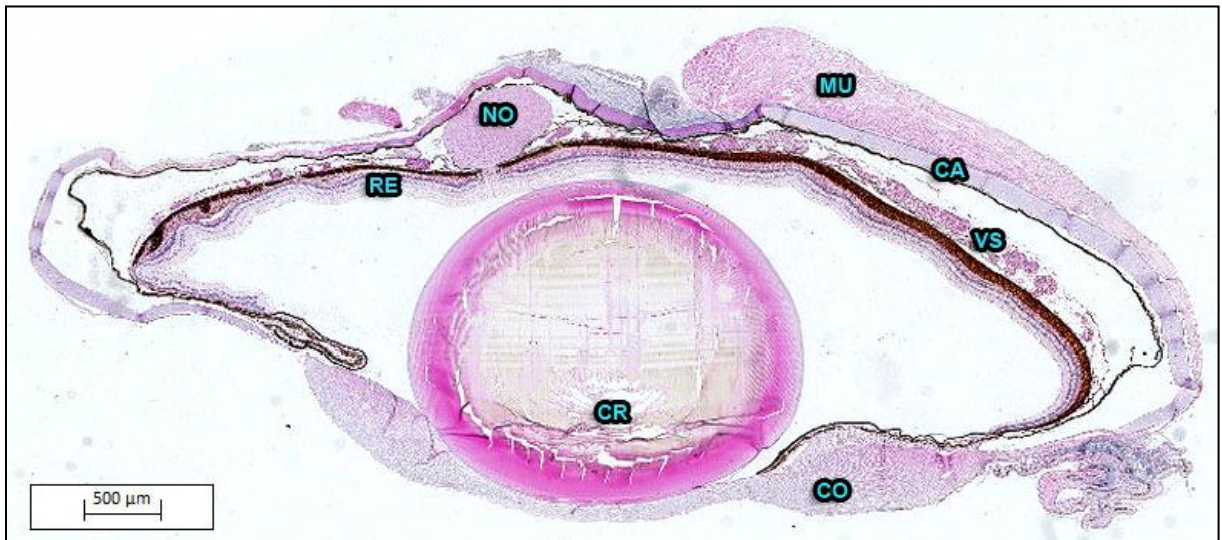


Figura 18. Corte histológico do olho de *P. lineatus* corado com Hematoxilina e Eosina. Os tecidos analisados através da autometalografia, sob microscopia de luz, são: (CA) cartilagem; (CO) córnea; (CR) cristalino; (MU) músculo; (NO) nervo óptico; (RE) retina; (VS) vaso sanguíneo da coroide.

O protocolo de *Bleaching* foi utilizado com sucesso para remoção da melanina da porção exterior da retina (figura 19). Mas em cortes de retina oriundos de peixes do grupo exposto às nanopartículas não foram observados depósitos de prata. Possivelmente, esta técnica foi agressiva ao tecido e acabou por remover também as nanopartículas deste. Embora haja diferenças entre os grânulos de melanina e os depósitos, pois estes são mais escuros, pontuais e arredondados, preferiu-se não determinar os possíveis depósitos de prata na camada dos segmentos externos dos fotorreceptores e epitélio pigmentado da retina, afim de evitar erros de análise utilizando a microscopia de luz.

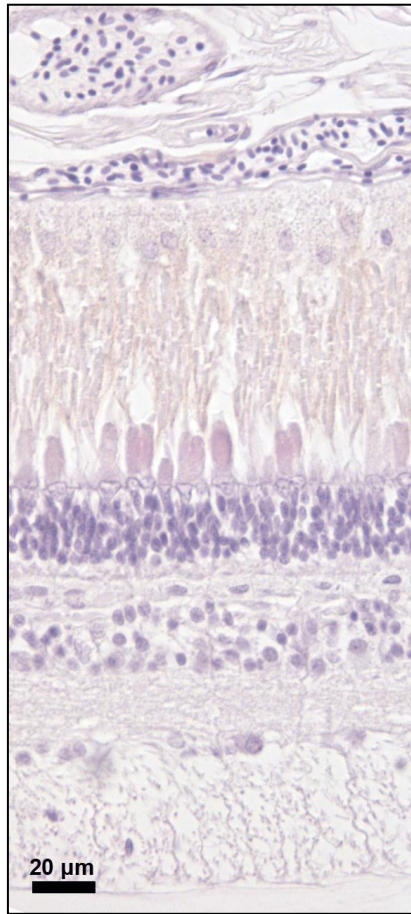


Figura 19 Retina de *P. lineatus* após a técnica de *Bleaching*, seguida pela coloração por Hematoxilina e Eosina

No grupo controle não foram observados depósitos de prata (figura 20).

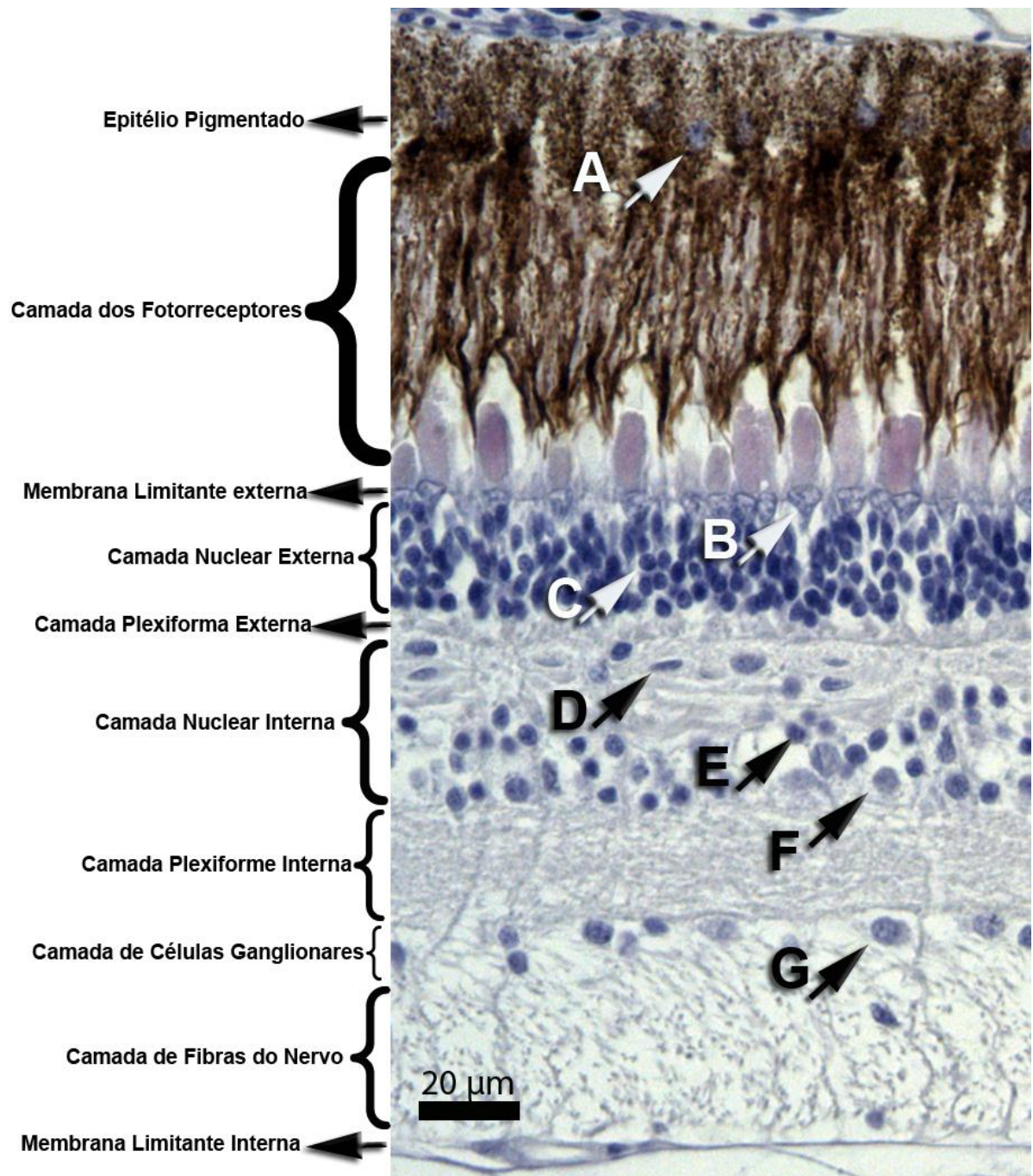


Figura 20. Fotomicrografia da retina de *P. lineatus* do grupo controle, indicando as 10 camadas histológicas e as 6 principais células (letras); A – Núcleo de Célula epitelial pigmentada da retina. B – Núcleo de Fotorreceptor tipo Cone . C - Núcleo de Fotorreceptor tipo Bastonete. D - Célula Horizontal. E - Célula Bipolar. F - Célula Amácrina. G - Célula Ganglionar.

Observou-se que há depósitos de prata tanto em amostras de retina oriundas de peixes expostos a nano ZnO quanto a nano TiO<sub>2</sub>, bem como a mistura destes, em todas as concentrações e tempos de exposições estudados. Os depósitos de prata foram observados nas seguintes camadas: segmento interno de cones (figura



21.a) camada nuclear externa (figura 21.b); camada plexiforme externa (figura 22.a); camada nuclear interna (figura 22.b); camada plexiforme interna (figura 22.c); camada das células ganglionares (figura 22.d). Análises preliminares mostram que as camadas nucleares apresentaram mais nanopartículas se comparadas às camadas plexiformes.

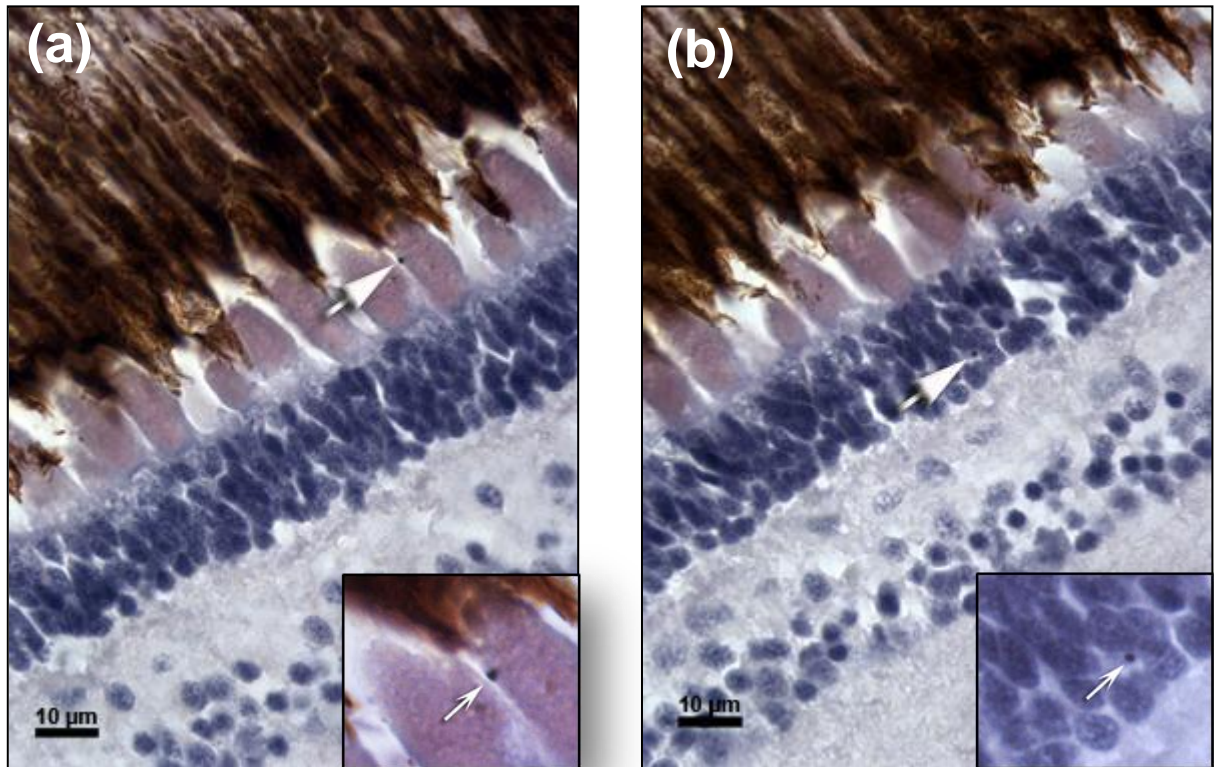


Figura 21. Camadas da retina de *P. lineatus* onde foram observados os depósitos de prata, indicados pelas setas. (a) segmento interno de fotorreceptores - nano TiO<sub>2</sub> (0,1 µg/l) subcrônica; (b) camada nuclear externa - nano TiO<sub>2</sub> (0,1 µg/l)

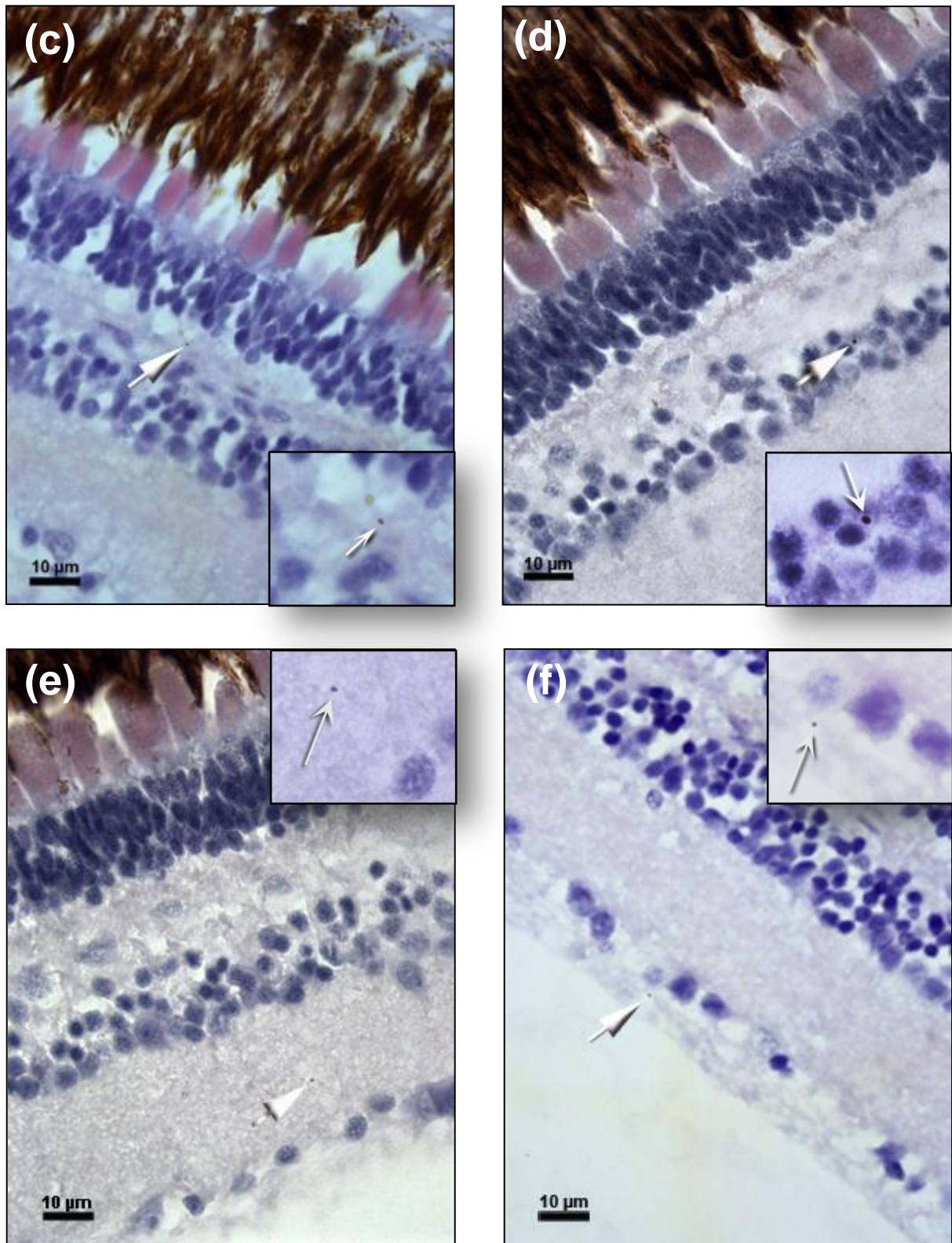


Figura 22 Camadas da retina de *P. lineatus*, onde foram observados os depósitos de prata, indicados pelas setas. (a) segmento interno de fotorreceptores - nano TiO<sub>2</sub> (0,1 µg/l) subcrônica; (b) camada nuclear externa - nano TiO<sub>2</sub> (0,1 µg/l) aguda; (c) camada plexiforme externa - nano ZnO (7 µg/l) subcrônica; (d) camada nuclear interna - nano ZnO (7 µg/l) aguda; (e) camada plexiforme interna - nano ZnO (7 µg/l) subcrônica; (f) camada de células ganglionares - nano ZnO (7 µg/l) aguda.

Não foram encontradas diferenças entre as concentrações de ambas as nanopartículas ou tipo de nanopartículas, mas houve maior quantidade de nanopartículas nas retinas dos grupos expostos de forma subcrônica, conforme demonstrado na figura 23.a, quando comparamos com a exposição aguda. Na retina periférica também foram encontradas nanopartículas (figura 23.b).

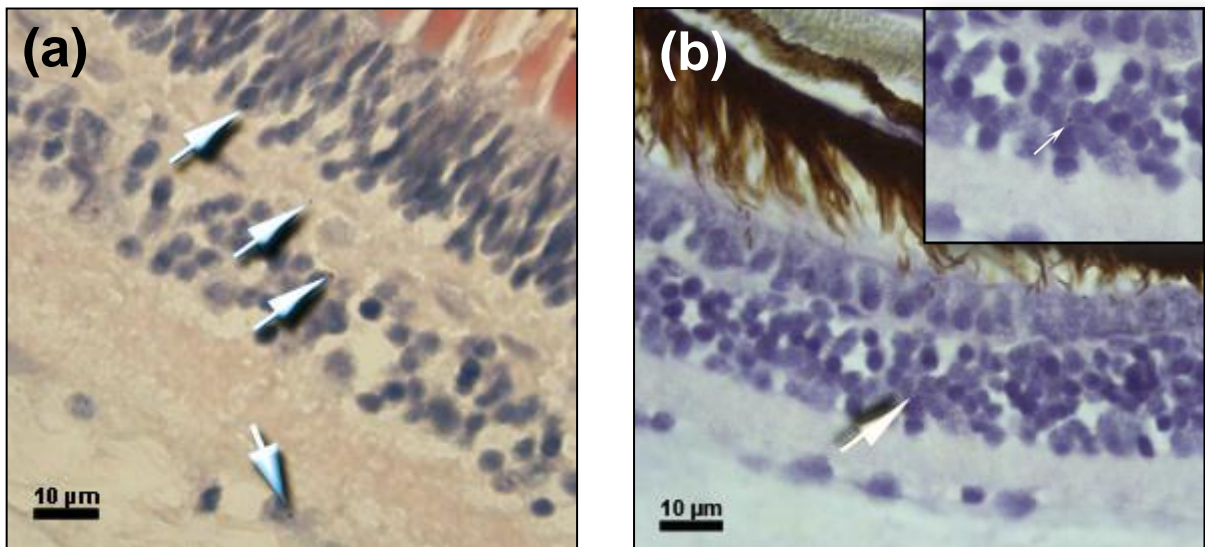


Figura 23. Retina de *P. lineatus*. Setas indicam depósitos de prata. (a) nano ZnO (700 µg/l) subcrônica; (b). Retina periférica - nano ZnO (7 µg/l) aguda. Aumento do depósito de prata no canto superior direito.

Comparando os grupos da exposição aguda, também não há diferenças entre as concentrações ou entre os tipos de nanopartículas. Não foram observadas nanopartículas em vasos sanguíneos da coróide, músculos extraoculares, córnea, cartilagem e cristalino. O nervo óptico também apresentou depósitos de prata (figura 24.a) em todas as concentrações, com discreta aumento de depósitos de prata nas maiores concentrações de ambos os agregados de nanopartículas.

Na exposição subcrônica, nos vasos sanguíneos da coróide e músculo não houve depósitos de prata, assim como na exposição aguda. No nervo óptico houve depósitos de prata (figura 24.b) em todos os grupos, assim como na exposição aguda. Na córnea, houve depósitos de prata tanto na camada escleral (figura 24.c) quanto na dermal (figura 24.d), mas de forma pontual em todas as concentrações de nano TiO<sub>2</sub>, nano ZnO e também no grupo de mistura. Exibiram raros depósitos de prata o cristalino (figura 24.e) em todas as concentração e tipos de agregados de nanopartículas, assim como a cartilagem da esclera (Figura 24.f).

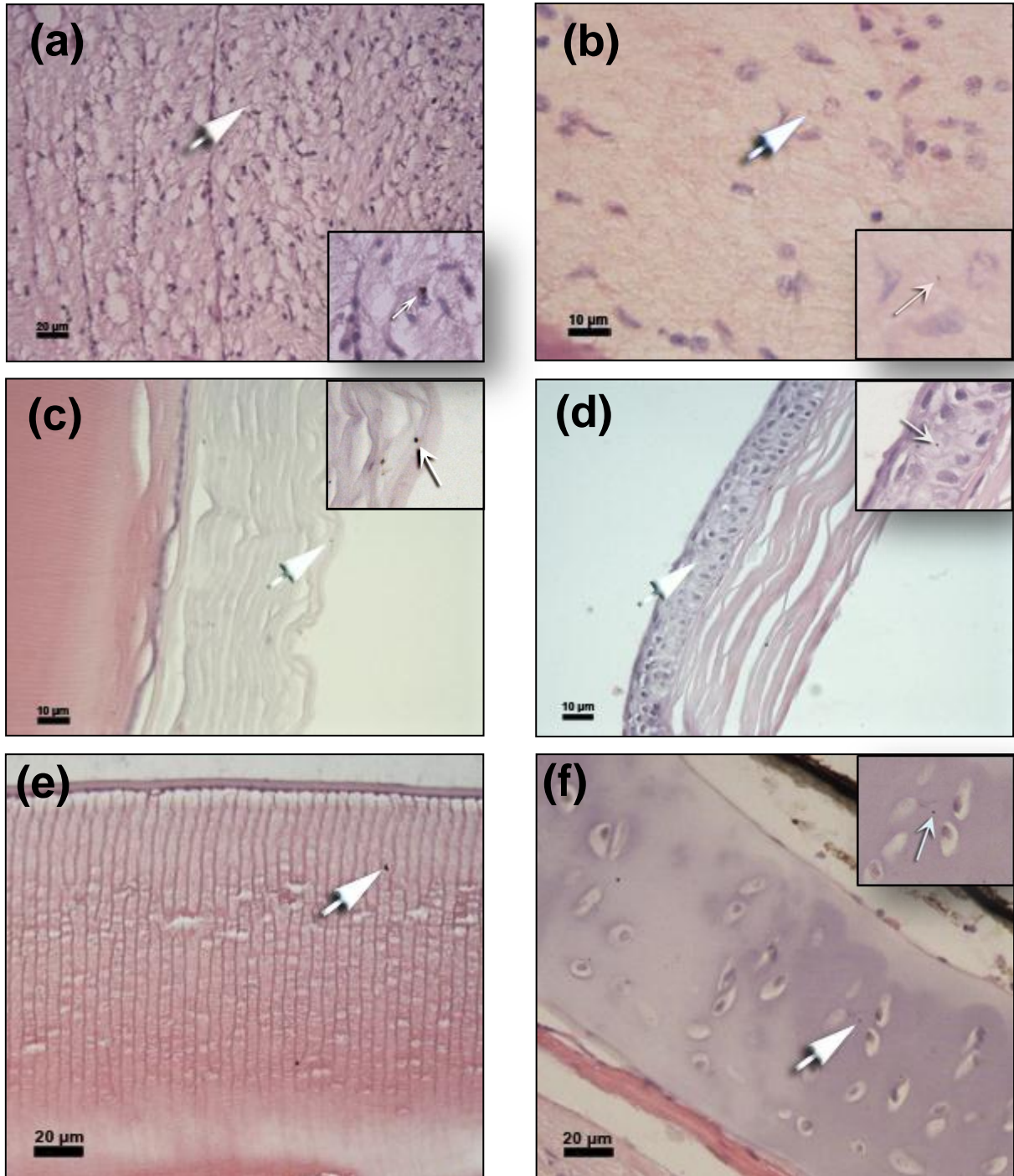


Figura 24. (a) nervo óptico com depósitos de prata (setas) nano ZnO 7 µg/l – aguda; (b) nano TiO<sub>2</sub> (0,1 µg/l) - subcrônica. Camadas da córnea com (setas) depósitos de prata: (c) camada escleral - nano ZnO (700 µg/l), subcrônica (d) camada dermal - nano TiO<sub>2</sub> 0,1, subcrônica. Cristalino com depósitos de prata (setas) – (e) nano TiO<sub>2</sub> (0,1 µg/l), subcrônica; (f) Cartilagem com depósitos de prata (setas) - TiO<sub>2</sub> (0,1 µg/l), subcrônica.

#### 4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

No MET, foi possível observar que as amostras de retina apresentaram pontos eletrodensos. Estas foram visualizadas no interior do núcleo, no citoplasma e em axônios (figura 25). Nestes, pontos eletrodensos foram verificados na mielina, no citoplasma, mitocôndrias, e microtúbulos (figura 26). Acredita-se que estas são células ganglionares, pois são as únicas em que os axônios são mielinizados.

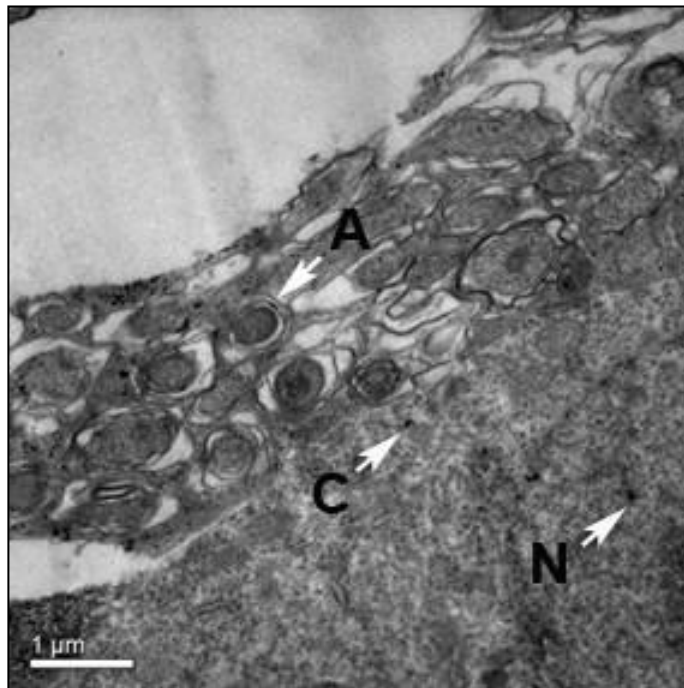


Figura 25. Retina com pontos eletrodensos, possivelmente, em células ganglionares, sob MET- nano  $\text{TiO}_2$  (0,1  $\mu\text{g/l}$ ), subcrônico. Setas indicam pontos eletrodensos no núcleo (N), no citoplasma (C) e no axônio (A).

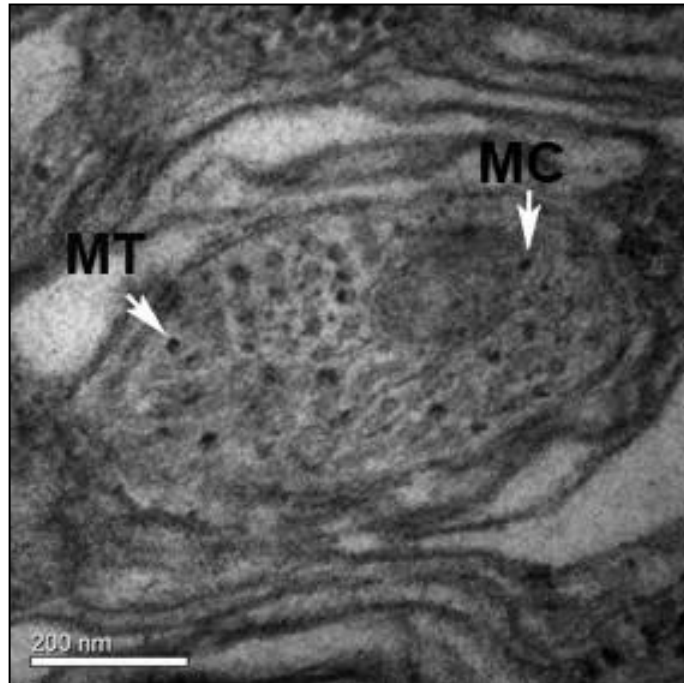


Figura 26. Retina com pontos eletrodensos, sob MET – nano  $\text{TiO}_2$  (0,1  $\mu\text{g/l}$ ), aguda. Setas indicam pontos eletrodensos em microtúbulos (MT) e em mitocôndrias (MC).

Na outra extremidade da estrutura da retina, observou-se pontos eletrodensos no interior do segmento externo de cone simples (figura 27). Curiosamente, não há pontos eletrodensos nos processos caliciais ao redor da célula.

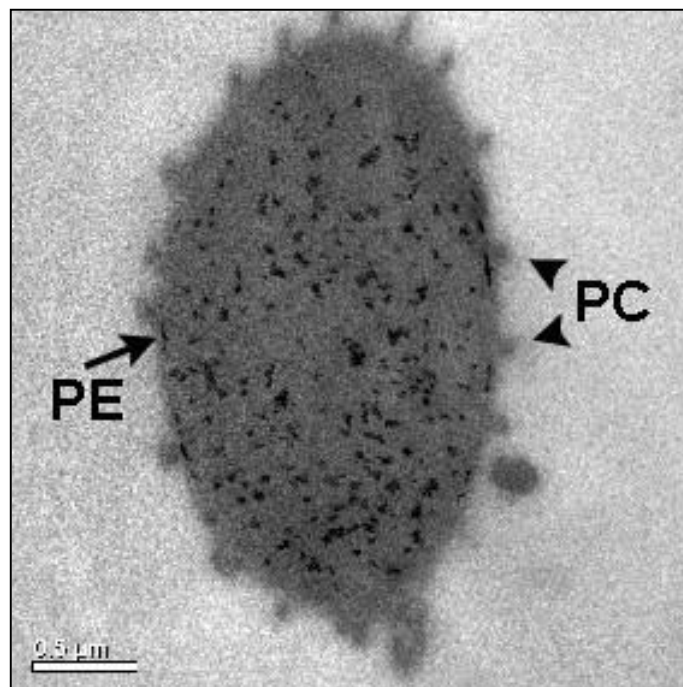


Figura 27. Secção transversal de cone simples da retina de *P. lineatus*, sob MET - nano  $\text{TiO}_2$  (0,1  $\mu\text{g/l}$ ), aguda. Seta indica pontos eletrodensos (PE) e cabeça de seta indica processo calicial (PC), onde nota-se a ausência de pontos eletrodensos,

Além dos cones simples, os cones duplos também apresentaram pontos eletrodensos (figura 28.a). Novamente observou-se que os processos caliciais não apresentaram pontos eletrodensos, assim como o segmento externo acessório desses cone duplos mostra um dos membros do cone duplo em maior aumento. Sob MET, é notável a diferença entre os pontos eletrodensos e os grânulos de melanina das células epiteliais pigmentadas da retina (figura 28.a).

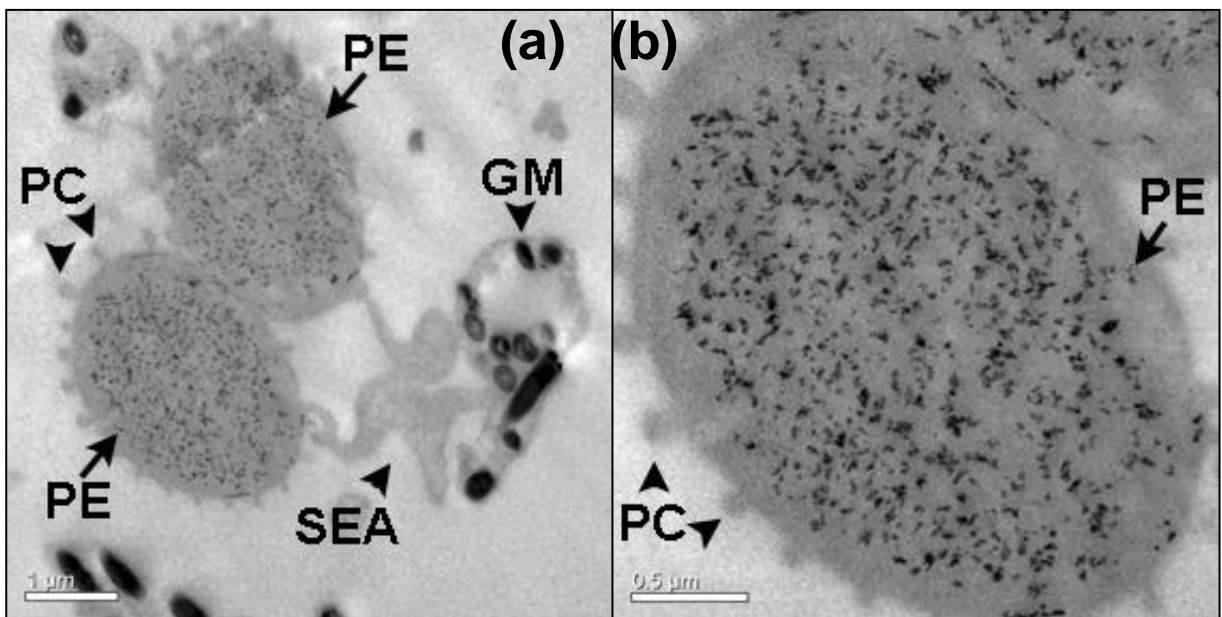


Figura 28. Cone duplo de retina de *P. lineatus*, sob MET - nano TiO<sub>2</sub> (0,1 µg/l), aguda. (a) Seta indica pontos eletrodensos (PE) no interior de ambos os membros de um cone duplo. Já nos processos caliciais (PC) e segmento externo acessório (SEA) não há pontos eletrodensos. Grânulos de melanina (GM) em célula epitelial (b) Maior aumento de um dos membros do cone duplo.

Vesículas endocíticas contendo pontos eletrodensos também foram encontradas (figura 29.a). Possivelmente, estas vesículas estejam em células fagocíticas, como as células da glia da retina. Em maior aumento (figura 29.b), pode-se observar que no interior da vesícula há estruturas eletrondensas menores e maiores, semelhantes às imagens das nanopartículas observadas em MET (figura 14).

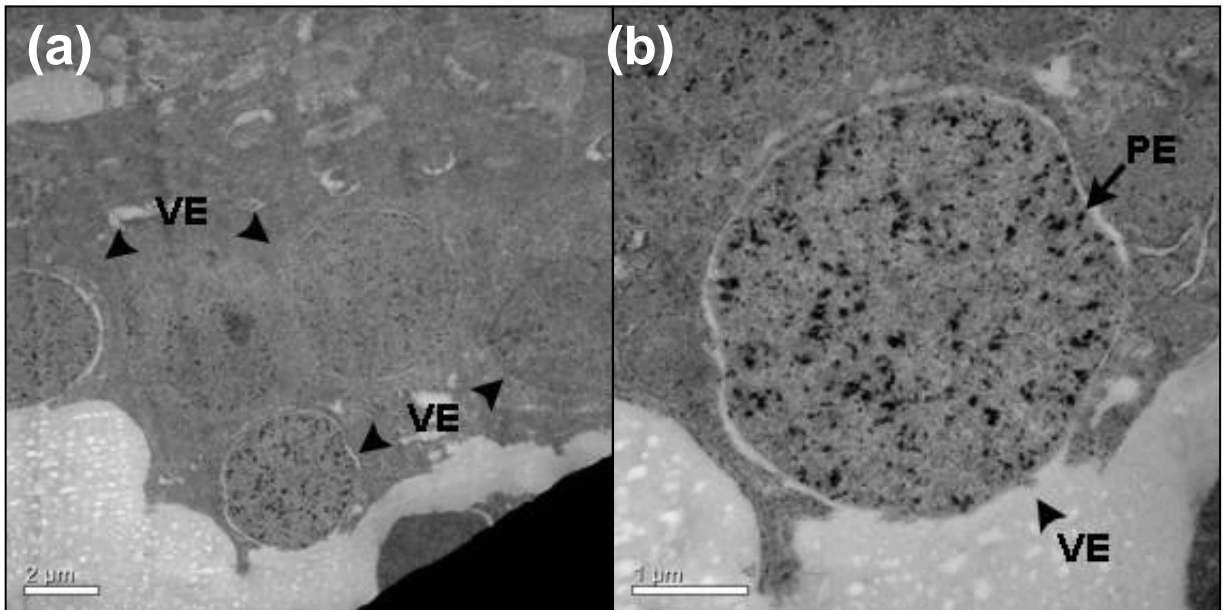


Figura 29. (a) Vesículas endocíticas na retina de *P. lineatus*, sob MET - nano TiO<sub>2</sub> (0,1 μg/l), aguda. Cabeça de seta indica (VE) vesículas endocíticas contendo pontos eletrodensos (PE). (b) maior aumento de uma vesícula endocítica.

Amostras dos grupos controle e expostos a nano ZnO estão sendo analisados, sob MET.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 BIOENSAIO E NANOPARTÍCULAS

As dimensões dos agregados de nanopartículas foram calculadas nas suspensões estoque de  $\text{TiO}_2$  (100 mg/l) e  $\text{ZnO}$  (7g/l), as quais são 10 mil vezes mais concentradas que as maiores concentrações testadas neste trabalho. Há evidências de que quanto maior for a concentração da suspensão de  $\text{nanoTiO}_2$ , maior será a dimensão média desses agregados (XIONG *et al.* 2011). Então, é possível que se as suspensões para cada uma das concentrações adicionadas nos aquários fossem aferidas separadamente quanto as suas dimensões, o tamanho médio dos agregados poderia ser diferente. Então deve-se dimensionar as nanopartículas em suspensão em cada uma das concentrações estudadas. Quanto mais concentrada uma suspensão, maior será a quantidade de partículas num mesmo volume, assim há maior possibilidade dessas partículas de encontrarem e formarem agregados. Deve-se considerar também que após milissegundos da geração de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , estas formam agregados (EPA, 2010), mas mesmo esses agregados podem causar efeitos tóxicos (XIONG *et al.*, 2011).

Considerando a entrada de nanopartículas num organismo via ingestão, apesar dos curimatás serem detritívoros, em condições experimentais deste trabalho, eles alimentavam-se da ração que flutuava na superfície da água. Como a água foi renovada diariamente, não havido tempo de o alimento imergir e absorver/adsorver os agregados de nanopartículas. Essa impregnação de agregados no alimento poderia aumentar a entrada via oral desses nanomateriais no organismo.

Mesmo com a movimentação da água no aquário causada pelas bombas de ar e pela circulação dos peixes, as nanopartículas e seus agregados podem ter sofrido sedimentação, diminuindo a quantidade de nanoagregados em contato direto com os peixes. Mas supondo um ambiente contendo nanopartículas e considerando que esses peixes se alimentam de restos de vegetais e animais no substrato, estas poderiam estar sedimentadas e aumentar a entrada dessas em animais com hábito alimentar detritívoro.

Apesar destas condições, foi verificado que os nano TiO<sub>2</sub> e nano ZnO acumularam-se nos tecidos oculares, incluindo a retina.

## 5.2 MICROSCOPIA DE LUZ

A técnica da autometalografia é uma metodologia já utilizada para a localização de metais na retina de peixes (MELA *et al.*, 2010 e 2012). Esta metodologia pode ser tão sensível ao ponto de detectar até mesmo metais iônicos endógenos, como o zinco endógeno em neurônios do cérebro de ratos (DANSCHER E STOLTENBERG, 2005) embora, os protocolos e reagentes utilizados sejam diferentes dos utilizados no presente trabalho. A variante de íons endógenos detectados pela autometalografia é descartada nesta pesquisa, visto que o grupo que não recebeu nanopartículas não apresentou depósitos de prata em sua estrutura ocular. Assim, os depósitos de prata provenientes da técnica de autometalografia indicam que esta metodologia pode ser utilizada para detecção de nano TiO<sub>2</sub> e ZnO em tecidos oculares.

Análises subjetivas mostram que as camadas nucleares da retina apresentaram mais depósitos de prata, do que as camadas plexiformes. Provavelmente, porque as camadas nucleares contém o corpo celular dos neurônios, com maior espaço intracelular para comportar esses nanoagregados se comparados aos axônios e terminações nervosas presentes nas camadas plexiformes. Há artigos que confirmam a entrada em neurônios de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (RAMSDEN, C. S. *et al.*, 2009; ZUCKER *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2012) e de ZnO (HAO; CHEN, L., 2012). Nanopartículas foram detectadas nas camadas plexiformes através da autometalografia, e também foram encontradas em axônios de ganglionares, por meio do MET. Isso corrobora a ideia de que os agregados de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e ZnO podem atingir tanto o corpo celular, quanto as projeções dos neurônios.

Na retina periférica, a qual contém as células-tronco que originam os neurônios de toda a retina, também foram encontrados depósitos de prata. As células de Müller respondem a danos agudos em outros tipos de células da retina,

aumentando sua taxa de proliferação (STENHAMP, 2011). Portanto, interferências, como a presença de nanopartículas, nesta porção específica da retina podem afetar a dinâmica de renovação celular, além da estrutura como um todo, pois novas células são continuamente adicionadas na margem da retina por toda a vida de um peixe. Como já citado nesta pesquisa, há estudos que relatam os efeitos tóxicos de nanopartículas tanto em neurônios como em glias. Além das nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , outros 3 tipos de nanopartículas<sup>18</sup> também estimulam reações inflamatórias e danos a micróglia e neurônios de cérebro de camundongo (Xue *et al.*, 2012). Nanopartículas de ZnO também podem desregular a homeostase iônica e a função fisiológica em cultura de neurônios do hipocampo (JINGXIA *et al.*, 2009).

Aparentemente, em 5 dias apenas a retina e o nervo óptico foram afetados por ambos os tipos de agregados de nanopartículas. Já na exposição crônica, os agregados de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  atingiram além da retina e nervo óptico, a córnea, a cartilagem, e o cristalino. Esses depósitos podem alterar a estrutura ocular, e conseqüentemente, a função dos mesmos (DIEBOLD; CALONGE, 2010). Há dados na literatura à respeito do uso de nanopartículas como nanocarreadores em alguns tecidos, como a córnea e cartilagem. Nanopartículas de ácido hialurônico e quitosana já são utilizadas para carrear genes para células da córnea humana (DE-LA-FUENTE *et al.*, 2008 *apud* MOHAN *et al.*, 2012). Nanopartículas de PLGA<sup>19</sup> e PNIPAM<sup>20</sup> carregam fator de crescimento semelhante a insulina e fator de crescimento 1, estimulando a proliferação e diferenciação de células mesênquimais de medula óssea em células de cartilagem (RADAD *et al.*, 2012). Já no cristalino, há evidências de que fulerenos complexados com ciclodextrina acumulam-se e induzem danos fototóxicos em células epiteliais do cristalino humano (ZHAO, *et al.*, 2009). Mas ainda não há trabalhos na literatura avaliando a interação de nanopartículas óxido metálicas, como as estudadas neste trabalho, e os tecidos oculares.

---

<sup>18</sup> Nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ , HAP (hidroxiapatita) e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

<sup>19</sup> PLGA - “poly(lactic acid-co-glycolic acid)”

<sup>20</sup> PNIPAM - “poly(isopropylacrylamide)”

Com os resultados obtidos, não foi possível determinar qual a possível via de entrada nas nanopartículas na estrutura ocular.

### 5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os resultados do MET mostram que os pontos eletrodensos são evidências fortes da presença de nanopartículas em células essenciais a percepção visual: os fotorreceptores. Foram observados pontos eletrodensos nos segmentos externos de cones simples e duplos, mas não nos processos caliciais e segmentos externos acessórios destas células, apesar destas estruturas serem conectadas com as fotorreceptores (JANUSCHKA *et al.*, 1987). Possivelmente as pilhas de membranas presentes nos segmentos externos ou a composição molecular, como a presença das proteínas visuais, pode ser a resposta para essa acumulação diferencial. No entanto, mais estudos devem ser feitos para se concluir tal suposição.

As imagens de vesículas endocíticas contendo pontos eletrodensos, sob MET, obtidas neste trabalho são bastante semelhantes com as encontradas em uma pesquisa de exposição de células à nanopartículas de óxido de cobalto por 72h (GORNATI *et al.* 2009 *apud* SAHU; CASCIANO, 2009). Alguns artigos relatam que partículas de TiO<sub>2</sub> são principalmente captadas pela célula através da endocitose dependente de clatrina (SINGH *et al.*, 2007 *apud* FRÖHLICH; ROBLEGG, 2012)

Pontos eletrodensos foram verificados nos microtúbulos que compõe o axônio de possíveis células ganglionares. Há relato de que nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (~ 20 nm) alteram significativamente a conformação da tubulina, além de diminuir e afetarem a polimerização da tubulina *in vitro* (GHESHLAGHI *et al.*, 2008). Microtúbulos têm funções essenciais para as células, como mobilidade e transporte celular. Especificamente nos neurônios, esse filamento do citoesqueleto está envolvido no transporte de vesículas repletas de neurotransmissores, por exemplo. Também participam da divisão celular, processo que ocorre frequentemente na porção periférica da retina (STENKAMP, 2011), local onde também foram encontradas depósitos de prata, sob microscópio de luz.

Na mitocôndria presente em axônios de possíveis células ganglionares também foram observadas pontos eletrodensos. Já é descrito que nanopartículas podem prejudicar a função mitocondrial (KOEHLER *et al.*, 2008; FREYRE-FONSECA *et al.*, 2011; WANG, *et al.*, 2011).

Além de organelas e componentes estruturais celulares, já é descrito que nanopartículas também podem lesar biomoléculas. As de ZnO, por exemplo, podem induzir a apoptose, via p53, em fibroblastos da derme humana (MEYER *et al.*, 2011), podem alterar a liberação do cálcio na via de sinalização de receptores muscarínicos M3 (WANG, H.-J. *et al.*, 2010), ou até mesmo reduzir a atividade da acetilcolinesterase em até 38,1 % em tecido cerebral de *P. lineatus* (RANK-MIRANDA, 2013). Já as de TiO<sub>2</sub> podem alterar no cérebro os níveis iônicos de Ca, Mn, K, Na, Fe e Zn, além de inibir a bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase e acetilcolina, um neurotransmissor encontrado na retina.

## 6. CONCLUSÕES

- Depósitos de prata oriundos da técnica de autometalografia indicam a possibilidade de utilização dessa metodologia na detecção de nanopartículas.

- Os depósitos de prata encontrados através da autometalografia, sob microscópio de luz, indicam a presença de nanopartículas em todas as camadas da retina analisadas e nervo óptico, na exposição aguda. Na exposição subcrônica, foram encontrados depósitos de prata em toda a retina, nervo óptico, córnea, cartilagem da esclera e cristalino.

- Os pontos eletrodensos encontrados sob MET são fortes indícios da presença de nanopartículas em células ganglionares, cones e células de Müller.

- Nesta pesquisa, não foi possível determinar a via de entrada das nanopartículas até a retina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, M. A.; KLYNE, M. A. **Vision in Vertebrates**. New York: Olenum Press, 1985.

ASCHBERGER, K.; MICHELETTI, C.; SOKULL-KLÜTTGEN, B.; CHRISTENSEN, F. M. Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health - Lessons learned from four case studies. **Environment international**, v. 37, n. 6, p. 1143–56, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21397332>>. Acesso em: 22/7/2011.

BAKRI, S. J.; PULIDO, J. S.; MUKHERJEE, P.; MARLER, R. J.; MUKHOPADHYAY, D. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal nanogold in a rabbit model. **Retina**, v. 28, n. 1, p. 147–149, 2008.

BONCI, D. M. O. **Análise morfológica de células amácrinas PV-IR e bipolares PKC-IR em retina de peixe tropical (Hoplías malabaricus) intoxicado com metilmercúrio**. Dissertação (Mestrado em Neurociência) Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BOYES, WILLIAM K; CHEN, R.; CHEN, C.; YOKEL, R. A. The neurotoxic potential of engineered nanomaterials. **Neurotoxicology**, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198707>>. Acesso em: 7/6/2012.

BRASIL -PORTAL. **Investimento em Nanotecnologia pode chegar à R\$ 110 milhões**. 2012. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2012/11/29/investimento-em-nanotecnologia-pode-chegar-a-r-110-milhoes>>. Acesso em: 12/3/2012.

BRUN, E.; CARRIÈRE, M.; MABONDZO, A. In vitro evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated / long-term exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 3, p. 886–896, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.025>>. Acesso em: 12/3/2012.

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G.; GOLIMOWSKI, J.; URBAN, P. L. Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Management**, v. 29, n. 9, p. 2587–95, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427190>>. Acesso em: 12/3/2012.

CARVALHO, C. D. S.; FERNANDES, M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 151, n. 3, p. 437–42, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537655>>. Acesso em: 16/3/2012.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei:Ostariophysi:Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, , n. 622, p. 1–189, 2004. Disponível em: <<http://si.pddr.si.edu/dspace/handle/10088/5149>>. Acesso em: 16/3/2012.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C B R; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation research**, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18638566>>. Acesso em: 16/3/2013.

CHEN, J.; DONG, X.; XIN, Y.; ZHAO, M. Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 101, n. 3-4, p. 493–9, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21276475>>. Acesso em: 30/1/2013.

CHEN, K. L.; ELIMELECH, M. Aggregation and deposition kinetics of fullerene (C60) nanoparticles. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 22, n. 26, p. 10994–1001, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17154576>>. Acesso em: 30/1/2013.

DANSCHER G. Autometallography. A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). **Histochemistry**, v. 81, n. 331, p. 5, 1984.

DANSCHER, G.; NORGAARD, AN O. R. Ultrastructural Autometallography: A Method for silver Amplification of Catalytic Metals. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 33, n. 7, p. 706–710, 1985.

DANSCHER, G.; STOLTENBERG, M. Zinc-specific autometallographic in vivo selenium methods: tracing of zinc-enriched (ZEN) terminals, ZEN pathways, and pools of zinc ions in a multitude of other ZEN cells. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 53, n. 2, p. 141–53, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15684327>>. Acesso em: 16/8/2012.

DE-LA-FUENTE, M.; SEIJO, B.; ALONSO, M. J. Bioadhesive hyaluronan – chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. **Gene Therapy**, v. 15, p. 668–676, 2008.

DIEBOLD, Y.; CALONGE, M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. **Progress in retinal and eye research**, v. 29, n. 6, p. 596–609, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20826225>>. Acesso em: 16/3/2012.

DOWLING, J. R.; DUBIN, M. W. The Vertebrate retina. **Handbook of Physiology**. p.317–339, 1984. Bethesda, MD: American Physiological Society.

DUGAN, L. L.; GABRIELSEN, J. K.; YU, S. P.; LIN, T. S.; CHOI, D. W. Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. **Neurobiology of disease**, v. 3, n. 2, p. 129–35, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9173920>>. Acesso em: 30/1/2013.

EPA, U. S. E. P. A. State of the Science Literature Review : Nano Titanium Dioxide. ,2010.

FERNALD, R. D. Evolution of eyes. **Current opinion in neurobiology**, v. 10, n. 4, p. 444–50, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10981612>>. Acesso em: 30/1/2013.

FILIPPONI, L.; SUTHERLAND, D. Introduction to Nanoscience and Nanotechnologies. **NANOYOU Teachers Training Kit in Nanoscience and Nanotechnologies**. p.1–29, 2010. Denmark: European Community's Seventh Framework Programme. Disponível em: <[http://nanoyou.eu/attachments/188\\_Module-1-chapter-1.pdf](http://nanoyou.eu/attachments/188_Module-1-chapter-1.pdf)>. Acesso em: 30/1/2013.

FINLAY, B. L. The developing and evolving retina: using time to organize form. **Brain research**, v. 1192, p. 5–16, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692298>>. Acesso em: 22/10/2012.

FISH-BASE. **Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1837)**. ,2012. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/Prochilodus-lineatus.html>>. Acesso em: 30/1/2013.

FREYRE-FONSECA, V.; DELGADO-BUENROSTRO, N. L.; GUTIÉRREZ-CIRLOS, E. B. et al. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. **Toxicology letters**, v. 202, n. 2, p. 111–9, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315139>>. Acesso em: 26/8/2012.



FRÖHLICH, E.; ROBLEGG, E. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. **Toxicology**, v. 291, n. 1-3, p. 10–7, 2012. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3273702&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20/2/2013.

GHESHLAGHI, Z. N.; RIAZI, G. H.; AHMADIAN, S.; GHAFARI, M.; MAHINPOUR, R. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. **Acta Biochimica et Biophysica Hungarica**, v. 40, n. 9, p. 777–782, 2008.

GORNATI, R.; PALPIS, E.; GIOACCHINO, M. DI; et al. In Vivo and In Vitro Models for Nanotoxicology Testing. In: S. C. Sahu; D. A. Casciano (Eds.); **Nanotoxicity- From In Vitro and In Vivi Models to Health Risks**. p.610, 2009. Wiley.

GROTZNER, S. R. **Densidade e topografia dos fotoreceptores da retina da tartaruga *Trachemys scripta elegans* com imunocitoquímica de opsinas**. 159f. Tese (Doutorado em Neurociência e Comportamento) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HAO, L.; CHEN, L. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 80, p. 103–110, 2012. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22425733>>. Acesso em: 7/2/2013.

HOSOYA, K.; TOMI, M. Advances in the cell biology of transport via the inner blood-retinal barrier: establishment of cell lines and transport functions. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 1, p. 1–8, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15635153>>. Acesso em: 7/2/2013.

IMAHORI, H.; UMEYAMA, T. **Fullerenes Principles and Applications**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008.

JANUSCHKA, M. M.; BURKHARDT, D. A.; ERLANDSEN, S. L.; PURPLE, R. L. The Ultrastructure of cones in the Walleye Retina. **Vision Research**, v. 27, n. 3, p. 327–341, 1987.

JINGXIA, Z.; LANJU, X.; TAO, Z.; GUOGANG, R.; ZHUO, Y. Influences of nanoparticle zinc oxide on acutely isolated rat hippocampal CA3 neurons. **NeuroToxicology**, v. 30, p. 200–230, 2009.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H.-C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v. 269, n. 2-3, p. 105–119, 2010. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732804>>. Acesso em: 4/3/2012.

KOEHLER, A.; MARX, U.; BROEG, K.; BAHNS, S.; BRESSLING, J. Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas - a new threat to marine life? **Marine environmental research**, v. 66, n. 1, p. 12–4, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18397804>>. Acesso em: 27/6/2011.

KRAAIJ, D. A. **Spectral and Dinamic properties of Cone/Horizontal Cell Interaction in Goldfish Retina**. Academisch proefschrift, 2000.

LIEBEL, S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA, R. C. et al. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1493–500, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600976>>. Acesso em: 16/3/2012.

LOEW, E. R.; LYTHGOE, J. N. The ecology of cone pigments in teleost fishes. **Vision research**, v. 18, n. 6, p. 715–22, 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/664357>>. Acesso em: 7/2/2013.

MA, L.; LIU, J.; LI, NA; et al. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO<sub>2</sub> delivered to the abdominal cavity. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 99–105, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783296>>. Acesso em: 14/2/2013.

MALVERN. **Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes**. ,2007. Disponível em: <[http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zeta potential - An introduction in 30 minutes.pdf](http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zeta%20potential%20-%20An%20introduction%20in%2030%20minutes.pdf)>. Acesso em: 1/3/2013.

MARSHAK, D. W.; DOWLING, J. E. Synapses of cone horizontal axons in golfish retina. **Journal of Comparative Neurology**, v. 246, n. 3, p. 430–443, 1987.

MATSUNAGA, T.; SUZUKI, T.; TANAKA, M.; ARAKAKI, A. Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nano-biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 182–8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306901>>. Acesso em: 1/3/2013.

MAYNARD, A. D. Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk. **Woodrow Wilson International Center for Scholars**, 2006.

MEDINA, C.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; RADOMSKI, A; CORRIGAN, O. I.; RADOMSKI, M. W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British journal of pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 552–8, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2189773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12/3/2012.

MELA, M.; CAMBIER, S.; MESMER-DUDONS, N. et al. Methylmercury localization in Danio rerio retina after trophic and subchronic exposure: a basis for neurotoxicology. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 5, p. 448–53, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20450934>>. Acesso em: 10/7/2011.

MELA, M.; GRÖTZNER, S. R.; LEGEAY, A. et al. Morphological evidence of neurotoxicity in retina after methylmercury exposure. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 407–15, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22531226>>. Acesso em: 16/8/2012.

MEYER, K.; RAJANAHALLI, P.; AHAMED, M.; ROWE, J. J.; HONG, Y. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 25, n. 8, p. 1721–6, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903158>>. Acesso em: 20/2/2013.

MOHAN, R. R.; TOVEY, J. C. K.; SHARMA, A.; TANDON, A. Progress in Retinal and Eye Research Gene therapy in the Cornea : 2005-present. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 31, n. 1, p. 43–64, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.09.001>>. Acesso em: 1/3/2013.

MUSEE, N. Nanowastes and the environment: Potential new waste management paradigm. **Environment international**, v. 37, n. 1, p. 112–28, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20832119>>. Acesso em: 31/10/2012.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, NING. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–7, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456071>>. Acesso em: 1/11/2012.

NEWMAN, M. D.; STOTLAND, M.; ELLIS, J. I. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 4, p. 685–92, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646780>>. Acesso em: 18/10/2012.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 150, n. 1, p. 5–22, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17658673>>. Acesso em: 7/10/2012.

OLIVEIRA-RIBERO, C. A. DE O.; REIS-FILHO, H. S. DOS; GROTZNER, S. R. **Técnicas e Métodos para Utilização Prática em Microscopia**. São Paulo: Santos, 2012.

PEREIRA, B. L.; CINTRA, B.; FONSECA, V. E.; LUNA, H. S. Índice gonadossomático como indicador do período reprodutivo de *Prochilodus lineatus* nos rios Aquidauana e Miranda. **Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal**, 2004.

PORTUGAL, C. C. **Captação e liberação de ácido ascórbico em células de retina em cultura: modulação por receptores ionotrópicos de glutamato**. Programa de Neuroimunologia - Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, 2008. Disponível em: <[http://www.uff.br/neuroimuno/Dissertacao Camila Cabral Portugal.pdf](http://www.uff.br/neuroimuno/Dissertacao%20Camila%20Cabral%20Portugal.pdf)>. Acesso em: 1/3/2013.

PRODOCIMO, M. M. **Avaliação dos efeitos tóxicos do metilmercúrio na retina de duas espécies de teleosteos: *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio*, utilizando um conjunto de biomarcadores biológicos**. Tese (Doutorado em Neurociência e Comportamento), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PROW, T. W.; BHUTTO, I.; KIM, S. Y. et al. Ocular nanoparticle toxicity and transfection of the retina and retinal pigment epithelium. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 4, n. 4, p. 340–9, 2008. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18640079>>. Acesso em: 29/3/2012.

PÉREZ, S.; FARRÉ, M. L.; BARCELÓ, D. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 820–832, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993609000739>>. Acesso em: 19/10/2012.

RADAD, K.; AL-SHAIM, M.; MOLDZIO, R.; RAUSCH, W.-D. Recent advances in benefits and hazards of engineered. **Environment Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 661–672, 2012.

RAGNAILL, M. N.; BROWN, M.; YE, D. et al. Internal benchmarking of a human blood – brain barrier cell model for screening of nanoparticle uptake and transcytosis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 360–367, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.12.024>>. Acesso em: 1/3/2013.

RAMSDEN, C. S.; SMITH, T. J.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 18, n. 7, p. 939–51, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19590957>>. Acesso em: 31/1/2013.

RAMSDEN, J. J. What is nanotechnology? **Nanotechnology Perceptions 1**, p. 3–17, 2005.

RAMÓN Y CAJAL, S. La retina des vertebres. La cellule. **La cellule**. p.17–257, 1983.

RANK-MIRANDA, R. **Respostas biológicas de *Prochilodus lineatus* frente a agregados particulados de dióxido de titânio e óxido de zinco**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

RODIECK, R. W. **The Vertebrate Retina: Principles of Structure and Fuction**. WH Freeman, San Francisco, 1973.

SAHU, S. C.; CASCIANO, D. A. **Nanotoxicity: in vivo and in vitro models to health risks**. Wiley, 2009.

SANTOS, L. J. DEO; ROCHA, G. P.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. DE. Fullerenos [C60]: Química e Aplicações. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 680–693, 2010.

SERVICE, R. F. Nanotechnology Grows Up. **Science**, v. 304, n. June, p. 1732–1734, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/304/5678/1732.full>>. Acesso em: 1/3/2013.

SHARMA, H. S.; WESTMAN, J. **Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease**. Elsevier, 2004.

SHEW, A. Nanotech's History: An Interesting, Interdisciplinary, Ideological Split. **Bulletin of Science, Technology & Society**, v. 28, n. 5, p. 390–399, 2008. Disponível em: <<http://bst.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0270467608322535>>. Acesso em: 21/10/2012.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, CLÁUDIA B R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 69, n. 1, p. 112–20, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368761>>. Acesso em: 16/3/2012.

SINGH, S.; SHI, T.; DUFFIN, R. et al. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO<sub>2</sub>: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 222, n. 2, p. 141–51, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599375>>. Acesso em: 20/2/2013.

STENKAMP, D. L. The rod photoreceptor lineage of teleost fish. **Progress in retinal and eye research**, v. 30, n. 6, p. 395–404, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3196835&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13/2/2013.

TANIGUCHI, N. On the basic concept of nanotechnology. **Proceedings of the International Conference on Production Engineering**, p. 1823, 1974.

ULLMANN, J. F. P.; MOORE, B. A.; TEMPLE, S. E.; FERNÁNDEZ-JURICIC, E.; COLLIN, S. P. The retinal wholemount technique: a window to understanding the brain and behaviour. **Brain, behavior and evolution**, v. 79, n. 1, p. 26–44, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22142853>>. Acesso em: 3/8/2012.

WALLS, G. L. **The Vertebrate Eye and its Adaptive Radiation**. 1st ed. Michigan, USA: The Cranbook Press, 1942.

WANG, H.-J.; GROWCOCK, A. C.; TANG, T. et al. Zinc oxide nanoparticle disruption of store-operated calcium entry in a muscarinic receptor signaling pathway. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 24, n. 7, p. 1953–61, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20708676>>. Acesso em: 20/2/2013.

WANG, JIANGXUE; LIU, Y.; JIAO, F. et al. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles. **Toxicology**, v. 254, n. 1-2, p. 82–90, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929619>>. Acesso em: 24/1/2013.

WANG, JIANYONG; SUN, W.; ALI, S. F. Nanoparticles: Is Neurotoxicity a Concern? In: S. C. Sahu; D. A. Casciano (Eds.); **Nanotoxicity- Fron In Vitro and In Vivi Models to Health Risks**. p.608, 2009. Wiley.

WANG, Y.; AKER, W. G.; HWANG, H. et al. A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells. **The Science of the total environment**, v. 409, n. 22, p. 4753–62, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3185176&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7/1/2013.

WIELGUS, A. R.; ZHAO, B.; CHIGNELL, COLIN F; HU, D.-N.; ROBERTS, J. E. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human retinal pigment epithelial cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 242, n. 1, p. 79–90, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800903>>. Acesso em: 19/1/2013.

WOODROW WILSON INTERNATIONAL CENTRE FOR SCHOLARS. A nanotechnology consumer products inventory Project on Emerging Nanotechnologies. ,2008. Disponível em: <[www.nanotechproject.org](http://www.nanotechproject.org)>. Acesso em: 1/2/2013.

XIONG, D.; FANG, T.; YU, L.; SIMA, X.; ZHU, W. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. **The Science of the total environment**, v. 409, n. 8, p. 1444–52, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296382>>. Acesso em: 9/7/2012.

XUE, Y.; WU, J.; SUN, J. Four types of inorganic nanoparticles stimulate the inflammatory reaction in brain microglia and damage neurons in vitro. **Toxicology letters**, v. 214, n. 2, p. 91–8, 2012. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22939914>>. Acesso em: 16/2/2013.

YACOB, A.; WISE, C.; KUNZ, Y. W. The Accessory Outer Segment of Rods and Cones in the Retina of the Guppy , *Poecilia reticulata* P . ( Teleostei ) an Electron Microscopical Study. **Cell and Tissue Research**, v. 193, p. 181–193, 1977.

ZARBIN, M. A.; MONTEMAGNO, C.; LEARY, JAMES F; RITCH, R. Nanotechnology in ophthalmology. **Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie**, v. 45, n. 5, p. 457–76, 2010. Canadian Ophthalmological Society. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20871642>>. Acesso em: 15/3/2012.

ZARBIN, M. A.; MONTEMAGNO, C.; LEARY, JAMES FRANCIS; RITCH, R. Nanomedicine for the treatment of retinal and optic nerve diseases. **Current opinion in pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 134–48, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142104>>. Acesso em: 18/2/2013.

ZHAO, B.; HE, Y.-Y.; CHIGNELL, COLLIN F. et al. Difference in phototoxicity of cyclodextrin complexed fullerene [(gamma-CyD)(2)/C(60)] and its aggregated derivatives toward human lens epithelial cells. **Chem Res Toxicol**, v. 22, n. 4, p. 660–667, 2009.

ZUCKER, R. M.; MASSARO, E. J.; SANDERS, K. M.; DEGN, L. L.; BOYES, W K. Detection of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cells by flow cytometry. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 77, n. 7, p. 677–85, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20564539>>. Acesso em: 15/10/2011.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 - Protocolo para preparação do fixador Fluido de Bouin

75 ml de solução saturada de ácido pícrico

25 ml de formalina 40%

5 ml de ácido acético glacial

### APÊNDICE 2 – Protocolo de *Bleaching*

#### Desparafinização

Xilol I - Xilol II (5 min em cada solução)

#### Hidratação

Xilol + Álcool 100% (1:1) (5 min)

Álcool 100% - Álcool 90% - Álcool 80% - Álcool 70% - Álcool 60% - Álcool 50% (5 min em cada solução)

H<sub>2</sub>O destilada (10 minutos)

#### *Bleaching*

Solução de *Bleaching* (8 minutos)

Lavar em água destilada (5 min)

#### Protocolo para preparo da solução de *Bleaching*

-90 ml de PB 0,1 M

-10 ml de peróxido do oxigênio 30%

ajustar o pH para 11, 95 com solução KOH 1M

### **APÊNDICE 3 - Protocolo da Autometalografia com goma arábica e nitrato de prata**

A técnica da autometalografia detecta metais nos tecidos biológicos e consiste em 3 etapas principais:

- I) Desparafinização e Hidratação
- II) Revelação e Fixação
- III) Coloração e Montagem da lâmina permanente

#### **I) Desparafinização e Hidratação dos cortes**

Xilol I - Xilol II - Álcool etílico 100 % + Xilol (1:1) - Álcool etílico 100 % - Álcool etílico 90 % - Álcool etílico 70 % - Álcool etílico 50 % - Água destilada (5 min em cada solução)

Secar a lâmina em estufa (37°C) por 1h ou 24h em temperatura ambiente.

#### **II) Revelação e fixação**

Estas etapas devem ser realizadas em ambiente ausente de luz.

São necessários quatro reagentes para preparar a solução de revelação:

##### 1. Goma arábica

500 g de goma arábica

100 ml de água destilada

Adicionar aos poucos 500 g de goma arábica em pó em 1000 ml de água destilada. Agitar lentamente com um bastão de vidro, pois faz espuma. Após diluir, filtrar com gaze. Fazer alíquotas de 40 ml e congelar em -20°C. Não é tóxico.

Rendimento: 29 tubos de centrífuga com 40 ml de goma.

Validade: 6 meses congelada

Para preparar a solução de revelação a goma deve ser descongelada. Para isso, coloque o tubo com a goma em um recipiente com água, por aproximadamente 20 min.

## 2. Tampão Citrato

15,3 g de ácido cítrico

14,1 g de citrato de sódio

aprox. 60 ml de água destilada

Diluir 15,3 g de ácido cítrico e 14,1 g de citrato de sódio em água destilada. Completar o volume para 60 ml. Não é tóxico.

## 3. Hidroquinona

0,51 g de hidroquinona

aprox. 9 ml de água destilada

Diluir 0,51g de hidroquinona em água destilada aquecida a +/- 40°C, até ficar incolor e homogênea. Completar o volume total para 9 ml. É tóxica! Dilua na capela!

Validade: 1 semana na geladeira

## 4. Prata

0,066 g de nitrato de prata

9 ml de água destilada

**ATENÇÃO!!!** Não expor a prata diretamente à luz! Não utilize objetos metálicos para pesá-la! Dilua apenas no ESCURO e adicione por último na solução de revelação!

Dilua 0,066 g de nitrato de prata (cristais) em 9 ml de água destilada no escuro, agitando com um bastão de vidro até ficar homogênea.

### **Solução de Revelação (60 ml):**

36 ml de goma arábica

6 ml de tampão citrato

9 ml de hidroquinona

9 ml prata (última a ser adicionada na solução e apenas no escuro)

Os primeiros reagentes podem ser misturados momentos antes do processo e na luz, depois devem ser levados para a sala escura. Nela, a prata deve ser



diluída em água destilada, adicionada na solução e esta despejada na cubeta com as lâminas.

Após o tempo de reação, lavar durante 5 min, trocando a água destilada 3 vezes.

### **Fixação**

2,5 g de Tiosulfato de Sódio

100 ml de água destilada

Ainda na mesma cubeta, fixar com tiosulfato de sódio a 2,5 % por 2 min. Lavar durante 5 min, trocando a água destilada 3 vezes.

### **III) Coloração e montagem da lâmina**

Hematoxilina (tempo variável) - Água corrente (5 min) - Água destilada (3 x por 5 min) - Eosina (tempo variável) - Água destilada (3 x por 5 min) - Álcool etílico 70% (5 min) - Álcool etílico 80% (5 min) - Álcool etílico 90% (5 min) - Álcool etílico 100 % I (5 min) - Álcool etílico 100 % II (5 min) - Álcool etílico 100 % + Xilol (5 min) - Xilol I (5 min) - Xilol II (5 min)

Montagem da lâmina utilizando a resina Entellan (Merck®)

### **APÊNDICE 4 – Protocolo de gelatinização de lâminas**

Lavagem das lâminas comuns:

- 1° Lavar as lâminas com água e sabão;
- 2° Lavar as lâminas com água destilada;
- 3° Lavar as lâminas com NaOH 0,1 M por 15 min;
- 4° Lavar as lâminas com água destilada.

Solução de Gelatinização

Esquentar 250 ml de água destilada até 70°C. Adicionar 1,25 g de gelatina em pó (Sigma) até dissolver tudo. Depois, acrescentar 0,16 g sulfato de potássio cromo (também chamado de sulfato de cromo potássio ou alúmen de cromo) CUIDADO, esse reagente é TÓXICO!

Filtrar a solução e colocar em uma cuba envolta por papel alumínio, dentro de uma caixa de isopor com água quente (para evitar perda de temperatura)

#### Procedimento

1° cuba: álcool éter (ou éter etílico)

2° cuba: água destilada

3° cuba: água ultrapura quente (para evitar perda de temperatura da solução de gelatinização)

4° cuba: solução de gelatinização

Trocar a água destilada e ultrapura a cada 2 conjunto de lâminas.  
10 minutos em cada solução.

#### Secagem

Estufa a 37°C por no mínimo 48 h, ou melhor 72 h. Manter as lâminas na vertical

#### Validade

Manter as lâminas em blocos envoltas por papel dentro da própria caixa, para manter livre de humidade. Assim podem ser usadas por muito tempo.

### **APÊNDICE 5** - Protocolo para preparação do fixador *Karnovsky*.

#### Fixação

##### Solução de fixação

10 ml de tampão cacodilato de sódio 0,2 M

2 ml de glutaraldeído 25%

8 ml de paraformaldeído 2%

10 µl de CaCl<sub>2</sub> 1M

Mergulhar as amostras na solução de fixação por 2 h

Lavar em tampão cacodilato de sódio 0,1 M

#### Pós-fixação

Tetróxido de ósmio 1% por 2h no escuro

Lavar em tampão cacodilato de sódio 0,1 M

#### Pré-contrastação

Uranila 1% *over night* no escuro

Lavar em tampão cacodilato de sódio 0,1 M

#### Desidratação

Etanol 50% - 70% - 90% - 95% - 100% I - 100% II (15 min cada)

Óxido de propileno (15 min cada)

#### Inclusão

Óxido de propileno/ resina (2:1) (2h)

Óxido de propileno/ resina (1:1) (2h)

Óxido de propileno/ resina (1:2) (2h)

Resina PoliEmbed<sup>®</sup> *per noite* no vácuo

#### Inclusão

Acondicionar as amostras e etiquetas de identificação na resina nos moldes contendo resina PoliEmbed<sup>®</sup> e manter o conjunto na estufa a 60°C por 72 h.