



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Beatriz da Silva Rosa Bonadiman

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO E DO SISTEMA
PURINÉRGICO EM CÉLULAS DO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA
EXPOSTAS AO EXTRATO ETANÓLICO DE *Astrocaryum aculeatum***

FLORIANÓPOLIS

2021

Beatriz da Silva Rosa Bonadiman

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO E DO SISTEMA
PURINÉRGICO EM CÉLULAS DO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA
EXPOSTAS AO EXTRATO ETANÓLICO DE *Astrocaryum aculeatum***

Tese de qualificação submetida ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Margarete Dulce Bagatini

Co-orientadora: Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bonadiman, Beatriz da Silva Rosa
AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO E DO SISTEMA
PURINÉRGICO EM CÉLULAS DO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA
EXPOSTAS AO EXTRATO ETANÓLICO DE *Astrocaryum aculeatum* /
Beatriz da Silva Rosa Bonadiman ; orientadora, Margarete
Dulce Bagatini, coorientador, Ariane Zamoner Pacheco de
Souza, 2021.

87 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Degeneração macular relacionada à idade.
3. Produtos naturais. 4. Tucumã. I. Bagatini, Margarete
Dulce. II. Zamoner Pacheco de Souza, Ariane . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Beatriz da Silva Rosa Bonadiman

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof(a). Dr(a). Carla Inês tasca
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Alencar Kolinski Machado
Universidade Franciscana

Prof(a). Dr(a). Jucimara Baldissarelli
Universidade Federal de Pelotas

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Margarete Dulce Bagatini, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2021.

Esse trabalho é dedicado ao meu querido esposo Darlan,
a minha filha Maria Luiza e aos meus pais Ivo e Maria Juleide.

AGRADECIMENTOS

É muito gratificante ter a quem agradecer ao término de um trabalho. Agradecer, que segundo o dicionário é o ato de reconhecimento do bem feito por alguém.

Agradeço a Deus pela dádiva da vida, por ser a minha força, minha fé e minha esperança.

Agradeço ao meu esposo Darlan Bonadiman por todo amor, apoio e compreensão, por sempre acreditar em mim e por jamais ter deixado de me incentivar. Você sempre esteve comigo. Muito obrigada meu amor!

À minha querida filha, Maria Luiza por ter me transformado como ser humano, filha você chegou para iluminar nossas vidas e mostrou que eu tenho uma força incrível.

A toda a minha família: meus pais, Ivo e Maria Juleide da Silva Rosa e meus irmãos Vanderlete, Vanderlei, Amarildo, obrigada por estarem comigo sempre.

À professora Ivana Beatrice Mânica da Cruz, por me proporcionar a experiência do fantástico mundo da ciência no mestrado e por ser um grande exemplo de pesquisadora.

À professora Margarete Dulce Bagatini, minha orientadora por ter aberto as portas para mim, por sempre acreditar em mim e não medir esforços para concretizar as nossas ideias e projetos. Obrigada por todas as oportunidades que me deste, desde a participação de inúmeros outros trabalhos até a organização de eventos. Muito obrigada!

À professora Ariane Zamoner Pacheco de Souza, meu mais profundo obrigado, você foi a principal responsável para que eu pudesse entrar no doutorado e realizar esse sonho. Muito obrigada, por abrir as portas para mim em 2017 sem me conhecer. Serei eternamente grata a você.

À minha querida colega de laboratório e que se tornou uma grande amiga Filomena Marafon, por sempre estar disponível para me ajudar em todas as situações.

Aos meus grandes amigos de pesquisa e da vida, Grazielle Castagna Cezimbra Weis, Audrei de Oliveira Alves e Charles Elias Assmann, vocês são os meus irmãos de coração. Muito obrigada por sempre estarem comigo.

À Aline Mânica que me apresentou a professora Margarete.

As colegas do laboratório BioSignal, o tempo vivido com você foi muito valioso.

Aos alunos de iniciação científica que contribuíram para elaboração dessa tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa nos primeiros anos do doutorado.

À Universidade Federal de Santa Catarina, a todos os professores, com os quais eu tive o privilégio de aprender, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela formação proporcionada.

À Universidade Federal da Fronteira Sul campus Chapecó por toda a estrutura de pesquisa disponibilizada.

E, por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho e deste sonho.

Muito obrigada!

“Inteligência é a capacidade de se adaptar as mudanças”

(HAWKING, Stephen)

RESUMO

O envelhecimento humano está associado ao risco de desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas. Entre as doenças que acometem os idosos, destacam-se as que comprometem a visão. O dano nos fotorreceptores, nesse período, contribui para a deficiência visual em uma variedade de doenças da retina. A mais severa delas é a degeneração macular relacionada a idade (DMRI). Essa doença é a principal causa de deficiência visual e cegueira em idosos em todo o mundo e é associada a fatores de risco como: poluição, obesidade, tabagismo, hipertensão e exposição à luz. Esses fatores de risco levam à geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam estresse oxidativo. O estresse oxidativo desempenha um papel crucial na patogênese dessa doença. Soma-se a isso a ativação do sistema imunológico que estimula a produção de citocinas inflamatórias, a angiogênese, danos de proteínas e DNA, apoptose e por fim a morte dos fotorreceptores e perda progressiva da visão. Sendo assim, minimizar esses danos oxidativos e inflamatórios é uma estratégia a ser considerada para essa doença. Algumas investigações sugerem que moléculas bioativas, encontradas em alimentos, como compostos fenólicos e alcaloides, participariam do processo de redução dos danos aos fotoreceptores e melhorariam a condição visual. Dessa forma, o presente estudo investigou o efeito antioxidante e anti-inflamatório do extrato etanólico de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) em um modelo experimental *in vitro* de DMRI. O modelo de DMRI induzida por Paraquat em células ARPE-19 foi escolhido para avaliar os potenciais efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do extrato. Neste modelo, as células foram tratadas com 50µg/ml do extrato etanólico de tucumã por 24h e expostas a 30µM de Paraquat por 6h. O extrato na concentração utilizada não foi tóxico e melhorou a viabilidade das células e foi eficiente em prevenir necrose e apoptose, danos oxidativos e moleculares. Nos testes para avaliar os marcadores de inflamação o extrato apresentou efeitos anti-inflamatórios por modular a atividade das purinas, prevenindo a morte celular. Além disso, o extrato reduziu significativamente a expressão das citocinas pró-inflamatórias (*IFN*, *IL-6*, *IL-2* e *TNF*) e estimulou as anti-inflamatórias (*IL-10* e *IL-4*). Assim, verificamos que o extrato alcoólico de tucumã apresenta efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios no modelo estudado, sugerindo que esse fruto amazônico é um composto natural promissor na terapêutica de doenças crônicas como a DMRI.

Palavras-chave: Antioxidante. Anti-inflamatório. Tucumã. Envelhecimento. Visão.

ABSTRACT

Human aging is associated with the risk to develop chronic degenerative diseases. Among the diseases that are common in the elderly population, eyesight impairment is the most prominent. Damage to photoreceptors in this stage of life plays a key role in vision disorders in an array of retina diseases. The most severe being age-related macular degeneration (AMD). It is the main cause of visual impairment and blindness in the elderly population worldwide and is associated to risk factors such as pollution, obesity, smoking, high blood pressure, and light exposure. These risk factors lead to the development of unmanageable reactive oxygen species (ROS) that cause oxidative stress. Oxidative stress plays a crucial part in the pathogenicity of this disease. In addition to the activation of the immune system that stimulates the production of inflammatory cytokines, angiogenesis, DNA and protein damage, apoptosis, and ultimately the death of photoreceptors and progressive vision loss. Thus, minimizing oxidative and inflammatory damage is a strategy to be considered against this disease. A number of studies suggest that bioactive molecules such as phenolic and alkaloid compounds, which are found in food, could be part of the process of reduction of damage to photoreceptors and improve visual condition. Therefore, the present study investigated the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Tucumã* (*Astrocaryum aculeatum*) ethanolic extract in an experimental model of AMD. The model of Paraquat-induced AMD in ARPE-19 cells was chosen to assess the potential antioxidant and anti-inflammatory effects of the extract. In this model, cells were treated with 50µg/ml *Tucumã* extract for 24h and then exposed to 30µM Paraquat for 6h. The extract concentration used showed no cell toxicity, improved cell viability, and efficiently prevented necrosis, apoptosis, molecular and oxidative damage. The extract showed anti-inflammatory effects in tests that assess inflammatory markers because it modulates purine activity. Also, the extract significantly reduced the expression of pro-inflammatory cytokines (*IFN*, *IL-6*, *IL-2* and *TNF*) and stimulated anti-inflammatory cytokines (*IL-10* e *IL-4*). Thus, we verified that *Tucumã* alcoholic extract has antioxidant and anti-inflammatory effects in the studied model, what suggests that this Amazon fruit is a promising natural compound in the therapy of chronic diseases such as AMD.

Keywords: Antioxidant. Anti-inflammatory. Natural Product. Aging. Vision.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspectos Anatômicos da visão	20
Figura 2 - Retinografia de retina.....	23
Figura 3 - Visão normal e visão de um paciente com DMRI.....	24
Figura 4 - Fruto do Tucumã	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADO	Adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
AGE	Acidos graxos essenciais
AMP	Monofosfato de adenosina
AREDS	<i>Age-Related Eye Disease Study</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
ATCC	American tyoe culture collection
AV	Acuidade visual
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
CaCl ₂	Clóreto de cálcio
CCG	Camada de células ganglionares
CFN	Camada de fibra nervosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNI	Camada nuclear interna
CPE	Camada plexiforme externa
CPI	Camada plexiforme interna
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPR	Epitélio pigmentar da retina
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interlecina 10
IL-18	Interleucina 18
IL-33	Interleucina 33

KCL	Cloreto de potássio
LPO	Lipoperoxidação lipídica
MLI	Membrana limitadora interna
MLE	Membrana limitadora externa
MTT	MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaCl	Cloreto de sódio
NLRP-3	Inflamassoma
NOX	NADPH Oxidase
RD	Retinopatia diabética
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Retinografia
SNC	Sistema Nervoso Central
OCT	Tomografia de coerência optica
O ₂ -	Superóxido
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógeno
PI	Iodeto de propidio
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Tris-HCL	Tris-hidrocloroeto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1.1 Objetivo geral.....	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
2 JUSTIFICATIVA	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 ASPECTOS ANATÔMICOS E ENVELHECIMENTO OCULAR	20
3.2 DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE E ASPECTOS EPIDEMIOLOGÍCOS	21
3.3.1 Sintomas e diagnóstico	24
3.4 TRATAMENTO	26
3.5 ESTRESSE OXIDATIVO: UM POTENCIAL MECANISMO ENVOLVIDO NA DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE	27
3.6 MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO COMO ASPECTO FISIOPATOLÓGICO DA DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE	28
3.7 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA.....	29
3.8 TUCUMÃ.....	31
4 METODOLOGIA	33
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
4.2 EXTRATO.....	33
4.2.1 A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	34
4.3 VIABILIDADE CELULAR E PERFIL OXIDATIVO	35
4.3.1 Viabilidade Celular	35
4.3.1.1 <i>MTT</i>	35
4.3.1.2 <i>Apoptose e necrose</i>	35
4.3.1.3 <i>Morfologia</i>	35
4.3.2 Perfil Oxidativo	35
4.3.2.1 <i>Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)</i>	35
4.3.2.2 <i>Peroxidação lipídica (TBARS)</i>	36
4.3.2.3 <i>Óxido Nítrico</i>	37
4.3.2.4 <i>Superóxido</i>	37
4.3.2.5 <i>Picogreen</i>	37
4.4 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E INFLAMAÇÃO	37
4.4.1 Sinalização Purinérgica	37

4.4.1.1 Mensuração da hidrólise do ATP em ADP e AMP	37
4.4.1.2 Desaminação da adenosina	38
4.4.1.3 Expressão da enzima E-NTPDase e E-5`-Nucleotidase.....	38
4.4.2 Perfil inflamatório	39
4.4.2.1 Interleucinas	39
5 RESULTADOS	39
5.1 CAPÍTULO 1.....	40
5.2 CAPÍTULO 2.....	52
5.3 CAPÍTULO 3.....	62
6 DISCUSSÃO	70
CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento humano está associado a uma série de alterações metabólicas dos órgãos e sistemas fisiológicos que levam ao aparecimento de disfunções crônicas degenerativas (DATTA *et al.*, 2017; KAM *et al.*, 2019). Entre as doenças crônicas que mais acometem os idosos estão as que comprometem a visão, tais como: a catarata, a degeneração macular relacionada à idade (DMRI), o glaucoma e a retinopatia diabética (RD) (ILOKI-ASSANGA *et al.*, 2015; LEWIS *et al.*, 2015; DATTA *et al.*, 2017).

A DMRI é a principal e mais comum causa de perda visual irreversível em indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos nos países em desenvolvimento, como o Brasil (BAHADORANI; SINGER, 2017; HANDA *et al.*, 2019). É clinicamente caracterizada pelo aparecimento de pequenos depósitos branco-amarelados chamadas de drusas e por alterações nas células do epitélio pigmentar da retina (EPR) (ROZING *et al.*, 2019). Essa doença manifesta-se sob duas formas principais: a forma seca, sem neovascularização e a forma exsudativa, neovascular, com efeitos deletérios (YONEKAWA; MILLER; KIM, 2015; DATTA *et al.*, 2017).

A etiologia da DMRI ainda não está completamente esclarecida. Estudos sugerem que as reações fotoquímicas originadas no EPR tornam suas estruturas extremamente suscetíveis aos danos causados pelo acúmulo de moléculas oxidantes e pelo processo inflamatório, já que a retina é um dos tecidos com maior taxa metabólica do corpo humano (DATTA *et al.*, 2017). Além disso, algumas investigações sugerem que a poluição, o tabagismo, a hipercolesterolemia, a hipertensão arterial e a exposição à luz potencializam os danos na retina (KIM *et al.*, 2010; ROZING *et al.*, 2019).

Nessa situação, a resposta inflamatória ocorre com o objetivo de remover as moléculas oxidantes e promover a reparação do tecido danificado (DATTA *et al.*, 2017). Segundo Natoli e colaboradores (2017), nesse processo acontece acúmulo de macrófagos na retina e no espaço sub-retiniano, bem como, a expressão de citocinas inflamatórias, agravando a perda visual.

Soma-se a isso a sinalização purinérgica, que tem uma atividade fundamental no processo inflamatório. Essa função é particularmente desempenhada pela participação de biomoléculas, tais como os nucleotídeos de adenina, 5'-trifosfato de adenosina (ATP), 5-difosfato de adenosina (ADP) e 5'-monofosfato de adenosina (AMP) e seu derivado o nucleosídeo de adenosina (CORSO *et al.*, 2016).

Esse aumento na concentração de ATP não está envolvido apenas na sinalização entre os diferentes tipos de células, mas, altos níveis ATP no meio extracelular e promovem neurodegeneração retiniana potencializando o dano nesse tecido (SHEN *et al.*, 2005; FLETCHER, 2010; CORSO *et al.*, 2016).

Considerando os fatores de risco, bem como, o estresse oxidativo e o processo inflamatório, investigar tratamentos alternativos que reduzam ou minimizem esses processos danosos são relevantes. Alguns pesquisadores sugerem que produtos naturais ricos em ácido ascórbico, α -tocoferol e carotenoides poderiam trazer benefícios a visão, diminuindo a progressão da doença (SOUZA-FILHO *et al.*, 2013; GARCÍA-MONTALVO; MATÍAS-PÉREZ, 2015).

Nesse sentido, o fruto nativo da Amazônia Brasileira, Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) ganha destaque pois apresenta uma matriz química rica em vitamina A, ácidos graxos, carotenoides (alltrans- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno, all-trans- α -caroteno, trans- β -criptoxantina), catequinas e quercetina (BONY *et al.*, 2012; SOUZA-FILHO *et al.*, 2013).

O tucumã é amplamente utilizado na medicina tradicional pelas comunidades ribeirinhas amazônicas com o objetivo de tratar doenças crônicas. Alguns poucos estudos sugerem o potencial anti-inflamatório (SAGRILLO *et al.*, 2015), antimicrobiano (JOBIM *et al.*, 2014), anticarcinogênico (SOUZA-FILHO *et al.*, 2014), e atividades antioxidantes (CABRAL *et al.*, 2020). No entanto, não se têm estudos descrevendo os efeitos desse fruto em doenças que comprometam a visão.

Portanto, considerando que a DMRI é a principal causa de perda visual na população idosa, que não possui um tratamento eficaz disponível e a sua etiologia ainda não está elucidada, investigar produtos naturais com potencial terapêutico é de extrema valia, objetivando proporcionar uma melhora na acuidade visual e na qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela doença.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar o efeito antioxidante e anti-inflamatório do extrato etanólico de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) em um modelo experimental *in vitro* de DMRI.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar e escrever uma revisão bibliográfica.
- Preparar o extrato do fruto e identificar os compostos presentes na matriz química do extrato etanólico do tucumã;
- Estudar a citotoxicidade do extrato de tucumã nas células do epitélio pigmentar da retina;
- Investigar o efeito antioxidante no modelo experimental de DMRI;
- Verificar a capacidade de prevenir danos moleculares do extrato;
- Analisar a atividade anti-inflamatória do extrato no modelo estudado.

2 JUSTIFICATIVA

Dentre as doenças que acometem idosos, a DMRI está entre as mais frequentes. É a principal causa de cegueira na população acima de 55 anos (ROZING *et al.*, 2019). Sua prevalência aumenta com a idade, chegando a afetar até 27,9% da população com mais de 80 anos. Estima-se que 196 milhões de pessoas serão afetadas pela doença até 2020, chegando a atingir 288 milhões no ano de 2040 (WONG *et al.*, 2014; LANA *et al.*, 2017).

Em nível global, a DMRI seca e exsudativa representaram 5,6% de todas as causas de cegueiras no ano de 2015, e 4% do comprometimento da visão moderado e grave, tornando-se a quarta causa principal de cegueira e terceira causa principal de comprometimento visual moderado a severo (LANA *et al.*, 2017).

A perda irreversível da visão é altamente incapacitante em várias áreas, como: físicas, sociais e emocionais dos acometidos pela doença, levando a uma necessidade maior da utilização dos recursos de saúde e à alta carga de custo social (CRUESS *et al.*, 2008). Sua detecção precoce e o tratamento são fundamentais para aumentar a probabilidade de manter a acuidade visual. No entanto, apesar do crescimento das opções de tratamento para esta doença, não há terapia curativa disponível no mercado (GARCÍA-LAYANA *et al.*, 2017).

Além disso, os mecanismos da patogênese da DMRI ainda estão mal definidos. Na verdade, a natureza multifatorial da doença, a complexidade do sistema visual e o enigma dos processos de envelhecimento humano tornam a DMRI uma patologia complexa, na qual o diagnóstico precoce e correto é ponto chave para a qualidade de vida do idoso (KHANDHADIA; CHERRY; LOTERY; 2012).

Algumas evidências indicam que o dano oxidativo e o processo inflamatório desempenham um papel importante na DMRI. Entretanto, ainda não há consenso a respeito (BELLINI; FREITAS, 2008; DATTA *et al.*, 2017). Soma-se a isso o fato de que o sistema purinérgico possa estar associado ao desenvolvimento da DMRI, por estar diretamente ligado ao dano tecidual que leva a morte dos fotorreceptores (CORSO *et al.*, 2016).

Algumas investigações descritas na literatura sugerem que compostos naturais com capacidade antioxidante e anti-inflamatória participariam do processo de melhora da doença, sendo capazes de prevenir e minimizar os efeitos para a visão (KUBOTA *et al.*, 2010; BONY *et al.*, 2012; GARCÍA-MONTALVO; MATÍAS-PÉREZ, 2015; PAN *et al.*, 2016; BONADIMAN *et al.*, 2017).

Sendo assim, o tucumã fruto nativo da Amazônia Brasileira, amplamente utilizado na medicina tradicional e na culinária ribeirinha, poderia apresentar efeitos sobre as células do EPR, melhorando a condição visual dos indivíduos acometidos pela doença. O tucumã apresenta uma matriz química rica em molécula bioativas capazes de reduzir ou minimizar o processo oxidativo e inflamatório, podendo assim, melhorar a viabilidade celular (BONADIMAN *et al.*, 2021)

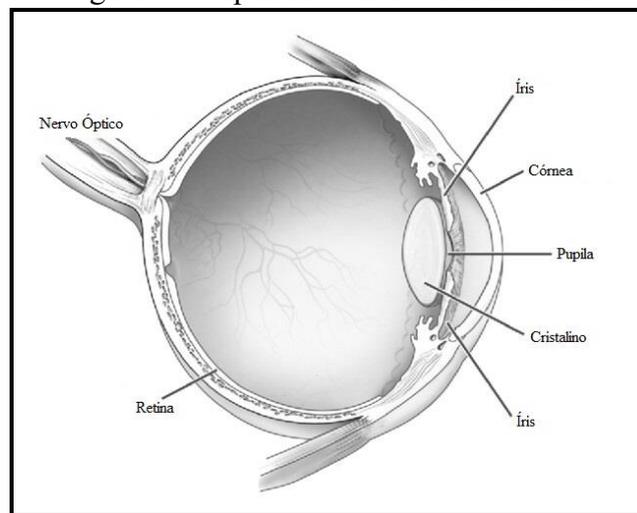
Assim, este estudo contribuirá para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos capazes de diminuir e ou evitar a progressão da DMRI, uma vez que esta doença é uma das causas responsáveis pelo comprometimento da visão nos idosos e ainda não apresenta tratamento eficaz disponível no mercado.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ASPECTOS ANATÔMICOS E ENVELHECIMENTO OCULAR

A visão é um dos sentidos mais importantes do ser humano. Ela é anatomicamente formada pelo globo ocular que possui forma esférica, sendo constituído pela córnea, cristalino, íris, humor aquoso e humor vítreo (Figura 1). Sua porção interna é organizada em três camadas semelhantes: a retina, a coroide e a esclera (PARIER; SOUBRANE, 2008; HELENE; HELENE, 2011).

Figura 1 - Aspectos Anatômicos da visão



Fonte: Adaptado de *National Eye Institute* (NIH), 2017.

A retina é subdividida em dez camadas, da mais externa a mais interna da seguinte maneira: EPR, fotorreceptores, membrana limitante externa (MLE), camada nuclear externa (CNE), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI), camada de células ganglionares (CCG), camada de fibra nervosa (CFN) e membrana limitadora interna (MLI). A região central da retina conhecida como a mácula tem um pequeno poço no centro da fóvea central (LANDRUM *et al.*, 2001; ARUNKUMAR; GORUSUPUDI; BERNSTEIN, 2020).

Os fotorreceptores (cones e bastonetes), são responsáveis pelo processamento da informação visual. Ligado a eles, encontra-se o EPR que consiste em uma única camada de células responsáveis pela manutenção e funcionamento dos fotorreceptores (STRAUSS, 2005; JAGER; MIELER; MILLER, 2008; BRITO, 2008).

Sendo assim, o EPR desempenha um papel fundamental na manutenção da função visual. Participa na “reciclagem” dos fotorreceptores e fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores, permitindo a sua constante renovação (STRAUSS, 2005; RATTNER; NATHANS, 2006). Sua alta capacidade fagocítica ocorre durante toda a vida. Como consequência, tem-se o acúmulo de agregados proteicos e lipídicos (lipofuscina) no interior das células do EPR durante o envelhecimento. A lipofuscina funciona como fotossensibilizador, gerando EROs (SPARROW; BOULTON, 2005; BRITO, 2008; BELLINI; FREITAS, 2008), contribuindo para a disfunção do EPR.

No processo de envelhecimento humano algumas lesões na visão podem passar despercebidas, como as que acometem a córnea, que é mais externa, mas qualquer disfunção que atinge o EPR é grave e pode levar a perda visual. Elas muitas vezes são progressivas e não possuem tratamento (BELLINI; FREITAS, 2008; ARUNKUMAR; GORUSUPUDI; BERNSTEIN, 2020).

Adicionalmente, durante o envelhecimento o tamanho da pupila diminui e também fica mais lenta nas respostas à escuridão ou à luminosidade intensa. Por outro lado, o cristalino torna-se esbranquiçado, menos flexível e levemente opaco, resultado do agrupamento de componentes proteicos da lente, que pode levar a catarata. Apesar desta já impactar negativamente na vida do idoso, a DMRI é uma das doenças mais importantes dos olhos associadas ao envelhecimento (PESCOSOLIDO *et al.*, 2016).

É importante salientar que, vários estudos têm mostrado que a diminuição da acuidade visual provocada pelo envelhecimento fisiológico, por si só, já reduz a estabilidade postural e aumenta significativamente o risco de quedas e fraturas em idosos. Além disso, interfere nas atividades diárias e na saúde mental, podendo ser um fator de risco para depressão e comorbidades (PESCOSOLIDO *et al.*, 2016).

Dessa forma, as doenças visuais podem levar a uma necessidade maior da utilização dos recursos de saúde pública e à alta carga de custo social (CRUESS *et al.*, 2008). Por esses motivos, a detecção precoce e o tratamento são fundamentais para aumentar a probabilidade de manter a visão boa e funcional.

3.2 DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

No mundo, no ano de 2015 a DMRI representava 5,6% de todas as causas de cegueiras, e 4,0% do comprometimento da visão moderado e grave (LANA *et al.*, 2017). Somente nos Estados Unidos (EUA), essa doença chega a acometer 11 milhões de pessoas

com idade superior a 40 anos (KEIN; CHOU, 2011; PRADELLA *et al.*, 2016). Na França, a DMRI é considerada a principal causa de cegueira na população com idade igual ou superior a 50 anos, com uma prevalência de 8,5% e podendo chegar a 27,9% em pessoas acima de 75 anos (LE-TIEN, 2008; PRADELLA *et al.*, 2016).

Por outro lado, para o Brasil não existem dados estatísticos epidemiológicos oficiais, no entanto, em uma meta-análise realizada por Wong e colaboradores no ano de 2014, os autores demonstram que a incidência seria de aproximadamente 7,5% a 10% da população brasileira. Fez parte dessa meta-análise um estudo realizado em Londrina-PR, que aponta a prevalência de DMRI em 13% na população acima de 60 anos.

Além disso, outro estudo realizado em Pernambuco, apontou que de 25 a 30% da população com mais de 60 anos apresenta diagnóstico para DMRI (SANTOS *et al.*, 2005). Outra investigação realizada em Santo André-SP analisou prontuários de pacientes idosos que frequentavam um hospital dos olhos e os autores concluíram que 7,8% dos pacientes apresentavam diagnóstico para DMRI (SERRA *et al.*, 2016).

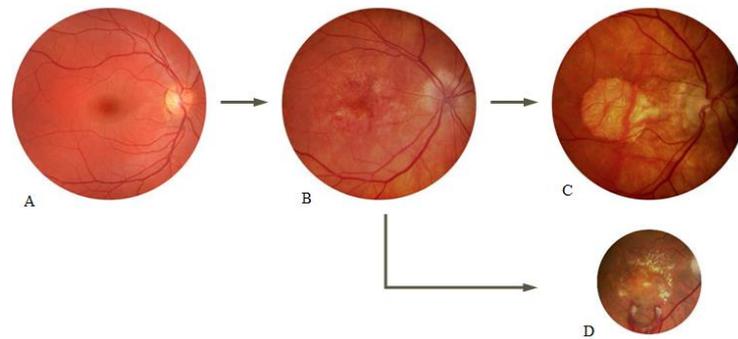
Além do mais, pesquisadores sugerem que essa doença possa afetar cerca de 27,9% da população mundial. Atingindo 196 milhões de indivíduos no ano de 2020, chegando a atingir 288 milhões no ano de 2040 (WONG *et al.*, 2014; LANA *et al.*, 2017).

3.3 DEGENERACÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE: ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

A DMRI foi inicialmente descrita em 1903 por Oeller (OELLER, 1904). Em 1926, Junius e Kunt a apontaram como a principal causa de cegueira em pessoas com mais de 55 anos (ÁVILA, 2003; MITCHELL *et al.*, 2018).

A patologia, manifesta-se sob duas formas principais: a forma seca “sem neovascularização” e a forma exsudativa “neovascular”, associada a formação de cicatriz fibrovascular e a processo sero-hemorrágico da retina (*National Eye Institute*, 2017) figura 2.

Figura 2 - Retinografia de retina



Legenda: A-Retina Normal; B- DMRI seca; C- DMRI geográfica (tardia); D- DMRI úmida
 Fonte: *Adaptado de National Eye Institute, 2017.*

Na forma seca, ocorre atrofia da rede coriocalilar e do EPR à ela associada. Também há surgimento da drusas ou *drusen* que são os primeiros sinais da doença. Clinicamente, as drusas típicas aparecem como focais, esbranquiçados amarelas e profundas na retina. O tamanho das drusas é variável, ficando entre 20-100 μ m (DATTA *et al.*, 2017; HANDA *et al.*, 2019). É possível observar a formação de drusas na figura 2b.

Na forma exsudativa (figura 2), ocorre a formação de neovasos da coriocalilar, que rompem os tecidos, invadindo a retina, onde podem sangrar e exsudar. Já nos estágios tardios da doença, forma-se um tecido fibroso (cicatriz) na região macular, com o consequente decréscimo da visão central (BELLINI; FREITAS, 2008; CANOVAS *et al.*, 2009).

Os principais fatores de risco para a DMRI é a idade, etnia caucasiana, atEROSclERose, tabagismo, alimentação e exposição a luz (*American Academy of Ophatalmology*, 2015). Entretanto, entre todos esses fatores, o tabagismo é o fator modificável mais relevante, e sua interrupção reduz o risco de doença (SCHMIDT-ERFURTH *et al.*, 2014; *American Academy of Ophatalmology*, 2015).

Durante toda a vida e mais abundantemente no envelhecimento, na retina e no EPR ocorrem reações fotoquímicas que tornam essas estruturas extremamente suscetíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo. O processo de oxidação, por sua vez, gera moléculas instáveis, as EROs, que são altamente reativos com os tecidos oculares subjacentes. Desta forma, sugere-se que esses processos de oxi-redução estão associados diretamente na gênese da DMRI (BELLINI; FREITAS, 2008).

Soma-se a isso o processo inflamatório crônico que pode ser gerado pelo excesso de moléculas oxidantes e que predispõem o organismo à perda da homeostase. No entanto a

fisiopatologia da doença ainda não está bem clara (*American Academy of Ophthalmology* 2015).

3.3.1 Sintomas e diagnóstico

Segundo Medina e Muñoz (2011), os idosos acreditam que seus problemas visuais são normais e ocorrem devido ao processo natural de envelhecimento. Como muitos deles não buscam ajuda ou até mesmo não sabem o grau e qual doença visual os acometem, e muitas vezes chegam ao atendimento com um comprometimento avançado da visão, identificar e acompanhar esses indivíduos acaba se tornando um desafio para os serviços de saúde (MEDINA; MUÑOZ, 2011).

Na DMRI os sintomas, no início da doença, ocorrem devido o comprometimento macular. O paciente relata diminuição da sensibilidade ao contraste: tem a impressão de falta de luz para ler ou escrever, as imagens podem parecer embaçadas ou amareladas; ocorre a diminuição da acuidade visual, percepção de linhas retas como deformadas ou onduladas e mancha sombreada central (BELLINI; FREITAS, 2008). No entanto, os principais sintomas são a piora da visão central e a distorção da visão (BRASIL, 2016). Na figura 3 é possível observar uma figura representativa da visão normal e visão comprometida pela DMRI.

Figura 3 – Comparação entre visão normal e visão de um paciente com DMRI



Fonte: *Adaptado do instituto nacional da visão –NIH (2017)*

Segundo a Portaria do Ministério da Saúde N°18 de julho de 2018, o diagnóstico pode ser realizado pela biomicroscopia do segmento posterior, mas exames complementares como a retinografia fluorescente (RF) e a tomografia de coerência óptica (OCT) são importantes para confirmar, classificar e monitorar a doença (BRASIL, 2018).

O OCT, detecta e avalia alterações internas na retina que outros exames não permitem identificar. Este exame possibilita verificar a presença de drusas, alterações pigmentares, crescimento de novos vasos, bem como lesões e medidas da espessura da retina. A RF, por sua vez, mostrar se há novos vasos sanguíneos na mácula e/ou há vazamento de corante para determinar se um indivíduo tem DMRI úmido (*National Eye Institute, 2017; American Academy of Ophthalmology, 2015*).

As alterações maculares que podem ser encontradas, incluem drusas, alterações pigmentares do EPR, hemorragia e exsudatos duros intra- ou sub-retinianos, descolamento sEROSO da retina, descolamento do EPR, lesões fibróticas e atrofia geográfica. Os principais sintomas são a piora da visão central e a metamorfopsia (BRASIL, 2016).

Além dos achados oftalmoscópicos, o diagnóstico clínico é corroborado pela ocorrência de baixa da acuidade visual (AV). Os pacientes com a forma seca inicialmente apresentam sintomas leves, com AV borrada e alteração na percepção de contraste. Com o passar do tempo, as áreas de atrofia do EPR podem progredir, levando à baixa visual acentuada com escotoma central. Já os pacientes com a forma exsudativa apresentam diminuição da AV com velocidade de progressão variável. Nos casos de membranas neovasculares sub-retinianas hemorrágicas, por exemplo, a diminuição da AV costuma ocorrer de forma aguda (CUGATI *et al.*, 2007; BELLINI; FREITAS, 2008; BRASIL, 2018).

Além disso, segundo a Portaria do Ministério da Saúde (Nº18 de julho 2018) após o diagnóstico os pacientes são classificados de acordo com o padrão internacional do AREDS (*Age-Related Eye Disease Study*) publicado no ano de 2001 e simplificada pelo consenso da Academia Americana de Oftalmologia:

- a) sem DMRI (AREDS categoria 1): caracterizada por nenhuma ou poucas drusas pequenas (tamanho inferior a 63 micra de diâmetro);
- b) DMRI leve (AREDS categoria 2): caracterizada por combinação de múltiplas drusas pequenas, poucas intermediárias (63-124 micra de diâmetro) ou anormalidades do EPR;
- c) DMRI intermediária (AREDS categoria 3): caracterizada por drusas intermediárias extensas, pelo menos 1 drusa grande (igual ou superior a 125 micra de diâmetro) ou atrofia geográfica não envolvendo o centro da fóvea;
- d) DMRI avançada (AREDS categoria 4): caracterizada por pelo menos uma das condições abaixo (sem outras causas): - atrofia geográfica do EPR e coriocapilar envolvendo o centro da fóvea; DMRI exsudativa (maculopatia neovascular), definida como neovascularização de coroide, descolamento sEROSO ou hemorrágico da retina

neurosensorial ou do EPR, exsudatos lipídicos (fenômeno secundário de extravasamento vascular de qualquer fonte), proliferação fibrovascular sub-retiniana ou sub-EPR e cicatriz disciforme.

Considerando essa classificação, alguns protocolos terapêuticos podem ser utilizados com o objetivo de minimizar os sintomas da doença, no entanto não existe disponível uma alternativa terapêutica que evite a progressão da doença (BELLINI; FREITAS, 2008).

3.4 TRATAMENTO

Até início do século XX, não havia, praticamente, nenhum tratamento satisfatório para a DMRI exsudativa. Estudos iniciados naquela década, revelaram resultados favoráveis por meio da fotocoagulação com laser em lesões pequenas bem delimitadas que poupassem a área foveal (*Macular Photocoagulation Study Group*, 1990; *Macular Photocoagulation Study Group*, 1993). Entretanto, os resultados eram ainda escassos nos casos de comprometimento foveal, devido ao risco de decréscimo da visão após o tratamento (BELLINI; FREITAS, 2008).

Já em meados dos anos 90, surgiu uma nova modalidade de tratamento laser, chamada terapia fotodinâmica com verteporfirina (substância fotossensível), que ficou conhecida mundialmente por PDT, sua sigla em inglês, sendo esse utilizado até hoje (BELLINI; FREITAS, 2008).

Atualmente no Brasil, segundo a Normativa do Ministério da Saúde Nº 18 de julho de 2018, a terapia apresenta potencial melhora da visão. O tratamento está baseado na aplicação de fármacos na cavidade vítrea que bloqueiam a atividade do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A), inibindo a permeabilidade vascular e a angiogênese. A ação dos fármacos dura em torno de 4-6 semanas, estabilizando a AV e, em cerca de 1/3 dos casos, melhorando-a. Como terapia não medicamentosa deve ser utilizada a fotocoagulação a laser e a terapia fotodinâmica. Como terapia medicamentosa intravítrea, recomenda-se utilizar: Pegaptanibe sódico, Ranibizumabe, Bevacizumabe, Aflibercepte e algumas terapias combinadas (Corticosteroides intravítreos associados a antiangiogênicos, PDT associada a antiangiogênicos e Radioterapia associada a antiangiogênicos (BRASIL, 2018).

A DMRI seca, que acomete 90% dos indivíduos, não tem uma terapia curativa disponível no mercado. No entanto, evidências científicas têm sugerido que a suplementação alimentar com substâncias antioxidantes (ácido ascórbico, α -tocoferol e carotenoides) pode trazer benefícios, diminuindo a progressão da doença para as formas mais avançadas

(SCRIPSEMA *et al.*, 2015; GARCÍA-MONTALVO; MATÍAS-PÉREZ, 2015; MANIKANDAN; THIAGARAJAN, 2016). Além disso, um dos mais importantes trabalhos já realizados, o AREDS, sugere que a combinação diária de 500 mg de Vitamina C, 400 UI de Vitamina E, 15 mg de betacaroteno, 80 mg de óxido de zinco e 2 mg de óxido cúprico, diminui o risco de progressão para a forma avançada da DMRI (*Aged-Related Eye Disease Study Research Group*, 2001).

3.5 ESTRESSE OXIDATIVO: UM POTENCIAL MECANISMO ENVOLVIDO NA DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE

O estresse oxidativo é uma situação fisiopatológica definida por um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de EROs (HALLIWELL, 2007; BUENO, 2015). As EROs são subprodutos da respiração celular e são importantes para sinalização redox (FINKEL, 2011). Existem, também, fatores ambientais importantes na produção de EROs, como: radiação ionizante, luz ultravioleta, metais pesados, agentes químicos e maus hábitos alimentares (HALLIWELL, 2007; SHEBIS *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo pode danificar lipídios, proteínas, moléculas de DNA e RNA (CROSS *et al.*, 1987) e tem sido associado a várias doenças, como a DMRI (ICHIISHI *et al.*, 2016). Mas, a produção de EROs também é importante para uma resposta inflamatória eficiente em casos de infecções. Nessa situação as EROs são liberadas principalmente de neutrófilos e monócitos em resposta aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). É uma parte crucial da fagocitose e é mediada por nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX) (ROZING *et al.*, 2019).

Em um estado fisiológico de homeostase o EPR exige uma alta demanda metabólica que produz altos níveis de EROs, para permitir que aconteça transdução de sinal e o indivíduo possa enxergar. Para atender essa demanda esse tecido recebe um dos mais altos fluxos sanguíneos no corpo. Como resultado, o EPR é exposto a pressões parciais de oxigênio de 70 a 90 mm Hg (DATTA *et al.*, 2017).

Devido a essa necessidade, o EPR é um tecido com uma grande quantidade de mitocôndrias, que são a principal fonte de EROs (JAGER *et al.*, 2008; DATTA *et al.*, 2017). Durante o processo de envelhecimento as mitocôndrias produzem mais dessas moléculas tornando as células mais susceptíveis aos danos oxidativos (DATTA *et al.*, 2017).

Soma-se a isso, o fato de que o EPR realiza a fagocitose de rotina de aproximadamente 30.000 segmentos externos de receptores, acumulando um material fluorescente, chamado

lipofuscina (ERSHOV; BAZAN, 2000). Durante esse processo, ocorre a formação de mais EROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MICELI *et al.*, 1994; TATE *et al.*, 1995).

Ainda, o processamento da luz para a visão gera de forma adicional mais moléculas oxidativas ou a foto-oxidação, gerando ainda mais danos para as células do EPR (BEATTY *et al.*, 2000). Taylor e colaboradores (1990 e 1992) mostraram uma ligação epidemiológica importante da exposição à luz solar e o risco de DMRI.

Segundo Datta e colaboradores (2017), os maus hábitos, como, tabagismo e uma alimentação rica em gorduras, são importantes fatores de risco para essa doença, pois potencializam a produção de substâncias “maléficas” no organismo humano.

Como exemplo, existem os trabalhos desenvolvidos ainda nos anos 90 por Pauleikhoff *et al* (1990) e Holz *et al* (1994), onde os autores sugerem que o acúmulo de lipídeos e o colesterol desempenham um papel de suma relevância para o desenvolvimento da DMRI. Essa razão foi confirmada por Van Leeuwen e colaboradores no ano de 2018.

Sendo assim, o estresse oxidativo parece ter um papel fisiológico potencialmente patológico para o desenvolvimento e evolução da DMRI. Nesse contexto, componentes dietéticos e melhora de hábitos poderiam contribuir positivamente para a desaceleração do envelhecimento ocular e desenvolvimento de doenças como a doença.

3.6 MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO COMO ASPECTO FISIOPATOLÓGICO DA DEGENERACÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE

A inflamação é a resposta do organismo ao dano ou lesões nas células ou tecidos (NATOLI *et al.* 2017). Pesquisadores sugerem que a disfunção imunológica é um dos mecanismos associados ao desenvolvimento da DMRI (NATOLI *et al.* 2017; DATTA *et al.*, 2017). Em um estudo realizado com camundongos, foi observado que em resposta aos danos oxidativos na retina, ocorre um acúmulo de macrófagos na retina e no espaço sub-retiniano, bem como, a expressão de citocinas inflamatórias e ativação da via das caspases (CRUZ-GUILLOTY *et al.*, 2013).

Além disso, fagócitos mononucleares sub-retinianos ou interleucina-1 β (IL-1 β) podem contribuir para a perda de fotorreceptores no estágio final da doença (EANDI *et al.*, 2016). Nessa situação fagócitos mononucleares ativados podem resistir e acumular no EPR, estimulando a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que leva a danos nas células do EPR levando a perda de função do mesmo (EANDI *et al.*, 2016). Soma-se a isso o

recrutamento dos macrófagos na coroide com o objetivo de fagocitar os depósitos devido a formação e ao acúmulo das drusas (CHEREPANOFF *et al.*, 2010).

No ano de 2012, Bhutto e colaboradores, descreveram que ocorre degranulação de mastócitos na coroide de todas as fases da DMRI, e eles podem liberar enzimas proteolíticas que levam a degradação da membrana de Bruch, morte do EPR, morte celular de coriocapilares, e afinamento da coroide durante o desenvolvimento da doença.

Além disso, alguns estudos sugerem que no EPR, a inflamação envolve a imunidade inata do complemento e inflamassoma (NLRP3). O inflamassoma são complexos multiproteicos que detectam o perigo celular e implementam defesa imune inata através da ativação de interleucinas pro-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (MARTINON *et al.*, 2002), e recentemente inativação da IL-33 (CAYROL; GIRARD, 2009), também, auto-ativa a caspase 1 e também pode ser ativado pelo estresse oxidativo, que é uma possível via de patogênese da DMRI (DOSTERT *et al.*, 2008).

A ativação descontrolada do NLRP3 pode, ainda, estar associada a autofagia (maquinaria de autolimpeza de uma célula) - um desequilíbrio no sistema de autofagia pode levar ao acúmulo intracelular de moléculas tóxicas e na geração de mais EROs - o que pode desencadear a ativação progressiva desse processo (LEVINE *et al.*, 2011; CHEN; XU *et al.*, 2015).

Assim, evidências sugerem que os principais agentes estimuladores dos processos inflamatórios na visão estão associados ao acúmulo de lipofuscina no tecido e componentes de drusen, que desencadeiam a ativação do NLRP3, como consequência a ativação de interleucinas pró-inflamatórias e a capase 1. Essa ativação pode aumentar o Ca⁺² intracelular, promovendo a perda do potencial de membrana mitocondrial (TRIANTAFILOU *et al.*, 2013; KAUPPINEN *et al.*, 2016; DATTA *et al.*, 2017) e degradação da membrana celular promovendo a liberação de ATP para o meio extracelular (DI VIRGILIO, 2020)

3.7 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

A sinalização purinérgica foi descrita em 1972, após um estudo que demonstrou que o ATP também tinha a função de transmissão em nervos inibidores adrenérgicos e não colinérgicos. Mais tarde também foi identificado como um cotransmissor em todos os nervos periféricos do sistema nervoso central (SNC) (BURNSTOCK 1972; PELEGRIN 2020).

O sistema purinérgico envolve uma rede de sinalização nos tecidos, que forma uma importante via de modulação tanto inflamatória quanto imunológica. Além disso, tem função importante na dor, agregação plaquetária, tromborregulação, vasodilatação, proliferação e morte celular (PELEGRIN 2020).

Essas funções são particularmente desempenhadas pela participação de biomoléculas como os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e seu derivado nucleosídico adenosina (Ado). Ambos, ATP extracelular e adenosina, são controlados por algumas ectoenzimas, em especial pela ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) e a adenosina desaminase (ADA), ancoradas a membrana extracelular onde também estão os purinoreceptores (CORSO *et al.*, 2016).

Os purinoreceptores compreendem o local onde as biomoléculas são acopladas para realização da transdução do sinal e efetivação das suas funções. São divididos em receptores de adenosina P1 (RP1), com quatro subtipos (A1, A2, A2A e A3) ligados a proteína G (PELEGRIN, 2020). Os purinoreceptores de nucleotídeos ionotrópicos P2 (RP2), são divididos em dois subgrupos, ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y). Os receptores P2Y apresentam-se na forma de oito subtipos de clones (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14), cujo agonistas são as pirimidinas e as purinas, receptores acoplados a proteína G. Os P2X apresentam uma estrutura diferencial - formada por duas alfa-hélices transmembrana ligadas por uma longa alça extracelular - sendo composto por sete subunidades clonadas e sequenciadas (P2X1-7), amplamente dispostos nos neurônios centrais e periféricos, e tem como agonista principal o ATP (PELEGRIN, 2020).

Atualmente, sabe-se que o ATP é uma importante molécula de sinalização de curto prazo na neurotransmissão, neuromodulação e neurosecreção. Também influencia a longo prazo na proliferação, diferenciação e morte celular no desenvolvimento e regeneração dos tecidos (BURNSTOCK, 2007; PELEGRIN, 2020).

Na retina, o ATP e a adenosina atuam como neuro e gliotransmissores e contribuem para sinalização e a comunicação entre os fotorreceptores e EPR (REICHENBACHA; BRINGMANNB., 2016). Os fotorreceptores, neurônios, células gliais, e as células RPE expressam os receptores P1 e P2 (HOUSLEY *et al.*, 2009). O ATP extracelular contribui para a neurotransmissão excitatória rápida ativando receptores P2X ionotrópicos, que são expressos pela maioria das classes de neurônios da retina (HOUSLEY *et al.*, 2009; WARD *et al.*, 2010; REICHENBACHA; BRINGMANNB., 2016).

A Ado é um nucleosídeo formado pela ligação de uma adenina e uma ribose, presente no meio extracelular e também age como sinalizadora na via das purinas (DI VIRGILIO,

2020). Esse nucleosídeo é um sinalizador de dano celular, mediando ações anti- inflamatórias e sendo uma importante molécula imunossupressora; desempenhando também um papel protetor através da liberação de neurotransmissores; atua no estímulo a migração celular, da redução da apoptose, necrose e proliferação celular; inibe a agregação plaquetária e atua como vasodilatador, exercendo assim a função de regulação endógena da imunidade inata e defesa nas lesões teciduais extensas associadas à inflamação (BOURS *et al.*, 2006; DI VIRGILIO; VUERICH, 2015) .

Segundo Corso e colaboradores (2016), na retina, os nucleotídeos de adenina estão envolvidos não apenas na sinalização entre os diferentes tipos de células, mas níveis elevados de ATP no meio extracelular promovem neurodegeneração retiniana.

A degeneração fotorreceptora na retina é uma característica importante da DMRI, onde ocorre uma liberação em massa de ATP das células da retina induzida por extravasamento de sangue. Esse ATP extracelular desencadeia apoptose de células fotorreceptoras por ativação de P2X7 (NOTOMI *et al.*, 2013). Além disso, a resposta ao dano envolve a ativação das caspases, especialmente a Caspase-1 e, ainda promove a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação do domínio de ligação do (NOD-like) receptor contendo motivo de repetição rica em leucina e domínio pirina, que tem papel importante na resposta imune (DI VIRGILIO, 2017; YOUNG; GORECKI, 2017).

Sendo assim, elucidar os mecanismos pelo quais o tucumã poderia frear ou prevenir danos na retina, modulando a sinalização purinérgica e evitando a apoptose dos fotorreceptores é de suma importância.

3.8 TUCUMÃ

O tucumã (*Astrocaryum aculeatum* M.), pertence à família Arecaceae, é uma espécie nativa da América do Sul, crescendo principalmente no Brasil, Bolívia, Suriname e na Venezuela (BONY *et al.*, 2012).

Os frutos do tucumã apresentam drupas ovoides lisas (5-6 cm de diâmetro, 70-75 g de peso) com epicarpo (casca), mesocarpo (polpa) e endocarpo (semente) que variam de amarelo a laranja escuro e vermelho (MAIA *et al.*, 2014; MATOS *et al.*, 2019), como pode ser visto na figura 4.

Figura 4 - Fruto do Tucumã



Fonte: Bonadiman 2021.

O tucumã é uma fruta amplamente distribuída na biodiversidade amazônica e é tradicionalmente consumido pela população ribeirinhana na culinária e na medicina tradicional (BONADIMAN *et al.*, 2021). É popularmente consumida *in natura*, utilizado no preparo de sorvetes, doces e licores alcoólicos (SHANLEY *et al.*, 2011).

Essa fruta apresenta uma matriz química rica em compostos bioativos, entre eles, vitamina A (75% de todos os carotenóides), ômega-3, 6 e 9, carotenoides (all-trans- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno, all-trans- α -caroteno, trans-criptoxantina, β -caroteno, γ -caroteno e δ -caroteno), catequinas e quercetina (BONY *et al.*, 2012; SOUZA-FILHO *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2019). Os carotenóides encontrados na casca dos frutos de tucumã são o β -caroteno (geralmente o principal carotenoide), seguido pelo γ -caroteno e δ -caroteno (MATOS *et al.*, 2019). Além disso, Aguiar (1996) mostrou que o óleo extraído do tucumã consiste em 74,4% de ácidos graxos essenciais (AGEs) e 25,6% de AGEs e é rico em ácidos graxos ômega-3, 6 e 9. Esses compostos poderiam trazer benefícios para saúde humana.

Bony *et al.* (2012) demonstraram as propriedades anti-inflamatórias do óleo de tucumã em macrófagos J774 *in vitro* e em um modelo de camundongo tratados com endotoxina, bem como em um modelo agudo e crônico de inflamação pulmonar.

Já um estudo realizado por Baldissera e colaboradores (2017), sugere-se que as propriedades anti-inflamatórias são provavelmente mediadas por ácidos graxos e pela presença de compostos antioxidantes, como carotenóides e moléculas anti-inflamatórias, como os esteróis.

Em um experimento realizado por Sagrillo *et al.* (2015), o extrato de tucumã foi capaz de reduzir os efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio nos linfócitos humanos, sugerindo alguns efeitos citoprotetores desse fruto.

Carneiro *et al.* (2017) relataram que o óleo de tucumã apresentou efeito antígenotóxico em macrófagos de ratos estimulados por doxorrubicina.

Além disso, Cabral *et al.*, (2020), demonstraram que extrato de tucumã inibiu a proliferação de macrófagos, aumentou as defesas antioxidantes e reduziu os níveis de estresse oxidativo, além disso, modulou genes relacionados a resposta inflamatória.

No entanto, ainda, não existem estudos que relatam o efeito do tucumã em células do EPR, assim, este estudo contribuirá para a investigação de novos alvos terapêuticos capazes de minimizar ou evitar a progressão da DMRI, uma vez que esta doença é uma das principais causas pela perda visual severa em idosos.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo caracteriza-se como uma pesquisa experimental *in vitro*, no qual as células do epitélio pigmentar da retina (linhagem ARPE-19), obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), foram cultivadas em estufa de CO₂ à 37C°, com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e antifúngico anfotericina B, conforme Peres e Curi (2005) e as instruções do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

O modelo experimental utilizado no estudo foi desenvolvido de acordo com artigo previamente publicado Bonadiman *et al.*, 2017. O Paraquat foi utilizado como agente estressor, por estimular a produção EROs no meio e danificar as células, simulando uma condição de DMRI grave.

Nesse estudo, as células ARPE-19 foram previamente tratadas com extrato de Tucumã por 24 horas e após expostas ao Paraquat na concentração de 30 µM por 6 horas.

4.2 EXTRATO

Para a realização desse estudo, o projeto foi cadastrado e autorizado pelo Conselho de Administração do Patrimônio Genético (número SisGen A08E59B).

Os frutos maduros de tucumã foram adquiridos no Mercado Público de Manaus-AM /Brasil em novembro/2017. O extrato etanólico foi preparado conforme descrito por Souza-Filho *et al.* (2013) com modificações.

O extrato utilizado nesse estudo foi desenvolvido utilizando a casca e a polpa do fruto, tanto a casca quanto a polpa foram removidas manualmente das frutas frescas, trituradas e colocadas em frascos de âmbar contendo uma solução absoluta de etanol, na proporção de 1:5. A extração foi realizada durante 4 dias com agitação uma vez ao dia; subsequentemente, os homogenatos foram filtrados através de papel Whatman N^o. 1. O etanol foi removido usando um evaporador (30-40 ° C a 115 rpm). Os extratos foram então liofilizados e armazenados a -20 °C.

4.2.1 A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O perfil fenólico do extrato foi determinado e quantificado por CLAE acoplado ao detector de espectrofotometria de massa (HPLC-DAD-MS), com auto-amostrador SIL-20AHT, bomba LC-20ADT, desgaseificador DGU-20A3R, integrador CBM-20A e um detector UV-Vis SPD-M20A DAD, forno CTO-20A e coluna C-18 (4,6 mm x 250 mm) embalada com partículas de 5 µm de diâmetro.

Os parâmetros para análise foram ajustados usando modos de íons negativos, com espectros adquiridos em uma faixa de massa de m/z 50 a 1200. Os valores ótimos dos parâmetros ESI-MS foram os seguintes: tensão capilar, 4500 V; temperatura do gás de secagem 215 ° C; fluxo de gás de secagem, 10,0 L / min; pressão de gás de nebulização 5,0 Bar; RF de colisão, 150 Vpp; tempo de transferência 70 ls e armazenamento pré-pulso, 5 ls. Foram realizadas experiências automáticas de MS / MS ajustando os valores de energia de colisão da seguinte forma: m/z 100, 20 eV; m/z 500, 30 eV; m/z 1000, 35 eV, usando nitrogênio como gás de colisão. Os dados do MS foram processados usando o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). As fases móveis foram A: ácido acético a 2% (pH 2,0) e B: metanol: ácido acético: água destilada a 18: 1: 1, seguindo o gradiente de eluição de: 0 min: 20% de B, 0-25 min: 50% de B, 25 min: 20% de B, 30 min: 20% de B (fim da corrida), na taxa lenta de 0,8 mL / min. Os picos foram identificados por comparação com o tempo de retenção e o espectro de massa obtido na biblioteca de software e obtido pelos padrões internos. Os tempos de retenção foram os seguintes: ácido gálico; 3,7 min; catequina, 5,6 min; ácido cafeico, 8,2 min; rutina, 13,9 min; quercetina, 20,1 min; e luteolina, 22,0 min. Os padrões utilizados foram da Sigma ®. As amostras foram testadas em triplicata.

4.3 VIABILIDADE CELULAR E PERFIL OXIDATIVO

4.3.1 Viabilidade Celular

4.3.1.1 MTT

No ensaio do MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), o sal de tetrazolium, hidrossolúvel e de coloração amarelada, é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto a formazan. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em sal de formazan, insolúvel em água e de coloração roxo-azulado, que fica armazenado no citoplasma celular, sendo posteriormente solubilizado, pela adição do DMSO (dimetilsulfóxido) e quantificado colorimetricamente, através de espectrofotometria em um comprimento de onda de 560 nm, sendo o valor da absorbância proporcional ao número de células viáveis (FUKUI *et al.*, 2010).

4.3.1.2 Apoptose e necrose

A apoptose e necrose foram avaliados por citometria de fluxo pelo Kit FITC Annexin V e Iodeto de Propídio (PI), conforme as instruções do fabricante (BD Biosciences).

2.3.1.3 Morfologia

A morfologia celular foi examinada através das imagens obtidas no microscópio eletrônico Nikon Eclipse Ts2 - 4 · / 0,13, WD16, por contraste de fase.

4.3.2 Perfil Oxidativo

4.4.2.1 Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)

O ensaio fluorimétrico da 2,7 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) baseia-se na capacidade desta substância ser desacetilada por esterasas citosólicas para diclorodihidrofluoresceína (DCFH), produto não fluorescente, que por sua vez, é convertido por espécies reativas para diclorofluoresceína (DCF) que, enfim, pode ser facilmente visualizada por sua forte fluorescência a 525nm quando excitada a 488nm.

Esta técnica é comumente utilizada para ver o conteúdo de espécies reativas (mais sensível para peróxido de hidrogênio) que será diretamente proporcional à intensidade da fluorescência que, por sua vez, fornece uma medida indireta da taxa total de espécies reativas, bem como do potencial antioxidante do extrato ou substância que está sendo testada através da avaliação do nível de estresse oxidativo da amostra frente ao controle do estudo (ESPOSTI, 2002; HALLIELL e WHITEMAN, 2004).

O reagente utilizado neste teste, a DCFH-DA é uma sonda não fluorescente que atravessa facilmente a membrana celular, permitindo assim, a efetivação deste ensaio (BASS et al., 1983).

4.3.2.2 Peroxidação lipídica (TBARS)

A lipoperoxidação (LPO) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radical lipídico, radical alcóxila e radical peróxil, levando à grave alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana (NELSON COX, 2011).

As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (OHKAWA, OHISHI, YAGI, 1979).

A geração de RL e a LPO são reações extremamente rápidas, que são, geralmente, mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre as quais o malondialdeído é o principal. A formação de malondialdeído, pela quebra de ácidos graxos poliinsaturados, é um conveniente método para se determinar o grau de peroxidação lipídica, sendo uma ferramenta para o monitoramento das propriedades antioxidantes de qualquer substância, sendo assim, a avaliação da peroxidação lipídica foi mensurada através do ensaio TBARS, de acordo com Jentzsch *et al.* (1996).

4.3.2.3 Óxido Nítrico

O teste do óxido nítrico detecta a presença de nitrito orgânico na amostra. O nitrito é detectado e analisado pela formação de uma coloração rosada quando o reagente de Griess é adicionado à amostra contendo NO_2 . A sulfanilamida do reagente de Griess é responsável pela formação de sais de diazônio a partir do nitrito da amostra. Quando o azo-composto (N1-naftiletilenodiamino-bicloridrato) interage com os sais de diazônio, e a coloração rosa surge na amostra. O teste é lido em absorvância à 540nm em espectrofotômetro (CHOI *et al.*, 2012).

4.3.2.4 Superóxido

O ensaio de determinação do radical Superóxido foi utilizado para determinar as concentrações de ânion superóxido na amostra (MORABITO *et al.*, 2010). O teste baseia-se na formação do sal de formazam via reação entre o Cloreto de Nitrobluetetrazoliun (NBT) e o ânion radical superóxido (O_2^-). Utilizado para determinar as concentrações de Superóxido na amostra. Esse teste é medido em absorvância a 550 nm.

4.3.2.5 Picogreen

A citotoxicidade/viabilidade celular será avaliada através do reagente Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent (Invitrogen®), de acordo com Cadoná *et al* (2014).

4.4 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E INFLAMAÇÃO

4.4.1 Sinalização Purinérgica

4.4.1.1 Mensuração da hidrólise do ATP em ADP e AMP

A mensuração da hidrólise foi verificada pela atividade das ectoenzimas E-NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, utilizando o método de Pilla *et al.* (1996) adaptado por Lunkes *et al.* (2003).

Os testes realizados imediatamente após o término o tempo de tratamento. Foi preparado uma solução de incubação utilizando-se cloreto de sódio (NaCl) 1,2M, glicose 60mM, cloreto de potássio (KCl) 50mM, tris-hidrocloreto (Tris-HCL) 500mM (pH 7,4),

cloreto de cálcio (CaCl_2) 50mM e água destilada. Para cada 20 μL de amostras foi adicionado 160 μL da solução de incubação, procedeu-se a incubação em banho seco à 37°C por 10min, após foi adicionado 20 μL do substrato (ATP/ADP 10mM) em cada amostra e procedeu-se a incubação por mais 60min à 37C, após este período adicionou-se 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) 15%, o qual permite a parada da reação. E procedeu-se a coloração, utilizando 30 μL da amostra e 300 μL de verde malaquita com leitura da absorbância em 630nm.

Para a determinação da atividade da ecto-5'-nucleotidase, preparou-se solução de incubação similar da E-NTPDase, substituindo o CaCl_2 50mM por cloreto de magnésio (MgCl_2) 100mM e utilizou-se como substrato o AMP 20mM.

Para ambas as determinações de hidrólise dos nucleotídeos utilizou-se as médias das absorbâncias multiplicadas pelo fator de correção do fosfato (FCF), e divididas pelo tempo de incubação, volume e concentração de proteínas. Ao final os resultados foram expressos em nmol pi/min/mg de proteína.

4.4.1.2 Desaminação da adenosina

Foi realizada pela avaliação da atividade da ADA, onde a atividade é determinada através da quantidade de amônia liberada pela ação da enzima segundo o método descrito por Giusti e Galanti (1984). O seguinte protocolo experimental procedeu-se a identificação de dois poços na placa para cada. Foi utilizado 30 μL de amostra “poço 01” mais 90 μL de adenosina nos dois poços, a placa incubada por 60 minutos à 37°C, após esse período foi pipetado 30 μL da amostra no “poço 02”, e em ambos os poços foi adicionado 80 μL de fenol e 80 μL de hipoclorito. A placa foi novamente incubada por 30 minutos à 37°C e procedida a leitura a 620nm. Para definição dos resultados utilizou-se a média das absorbâncias e do padrão, multiplicados pelo FC, sendo os valores obtidos expressos em unidades/litro (U/L).

4.4.1.3 Expressão da enzima E-NTPDase e E-5`-Nucleotidase

Foi realizada utilizando a técnica de Citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais; anti-CD39 e anti-CD73 para marcação de E-NTPDase1 e E-5'-Nucleotidase. O protocolo experimental foi realizado de acordo com as instruções do fabricante Sigma®.

4.4.2 Perfil inflamatório

4.4.2.1 Interleucinas

Para a determinação dos parâmetros inflamatórios foi utilizado o kit Cytometric Bead Array Human (CBA) Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences), IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e interferon- γ . O ensaio CBA II permite a captura de um analito solúvel ou conjunto de analitos com esferas de tamanho e fluorescência conhecidos, foi realizada por meio do ensaio *Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (Sandwich ELISA)* sendo detectados por citometria de fluxo.

5 RESULTADOS

Os resultados desse trabalho estão organizados na forma de três capítulos. O primeiro compreende uma revisão de literatura que apresenta moléculas capazes de prevenir ou minimizar os sintomas da DMRI, o segundo contempla o perfil antioxidante e a prevenção de danos ao DNA e o terceiro capítulo demonstra o perfil anti-inflamatório do extrato.

5.1 CAPÍTULO 1

EFEITOS DOS PRODUTOS NATURAIS NA DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE

Introdução

As doenças oculares têm um impacto negativo na qualidade da visão da população mundial. A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) chama atenção especial por ser uma doença crônica, considerada a causa mais comum de perda visual severa em idosos em todo o mundo e caracterizada por danos oxidativos e inflamatórios no epitélio pigmentar da retina (EPR) (BONADIMAN *et al.*, 2021).

Devido ao aumento da expectativa de vida em todo o mundo e principalmente no Brasil, o número de idosos acometidos por essa doença tem aumentado consideravelmente. Torres *et al.* (2008) sugerem que a DMRI afeta cerca de 1 a 4 pessoas com mais de 80 anos de idade. Sua incidência tem aumentado nas últimas décadas na ordem de 30% a 40% (TORRES *et al.*, 2008).

A perda de visão causada por doenças oculares relacionadas à idade tem efeitos comprometedores na qualidade de vida e também pode resultar em um fardo econômico para o indivíduo, a família e a sociedade (KIM *et al.* 2010). Em 2010, a OMS informou que 253 milhões de indivíduos viviam com deficiência visual, 39 milhões dos quais eram cegos, e estima-se que até 2050 o número triplicará (OMS, 2012; BOURNE *et al.*, 2017; IKONNE *et al.*, 2020). Koberlein *et al.* (2013) previu que o fardo econômico da deficiência visual será de mais de US\$ 70 bilhões nos países desenvolvidos. Esses dados sugerem o grande impacto desta doença no que diz respeito à saúde pública, adquirindo relevância devido ao aumento significativo da longevidade da população observado nos últimos anos (BELLINI; FREITAS, 2008).

Infelizmente, o processo patogênico da DMRI é complexo e os fatores que levam ao seu desenvolvimento ainda não estão claros. Frequentemente, essa doença é diagnosticada durante seus estágios avançados ou tardios e, na maioria dos casos, tratamentos eficazes não estão prontamente disponíveis (BUNGAU *et al.*, 2019; IKONNE *et al.*, 2020).

Sendo assim, várias investigações mostraram experimentalmente evidências científicas de que o consumo de produtos naturais tem o potencial de prevenir a perda de visão e reverter a deficiência visual devido à sua atividade anti-inflamatória e antioxidante (BONADIMAN *et al.*, 2017; IKONNE *et al.*, 2020; BONADIMAN *et al.*, 2020; BONADIMAN *et al.*, 2021). Os

antioxidantes são naturalmente abundantes em fontes dietéticas, como frutas e vegetais (YEUNG *et al.*, 2019; BONADIMAN *et al.*, 2021). Seu consumo como base na dieta alimentar melhora o estresse/dano oxidativo celular e tem o potencial de prevenir doenças crônicas não transmissíveis (BONADIMAN *et al.*, 2017; IKONNE *et al.*, 2020).

Assim, esta revisão avaliará o efeito de moléculas fitoquímicas como polifenóis, carotenoides e vitaminas na prevenção e tratamento de doenças oculares relacionadas à idade, como a DMRI.

Materiais e métodos

Neste estudo, foram selecionados artigos científicos publicados apenas em inglês. Materiais relevantes foram obtidos usando bancos de dados on-line, como *Pubmed*, *ScienceDirect* e *Springer*. Como estratégia de busca, foram utilizadas as seguintes palavras-chave: antioxidantes, saúde ocular, degeneração macular relacionada à idade e produtos naturais. Os tipos de publicações utilizadas foram ensaios clínicos e estudos experimentais.

Foram excluídos: publicações repetidas, cartas, editoriais, comentários, resumo de anais, teses, dissertações, trabalhos de conclusão, livros, cartas ao editor, estudos reflexivos, bem como estudos que não abordassem o tema relevante para o propósito da revisão.

Degeneração Macular Relacionada à Idade

A DMRI é uma doença crônica retiniana causada pela perda progressiva de fotorreceptores ou das células do EPR. É uma das principais causas de deficiência visual em pacientes com mais de 65 anos (AMMAR *et al.*, 2020). Os principais fatores de risco para seu desenvolvimento são idade, poluição, tabagismo, obesidade, história familiar, hipertensão, hipercolesterolemia e exposição à luz (KIM *et al.* 2010).

Os sintomas iniciais geralmente aparecem por volta da quarta ou quinta década de vida e incluem perda de acomodação visual e foco em objetos próximos (presbiopia). Com o passar dos anos, pode ocorrer perda de campo visual, sensibilidade ao contraste, diferenciação de cores e redução da capacidade de restauração após a exposição solar, bem como redução do ajuste ao escuro e sensação de profundidade (PESCOSOLIDO *et al.*, 2016).

Em seus estágios avançados, a DMRI pode se manifestar como uma atrofia geográfica que está associada à degeneração dos fotorreceptores e do epitélio pigmentar da retina (EPR) (HOLZ *et al.*, 2014; AMMAR *et al.*, 2020). As reações fotoquímicas originadas na retina e

nas células do EPR tornam essas estruturas extremamente suscetíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo. O processo de oxidação gera moléculas instáveis e radicais livres altamente reativos com os tecidos oculares subjacentes. Assim, sugere-se que as reações de oxidação-redução estão diretamente associadas à gênese da DMRI (BELLINI; FREITAS, 2008).

Natoli *et al.* (2017) relataram que um dos pontos-chave associados à morte de fotorreceptores é a ativação do sistema imunológico, favorecendo o acúmulo de macrófagos na retina e no espaço sub-retiniano, bem como a expressão de citocinas inflamatórias, promovendo um severo processo inflamatório e agravamento do quadro.

Em uma investigação, Fetcher (2020), sugere que a função purinérgica tem um papel importante na sinalização normal dentro da retina e há evidências crescentes de que anomalias na sinalização purinérgica podem ser um contribuidor central para doenças da função retinal. Essa função é realizada pela participação de biomoléculas como os nucleotídeos de adenina e seu derivado de nucleosídeo adenosina (CORSO *et al.*, 2016). O nucleotídeo de adenina trifosfato de adenosina (ATP), encontrado em alta concentração no interior das células, parece ter papel central na morte dos fotorreceptores, podendo ser liberado no espaço extracelular após a morte da célula, estando fortemente associado a processos oxidativos e inflamatórios que levam à morte celular (HO *et al.*, 2016).

O dano visual causado pela degeneração que ocorre devido à disfunção dos fotorreceptores pode estar associado às formas exsudativa e não exsudativa da doença. No primeiro, há atrofia da rede coriocalilar e de suas células EPR associadas, enquanto no último, observa-se que os novos vasos dos coriocalilares rompem o BM e o EPR, invadindo a retina onde podem sangrar e exsudar. Nos estágios avançados da doença, forma-se um tecido fibroso (cicatriz) na região macular, levando ao declínio da visão central (BELLINI; FREITAS, 2008; CANOVAS *et al.*, 2009).

Devido ao impacto desta doença nos idosos e sua relevância epidemiológica, muitos estudos estão sendo realizados e há a busca por terapias alternativas, todas na tentativa de evitar o aparecimento e a progressão desta condição (GORUSUPUDI; NELSON; BERNSTEIN, 2017; AGI; KASAHARA; LOTTENBERG; 2018).

Apesar de nossa compreensão em evolução das complexidades da DMRI seca, um tratamento eficaz permanece indefinido. Inúmeras abordagens terapêuticas foram investigadas e se enquadram em várias categorias gerais: inflamação e supressão do estresse oxidativo, modulação do ciclo visual, neuroproteção e terapia baseada em células.

Efeitos dos produtos naturais da dieta contra Degeneração Macular Relacionada à Idade

Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é o psicoestimulante mais consumido em todo o mundo (GAHR, 2019). É um alcalóide purínico de ocorrência natural no café, consumido globalmente (YOON E DANESH-MEYER, 2019) e também em chás derivados de *Camellia sinensis*, guaraná (*Paullinia Cupana*) e erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (CADONÁ *et al.*, 2019).

Além de seu papel principal como ingrediente ou aditivo em várias bebidas, também tem uso médico na displasia broncopulmonar em bebês prematuros, dor de cabeça pós-punção lombar, apneia neonatal e enxaqueca aguda, como um adjuvante na terapia da dor e de curto prazo tratamento de sintomas de fadiga (GAHR, 2019; YOON E DANESH-MEYER, 2019).

Na DMRI, a cafeína tem o potencial de diminuir a atividade de SOD, CAT e MDA (KACZMARCZYK-SEDLAK *et al.*, 2019) e aumentar as atividades antioxidantes (VARMA, 2016). Pan *et al.* (2019) relataram o efeito protetor do consumo de chá verde, rico em cafeína, na deficiência visual em idosos. Dados obtidos em uma investigação entre 4.579 adultos mais velhos (60 anos) que vivem em uma comunidade rural no leste da China mostraram uma menor ocorrência de deficiência visual associada à ingestão de três ou mais copos de chá verde por dia.

Em outra investigação, Bonadiman e colaboradores (2017) demonstraram em um estudo *in vitro* e *in vivo* que o guaraná (*Paullinia cupana*) 0,5 mg / mL protege as células retiniais contra danos oxidativos, melhorando a condição visual.

Em relação às doenças oculares, Boya *et al.* (2016) sugeriram que a cafeína poderia ter um valor terapêutico para seu tratamento. As células retiniais, especialmente na mácula, são frequentemente expostas ao estresse oxidativo, que é considerado uma das principais causas de DMRI (MARAZITA *et al.*, 2016). Por outro lado, há evidências de que o consumo excessivo de cafeína pode aumentar o risco de glaucoma em indivíduos suscetíveis (KANG, LOOMIS, ROSNER, WIGGS, & PASQUALE, 2015; KANG, WILLET, ROSNER, HANKINSON, & PASQUALE, 2008; BONADIMAN *et al.*, 2017). No entanto, a cafeína pode oferecer algum valor terapêutico no tratamento de disfunções oculares, como a DMRI.

Quercetina

A quercetina (3,3,4,5,7-pentahidroxiflavona), um produto químico derivado de planta pertencente à família dos flavonoides, é um excelente eliminador de EROS e espécies reativas de nitrogênio e tem propriedades anti-inflamatórias, antidiabéticas e antitumorais robustas (Li *et al.*, 2020). É um polifenol vegetal de flavonoides encontrados principalmente na cebola roxa, maçã, tomate, mirtilo, uva vermelha, brócolis e frutas cítricas (BANSAL *et al.*, 2018; IKONNE *et al.*, 2020).

Atualmente, vários estudos apoiam que a quercetina pode exercer seu efeito antioxidante direto, estimulando as células a resistir ao estresse oxidativo (XU *et al.*, 2019). Forte expressão de proteínas relacionadas à autofagia, como Beclin-1 e LC3, foram observadas na camada de células ganglionares da retina, camada nuclear interna, camada nuclear externa e EPR, sugerindo que a autofagia está envolvida na manutenção da estrutura e função da retina (RAZANI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2020).

Li *et al.* (2020) relataram que o pré-tratamento com quercetina poderia proteger da interrupção da junção apertada induzida por H₂O₂ na viabilidade das células RPE, que foi associada com a regulação positiva da autofagia, indicando que a quercetina em uma concentração segura (25 mM) tem um efeito citoprotetor nas células ARPE19. O tratamento com H₂O₂ diminuiu significativamente os níveis de proteínas de junção apertada em células RPE, enquanto o pré-tratamento com quercetina aumentou significativamente o nível dessas proteínas, sugerindo que o efeito protetor da quercetina é devido ao seu efeito antioxidante.

Em seus experimentos, Kook *et al.* (2008) e Cao *et al.* (2010) observaram que 50µM de quercetina protegeram as células RPE humanas do estresse oxidativo, senescência celular e inibiram moléculas pró-inflamatórias, o que resultou na prevenção da DMRI. Koyama *et al.* (2019) relataram que 50 mg / peso corporal / kg de quercetina em um experimento de modelo de rato diminuiu o dano fotooxidativo na retina de ratos.

Assim, é importante investigar o efeito da quercetina em experimentos com animais para posteriormente realizar estudos clínicos e melhor fornecer aos pacientes opções de tratamento complementares.

Epigallocatequina galato

Galato de epigallocatequina (EGCG) ([[(2R, 3R) -5,7-dihidroxi-2- (3,4,5-trihidroxifenil) -3,4-dihidro-2H-cromen-3-il] 3,4,5 -triidroxibenzoato), um composto com baixo peso molecular e propriedades hidrofílicas, é o polifenol mais abundante nas catequinas encontradas nos produtos naturais. Seus efeitos já foram comprovados como antiangiogênicos, antiaterogênicos, anticâncer, antiinflamatórios e antioxidantes (IKONNE *et al.*, 2020).

Em doenças oculares relacionadas à idade, o galato de epigallocatequina inibe EROS, angiogênese, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), apoptose de células ganglionares da retina e protege contra disfunção mitocondrial (IKONNE *et al.*, 2020). Além disso, esta catequina provou ser um eliminador eficiente de radicais livres (incluindo EROS e ERNS), um agente quelante (inibindo algumas sínteses de radicais livres dependentes de metal) e um modulador da expressão gênica de enzimas pró-oxidantes e antioxidantes por fatores de transcrição, como fator nuclear-kappa B (NF-κB) (PERDICES *et al.*, 2020).

Perdices e colaboradores (2020) relataram que o tratamento com EGCG melhora a função visual e o status antioxidante em ratos transgênicos P23H. Lee *et al.* (2014) observaram que a inclusão de 1–50 mM EGCG na linha celular RPE humana ARPE-19 inibiu a angiogênese e a permeabilidade vascular, exibindo um efeito preventivo contra a DMRI e a retinopatia diabética.

Observações semelhantes foram relatadas por Alex *et al.* (2010) e Chan *et al.* (2010). Zhang *et al.* (2008) e Costa *et al.* (2008) estabeleceram que a administração oral de EGCG evitou a morte de células fotorreceptoras na morte neuronal retinal induzida por luz.

Outro estudo avaliou se o EGCG poderia prevenir o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ em células do epitélio pigmentar primário da retina de ratos. Os resultados do estudo mostram que o pré-tratamento com EGCG pode proteger as células RPE primárias de ratos da morte induzida por H₂O₂ (CIA *et al.*, 2013).

Uma investigação translacional relatada por Bonadiman *et al.* (2017) sugere que a suplementação com guaraná (*Paullinia cupana*), uma fruta da Amazônia brasileira, rica em compostos fenólicos como catequinas, teobromina e cafeína, pode proteger as células EPR de danos oxidativos e prevenir doenças oculares como a DMRI.

Quando se trata de doenças oculares, essas investigações são valiosas, pois o EGCG pode ter aplicações nutricionais potenciais para o tratamento de doenças como a DMRI, que ainda não tem uma terapia eficaz.

Resveratrol

O resveratrol RSV (3,5,4'-trihidroxi-estilbeno) é um polifenol de baixo peso molecular encontrado em frutas vermelhas, uvas, amendoim, jaca e cranberry (KEYLOR *et al.*, 2015; GAMBINI *et al.*, 2015). Foi inicialmente usado na terapia do câncer e mostrou efeitos benéficos contra a maioria das doenças degenerativas e cardiovasculares. Seus efeitos foram parcialmente ligados à sua ação indutora de autofagia, propriedades antiangiogênicas, bem como efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (JOSIFOVSKA *et al.*, 2020).

Na DMRI, a suplementação de resveratrol inibe o estresse oxidativo, EROS, fator de crescimento endotelial vascular, peroxidação lipídica e reduz moléculas inflamatórias em modelos experimentais animais e humanos (KIM *et al.*, 2012; YAR *et al.*, 2012; IKONNE *et al.*, 2020).

Um estudo *in vitro* usando células do RPE (ARPE-19) por Kang e Choung (2017) relata que o resveratrol foi capaz de proteger as células do RPE e reverter os danos causados pela exposição à luz ultravioleta. Eles mostraram que o resveratrol teve um efeito positivo contra a morte induzida pela luz azul (UV) que causa fotooxidação das células e sugeriram que o dano foi atenuado pelo pós e pré-tratamento com resveratrol.

Outro estudo sugere que o resveratrol pode potencialmente atenuar a resposta inflamatória do EPR que está implicada na patogênese da DMRI, Kutty *et al.* (2015), encontraram em um modelo *in vitro* de DMRI que este composto poderia inibir substancialmente a produção de CXCL11, uma quimiocina envolvida no recrutamento de células inflamatórias, presente nas drusas que se acumulam no EPR.

Josifovska e colaboradores (2020) relataram que um estudo *in vitro* com células ARPE-19 tratadas com resveratrol mostrou uma taxa de morte celular mais baixa em comparação com controles não tratados. O resveratrol induziu uma resposta antiinflamatória específica nas células ARPE-19.

Portanto, considerando os estudos citados, as propriedades do resveratrol podem ser plausíveis para formular futuras modalidades de tratamento para DMRI.

Curcumina

A curcumina (1,7-bis- (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno- 3,5diona) é um polifenol lipofílico derivado de planta obtido a partir de raízes de açafrão (*Curcuma longa*)

(BANSAL *et al.*, 2018). Apresenta vários efeitos farmacológicos incluindo antioxidante, anti-inflamatório e anti-VEGF (ALSHAMRAN *et al.*, 2019), bem como atividade antimicrobiana, antimutagênica e anticâncer (DAVIS *et al.*, 2018; BANSAL *et al.*, 2018; RADOMSKA-LESNIEWSKA *et al.*, 2019).

Alshamrani *et al.* (2019) relataram que em um estudo *in vitro* com epitélio pigmentar da retina humana (D407), a curcumina reduziu significativamente a liberação de VEGF na linhagem celular D407, diminuindo assim o risco de angiogênese. Coletivamente, esses resultados sugerem que a curcumina proposta pode ser excepcionalmente eficaz no tratamento de ambos os tipos de DMRI.

A investigação de Mandal *et al.* (2009) relataram que a suplementação de 0,2% de curcumina em dietas de ratos por duas semanas inibiu a ativação do NF- κ B e diminuiu a regulação dos genes inflamatórios, o que levou à neuroproteção retinal. Woo *et al.* (2012) mostraram em um experimento com células retiniais humanas que a incubação de células com 15 μ M de curcumina causou efeitos citoprotetores ao inibir EROS.

Yang *et al.* (2018) demonstraram que o tratamento com 100–200 mg / kg de curcumina restaurou as atividades antioxidantes e diminuiu as citocinas pró-inflamatórias em ratos com lesão retinal.

Essas descobertas promissoras indicam que a curcumina pode permitir uma boa entrega das concentrações terapêuticas de curcumina para o tratamento de ambos os tipos de DMRI por meio de suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-VEGF.

Carotenoides (luteína e zeaxantina)

A luteína e a zeaxantina são xantofilas carotenoides dietéticas encontradas principalmente no espinafre, cenoura e uvas vermelhas (CHU; PANG, 2014). Eles são chamados de pigmentos maculares por causa de suas altas concentrações na mácula e retina humanas (BERNSTEIN *et al.*, 2016). Possuem cardioprotetor, neuroprotetor, anti-inflamatório, anticancer e propriedades antioxidantes (ABDEL-AAL *et al.*, 2013; VIJAYA PADMA *et al.*, 2014).

Um estudo randomizado realizado em 2017 por Fortes *et al.* sugere que a administração apenas de luteína em combinação com epiluteína em pacientes com DMRI em estágio inicial foi associada a um aumento na densidade óptica do pigmento macular em comparação com a administração de luteína sozinha. Os autores estudaram 40 pacientes com

DMRI, que foram tratados aleatoriamente com administração oral diária de 8 mg de epiluteína e 2 mg de luteína (grupo 1) ou 10 mg de luteína (grupo 2) por 2 meses.

Em outro estudo realizado em laboratório com a lixagem experimental ARPE-19, Frede *et al.* (2017), apontam que o tratamento de células com luteína por 24 horas não serve apenas como um antioxidante direto, mas também ativa o fator nuclear relacionado ao eritroide 2 (Nrf2) que regula genes que codificam enzimas antioxidantes e enzimas de fase II envolvidas na manutenção do estado redox celular, bem como na desintoxicação de xenobióticos em células ARPE-19.

Gong *et al.* (2017) sugerem que carotenoides, xantofilas, luteína e zeaxantina são seletivamente absorvidos pelo EPR, preferencialmente acumulados na mácula e transferidos para fotorreceptores. Esses compostos teriam a capacidade de proteger a mácula (e a retina) por meio de sua capacidade antioxidante e atividade fotoprotetora. O estudo foi desenhado para investigar os efeitos dos carotenoides (caroteno, licopeno e luteína) em células RPE submetidas a hipóxia ou estresse oxidativo. Os resultados indicam que a luteína e o licopeno inibem o crescimento das células RPE humanas e protegem o RPE contra a perda de células induzida pelo estresse oxidativo. Esses achados contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos de proteção atribuíveis às xantofilas retiniais na saúde ocular e nas retinopatias.

Outro estudo randomizado avaliou o impacto da suplementação com carotenóides (incluindo e não incluindo meso-zeaxantina) em combinação com co-antioxidantes na função visual de pacientes com DMRI não avançada. Neste, 121 participantes foram aleatoriamente designados para o grupo 1 (indivíduos com DMRI receberam uma dose baixa de zinco [25 mg] mais 10 mg de meso-zeaxantina; n = 60) ou grupo 2 (recebeu a dose baixa de zinco [25 mg]; n = 61). Os resultados encontrados sugerem que a suplementação com antioxidantes em pacientes com DMRI não avançada resulta em aumentos significativos no pigmento macular, melhorias na sensibilidade ao contraste e outras funções visuais (AKUFFO *et al.*, 2017).

A suplementação de luteína e zeaxantina melhorou significativamente o desempenho visual e evitou a progressão da DMRI precoce em outro estudo de intervenção humana (Ma; Lin, 2010; Hammond *et al.*, 2014). O estudo de meta-análise de Ma *et al.* (2012) revelou que uma maior ingestão de luteína e zeaxantina reduziu o risco de DMRI tardia (Ikonne *et al.*, 2020).

Vitaminas

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais, sendo incorporados a este por meio ingestão de alimentos. Elas são essenciais para o desempenho de processos bioquímicos importantes no corpo, especialmente como catalisadoras de reações químicas. Neste estudo, abordaremos algumas vitaminas que contribuem para a saúde visual.

Merle *et al.* (2017), avaliaram os efeitos combinados de vitamina D e cálcio na progressão da DMRI por um período de 9,54 anos; onde 2.146 participantes foram examinados, dos quais 54 progrediram do estágio inicial ou intermediário da DMRI para uma forma mais avançada da doença. Eles observaram um efeito protetor contra a DMRI avançada entre os participantes com alta ingestão de vitamina D e baixo teor de cálcio em comparação com o grupo com baixos níveis de ambos os nutrientes.

Em estudo transversal realizado com amostra representativa de idosos coreanos com idade > 65 anos, fumantes e não fumantes, foi possível observar que os fumantes consumiram menos alimentos no total e, principalmente, menos cereais, batatas, açúcar produtos, frutas e vegetais, conseqüentemente menor teor de vitamina C, vitamina A e beta-caroteno do que não fumantes e ex-fumantes ($p < 0,05$). Em contraste, não houve associação entre a ingestão de nutrientes antioxidantes e DMRI entre não fumantes e ex-fumantes. Esses resultados sugerem que o aumento do consumo de frutas e vegetais que contêm componentes antioxidantes, como vitamina C, α -caroteno e β -caroteno, pode ter um efeito protetor sobre a DMRI (KIM *et al.*, 2017).

Além disso, uma revisão de Evans e Lawrenson (2017) encontrou quatro estudos que relataram o consumo de vitamina E e o desenvolvimento e progressão da DMRI, o tempo médio de tratamento e acompanhamento variou de 4 a 10 anos. Os dados estavam disponíveis para um total de 55.614 participantes e evidenciaram que os suplementos à base de vitamina E não previnem o desenvolvimento de ambas as formas da doença.

SanGiovanni *et al.* (2007) relataram em um estudo humano que a ingestão dietética de uma combinação de vitaminas A, C e E diminuiu significativamente o risco de DMRI quando comparada com as mesmas vitaminas tomadas individualmente. Da mesma forma, Aoki *et al.* (2016) observaram que a suplementação da mistura de vitaminas A, C e E resultou na inibição da DMRI. Também foi observado que a suplementação de pró-vitamina A, vitamina C e E reduziu o risco de DMRI neovascular (ZAMPATTI *et al.*, 2014).

Assim, as vitaminas são benéficas e podem ajudar a prevenir doenças oculares relacionadas com a idade devido à sua forte atividade antioxidante.

Aplicação

É sabido que a DMRI é uma doença grave. O seu desenvolvimento está relacionado com o aumento das EROS e do processo inflamatório. Dessa forma, a redução desses parâmetros torna-se um ponto chave para o seu tratamento (Agron *et al.*, 2020). Uma maior ingestão dietética de múltiplos nutrientes, incluindo minerais, vitaminas e carotenoides está associada com diminuição do risco de progressão da DMRI tardia, e essas associações são mais fortes especialmente para doenças para as quais nenhum tratamento está disponível (AGRON *et al.*, 2020).

A maior ingestão diária de nutrientes de produtos naturais está associada à diminuição do risco de progressão da doença nos casos mais graves. Além disso, o baixo consumo de gorduras insaturadas e monoinsaturadas e uma dieta pobre em açúcares estão associados à diminuição do risco de DMRI tardia (BLASIAK *et al.*, 2020), o que contribui para minimizar ou mesmo prevenir a progressão tardia da DMRI.

Além da dieta alimentar, o consumo de suplementação oral pode desempenhar papéis complementares para reduzir e minimizar os sintomas e proteger os idosos da perda visual causada pela DMRI. Os nutrientes com associações protetoras contra a DMRI tardia também tendem, com um nível de evidência mais fraco, a ter associações protetoras contra o desenvolvimento de drusas grandes. Se genuíno, isso é importante, uma vez que muito poucas intervenções estão disponíveis para retardar a progressão desse estágio altamente prevalente da doença.

Portanto, o desenvolvimento de um suplemento alimentar rico em fitoquímicos, que neutralize moléculas oxidantes, reduza o processo inflamatório e tenha baixo custo, pode ser promissor no tratamento de indivíduos com DMRI.

Conclusão

Portanto, o presente trabalho fornece novas perspectivas sobre o uso potencial de frutas e vegetais que apresentam fortes efeitos preventivos e terapêuticos em doenças oculares relacionadas à idade, como a DMRI. Os efeitos positivos observados nos produtos naturais devem-se às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiangiogênicas, bem como à sua capacidade de melhorar os sistemas de defesa antioxidante, protegendo, minimizando ou mesmo estabilizando a patogenicidade da DMRI. Porém, é necessário avaliar qual tipo de suplementação tem melhores e mais relevantes benefícios à saúde do paciente.

Apesar dos efeitos preventivos promissores de produtos naturais e evidências científicas documentadas contra doenças oculares relacionadas à idade, não há aprovações documentadas de suporte para seu uso na prevenção, gerenciamento e tratamento dessas doenças. Isso pode se dar devido à falta de ensaios clínicos controlados de longo prazo em humanos, com doses eficazes desses alimentos naturais a serem administrados sem quaisquer efeitos prejudiciais em humanos. Portanto, há necessidade de desenvolver mais estudos com o objetivo de elucidar a etiologia da DMRI, bem como os mecanismos associados ao papel benéfico dos compostos bioativos presentes nos alimentos, de extrema importância na terapia desta doença.

5.2 CAPÍTULO 2

TUCUMÃ (*ASTROCARYUM ACULEATUM*) EVITA DANOS OXIDATIVOS E AO DNA DAS CÉLULAS DO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA

Introdução

O fruto amazônico *Astrocaryum aculeatum*, popularmente conhecido no Brasil como Tucumã, nativo da palmeira pertencente à família Arecaceae, é uma fruta de coloração amarelo-laranja. Está distribuído nas regiões norte do Brasil e da América do Sul. É popularmente consumido *in natura* e muito utilizado na preparação de sorvetes, doces e licores alcoólicos por comunidades ribeirinhas da Amazônia brasileira (SHANLEY *et al.*, 2011).

A fruta do Tucumã é rica em vitamina A, compostos fenólicos, fibras e óleos comestíveis ricos em ácidos graxos saturados (Cabral *et al.*, 2020). Segundo Cabral *et al.* (2020), a catequina pertence ao subgrupo mais abundante dos compostos fenólicos e é responsável pelo potencial antioxidante dessas frutas.

É, ainda, utilizado por comunidades ribeirinhas na medicina tradicional para tratar diversas enfermidades. No entanto, são poucos os estudos que investigam as propriedades farmacológicas do Tucumã e os existentes geralmente se limitam às suas atividades antiinflamatória (SAGRILLO *et al.*, 2015), antimicrobiana (JOBIM *et al.*, 2014), anticarcinogênica (SOUZA-FILHO *et al.*, 2013) e antioxidante (YASUKAWA *et al.*, 2019). Por esse motivo, o efeito do Tucumã em doenças crônicas como a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) utilizando modelo de células do epitélio pigmentar da retina (EPR) deve ser considerado relevante.

A DMRI é uma doença degenerativa progressiva do epitélio da retina, sendo causa comum de cegueira e deficiência visual em pessoas com mais de 50 anos em países desenvolvidos (YASUKAWA *et al.*, 2019; MCHUGH *et al.*, 2019). Em todo o mundo, o número de pessoas afetadas será de 196 milhões em 2020, e esse número deverá aumentar para 288 milhões em 2040 (WONG *et al.*, 2014).

Essa morbidade está associada ao estresse oxidativo cumulativo que resulta em dano às células do EPR; com a idade avançada, essa condição pode piorar devido à alta demanda energética do EPR e à ineficiência de enzimas antioxidantes (MITTAL; KUMARI 2015). Ao

longo dos anos, essas doenças impactam negativamente na qualidade de vida dos idosos, favorecendo o desenvolvimento de depressão, isolamento social, quedas e hospitalizações.

Visto que doenças oculares como a DMRI são as principais causas de deficiência visual na população idosa de países desenvolvidos (YASUKAWA *et al.*, 2019; MCHUGH *et al.*, 2019), o presente estudo avaliou o potencial efeito do Tucumã nos processos associados a essas enfermidades. Para esta investigação, protocolos *in vitro* foram conduzidos para analisar (1) o efeito da polpa/extrato da semente de Tucumã quimicamente caracterizada etanólica em células EPR, (2) o efeito citopreventivo de Tucumã em células EPR expostas a altas concentrações de ânion superóxido, (3) o efeito antioxidante e o dano preventivo ao DNA em células RPE expostas a altas concentrações de ânion superóxido.

Materiais e métodos

Amostras e extração de frutos de Tucumã

Este estudo foi previamente autorizado pelo Ministério do Meio Ambiente (SisGen, número A08E59B). Frutos de *Astrocaryum aculeatum* foram adquiridos no Mercado Público de Manaus-AM/Brasil. Os extratos etanólicos foram preparados conforme descrito por Souza-Filho *et al.* (2013) com modificações. A casca e a polpa foram retiradas manualmente das frutas frescas, tituladas e colocadas em frascos âmbar contendo solução de etanol absoluto, na proporção de 1: 5. A extração foi realizada durante 4 dias com agitação uma vez ao dia; os homogenatos foram subsequentemente filtrados através de papel de filtro Whatman N^o. 1. O etanol foi removido usando um evaporador rotativo (30–40°C a 115 rpm). Os extratos foram então liofilizados e armazenados a –20 °C até análise posterior.

Caracterização química

O perfil do extrato fenólico foi determinado e quantificado por cromatografia líquida de ultra-alta performance (HPLC) acoplada a detector de espectrofotometria de massa (HPLC-DAD-MS), com auto-amostrador SIL-20 AHT, bomba LC-20 ADT, Desgaseificador DGU-20A3R, um integrador CBM-20A e um detector DAD UV-Vis SPD-M20A, um forno CTO-20A e uma coluna C-18 (4,6 mm x 250 mm) embalada com partículas de 5 µm de diâmetro. Os parâmetros analíticos foram definidos usando o modo de íon negativo, com espectros adquiridos em uma faixa de massa de m/z 50 a 1200. Os valores ótimos dos

parâmetros ESI-MS foram os seguintes: tensão capilar, 4500 V; temperatura do gás de secagem, 215 ° C; fluxo de gás de secagem, 10,0 L / min; pressão do gás de nebulização, 5,0 Bar; RF de colisão, 150 Vpp; tempo de transferência, 70 ls e armazenamento pré-pulso, 5 ls. Experimentos automáticos de MS / MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como segue: m / z 100, 20 eV; m / z 500, 30 eV; m / z 1000, 35 eV, usando nitrogênio como gás de colisão. Os dados de MS foram processados usando o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). As fases móveis foram A: ácido acético 2% (pH 2,0) e B: metanol: ácido acético: água destilada an 18: 1: 1, seguindo um gradiente de eluição de 0 min: 20% de B, 0-25 min: 50% de B, 25 min: 20% de B, 30 min: 20% de B (final da execução), a uma taxa lenta de 0,8 mL / min. Os picos foram identificados por comparação com o tempo de retenção e espectro de massa da biblioteca de software e obtidos por padrões internos. As amostras foram testadas em triplicado.

Condições de cultura celular

As experiências foram realizadas utilizando a linha de células epiteliais de pigmento retinal humano adulto comercialmente disponível ARPE-19 (CRL-2302™ ATCC). As células foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gibco™ (Thermo Fisher Scientific; Grand Island, NY, EUA) com soro fetal bovino (FBS; Vitrocell) a uma concentração de 10% e suplementado com 1% de penicilina / estreptomicina (Vitrocell; 10 mg / mL) e anfotericina B (Vitrocell; 0,25 µg / mL) em uma incubadora umidificada a 37 °C com 5% de CO₂ (Thermo Scientific™; Forma™ Series 3 Water Jacketed). Após o tratamento, as células foram destacadas usando Tripsina / EDTA (0,25%; Gibco™ Thermo Fisher Scientific; Grand Island, NY, EUA). Os experimentos foram realizados em placas de 96 ou 6 poços de acordo com o protocolo.

Protocolo in vitro

As células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato de Tucumã, para avaliação de sua citotoxicidade [5, 10, 50, 100 e 500 µg / mL] por 24 horas, e posteriormente expostas ao agente oxidante Dicloreto de Paraquat hidratado (Sigma-Aldrich) a uma concentração de 30 µM por 6 horas - o modelo experimental de DMRI foi desenvolvido de acordo com protocolo previamente realizado pelo nosso grupo (BONADIMAN *et al.*, 2017).

A concentração de 50 μ g / mL do extrato de Tucumã foi utilizada para a realização dos testes oxidativo e molecular.

Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). As células foram semeadas em placas de 96 poços (1 \times 10⁵ células / poço), após o tratamento. Elas foram lavadas uma vez com solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,01 M, pH 7,4). O reagente MTT (Sigma-Aldrich) dissolvido em PBS foi adicionado, e as placas foram incubadas por 1 h a 37 ° C, em uma concentração final de 2 mg. Cristais de formazan gerados pela redução do sal de MTT por células metabolicamente ativas foram liberados das células através da adição de DMSO, e a absorbância foi medida a 560 nm usando um leitor de microplacas de 96 poços (SpectraMax® i3 Multimode Plate Reader; Molecular Devices). O protocolo foi realizado de acordo com Fukui *et al.* (1891) com adaptações.

Citometria de fluxo para análises de apoptose e necrose

A apoptose e a necrose foram avaliadas usando um FITC anexina V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™ - 556463; San Jose, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. As células foram analisadas usando um BD Accuri™ C6 Plus (BD Pharmingen). O protocolo foi realizado seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 6 poços a 1 \times 10⁶ células por poço. Após o tratamento, elas foram separadas usando Tripsina/EDTA (0,25%), lavadas duas vezes com PBS e ressuspensos em tampão de ligação 1X a uma concentração de 1 \times 10⁶ células / mL. Em seguida, 100 μ L da solução contendo 1 \times 10⁵ células foram transferidos para um novo tubo de cultura, e as células foram coradas com 5 μ L de FITC Anexina V e 5 μ L de PI. As células foram submetidas a um vórtex suave e foram incubadas protegidas da luz à temperatura ambiente (25 ° C) durante 15 min. Após a incubação, 400 μ L de tampão de ligação 1X foram adicionados a cada tubo, e a fluorescência das células foi medida por citometria de fluxo em um citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 BD Biosciences (San Diego, CA, EUA).

Morfologia

A morfologia celular foi examinada em microscopia de contraste de fase (Nikon Eclipse Ts2) 4x / 0,13 WD16.5.

Marcadores Oxidativos

Para avaliar a atividade antioxidante do extrato de Tucumã, marcadores oxidativos foram medidos. (1) Para os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), as células foram misturadas com malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico e depois aquecidas em banho-maria por 60 min para avaliação da lipoperoxidação. Os resultados foram expressos em nmol (JENTZSCH *et al.*, 1996). (2) Para os níveis de nitrito, os níveis celulares totais de nitrito foram quantificados usando um ensaio colorimétrico. As células foram incubadas com o reagente de Griess por 10 min em temperatura ambiente (CHOI *et al.*, 2012). Os níveis de nitrito foram expressos como micromoles de nitrito. (3) Para a determinação do ânion superóxido, os níveis do radical superóxido ($O_2 \bullet$) foram medidos por meio de um protocolo colorimétrico (RAUEN *et al.*, 2000). O ensaio foi baseado na formação de sal de formazan via reação entre cloreto de azul nitrotetrazólio (NBT) e ânion radical superóxido (O_2^-). (4) Para medições de espécies reativas de oxigênio (ROS), metodologia bioquímica e citometria de fluxo foram utilizadas. No primeiro, a oxidação do diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA) a 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente foi medida para detectar ROS intracelulares. Os resultados foram expressos como micromoles de DCF (DEGLI ESPOSTI 2002). Para a citometria de fluxo, que oferece a vantagem de poder medir a fluorescência intracelular das células em cultura, foi utilizado o DCFH-DA. As células foram lavadas com transferência de PBS e imediatamente expostas ao tampão de carregamento pré-aquecido e a fluorescência foi examinada. O estado redox da amostra foi monitorado pela detecção do aumento da fluorescência. O acúmulo de DCF nas células foi medido por um aumento na fluorescência em 530 nm quando a amostra foi excitada em 485 nm (KAUFFMAN *et al.*, 2011). Os resultados foram expressos pela intensidade média de fluorescência (MFI-DCFDA).

Quantificação de dano de DNA

A quantificação dos danos ao DNA foi realizada com o reagente picogreen (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent (Invitrogen®)) 17. Após 10 min de incubação com PicoGreen à temperatura ambiente, o sinal fluorescente foi medido. Uma curva de quantificação de DNA foi gerada usando DNA de bezerro adquirido da Sigma-Aldrich. Os resultados foram expressos como uma porcentagem de células não tratadas.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Prism Software Company, 2014). ANOVA unilateral e bidirecional foram usados, seguido pelo teste post hoc de Tukey. As variáveis foram expressas como média \pm EPM e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados de forma independente em triplicata, e a análise de dados foi realizada de acordo com as boas práticas in vitro. Antes da análise estatística, a maioria dos dados foi normalizada e transformada em % de controle.

RESULTADOS

Caracterização química

O extrato etanólico de Tucumã apresentou composição química rica em ácido cafeico, ácido gálico, catequina, luteolina, quercetina e rutina. Os tempos de retenção foram os seguintes: ácido gálico; 3,7 min; catequina, 5,6 min; ácido cafeico, 8,2 min; rutina, 13,9 min; quercetina, 20,1 min; e luteolina, 22,0 min. Esses compostos foram identificados por análise cromatográfica, sendo que o mais abundante foi a quercetina, seguida da catequina, ambos compostos antioxidantes importantes.

Efeito de Tucumã nas células epiteliais pigmentares da retina

Nos primeiros protocolos, as células ARPE-19 eram tratadas apenas com extrato de Tucumã por 24h. Para avaliar o efeito citotóxico do extrato, foram utilizadas diferentes concentrações [5, 10, 50, 100 e 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$]. O extrato de Tucumã não apresentou efeito de

citotoxicidade. Além disso, quando as concentrações mais baixas [5, 10 e 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$] foram usadas, o extrato não causou apoptose e necrose nas células ARPE-19.

Efeito citopreventivo do extrato de Tucumã no modelo DMRI

Os efeitos citopreventivos do Tucumã nas células ARPE-19 expostas ao Paraquat [30 μM] por 6h foram determinados através da análise de viabilidade, necrose, apoptose e morfologia celular. Como esperado, a exposição ao Paraquat desencadeou níveis mais altos de mortalidade em células de controle não tratadas. Efeitos de mortalidade mais baixos foram observados em culturas ARPE-19 suplementadas com concentrações de Tucumã. As células expostas a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram mortalidade significativamente menor do que o grupo de controle negativo.

O Paraquat foi altamente citotóxico, reduzindo a viabilidade, aumentando a necrose e a apoptose e causando mudanças importantes na morfologia celular. Esses resultados indicaram que o extrato de Tucumã teve ação citopreventiva, diminuindo a mortalidade celular.

Efeito antioxidante do extrato de Tucumã no modelo AMD

Os efeitos antioxidantes do Tucumã foram determinados através da análise de ROS, MFI-ROS, nitrito, lipoperoxidação e ânion superóxido. Como esperado, o Paraquat aumentou todos os marcadores oxidativos. Uma redução significativa nos marcadores oxidativos foi observada nas células tratadas com o extrato de Tucumã 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esses resultados sugerem que o extrato foi capaz de prevenir o dano oxidativo causado pelo Paraquat em células ARPE-19.

Efeitos do extrato no DNA

Um protocolo complementar foi realizado para confirmar os potenciais efeitos biológicos de Tucumã em células ARPE-19 expostas a altas concentrações de ROS. A integridade do DNA é constantemente desafiada por fatores genotóxicos endógenos e ambientais. Nesta investigação, o extrato de Tucumã evitou significativamente ($p < 0,001$) os danos ao DNA causados pelo Paraquat.

DISCUSSÃO

A DMRI é uma doença crônica que leva à perda visual grave em idosos em países desenvolvidos e em desenvolvimento (YASUKAWA *et al.*, 2019). O principal mecanismo para o desenvolvimento da DMRI é o estresse oxidativo e, embora, ainda não tenha um tratamento eficaz (YASUKAWA *et al.*, 2019; MCHUGH *et al.*, 2019), compostos bioativos poderiam melhorar a condição da visão (BONADIMAN *et al.*, 2017). Portanto, a busca por produtos naturais que possam prevenir ou mitigar doenças oculares pode ser uma estratégia de busca por novos suplementos ou medicamentos terapêuticos.

O tucumã é uma fruta amplamente distribuída na biodiversidade amazônica. É tradicionalmente consumido pela população ribeirinha na culinária e na medicina (SHANLEY *et al.*, 2011). Porém, pouco se sabe sobre a sua ação na saúde humana. Considerando que suas sementes são grandes e intimamente ligadas à polpa do fruto, esta pesquisa teve como objetivo produzir um extrato da semente a partir da polpa. A análise química do extrato identificou compostos bioativos que têm efeitos biológicos na saúde humana e podem melhorar a condição da visão (HÁ *et al.*, 2011). Neste estudo, a espectrometria de massa de alta resolução dos compostos bioativos presentes no extrato de Tucumã permitiu a identificação de seis compostos fenólicos: ácido cafeico, ácido gálico, catequina, luteolina, quercetina e rutina. Todos esses compostos foram previamente descritos nessas frutas (CABRAL *et al.*, 2020; SAGRILLO *et al.*, 2015; JOBIM *et al.* 2014). As propriedades antioxidantes potenciais das catequinas têm atraído muito interesse. Várias catequinas exercem seus papéis antioxidantes nas células retiniais, e Karthikeyan *et al.* (2017) sugerem que a catequina está envolvida no transporte de nutrientes, íons e metabólitos, agindo como um guardião para a manutenção da integridade retinal. Esses compostos previnem várias doenças crônicas, distúrbios metabólicos, como doenças cardiovasculares e câncer (ELBAZ-HAYOUN *et al.*, 2019).

Em relação à composição química, os compostos fenólicos são o principal conjunto de metabólitos secundários presentes no fruto de Tucumã. A catequina pertence ao subgrupo mais abundante de compostos fenólicos e pode ser responsável pelo potencial antioxidante dessas frutas. O efeito do Tucumã nas células EPR foi testado. O extrato não apresentou efeito de citotoxicidade nas células tratadas apenas com o extrato por 24h. Os ensaios mostraram que o extrato melhorou a viabilidade, reduziu a apoptose e a necrose. Na verdade, esses resultados sugerem que o extrato é seguro para investigações *in vitro*.

No protocolo da DMRI, quando as células RPE foram expostas a altas concentrações da molécula pró-oxidante, o extrato de Tucumã apresentou um importante efeito citopreventivo, confirmando o potencial dessa fruta em prevenir doenças desencadeadas por mecanismos de oxidação, melhorando assim a saúde humana. Com o modelo DMRI, os protocolos *in vitro* mostraram que o extrato de Tucumã melhorou a viabilidade e reduziu a necrose e apoptose em células expostas ao Paraquat. Além disso, o extrato foi eficiente na redução de todos os marcadores oxidantes testados, bem como na proteção de danos ao DNA, mostrando que o Tucumã possui um importante efeito antioxidante e previne danos ao DNA.

Nesta investigação, o potencial antioxidante pode estar relacionado à grande quantidade de catequinas encontradas na caracterização química. Kim e colegas realizaram uma revisão (2017) sugerindo que vários alimentos têm efeitos preventivos e potencial antioxidante, prevenindo assim a DMRI. Essas frutas e vegetais contendo componentes antioxidantes, como vitamina C, α -caroteno e β -caroteno, podem ter um efeito protetor contra a DMRI. Semelhante a essas, o tucumã possui moléculas bioativas que podem contribuir para reduzir os efeitos oxidativos nas células do EPR. Assim, podemos inferir que a alimentação influencia na qualidade da visão em idosos.

RESSALTA-SE a redução significativa da lipoperoxidação ($p < 0,001$), pois a lipoperoxidação é um mecanismo associado a um maior risco para o desenvolvimento de DMRI, desempenhando papel fundamental na drusenogênese (JUN *et al.*, 2019). O EPR acumula colesterol pela fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores ou pela ingestão de lipoproteínas (HANDA *et al.*, 2019). É importante enfatizar que algumas características patológicas relacionadas aos lipídios são compartilhadas com outras doenças relacionadas à idade, como atEROSCLEROse (EA) e doença de Alzheimer (DA) (JUN *et al.*, 2019; HANDA *et al.*, 2019) No entanto, o extrato de Tucumã pode influenciar positivamente a homeostase e afetar a saúde visual dos pacientes.

Outra observação importante decorrente deste estudo foram os efeitos sobre o dano ao DNA, uma condição em que as células danificadas perdem a capacidade de desenvolvimento. Vários estudos sugerem que ciclos repetidos de superprodução de EROS resultam em aumento do dano ao DNA, o que, por sua vez, leva ao comprometimento da função celular (KAARNIRANTA *et al.*, 2019). Portanto, a manutenção da integridade do DNA pode ser crucial para o bom funcionamento das células EPR e desempenhar um papel importante na patogênese de doenças relacionadas às ROS. Danos não reparados ou mal reparados ao DNA podem contribuir para o envelhecimento, portanto, a resposta ao dano ao DNA também pode ser importante em doenças relacionadas à idade (KAARNIRANTA *et al.*, 2019). Hyttinen *et*

al. (2017) mostraram que reparar danos no DNA e reduzir a oxidação de lipídios pode ser a chave para a prevenção e/ou tratamento da DMRI.

A dieta aparenta ser um forte indicador do desenvolvimento de DMRI. Estudos *in vivo* e *in vitro* desenvolvidos por nosso grupo mostraram que o guaraná, altamente prevalente na dieta da Amazônia, contribuiu para a baixa incidência de doenças visuais na população ribeirinha de Maués, Amazônia, Brasil (BONADIMAN *et al.*, 2017). Ribeiro e colaboradores (2013) mostraram que as pessoas que vivem no interior da Amazônia apresentam menor perfil de doenças como obesidade, hipertensão e diabetes tipo II. Esses achados têm levantado questões sobre a relação de seu estilo de vida e dieta com sua longevidade e diminuição da morbidade (RIBEIRO *et al.*, 2013; CABRAL *et al.*, 2020).

Considerando que o Tucumã tem sido utilizado na culinária tradicional e na medicina tradicional pela população amazônica, os resultados aqui descritos permitem presumir que o Tucumã atue efetivamente contra moléculas oxidantes e DMRI. Estudos complementares *in vivo* podem elucidar os mecanismos associados à atividade antioxidante e citopreventiva do Tucumã.

Assim sendo, nossos achados sugerem que o extrato de Tucumã possui uma relevante matriz química, rica em moléculas antioxidantes, e seu consumo pode melhorar a saúde ocular e contribuir na prevenção do estresse oxidativo, por meio da citoprevenção, redução de EROS e manutenção da integridade do DNA nas células EPR. O tucumã é uma fruta importante da Amazônia que parece contribuir significativamente para a melhoria das condições de saúde humana.

5.3 CAPÍTULO 3

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) NAS CÉLULAS DO EPITÉLIO DO PIGMENTO RETINAL

Introdução

A degeneração retiniana por morte de fotorreceptores, é um evento característico da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) (VESSEY *et al.*, 2014), é uma doença degenerativa progressiva do pigmento retinal epitelial (EPR) e a principal causa de perda irreversível da visão na população idosa no mundo (NOTOMI *et al.*, 2013; YASUKAWA *et al.*, 2019).

Existe uma série de mecanismos que contribuem para a morte dos fotorreceptores, como dieta, meio ambiente, estresse oxidativo e inflamação (FLETCHER 2020). No entanto, os mecanismos exatos que levam à morte dos fotorreceptores ainda não estão claros.

De acordo com Natoli *et al.* (2017), um dos pontos-chave associados à morte de fotorreceptores leva à ativação do sistema imunológico, favorecendo o acúmulo de macrófagos na retina e no espaço sub-retiniano, bem como a expressão de citocinas inflamatórias, o que piora o quadro.

Além de um papel na sinalização normal dentro da retina, há evidências crescentes de que anomalias na sinalização purinérgica podem ser um contribuidor central para a função retinal (NATOLI *et al.*, 2017). Esta função é particularmente desempenhada por biomoléculas como os nucleotídeos de adenina, trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e seu derivado de nucleosídeo adenosina (CORSO *et al.*, 2016). Ho *et al.* (2016) sugerem que o ATP é encontrado em alta concentração dentro das células e pode ser liberado no espaço extracelular após a morte celular, estando fortemente associado a processos oxidativos e inflamatórios que levam à morte celular.

Assim, é importante compreender os mecanismos pelos quais a sinalização purinérgica associada ao processo inflamatório regula a função retiniana e como ela contribui para o desenvolvimento da DMRI. Além disso, investigar compostos naturais que atuam no sistema purinérgico e no processo inflamatório e podem prevenir ou atenuar a inflamação e os danos do EPR pode ser uma estratégia na busca por novos tratamentos.

O tucumã é uma fruta amazônica rica em vitamina A, compostos fenólicos, fibras e óleos comestíveis ricos em ácidos graxos saturados (BONADIMAN *et al.*, 2021). É usado por

comunidades ribeirinhas na medicina tradicional para tratar uma variedade de doenças. No entanto, poucos estudos investigam as propriedades farmacológicas desse fruto. Por isso, explorar os efeitos de Tucumã deve ser considerado relevante.

Portanto, esta pesquisa investiga se o extrato alcoólico de Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) poderia modular a sinalização purinérgica e o processo inflamatório em células EPR em um modelo in vitro de DMRI.

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas de linhagem celular de pigmento retinal humano ARPE-19

A linha celular epitelial de pigmento retinal humano adulto ARPE-19 (CRL-2302TM ATCC) foi cultivada em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) Gibco™ (Thermo Fisher Scientific; Grand Island, NY, EUA) com soro fetal bovino (FBS; Vitrocell) a uma concentração de 10% e suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Vitrocell; 10 mg / mL) e anfotericina B (Vitrocell; 0,25 µg / mL). A cultura de células foi mantida em 37 ° C e incubadora umidificada com 5% de CO₂ (Thermo Scientific™; Forma™ Series 3 Water Jacketed).

Tratamentos celulares

As células foram tratadas com concentração de 50µg / mL de extrato alcoólico de Tucumã por 24 horas e posteriormente expostas ao agente oxidante dicloreto hidratado de Paraquat (Sigma-Aldrich) na concentração de 30µM por 6 horas - o modelo experimental de DMRI foi desenvolvido de acordo com o protocolo previamente realizado por nosso grupo (BONADIMAN *et al.*, 2017).

O extrato alcoólico e a concentração utilizada neste estudo estão de acordo com o estudo anterior descrito por nosso grupo (BONADIMAN *et al.*, 2021).

Ensaio Enzimático

Após o tratamento, as células ARPE-19 foram lavadas três vezes com meio de incubação sem fosfato na ausência de substrato. 200 µL de meio de incubação foram adicionados contendo NaCl 120mM, KCl 5mM, glicose 10mm, ácido 4- (2 hidroxietil) piperazina - 1 - etanossulfônico (HEPES) 20mM, pH 7,4, CaCl₂ 2mM para o ensaio E-NTPDase (LUNKES *et al.*, 2003) e 2mM MgCl₂ para determinação da atividade da ecto-5'-

nucleotidase (HEYMANN; REDDINGTON 1984). A reação foi iniciada adicionando ATP, ADP ou AMP ao meio de reação para uma concentração final de 2,0 mM, e a incubação prosseguiu por 1h a 37 ° C. A reação foi interrompida com TCA 10% previamente colocado em gelo. A liberação de fosfato inorgânico (Pi) foi medida pelo método do verde malaquita, utilizando KH_2PO_4 como padrão de Pi. Os controles para corrigir a hidrólise não enzimática de nucleotídeos foram realizados medindo o Pi liberado no mesmo meio de reação incubado sem células. A atividade foi expressa como nmol Pi liberado / min / mg.

Determinação de adenosina desaminase (ADA)

A atividade ADA foi determinada de acordo com Giusti e Galanti (1984) com base na medição direta da amônia produzida quando a adenosina desaminase atua em excesso de adenosina. Resumidamente, as células que reagiram com 21 mmol / L de adenosina, pH 6,5 foram incubadas a 37 ° C durante 60 min. Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de uma solução de 106,2 mM de fenol e 167,8 mM de nitroprussiato de sódio, bem como de uma solução de hipoclorito. A quantidade de amônia produzida foi medida a 620 nm e os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L).

Citometria de fluxo para ectoenzimas purinérgicas

As células ARPE -19 foram mantidas em frascos de cultura até a confluência ser atingida. As células foram então dissociadas pela tripsina. Em seguida, 1×10^6 células foram centrifugadas por 5 minutos a 400g e lavadas duas vezes com PBS mais 10% de FBS. Os sedimentos foram suspensos e incubados durante 30 minutos com purificados de rato anti-CD39 humano e anti-CD73 humano (BD Pharmingen TM) (1:10). O mesmo número de células foi incubado sem tratamento (controle negativo). Todas as foram lavadas com PBS, e 20.000 eventos foram imediatamente adquiridos por citometria de fluxo (BD ACCURI C6).

Análise de citometria de fluxo para citocinas inflamatórias

As citocinas inflamatórias foram testadas usando um BD TM CBA Human Th1 / Th2 Cytokine Kit II (Catálogo No. 551809), seguindo as instruções do fabricante. Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interferon- γ (IFN- γ) foram medidos quantitativamente. As células foram

analisadas usando BD Accuri™ C6 Plus (BD Pharmingen). Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 12 poços a 1×10^6 células por poço. Após o tratamento, foram usados 50 μ L de sobrenadantes de cultura de células. Todas as etapas para execução da técnica foram seguidas rigorosamente de acordo com as instruções do fabricante. Os complexos foram medidos por citometria de fluxo (BD ACCURI C6) para identificar partículas com características de fluorescência tanto do grânulo quanto do detector.

Análise de dados

Todos os experimentos foram realizados de forma independente em triplicata, e a análise de dados foi realizada de acordo com as boas práticas in vitro. As análises estatísticas foram realizadas com GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Prism Software Company, 2014). ANOVA unilateral e bidirecional foram usados, seguido pelo teste post hoc de Tukey. As variáveis foram expressas como média \pm EPM e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Antes da análise estatística, a maioria dos dados foi normalizada e transformada em % de controle.

RESULTADOS

Atividade E-NTPDase

A interação significativa entre o modelo de DMRI e o tratamento com extrato de Tucumã na atividade E-NTPDase para o substrato ATP e substrato ADP foi observado. A atividade E-NTPDase para o substrato ATP diminuiu significativamente com o tratamento Tucumã (50 μ g / mL 24h) ($p < 0,0008$) e Tucumã 50 μ g / mL por 24 horas mais Paraquat 30 μ M por 6 horas ($p < 0,001$) em comparação com Paraquat 30 μ M por 6h.

A atividade da E-NTPDase para o substrato ADP aumentou significativamente ($p < 0,01$) em Tucumã (50 μ g / mL 24h) quando comparado ao Paraquat (30 μ M 6h), e diminuiu significativamente quando comparado ao controle. O tratamento de Tucumã mais Paraquat (50 μ g / mL 24h mais 30 μ M 6h) diminuiu significativamente quando comparado ao controle e foi semelhante ao Paraquat (30 μ M 6h).

Como esperado, o tratamento com Tucumã evitou o aumento do substrato de ATP, e o ADP permaneceu semelhante ao agente oxidante Paraquat. O ATP está associado ao aumento da morte celular em células RPE, favorecendo a perda de visão.

Para confirmar a diminuição da atividade das enzimas purinérgicas, foi realizada a expressão da E-NTPDase (CD39 - convertido ATP em ADP e AMP) por citometria de fluxo. Tucumã e Tucumã mais Paraquat reduziram significativamente a expressão de CD39 ($p < 0,0001$) quando comparados ao Paraquat.

Ecto-5'-nucleotidase e atividades ADA

Observou-se uma interação significativa entre o tratamento com DMRI e extrato de Tucumã na atividade da ecto-5'-nucleotidase ($p < 0,015$) e ADA ($p < 0,0004$), respectivamente. A atividade de ADA e ecto-5'-nucleotidase diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em Tucumã ($50\mu\text{g} / \text{mL}$ 24h) e no tratamento Tucumã mais Paraquat ($50\mu\text{g} / \text{mL}$ 24h mais $30\mu\text{M}$ 6h) em comparação com os grupos Paraquat e controle.

Para confirmar a diminuição da atividade das enzimas purinérgicas, foi realizada a expressão da ecto-5'-nucleotidase (CD73 - AMP convertido em Ado) por citometria de fluxo. Tucumã reduziu significativamente a expressão de CD73 ($p < 0,008$).

Análise da expressão de citocinas

Os níveis de citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10 aumentaram significativamente no extrato de Tucumã apenas e no tratamento com extrato de Tucumã em comparação com o grupo controle e exposição ao Paraquat ($p < 0,0004$ e $p < 0,014$ respectivamente). Assim, $50\mu\text{g} / \text{mL}$ de extrato de Tucumã aumentou significativamente as citocinas antiinflamatórias. Na mesma concentração, o Tucumã diminuiu significativamente os níveis de citocinas inflamatórias (IFN, IL-6, IL-2 e TNF) quando comparado aos grupos controle e Paraquat.

DISCUSSÃO

A DMRI está associada à forte inflamação, alterações de enzimas do sistema purinérgico e níveis de citocinas, que contribuem diretamente para a progressão da doença (KIM *et al.*, 2011; JUN *et al.*, 2019). Compostos naturais, incluindo o Tucumã, recentemente têm recebido considerável atenção por terem demonstrado prevenir danos oxidativos e ao

DNA (BONADIMAN *et al.*, 2021), e ter propriedades antiinflamatórias (CABRAL *et al.*, 2020), antimicrobianas e anticarcinogênicas (JOBIM *et al.*, 2014) No entanto, os efeitos do extrato de Tucumã no sistema purinérgico do modelo de DMRI são desconhecidos, motivo para investigar os efeitos da NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, atividade de ADA e níveis de citocinas.

Os resultados do presente estudo mostraram que a hidrólise de ATP aumentou na exposição ao Paraquat e diminuiu no tratamento de Tucumã no modelo DMRI. Corroborando esses resultados, estudos de Fletcher (2020), Vessey *et al.* (2014) e Notomi *et al.* (2013) demonstram que o ATP extracelular em alta concentração induz a morte de células RPE em humanos, ratos e camundongos, respectivamente. Portanto, diminuir a concentração de ATP no ambiente extracelular pode ser a chave para melhorar a condição ocular de pacientes com DMRI. Em nosso estudo, o Tucumã foi capaz de reduzir as atividades da ectoenzima diminuindo a concentração de ATP no espaço extracelular.

É possível inferir que a DMRI pode estar associada a altas quantidades de ATP liberado por células estressadas e imunidade inata que contribuem para o processo inflamatório promovido pelo envelhecimento celular, contribuições dietéticas, imunomediadas e ambientais, devido ao aumento dos níveis de ATP, que atuam como moléculas pró-inflamatórias quando em níveis elevados (FLETCHER *et al.*, 2020). Assim, a redução enzimática encontrada em nosso estudo pode levar a uma diminuição dos níveis extracelulares de ATP na tentativa de diminuir o processo inflamatório sistêmico, visto que o ATP é uma molécula pró-inflamatória quando em níveis elevados (FLETCHER *et al.*, 2020) favorecendo danos no EPR.

Além disso, a atividade sérica do ADA foi semelhante na exposição ao Paraquat e diminuiu em Tucumã e Tucumã mais Paraquat. Os níveis de desaminação da adenosina pela ADA podem estar associadas ao desenvolvimento do processo anti-inflamatório no modelo de DMRI, uma vez que a adenosina desempenha um papel importante na prevenção da inflamação (BURNSTOCK; VERKHRATSKY 2010). Esses resultados sugerem que o aumento da desaminação de adenosina na exposição ao Paraquat pode melhorar o processo inflamatório. A diminuição da desaminação de adenosina em Tucumã mais Paraquat pode contribuir para prevenir alterações inflamatórias no modelo de DMRI. Essas alterações nas enzimas purinérgicas podem contribuir como tratamento alternativo ou adicional dos processos inflamatórios em pacientes com DMRI, uma vez que essas enzimas são consideradas novos marcadores do processo inflamatório para diferentes doenças crônicas não transmissíveis (BALDISSERA *et al.*, 2017).

O potencial efeito antiinflamatório do Tucumã foi confirmado com a análise de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias. Estudos atuais sobre o desenvolvimento de DMRI sugerem que a condição imunológica privilegiada normal do espaço sub-retiniano é perdida com a idade, permitindo que células imunes inatas, monócitos ou microglia retinal migrem para o espaço sub-retiniano. Essas células são capazes de liberar uma gama de citocinas inflamatórias que, por sua vez, causam a morte de fotorreceptores e / ou alterações funcionais no epitélio pigmentar da retina (FLETCHER 2020).

Os resultados do extrato de Tucumã aumentaram a expressão de citocinas antiinflamatórias, como IL-4 e IL-10, e diminuíram a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IFN, IL-6, IL-2 e TNF, confirmando o potencial antiinflamatório efeito de Tucumã. Aos nossos resultados corroboram outros estudos como Bony *et al.*, (2012) em um modelo de inflamação aguda induzida por LPS, onde o óleo de *Astrocaryum vulgare* suprimiu os níveis de IL-6 e TNF- α e aumentou os níveis de IL-10 no soro, baço e pulmões de ratos. Cabral *et al.* (2020) sugerem que Tucumã melhora a inflamação e o balanço redox em um modelo in vitro de inflamação induzida em macrófagos.

Curiosamente, o tratamento com 50 μ g/mL foi capaz de prevenir os efeitos indesejáveis causados pelo Paraquat no modelo DMRI, reduzindo a atividade de E-NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e ADA e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, além de melhorar a expressão de citocinas antiinflamatórias. Isso é possível porque o extrato reduz a inflamação, evitando os efeitos negativos da doença. Como já bem relatado na literatura, Tucumã possui propriedades antiinflamatórias e é capaz de reduzir os danos oxidativos e inflamatórios (CABRAL *et al.*, 2020), o que é corroborado pela correlação significativa e positiva entre os níveis e a atividade de E-NTPDase para ATP e ADP, bem como, entre a atividade da ADA e citocinas. Nossos achados sugerem que o Tucumã previne os processos inflamatórios causados pelo Paraquat no modelo DMRI, uma vez que a atividade dessas enzimas e citocinas pró-inflamatórias foi reduzida.

Esses efeitos do extrato de Tucumã podem estar associados à composição da matriz química. Estudo realizado pelo nosso grupo (BONADIMAN *et al.*, 2021) mostra que seu extrato etanólico apresenta compostos como ácido cafeico, ácido gálico, catequina, luteolina, quercetina e rutina, moléculas conhecidas por seus efeitos antiinflamatórios e antioxidantes.

As propriedades anti-inflamatórias potenciais das catequinas têm atraído muito interesse. Várias catequinas exercem seus papéis antiinflamatórios e antioxidantes nas células da retina, e Karthikeyan *et al.* (2017) sugerem que a catequina está envolvida no transporte de

nutrientes, íons e metabólitos, agindo como um guardião para a manutenção da integridade retiniana. Esses compostos previnem várias doenças crônicas e distúrbios metabólicos.

De acordo com Bony *et al.* (2012), o consumo de Tucumã pode ter potencial para prevenir os efeitos de diversas doenças inflamatórias, principalmente devido à presença de carotenóides. Novoselova *et al.* (2009) demonstraram que o caroteno foi capaz de reduzir a atividade da cicloxigenase-2, um importante mediador pró-inflamatório, bem como a produção de mediadores inflamatórios como o TNF α e a citocina IL-6 durante o choque endotóxico.

É importante enfatizar uma redução significativa na atividade de enzimas purinérgicas e citocinas pró-inflamatórias observados nas células EPR expostas a um modelo de Paraquat de DMRI, reforçando as propriedades antiinflamatórias desse produto natural.

Além disso, o Tucumã pode ser considerado uma alternativa clínica interessante como coadjuvante no tratamento da DMRI, uma vez que possui propriedades antiinflamatórias, conforme observado no presente estudo. Portanto, é possível sugerir que os carotenóides podem contribuir para diminuir as atividades enzimáticas do sistema purinérgico e, conseqüentemente, reduzir os processos inflamatórios na DMRI. Em conclusão, os resultados encontrados neste estudo demonstram alterações em enzimas do sistema purinérgico em NTPDase, Ecto-5'-nucleotidase e ADA de um modelo de DMRI, sugerindo que essas alterações podem ser decorrentes da prevenção do processo inflamatório causado pelo Paraquat. Por outro lado, o tratamento com Tucumã foi capaz de modular essas alterações provavelmente por seus compostos carotenoides, reduzindo os níveis de ATP, ADP, AMP e adenosina, moléculas que apresentam propriedades anti-inflamatória. Assim, podemos sugerir que citado fruto é um composto natural promissor com efeito protetor contra a inflamação causada por doenças como a DMRI.

CONCLUSÃO

O Tucumã tem demonstrado notável efeito anti-inflamatório modulando purinas, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e promovendo a suprarregulação de citocinas antiinflamatórias. É, portanto, um alimento funcional que pode ser potencialmente usado para superar os efeitos da inflamação que ocorrem na DMRI e melhorar a saúde geral.

6 DISCUSSÃO

A disfunção visual é frequentemente observada na população idosa. Com o avançar da idade, ocorre uma redução progressiva do metabolismo celular da retina. Levando ao desenvolvimento de doenças crônicas como a DMRI (DATTA *et al.*, 2017). A etiologia dessa doença ainda não está clara, mas sabe-se que o envelhecimento humano é o fator chave para a perda visual somado ao estresse oxidativo e o processo inflamatório (HANDA *et al.*, 2019).

Sendo assim, muitos estudos comprovaram que alimentos funcionais com matriz química rica em compostos fenólicos e carotenoides podem contribuir para a prevenção ou tratamento dos danos nas células do EPR (BONY *et al.*, 2012; BONADIMAN *et al.*, 2021).

Neste estudo, demonstramos o efeito antioxidante e anti-inflamatório do extrato do fruto do Tucumã em um modelo *in vitro* de DMRI.

Para essa investigação foi desenvolvido um extrato alcoólico da casca e poupa do Tucumã. Na análise química, a espectrometria de massa de alta resolução permitiu a identificação de seis compostos fenólicos: ácido cafeico, ácido gálico, catequina, luteolina, quercetina e rutina (BONADIMAN *et al.*, 2021). Todos esses compostos foram previamente descritos nessa fruta (SOUZA-FILHO *et al.*, 2013; JOBIM *et al.*, 2014; SAGRILLO *et al.*, 2015; CABRAL *et al.*, 2020). Além disso, Cabral e colaboradores (2020) demonstram que o extrato etanólico de Tucumã também apresenta, além dos compostos descritos em nosso estudo, compostos como β -caroteno, Kampferol e Ácido elágico que são respectivamente carotenóides, flavonóides e polifenol. Somado a isso Baldissera *et al.* (2017) demonstraram a presença de ácidos graxos na composição química do óleo de Tucumã. Somados aos compostos encontrados em nosso estudo, esses outros estudos revelam o quanto a matriz química dessa fruta é rica em moléculas bioativas com potencial atividade antioxidante e anti-inflamatória (BONADIMAN *et al.*, 2021).

Entre as moléculas identificadas na matriz química do Tucumã, a propriedade antioxidante da catequina é a que mais chama atenção. Já está descrito que essa molécula exerce um papel antioxidante importante nas células da retina, e Karthikeyan *et al.* (2017), sugerem que ela está envolvida no transporte de nutrientes, íons e metabólitos, agindo como um guardião para a manutenção da integridade retinal. Além disso, pode previr várias doenças crônicas, distúrbios metabólicos, como doenças cardiovasculares e câncer (RANI *et al.*, 2016; ELBAZ-HAYOUN *et al.*, 2019).

Em relação à composição química, os compostos fenólicos são o principal conjunto de metabólitos secundários presentes na fruta do Tucumã. A catequina pertence ao subgrupo

mais abundante de compostos fenólicos e pode ser responsável pelo potencial antioxidante dessa fruta (BONADIMAN *et al.*, 2021)

Por essa razão, o efeito do Tucumã nas células do EPR foi testado. O extrato em diferentes concentrações (5, 10, 50, 100 e 500µg/mL) não foi citotóxico para células em um período de 24h. Os ensaios mostraram que o extrato melhorou a viabilidade, reduziu a apoptose e a necrose. Em razão disso, esses resultados sugerem que o extrato é seguro para investigações *in vitro*.

De acordo com Kurutas (2016), como consequência do metabolismo celular podem ocorrer danos aos ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, que podem danificar a integridade celular e induzir uma variedade de respostas celulares através da geração de EROs, levando a morte celular por necrose ou apoptose. Benhar (2020), sugere que as moléculas bioativas podem reduzir o dano oxidativo, bem como, atuar diretamente na redução da morte celular por necrose. Como já demonstrado, o extrato utilizado neste estudo apresenta uma matriz química rica em substâncias antioxidantes, portanto, testamos a capacidade desse extrato em prevenir o dano oxidativo em um modelo de DMRI.

No protocolo da DMRI, quando as células ARPE-19 foram expostas a altas concentrações da molécula pró-oxidante, Paraquat, o extrato de Tucumã apresentou um importante efeito citopreventivo, confirmando o potencial dessa fruta em prevenir doenças desencadeadas por mecanismos de oxidação, melhorando assim a saúde humana. Os protocolos realizados *in vitro* demonstraram que o extrato melhorou a viabilidade e reduziu a necrose e apoptose em células expostas ao Paraquat. Além disso, o extrato foi eficiente na redução de todos os marcadores oxidantes testados, bem como, na proteção de danos ao DNA, mostrando que o Tucumã possui um importante efeito antioxidante e previne danos ao DNA (BONADIMAN *et al.*, 2021).

Nesta investigação, o potencial antioxidante pode estar relacionado à grande quantidade de catequinas encontradas na caracterização química. Kim e colaboradores (2017) realizaram uma revisão sugerindo que vários alimentos têm efeitos preventivos e potencial antioxidante, prevenindo a DMRI. Essas frutas e vegetais contendo componentes antioxidantes, como vitamina C, α -caroteno e β -caroteno, podem ter um efeito protetor contra a DMRI. Semelhante a essas, o Tucumã possui moléculas bioativas que podem contribuir para reduzir os efeitos oxidativos nas células do EPR. Assim, podemos inferir que a alimentação influencia na qualidade da visão em idosos (BONADIMAN *et al.*, 2021).

Nesse contexto, chama a atenção a redução significativa da lipoperoxidação ($p < 0,001$), pois a lipoperoxidação é um mecanismo associado a um maior risco para o

desenvolvimento de DMRI, desempenhando papel fundamental na drusenogênese (JUN *et al.*, 2019). Com o passar dos anos o EPR acumula colesterol pela fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores ou pela ingestão de lipoproteínas (HANDA *et al.*, 2019). Dessa forma, é importante enfatizar que algumas características patológicas relacionadas aos lipídios são compartilhadas com outras doenças relacionadas à idade, como atEROSclERose (EA) e doença de Alzheimer (DA) (JUN *et al.*, 2019; HANDA *et al.*, 2019). E o extrato de Tucumã pode influenciar positivamente a homeostase e melhorando a saúde visual dos pacientes.

Outra observação importante decorrente deste estudo foram os efeitos sobre os danos ao DNA, uma condição em que as células danificadas perdem a capacidade de desenvolvimento. Vários estudos sugerem que ciclos repetidos de superprodução de EROs resultam no aumento ao dano de DNA, o que, por sua vez, leva ao comprometimento da função celular (BENHAR, 2020). Portanto, a manutenção da integridade do DNA pode ser crucial para o bom funcionamento das células do EPR e desempenhar um papel importante na patogênese de doenças relacionadas as EROs. Danos não reparados ou mal reparados ao DNA podem contribuir para o envelhecimento das células (KAARNIRANTA *et al.*, 2019). Hyttinen *et al.* (2017) mostraram que reparar danos no DNA e reduzir a oxidação de lipídios pode ser a chave para a prevenção e/ou tratamento da DMRI.

Além disso, o desenvolvimento da DMRI também está associado ao processo inflamatório, a alterações de enzimas da sinalização purinérgica e da expressão de citocinas, que contribuem diretamente para a progressão da doença (KIM *et al.*, 2017; JUN *et al.*, 2019).

Sendo assim, investigamos também como o extrato de Tucumã poderia modular o processo inflamatório através da análise de marcadores do sistema purinérgico e da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias. Os resultados do presente estudo mostraram que a hidrólise de ATP aumentou na exposição ao Paraquat e diminuiu no tratamento com Tucumã no modelo DMRI. Corroborando esses resultados, estudos de Fletcher (2020), Vessey *et al.* (2014) e Notomi *et al.* (2013) demonstram que o ATP extracelular em alta concentração induz a morte de células RPE em humanos, ratos e camundongos, respectivamente. Portanto, diminuir a concentração de ATP no ambiente extracelular pode ser a chave para melhorar a condição ocular de pacientes com DMRI.

Em nosso estudo, a redução enzimática encontrada pode levar a uma diminuição dos níveis extracelulares de ATP na tentativa de diminuir o processo inflamatório sistêmico, visto que o ATP é uma molécula pró-inflamatória quando em níveis elevados (FLETCHER, 2020) favorecendo os danos no EPR.

Além disso, a atividade da ADA foi semelhante ao controle na exposição ao Paraquat e diminuiu no tratamento somente com Tucumã (50µg/mL por 24h) e Tucumã mais Paraquat (50µg/mL por 24h mais Paraquat 30µM). A desaminação da adenosina pela ADA e a consequente queda dos níveis de adenosina podem estar associadas ao desenvolvimento do processo anti-inflamatório no modelo de DMRI, uma vez que a adenosina desempenha um papel importante na prevenção da inflamação (BURNSTOCK *et al.*, 2010). Esses resultados sugerem que o aumento da desaminação de adenosina na exposição ao Paraquat pode melhorar o processo inflamatório. A diminuição da desaminação de adenosina no grupo Tucumã mais Paraquat pode contribuir para prevenir alterações inflamatórias no modelo de DMRI. Essas alterações nas enzimas purinérgicas podem contribuir como tratamento alternativo ou adicional dos processos inflamatórios em pacientes com DMRI, uma vez que essas enzimas são consideradas novos marcadores do processo inflamatório para diferentes doenças crônicas não transmissíveis (BALDISSERA *et al.*, 2017).

O potencial efeito anti-inflamatório do Tucumã foi confirmado com a análise de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Estudos atuais sobre o desenvolvimento de DMRI sugerem que a condição imunológica privilegiada normal do espaço sub-retiniano é perdida com a idade, permitindo que células imunes inatas, monócitos ou microglia retinal migrem para o espaço sub-retiniano. Essas células são capazes de liberar uma gama de citocinas inflamatórias que, por sua vez, causam a morte de fotorreceptores e / ou alterações funcionais no EPR (FLETCHER 2020).

Os resultados mostraram que o extrato de Tucumã aumentou a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, e diminuíram a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IFN, IL-6, IL-2 e TNF, confirmando o potencial efeito anti-inflamatório do Tucumã. Nossos resultados corroboram com outros estudos, como o desenvolvido por Bony *et al.* (2012) em um modelo de inflamação aguda induzida por LPS, onde o óleo de *Astrocaryum vulgare* suprimiu os níveis de IL-6 e TNF- α e aumentou os níveis de IL-10 no soro, baço e pulmões de ratos. Cabral *et al.* (2020) sugerem que Tucumã melhora a inflamação e o balanço redox em um modelo *in vitro* de inflamação induzida em macrófagos.

Curiosamente, o tratamento com 50µl foi capaz de prevenir os efeitos indesejáveis causados pelo Paraquat no modelo de DMRI, reduzindo NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, a atividade da ADA e níveis das citocinas pró-inflamatórias, além de melhorar os níveis das citocinas anti-inflamatórias. Isso é possível porque o extrato reduz a inflamação, evitando os efeitos negativos da doença. Como já bem relatado na literatura, o Tucumã possui propriedades anti-inflamatórias e é capaz de reduzir os danos oxidativos e inflamatórios

(CABRAL *et al.*, 2020), o que é corroborado pela correlação significativa e positiva entre os níveis e a atividade de NTPDase para ATP e ADP, bem como, entre a atividade de ADA e das citocinas. Nossos achados sugerem que o Tucumã previne os processos inflamatórios causados pelo Paraquat no modelo de DMRI, uma vez que a atividade dessas enzimas e citocinas pró-inflamatórias foi reduzida. Em vista disso, sugerimos que os carotenoides, presentes na matriz química do Tucumã, podem modular a atividade das enzimáticas do sistema purinérgico e, conseqüentemente, reduzir os processos inflamatórios na DMRI.

Resalta-se ainda, o importante papel da dieta como indicador para o desenvolvimento de DMRI. Isso foi demonstrando no estudo *in vivo* e *in vitro* desenvolvidos pelo nosso grupo, onde é confirmado que o guaraná, altamente prevalente na dieta da Amazônia, contribuiu para a baixa incidência de doenças visuais na população ribeirinha de Maués, Amazônia, Brasil (BONADIMAN *et al.*, 2017).

Ribeiro e colaboradores (2013), também mostraram que as pessoas que vivem no interior da Amazônia apresentam menor perfil de doenças como obesidade, hipertensão e diabetes tipo II. Esses achados têm levantado questões sobre a relação de seu estilo de vida e dieta com sua longevidade e diminuição da morbidade (KIM *et al.*, 2013; CABRAL *et al.*, 2020).

Portanto, é possível sugerir que o Tucumã pode ser considerado uma alternativa terapêutica interessante como coadjuvante no tratamento da DMRI, uma vez que possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, conforme observado no presente estudo. Ainda, estudos complementares *in vivo* podem contribuir para elucidar os mecanismos associados à atividade citoprotetiva, antioxidante e anti-inflamatória do Tucumã.

CONCLUSÃO

- Os resultados desse estudo sugerem que o extrato etanólico da casca e da poupa do Tucumã possui uma matriz química rica em moléculas bioativas com potencial antioxidante e anti-inflamatório;
- As análises realizadas demonstram que o extrato na concentração de 50µg/mL preveniu os danos oxidativos causados pelo Paraquat, por meio da citoprevenção, redução de EROs e manutenção da integridade do DNA nas células do EPR.
- No modelo experimental estudado, o extrato de tucumã (50µg/mL) demonstrou importante efeito anti-inflamatório modulando a via das purinas, reduzindo os níveis das citocinas pró-inflamatórias e promovendo a expressão das citocinas anti-inflamatórias.
- Por fim, os resultados apresentados demonstram que o Tucumã é um alimento funcional natural promissor na terapêutica de doenças crônicas como a DMRI, pois contribui significativamente para a prevenção de danos as células do EPR no modelo experimental *in vitro* de DMRI.

REFERÊNCIAS

Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. **Arch Ophthalmol.** v. 119, n. 10, p. 1417-1436, 2001.

ABU-AMERO KK, KONDKAR AA, CHALAM KV. Resveratrol and Ophthalmic Diseases. **Nutrients.**, v. 8, n. 4, 2016.

AGI J, KASAHARA N, LOTTENBERG C L. Qualitative assessment of online information about age-related macular degeneration. **Einstein**, n. 16 v. 2, p. 1-6, 2018

AGUIAR, J. P. L. Tabela de composição de alimentos da Amazônia. **Acta Amazônica.** v.26, n. 1/2, p. 121-126, 1996.

AKUFFO K O, BEATTY S, PETO T, STACK J, STRINGHAM J, et al. The Impact of Supplemental Antioxidants on Visual Function in Nonadvanced Age-Related Macular Degeneration: A Head-to-Head Randomized Clinical Trial. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.1, n.1, 2017.

American Academy of Ophthalmology. **Macular degeneration diagnosis: how is AMD diagnosed?** Disponível em: <https://www.ao.org/eye-health/diseases/amd-diagnosis> Acesso em dezembro de 2019.

American Academy of Ophthalmology. **What is macular degeneration?** Disponível em: <https://www.ao.org/eye-health/diseases/amd-macular-degeneration>. Acesso em dezembro de 2019.

ARUNKUMAR, R.; GORUSUPUDI, A.; BERNSTEIN, P. S. The macular carotenoids: A biochemical overview. **Molecular and Cell Biology of Lipids.** 2020.

ÁVILA, M. A retina século XXI. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 66, n. 5, p. 719-730, 2003.

BEATTY S, KOH H, HENSON D, BOULTON M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Surv Ophthalmol.** 45(2):115–34, 2000.

BAHADORANI S, SINGER M. Recent advances in the management and understanding of macular degeneration. **F1000Research.**, v. 6, n. 1, 2017.

BALDISSERA, M.D., et al. Treatment with tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) for diabetic mice prevents changes in seric enzymes of the purinergic system: Improvement of immune system. **Biomed Pharmacother.** v. 94, p. 374-379, 2017.

BELLINI, L. P.; FREITAS, A. M. Atualização no diagnóstico e tratamento da degeneração macular relacionada à idade. **Revista da AMRIGS.** v. 52, n. 3, p. 204-208, 2008.

BENHAR M: Oxidants, antioxidants and thiol redox switches in the control of regulated cell death pathways. **Antioxidants (Basel)**, 9:309. 2020.

BHUTTO, I., LUTTY, G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. **Mol Aspects Med.** v.33, n.4, p.295-317, 2012.

BONADIMAN B.S.R., et al. Guarana (*Paullinia cupana*): Cytoprotective effects on age-related eye dysfunction. **Journal of Functional Foods.** v. 36, n. 2017, p. 375–386, 2017.

BONADIMAN B.S. R, et al. Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) Prevents Oxidative and DNA Damage to Retinal Pigment Epithelium Cells. **J Med Food**, 00 (0), 1–8, 2021.

BONY, E., et al. Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: chemical characterization, and anti-inflammatory properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation. **Fitoterapia.** v. 81, n. 1, p. 33-43, 2012.

BOURNE RR, STEVENS GA, WHITE RA, SMITH JL, FLAXMAN SR, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990–2010: a systematic analysis. **Lancet Glob Health.**, v. 1, n. 1, p. 339-49, 2013.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/21837-projecao-da-populacao-2018-numero-e-habitantes-do-pais-deve-parar-de-crescer-em-2047>. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC n° 111, de 06 de setembro de 2016.** Dispõe sobre autorização de uso excepcional, de caráter temporário, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), do medicamento Avastin® (25 mg/mL solução para diluição para infusão), no tratamento da Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI).

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). “**Síntese de Indicadores Sociais – Uma análise das condições de vida da população brasileira 2009**”. In: Estudos e pesquisas, informação demográfica e socioeconômica, n.24. Rio de Janeiro: Diretoria de Pesquisas/ Coordenação de População e Indicadores Sociais, 2009.

BRITO, A.F.M. **Regulação da produção de Interleucina8 por oxisteróis no Epitélio Pigmentado da Retina: Implicações para a Degenerescência Macular Relacionada com a Idade.** Faculdade de Ciência e Tecnologia Universidade de Coimbra. Dissertação de mestrado em engenharia biomédica. 2008.

BUENO, D. C. Toxicidade De Organocalcogênicos E Seus Mecanismos Através Da Expressão Gênica Em Leucócitos Humanos. Dissertação (Programa de pós-graduação em B-ioquímica toxicológica). Universidade Federal de Santa Maria. 2015.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev.** v.87, p.659–797, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacol Rev.** v.24, p.509–581, 1972.

- BURNSTOCK, G. VERKHRATSKY A. Long-term (trophic) purinergic signaling: purinereceptors control cell proliferation, differentiation and death. **Cell Death Dis.** 1, 2010.
- CABRAL, F. L., et al. *Astrocaryum aculeatum* fruit improves inflammation and redox balance in phytohemagglutinin-stimulated macrophages. **Journal of Ethnopharmacology.** v.247, n.112274, 2020.
- CADONÁ, F. C., et al. Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. **Analytical Methods.** v. 6, n. 1, p. 8559-8568, 2014.
- CAYROL C, GIRARD JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2;106(22):9021-6. 2009.
- CANOVAS, R., et al. Macular pigments. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 72, n. 6, p. 839-844, 2009.
- CARNEIRO, A.B.A., et al. Effect of *Astrocaryum aculeatum* (tucumã) on doxorubicin toxicity: in vivo experimental model. **Acta paul. enferm.** v.30, n.3, 2017.
- CHAN, C. M., et al. Protective effects of resveratrol against UVA-induced damage in ARPE19 cells. **Int J Mol Sci.** v. 16, n. 3, p. 5789-5802, 2015.
- CHOI, W. S., et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cell Immunology.** v. 280, n. 2, p. 164-170, 2012.
- CIA D, VERGNAUD-GAUDUCHON J, JACQUEMOT N, DOLY M. Epigallocatechin Gallate (EGCG) Prevents H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Primary Rat Retinal Pigment Epithelial Cells. **Current Eye Research.**, v. 39, n. 9, 2014.
- CORSO, L., et al. Saffron reduces ATP-induced retinal cytotoxicity by targeting P2X7 receptors. **Purinergic Signalling.** v.12, n. 1, p. 161-174, 2016.
- CROSS, C.E., et al. Oxygen radicals and human disease. Davis conference. **Ann. Intern. Med.** 1987.
- CRUESS, A. F., et al. Economic burden of bilateral neovascular age-related macular degeneration: multi-country observational study. **Pharmacoeconomics.** v. 26, n. 1, p. 57-73. 2008.
- CRUZ-GUILLOTY, F., et al. Infiltration of proinflammatory m1 macrophages into the outer retina precedes damage in a mouse model of age-related macular degeneration. **Int J Inflamm.** v.2013, n.503725, 2013.
- CRUZ IBM, SCHWANKE CH A. Reflexões sobre biogerontologia como uma ciência generalista, integrativa e interativa. **Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento,** Porto Alegre., v. 3, n; 1, p. 7-36, 2001.
- CUGATI, S., et al. Visual impairment, age-related macular degeneration, cataract, and long-term mortality: the Blue Mountains Eye Study. **Arch. Ophthalmol.** v. 125, n. 7, p. 917-924, 2007.

- DATTA, S., et al. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in nonneovascular AMD. **Progress in Retin and Eye Research**. v. 20, n. 1, 2017.
- DEGLI ESPOSTI M. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**. v. 26: p. 335-340, 2002.
- DI VIRGILIO, F., et al. The P2X7 receptor in infection and inflammation. **Immunity**. v.47, n.1, p.15–31, 2017.
- DI VIRGILIO F, SARTI AC, SILVA RC. Purinergic signalling, DAMPs and inflammation. **Physiology**. 2020.
- EANDI, C. M., et al. Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β . **eLife**.v.5, n.16490, 2016.
- ELBAZ–HAYOUN S, RINSKY B, HAGBI-LEVI S, et al.: Evaluation of antioxidant treatments for the modulation of macrophage function in the context of retinal degeneration. **Mol Vis**; 25:479– 488, 2019.
- EVANS JR, LAWRENSON JG. Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration (Review), v. 7, n.1, 2017.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.
- FLETCHER, E.L.; Mechanisms of photoreceptor death during retinal degeneration. **Optom Vis Sci**. v. 87, n. 1, p. 430-440, 2010.
- FLETCHER EL. Advances in understanding the mechanisms of retinal Degenerations. **Clinical and Experimental Optometry** 103.6, 2020.
- FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B.T. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo, **Eur. J. Cancer**. v. 46, p. 1882–1891, 2010.
- FORTE R, PANZELLA L, CESARANO I, CENNAMO G, EIDENBERGER T, et al. Epilutein for Early-Stage Age-Related Macular Degeneration: A Randomized and Prospective Study, **Ophthalmic Res**, v. 8, n. 4, p. 231-241, 2017.
- FRANCIS PJ, KLEIN ML. Update on the role of genetics in the onset of age-related macular degeneration. **Clin Ophthalmol.**, v. 5, n. 1, p. 1127–33, 2017.
- FREDE K, EBERT F, KIPP AP, SCHWERDTLE T, BALDERMANN S. Lutein Activates the Transcription Factor Nrf2 in Human Retinal Pigment Epithelial Cells., v. 65, n. 29, p; 5944-5952, 2017.
- GAHR M. Caffeine, the most frequently consumed psychostimulant: a narrative review article. **Fortschr Neurol Psychiatr.**, v. 88, n.5, p. 318-330, 2020.

GARCÍA-LAYANA, A., et al. Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review. **Clinical Interventions in Aging**. v. 12, n.1, p. 1579–1587, 2017.

GARCÍA-MONTALVO, I. A.; MATÍAS-PÉREZ, D. Componentes nutricionales y degeneración macular relacionada con la edad. **Nutricion. Hospitalaria**. v. 32, n. 1, p. 50-54, 2015.

GIUSTI, G., et al. Colorimetric method. In: BERGMAYER, H.U. (Coord.). **Methods of Enzymatic Analysis**. 3 ed. **Weinheim: Wiley VCH**, v.1, n.1, p. 315-320, 1984.

GONG X, DRAPER CS, ALLISON GS, MARISIDDIAIAH R, RUBIN LP. Effects of the Macular Carotenoid Lutein in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. **Antioxidants (Basel)**., v. 4, n. 6, 2017.

GORUSUPUDI A, NELSON K, BERNSTEIN PS. The Age-Related Eye Disease 2 Study: Micronutrients in the Treatment of Macular Degeneration. American Society for Nutrition. **Adv Nutr.**, v. 8, n. 1, p. 50-53, 2017.

HÁ, T.T.N, et al.: Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. **PLoS One**, v. 6: p. 259-69, 2011.

HO T, et al. Localization and Possible Function of P2X Receptors in Normal and Diseased Retinae. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics.**, v. 32, n. 7, 2016.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal Pharmacology**. v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HANDA, J.T., et al. A systems biology approach towards understanding and treating non-neovascular age-related macular degeneration. **Nature Communications**. 2019.

HELENE, A.; HELENE, A.F. Some aspects of the optics of the human eye. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. v. 33, n. 3, p.3312, 2011.

HEYMANN, G.W.K, Reddington M. Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine in rat brain. **J. Neurochem**. v. 4, p.971–978, 1984.

HOLZ, F.G., et al. Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. **Arch. Ophthalmol**. v.112, p.402-406, 1994.

HOUSLEY GD, BRINGMANN A, REICHENBACH A. Purinergic signaling in special senses. **Trends Neurosci**. 32(3):128-41. 2009.

HYTTINEN, J.M.T, et al.: DNA damage response and autophagy in the degeneration of retinal pigment epithelial cells—Implications for age-related macular degeneration (AMD). **Age Res Rev**, v.36, v. 64-77, 2017.

ICHIISHI, E.; LI, X. K.; IORIO, E.L. Oxidative Stress and Diseases: Clinical Trials and Approaches. **Oxid. Med. Cell. Longev**. v.2016, n. 3458276, 2016.

ILOKI-ASSANGA, S.B., et al. Retino-protective effect of *Bucida buceras* against oxidative stress induced by H₂O₂ in human retinal pigment epithelial cells line. **MC Complem. Altern. Med.** v. 15, n. 1, p. 232-254, 2015.

JACQUES-SILVA, M., et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharm. Toxicol.**, v. 88, p. 119–125, 2001.

JAGER, R.D.; MIELER, W.F.; MILLER, J.W. Age-related macular degeneration. **N Engl J Med.** v. 358, n. 24, p. 2606-2617, 2008.

JENTZSCH, A.M., et al. Improved analysis human of malondialdehyde in body fluids. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 20, n. 2, p. 251-256, 1996.

JOBIM MJ, SANTOS RCV, ALVES CFS, et al.: Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. **Microbiological Research**; 169:313-323, 2014.

JUN S, DATTA S, WANG L, et al.: The impact of lipids, lipid oxidation, and inflammation on AMD, and the potential role of miRNAs on lipid metabolism in the RPE. **Exp Eye Res**, 09-23, 2019.

KAM, J.H., et al. Fundamental differences in patterns of retinal ageing between primates and mice. **Nature Scientific reports.** v. 9, n. 12574, 2019.

KAARNIRANTA K, et al.: Role of mitochondrial DNA damage in ROS-mediated pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). **Int J Mol Sci**, v. 20, p. 23-74, 2019.

KAUFFMAN, M.E, et al.: MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. **React Oxyg Species (Apex)**, v. 2, n. 5, p. 361-370, 2016.

KARTHIKEYAN, B, et al.: Insights on the involvement of (–)-epigallocatechin gallate in ER stress-mediated apoptosis in age-related macular degeneration. **Apoptosis**, v. 22, p. 72-85, 2011.

KAUPPINEN, A., et al. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 73, p. 1765–1786, 2016.

KIM EK, KIM H, VIJAYAKUMAR A, et al.: Associations between fruit and vegetable, and antioxidant nutrient intake and age-related macular degeneration by smoking status in elderly Korean men. **Nutr J**, 4;16(1):77, 2017.

KIM EK , KIM H , VIJAYAKUMAR A, KWON O, CHANG N. Associations between fruit and vegetable, and antioxidant nutrient intake and age-related macular degeneration by smoking status in elderly Korean men. **Nutr J**. 16 (77), 2017.

KHANDHADIA, S.; CHERRY, J.; LOTERY A.J. Age-related macular degeneration. **Adv Exp Med Biol.** v. 724, n. 1, p. 15–36, 2012.

KLEIN, R., et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. **Arch Ophthalmol.** v. 129, n.1, p.75-80. 2011.

KUBOTA S., et al. Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation. **Am. J. Pathol.** v. 177, n. 01, p. 1725–1731, 2010.

KUTTY, et al. Proinflammatory cytokine interferon- γ increases the expression of BANCR, a long non-coding RNA, in retinal pigment epithelial cells. **Cytokine.** v.1043-4666, n. 17, p. 30313-30317, 2017.

KURUTAS EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: **Current state. Nutr J,** 15:71, 2016.

LANDRUM, J.T.; BONE, R.A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment, **Arch. Biochem. Biophys.** v. 385, p. 28-40, 2001.

LANE, M., et al. Multiple Deprivation, Vision Loss, and Ophthalmic Disease in Adults: Global Perspectives. **Surv Ophthalmol.** 2017.

LE TIEN. **Screening campaign assesses AMD prevalence in France.** v. 2008, 2008.

LEVINE, B.; KROEMER, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell.** v.132, p.27-42, 2016.

LEE, H.S, et al. Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Ocular Neovascularization and Vascular Permeability in Human Retinal Pigment Epithelial and Human Retinal Microvascular Endothelial Cells via Suppression of MMP-9 and VEGF. **Activation. Molecules.**, v. 19, p. 12150-12172, 2014.

LEWIS, L.L.M., et al. Oxidative stress implications for the pathogenesis of ocular pathology. **Internat. J. Develop. Res.** v. 5, n.1, p. 3275-3288, 2015.

LUNKES, G. I., et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research,** v. 109, n. 4, p. 189–194, 2003.

MAIA, G.C.H.M., et al. Effects of *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Tucumã) on Diet-Induced Dyslipidemic Rats. **J Nutr Metab.** v. 2014, p. 1-9, 2014.

MANIKANDAN, R.; THIAGARAJAN, R. Zeaxanthin and ocular health, from bench to bedside. **Fitoterapia.** v. 109, n. 1, p 58-66, 2016.

MARAZITA, M.C, et al. Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal Pigment epithelial cells: Implications for Age-Related Macular Degeneration. **Redox Biol.**, v.7, n. 1, p. 78- 87, 2016.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol. Cell.** v.10, p.417-426, 2002.

- MATOS KAN, et al. Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactrisgasipaes*) are by-products classified as very high carotenoid sources. **Food Chem.** v. 272, p. 216-221, 2019.
- MCHUGH KJ, et al. Computational modeling of retinal hypoxia and photoreceptor degeneration in patients with age-related macular degeneration. **PLoS One**, v. 11, p. 14-6, 2019
- MEDINA, N. H.; MUNOZ, E. H. Atenção à saúde ocular da pessoa idosa. **BEPA.Boletim Epidemiológico Paulista.** v.8, n.85, p.23-28, 2011.
- MERLE, B.M.J; SILVER, R.E; ROSNER, B; SEDDON, J.M. ASSOCIATIONS Between Vitamin D Intake and Progression to Incident Advanced Age-Related Macular Degeneration. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v.58, n. 11, p. 4569-4578, 2017.
- MICELI, M.V.; LILES, M.R.; NEWSOME, D.A. Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. **Exp Cell Res.** v.214, p. 242-249, 1994.
- MITCHELL, P., et al. Age-related macular degeneration. **The lancet.** v. 392, 2018.
- MORABITO, C., et al. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. **Free Radical Biology Medicine.** v. 48, n. 4, p. 579–589, 2010.
- MITTAL D, KUMARI K. Automated detection and segmentation of drusen in retinal fundus images. **Comput Electr Eng.** v. 87, p. 82-95, 2015.
- NATOLI, R., et al. Microglia-derived IL-1 β promotes chemokine expression. By Muller cells and RPE in focal retinal degeneration. **Molecular Neurodegeneration.** v. 12, n. 31, p.1-11, 2017.
- NEHEMY MB. Degeneração macular relacionada à idade: novas perspectivas. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 69 n. 6, p. 955-958, 2016
- NIH – National Eye Institute. **Facts about age-related macular degeneration.** Disponível em: https://nei.nih.gov/health/maculardegen/armd_facts Acesso em fevereiro de 2017.
- OELLER, J. Atlas seltener ophthalmoskopischer Befunde. Atlas of rare ophthalmoscopic findings. **Bergmann, J.F: Wiesbaden,** 1904.
- NOTOMI, S, et al. Dynamic Increase in Extracellular ATP Accelerates Photoreceptor Cell Apoptosis via Ligation of P2RX7 in Subretinal Hemorrhage. **PLOS ONE.**, v. 8 n.1, e53338, 2013.
- NOVOSELOVA, E, et al. Naturally occurring antioxidant nutrients reduce inflammatory response in mice. **Eur. J. Pharmacol.** v. 615, p. 234–240, 2009.
- PAN, C.W, et al. Visual Impairment among Older Adults in a Rural Community in Eastern China. **J Ophthalmol.** v. 201, n. 01, p.1-6, 2016.

- PARIER, V.; SOUBRANE, G. Age-related macular degeneration. **Rev Med Interne**. v. 29, n. 3, p 215-23, 2008.
- PAULEIKHOFF, D., et al. Afluorescein and indocyanine green angiographic study of choriocapillaris in age-related macular disease. **Arch Ophthalmol**. v.117, p.1353-1358, 1999.
- PELEGRIN, P. Purinergic Signaling: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. v. 2041, 2020.
- PERES CM; CURI R. Como cultivar células. **Guanabara Koogan**, ed 1, 2005.
- PESCOSOLIDO, N., et. al. Agerelated changes in the kinetics of human lenses: Prevention of cataract. **International Journal of Ophthalmology**. v. 10, p. 1506–1517, 2016.
- PILLA, C., et al. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**. v. 7, p. 225–230, 1996.
- PRADELLA, F. M., et al. Epidemiological profile of age-related macular degeneration patients in Federal University of Parana, Brazil. **Rev. Bras Oftalmol**. v.75, n.5, p.352-355, 2016.
- Prevent Blindness. **AMD (Age-Related Macular Degeneration)**. Disponível em: <http://www.preventblindness.org/AMD-age-related-macular-degeneration> Acesso em fevereiro de 2017.
- RANI, V, et al.: Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sci**, n. 148, p. 183– 193, 2016.
- RATTNER, A; NATHANS, J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. **Nat Rev Neurosci**. v.7, n. 11, p. 860-872, 2006.
- RAUEN U, et al.: Hypothermia injury/cold-induced apoptosis evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-/H₂O₂ formation. **FASEB J ; n. 14**, p. 1953-64. 200.
- RAZANI, B, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. **Cell Metab**, v. 15, p. 534–544, 2012.
- REICHENBACHA, A.; BRINGMANNB, A.. Purinergic signaling in retinal degeneration and regeneration. **Neuropharmacology**. v.104, p.194-211, 2016.
- RIBEIRO, E.E, et al.: Aspects of the health of Brazilian elderly living in a riverine municipality of Amazon rainforest. **Rev Amaz Geriatr e Gerontol**, n. 01, 2013.
- ROZING MP et al. Age-related macular degeneration: A two-level model hypothesis. **Prog Retin Eye Res**. 76:100825. 2020.
- SANGRILLO, M,L, et al, Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**. v. 173, p. 741-748, 2015.

SANTOS, L.P., et al. Age-related macular degeneration: analysis in two ophthalmological centers in Pernambuco-Brazil. **Arq Bras Oftalmol.** v. 68, n. 2, p. 229-233, 2005.

SCHMIDT-ERFURTH U., et al. Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). **Br J Ophthalmol.** v. 98, n. 9, p. 1144-1167, 2014.

SCRIPSEMA, N.K., et al. Lutein, Zeaxanthin, and meso-Zeaxanthin in the Clinical Management. **J Ophthalmol.** v. 2015, n.1, p.1-13, 2015.

SERRA, D., et al. Epidemiological Analysis of patients diagnosed with Age-Related Macular Degeneration in Retina's Sector of Faculdade de Medicina do ABC. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.33, n. 1, p. 20-23, 2016.

SHANLEY P, CYMERYYS M, SERRA M, MEDINA G: Fruit trees and useful plants in Amazonian life. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* 2011.

SHEBIS, Y., et al. Natural Antioxidants: Function and Sources. **Food Nutr. Sci.**, v. 4, p. 643-649, 2013.

SHEN, L., et al. Oxidative damage is a potencial cause of cone cells death in retinitis oigmentosa. **J Cell Physiol.** v.203, n. 1, p. 457-464, 2005.

SILVÁN, J. M.; REGUERO, M.; DE PASCUAL-TERESA, S. A protective effect of anthocyanins and xanthophylls on UVB-induced damage in retinal pigment epithelial cells. **Food & Function.** v. 7, p. 1067–1076, 2016.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.** v. 299, p. 152-178, 1998.

SOUZA FILHO, O. C. et al. The In Vitro Genotoxic Effect of Tucuma (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian Fruit Rich in Carotenoids. **Journal of Medicinal Food.** v. 16, n. 11, p. 1013-1021, 2013.

SPARROW, J.R; BOULTON, M. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. **Exp Eye Res.** v. 80, n.5, p. 595-606, 2005.

STRAUSS, O. The retinal pigment epithelium in visual function. **Physiol Rev.** v. 85, n. 3 p. 845-881, 2005.

SUBRAMANI, M; et al. Resveratrol reverses the adverse effects of bevacizumab on cultured ARPE-19 cells. **Sci Rep.**, 2017.

TATE, D.J. Jr.; MICELI, M.V.; NEWSOME, D.A. Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.36, p.1271-1279, 1995.

TAYLOR, H.R., et al. The long-term effects of visible light on the eye. **Arch Ophthalmol.** v.110, n.99, p.104, 1992.

TAYLOR, H.R., et al. Visible light and risk of age-related macular degeneration. **Trans Am Ophthalmol Soc.** v.88, p.163-173, 1990.

TORRES R.J.A, et al. Conceitos atuais e perspectivas na prevenção da degeneração macular relacionada à idade. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v. 3, n. 1, p. 142-155, 2008.

VESSEY KA, GREFERATH U, APLIN FP, et al. Adenosine Triphosphate-Induced Photoreceptor Death and Retinal Remodeling In Rats. **The Journal of Comparative Neurology.** 522:2928–2950, 2014.

WEIKEL KA, CHIU CJ, TAYLOR A. Nutritional modulation of age-related macular degeneration. **Mol. Asp. Med.**, v.33, n. 1, p. 318-375, 2012.

WONG W.L, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Glob Health.** v. 2, n. 2, p. 106-116, 2014.

XU D, HU M-J, WANG Y-Q, CUI Y-L. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. **Molecules**, p. 24:1123, 2019.

YONEKAWA, Y.; MILLER, J. W.; KIM, I. K. Age-Related Macular Degeneration: Advances in Management and Diagnosis. **J. Clin. Med.** v. 4, n. 2, p. 343-359, 2015.

YASUKAWA T, et al. Fundus autofluorescence and retinal sensitivity in fellow eyes of age-related macular degeneration in Japan. **PLoS One**, v 28, n. 14, 2019.

YOUNG, C.N.J.; GORECKI, D.C. P2RX7 purinoceptor as a therapeutic target – the second coming? **Front Chem.** v. 6, n. 248, 2017.

ZHANG, J, et al. Protective effect of autophagy on human retinal pigment epithelial cells against lipofuscin fluorophore A2E: implications for age-related macular degeneration. **Cell Death Dis**, v. 6: e1972. 2015.