

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Beatriz da Silva Rosa Bonadiman

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) NAS
DISFUNÇÕES OCULARES ASSOCIADAS À IDADE: UM ESTUDO
TRANSLACIONAL**

Santa Maria, RS

2017

Beatriz da Silva Rosa Bonadiman

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) NAS DISFUNÇÕES
OCULARES ASSOCIADAS À IDADE: UM ESTUDO TRANSLACIONAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS

2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bonadiman, Beatriz da Silva Rosa
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GUARANÁ (Paullinia cupana) NAS
DISFUNÇÕES OCULARES ASSOCIADAS À IDADE: UM ESTUDO
TRANSLACIONAL / Beatriz da Silva Rosa Bonadiman.- 2017.
55 f.; 30 cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2017

1. Guaraná 2. Idosos ribeirinhos 3. Degeneração
macular relacionada a idade 4. Qualidade visual I. Cruz,
Ivana Beatrice Mânica da II. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Beatriz da Silva Rosa Bonadiman. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: beadasilvarosa@gmail.com

Beatriz da Silva Rosa Bonadiman

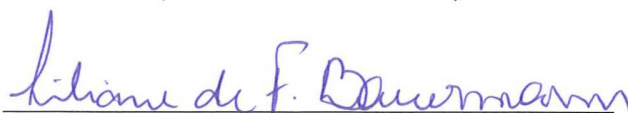
**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) NAS
DISFUNÇÕES OCULARES ASSOCIADAS À IDADE: UM ESTUDO
TRANSLACIONAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.


Aprovado em 27 de julho de 2017:



Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra (UFSM)
(Orientadora/Presidente)



Liliane Bauermann, Dra. (UFSM)



Francine Carla Cadoná, Dra. (UNOESC)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Dedico a toda a minha família, em especial para meus queridos avós que estão no céu!

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 ao meu esposo Darlan Bonadiman por todo amor, apoio e compreensão, por suportar a saudade quando eu estava em Santa Maria e por jamais ter deixado de me incentivar. Você sempre esteve comigo. Obrigada meu amor.

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, uma família unida como a nossa é uma grande benção de Deus.

Ao professor Alexis Trott, por me apresentar o laboratório Biogenômica.

À professora Ivana Beatrice Mânica da Cruz, por me proporcionar a experiência do fantástico mundo da ciência, por acreditar em mim e por ter me recebido de braços abertos em 2014.

Aos colegas do laboratório Biogenômica, foram momentos que levarei eternamente comigo, situações de alegria, correria e muitos experimentos.

Ao Alencar Kolinski Machado e a toda a família pela oportunidade de compartilhar o apartamento.

À Fernanda Barbisan que me acolheu em seus experimentos quando cheguei no laboratório.

Em especial, agradeço à Francine Carla Cadoná e a Charles Elias Assmann, pela ajuda nos experimentos, por todos os ensinamentos e pela grande amizade.

Ah, e como agradecer vocês, minhas colegas que viraram amigas e que agora já são da família; como agradecer pelo amor incondicional, por tudo o que eu aprendi com vocês, pelos mais sinceros abraços e pelas mais sinceras lágrimas: Audrei de Oliveira Alves, um pouco mãe, um pouco amiga, um pouco casa, um pouco família. Por dividir a casa comigo, por me ensinar a ser forte - pois alguém forte como você, eu ainda não encontrei - Obrigada! Grazi, minha pequena Grazielle Castagna Cezimbra Weis. Obrigada por dividir comigo o teu mundo, por me ensinar a ser um pouco mais paciente, pelo apoio e pelas inúmeras surpresas - em especial a festa de meu aniversário, eu sei, tudo saiu da sua cabeça. Não tem como falar de você Grazi sem falar em humildade, compaixão e bondade, você é um exemplo, eu aprendi muito com você. Obrigada! Eu amo vocês duas e sinto muito por não estar mais tão perto de vocês!

A minha companheira de viagens, Aline Mânica, que se tornou uma grande amiga parceira de experimentos.

À professora Margarete Dulce Bagatini, pela oportunidade proporcionada na Universidade Federal da Fronteira Sul e pelos inúmeros projetos.

Obrigada Dra. Cláudia Chaves e Dr. Cláudio Chaves pelas oportunidades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela formação proporcionada.

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

Muito obrigada!

*“Um Homem não se impõem pelas vestes que
usa, mas pelas palavras que profere.”
Rui Barbosa*

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) NAS DISFUNÇÕES OCULARES ASSOCIADAS À IDADE: UM ESTUDO TRANSLACIONAL

AUTOR: Beatriz da Silva Rosa Bonadiman

ORIENTADOR: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

O envelhecimento humano está associado ao risco de desenvolvimento de doenças degenerativas. Entre as doenças que acometem os idosos, destaca-se as que comprometem a visão, a mais severa é a degeneração macular relacionada a idade (DMRI) que leva a perda visual irreversível e não possui um tratamento eficaz. A DMRI, assim como outras morbidades crônicas está associada a alterações no metabolismo celular, com destaque ao estresse oxidativo. Evidências sugerem que a dieta teria um papel relevante no controle do estresse oxidativo, e deste modo estudos sobre o impacto de vegetais, em especial frutos sobre a saúde visual, são relevantes. Investigações prévias realizadas em idosos ribeirinhos de Maués, Amazonas, sugeriram que o consumo habitual de alguns frutos, em especial o guaraná (*Paullinia cupana*) estaria associado a uma menor prevalência de fatores de riscos a doenças cardiovasculares. Entretanto, nenhum estudo prévio investigou o impacto do guaraná na visão. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar *in vivo*, a associação entre a qualidade da visão auto relatada e a ingestão diária de guaraná em idosos ribeirinhos e, *in vitro*, os efeitos da guaraná (*Paullinia cupana*) na linhagem celular do epitélio pigmentar da retina (EPR) expostas ao Paraquat. As células do EPR, linhagem comercial ARPE-19 (ATCC ATCC® CRL-2302™), foram expostas ao guaraná por 48h e ao Paraquat por mais 6 h, e também ao Paraquat 6h mais guaraná 48h. Resultados: 630 idosos foram incluídos no estudo, sendo 291 (46,2%) homens e 344 (53,8) mulheres, com idade média de 72,3. Aproximadamente metade dos idosos auto relatou ter uma visão ruim 320 (50,8%), 234 (37,1%) auto relataram ter visão regular, e apenas 76 (12,1%) auto relataram ter uma boa visão. Os indivíduos que referiram boa visão apresentaram maior frequência de consumo habitual de guaraná (*Paullinia cupana*) (> 3 vezes/semana). A partir dos resultados *in vitro* foi possível observar que o tratamento com guaraná foi capaz de reverter a citotoxicidade causada pelo Paraquat, que aumenta os níveis do ânion superóxido, desencadeando estresse oxidativo. Esta ação protetora levou a diminuição dos eventos de apoptose e necrose, ocorrendo modulação diferencial da expressão gênica e dos níveis das proteínas das caspases 1, 3 e 8. O conjunto dos resultados sugere que o guaraná teria ação benéfica na saúde visual dos idosos. Dessa forma, este trabalho fornece novas perspectivas sobre o potencial uso guaraná na proteção doenças oculares devido aos seus efeitos citoprotectores.

Palavras-chave: Guaraná. Idosos ribeirinhos. Degeneração macular relacionada a idade. Qualidade visual.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECT OF GUARANÁ (PAULLINIA CUPANA) ON EYE DYSFUNCTIONS ASSOCIATED TO AGE: A TRANSLATIONAL STUDY

AUTHOR: Beatriz da Silva Rosa Bonadiman

ADVISOR: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

The human aging is associated to risk of chronic degenerative diseases. Among these morbidities that occur in elderly subjects is visual diseases, mainly age-related macular degeneration (AMD), which leads to irreversible visual loss. Currently, AMD did not have effective-treatment. AMD, as well as other chronic morbidities are associated with changes in cellular metabolism, with emphasis on oxidative stress. Evidence have suggested that diet would play a relevant role in the control of oxidative stress. Therefore, studies on the impact of vegetables, especially fruits, on visual health are relevant. Previous investigations carried out in riverine elderly people from Maués, Amazonas suggested that the usual consumption of some fruits, especially guaraná (*Paullinia cupana*) would be associated with a lower prevalence of risk factors for cardiovascular diseases. However, no previous study investigated the impact of guarana on vision. The present study conducted two complementary protocols. In the first one, was investigated the *in vivo* association between self-reported perception of visual quality and the habitual intake (> 3 days/week) of guarana powder in riverine elderly subjects. The second one was an *in vitro* study that evaluated effects protective effects of guarana (*Paullinia cupana*) on the cell line of the pigmentary epithelium Retina (RPE) exposed to Paraquat. EPR cells, commercial line ARPE-19 (ATCC ATCC® CRL-2302™), were exposed to guarana for 48h is to Paraquat for another 6h, and also to Paraquat 6h plus guarana 48h. Results: 630 elderly were included in the study, being 291 (46,2%) mens and 339 (53,8 %) women with a mean age of 72,3. Approximately half of the elderly self reported having a poor vision 320 (50.8%), 234 (37.1%) self reported having regular vision, and only 76 (12.1%) self reported having a good vision. Individuals who reported good vision had a higher frequency of habitual consumption of guarana (*Paullinia cupana*) (> 3 times / week). From the *in vitro* results it was possible to observe that the treatment with guarana was able to reverse the cytotoxicity caused by Paraquat, which increases the levels of the superoxide anion, triggering oxidative stress. This protective action led to a decreasing of some events as apoptosis and necrosis resulting in differential modulation of gene expression and protein levels of caspases 1, 3 and 8. The whole of results suggest that guarana would have a beneficial effect on the visual health of the elderly. Thus, this work provides new perspectives on potential guaraná use in protecting eye diseases due to its cytoprotective effects.

Keywords: Guarana. Riparian elderly. Age-related macular degeneration. Visual quality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Anatomia do olho humano.....	17
Figura 2 – Visão normal e visão com DMRI.....	19
Figura 3 – Análise cromatográfica do perfil de compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico de guaraná.	25
Figura 4 – Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>).....	26
Figura 5 – Estrutura química do Paraquat.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AV	Acuidade visual
CAT	Catalase
DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DMRI	Degeneração macular relacionada a idade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPR	Epitélio pigmentar da retina
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
GPX	Glutathione peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
MB	Membrana de Bruch
MGO	Metilglioxal
Nrf2	Fator-eritróide 2-fator 2
O ₂ •-	Ânion radical superóxido
OH•	Radical hidroxila
ON	Óxido nítrico
ONOO	Peroxinitrito
RD	Retinopatia diabética
RL	Radicais livres
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo geral	15
1.1.2 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO	16
2.2 ASPECTOS ANATÔMICOS E O ENVELHECIMENTO OCULAR	16
2.3 DEGENERAÇÃO MACULAR DA RETINA RELACIONADA A IDADE (DMRI)	18
2.4 DIAGNÓSTICO DA DMRI	19
2.5 TRATAMENTO DA DMRI	20
2.6 MODULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA DMRI	21
2.7 DIETA AMAZÔNICA	23
2.8 GUARANÁ (<i>Paullinia cupana</i>)	24
2.9 PARAQUAT	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 MANUSCRITO	28
4 DISCUSSÃO	30
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento humano está associado a alterações metabólicas dos órgãos e sistemas que aumentam a chance de aparecimento de disfunções e morbidades crônicas não transmissíveis (DATTA et al., 2017). O dano oxidativo e o processo inflamatório estão associados à patogenia de uma diversidade de doenças crônico-degenerativas e também doenças neurodegenerativas. Evidências indicam que o estresse oxidativo desempenha um papel importante em patologias oculares, incluindo a catarata, a degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), o glaucoma e a retinopatia diabética (RD) (MIRANDA et al., 2010; ILOKI-ASSANGA et al., 2015; LEWIS et al., 2015; DATTA et al., 2017).

Dentre as doenças oftalmológicas, destaca-se a DMRI, descrita pela primeira vez por Oeller em 1903. É a causa mais comum de perda visual irreversível na população com idade superior a 55 anos, nos países desenvolvidos (BAHADORANI; SINGER, 2017; DATTA et al., 2017), afetando até 27,9% dessa população (SOUBRANE; HADDAD; COSCAS, 2002). Estima-se que 196 milhões de pessoas serão acometidas pela doença até 2020, chegando a atingir 288 milhões no ano de 2040 (BELLINI; FREITAS, 2008).

Apesar da etiologia da DMRI ainda não estar completamente esclarecida, estudos sugerem que as reações fotoquímicas originadas no epitélio pigmentar da retina (EPR) tornam suas estruturas extremamente suscetíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo, tendo em vista que a retina é um dos tecidos com maior consumo de oxigênio no corpo humano (DATTA et al., 2017).

Esse processo de oxidação gera moléculas instáveis: os radicais livres (RL), que são altamente reativos com os tecidos oculares subjacentes. Em um estado fisiológico saudável, esses tecidos possuem enzimas antioxidantes endógenas capazes de anular/combater o estresse oxidativo, formado como consequência fisiológica do metabolismo. Entretanto, durante a injúria tecidual ocorre a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e RL, fazendo com que o sistema antioxidante endógeno não consiga anular os efeitos dessas moléculas, e, portanto, desencadeando uma condição patológica (BELLINI; FREITAS, 2008).

A DMRI manifesta-se sob duas formas principais: a forma seca, “sem neovascularização” (presença de drusas e alterações pigmentares no polo posterior) e a forma exsudativa, “neovascular”, com efeitos deletérios (membrana neovascular sub-retiniana associada à formação de cicatriz fibrovascular e a processo sero-hemorrágico da retina neurosensorial no polo posterior) (YONEKAWA; MILLER; KIM, 2015; DATTA et al., 2017).

Por conseguinte, os sintomas irão decorrer do comprometimento macular. Usualmente os pacientes relatam diminuição da sensibilidade ao contraste - ocorrendo sensação de falta de luz para ler ou escrever - embaçamento ou tonalidade amarelada nas imagens, bem como a diminuição da acuidade visual, percepção de linhas retas como deformadas ou onduladas e mancha sombreada central (BELLINI; FREITAS, 2008).

As consequências da DMRI na qualidade de vida de um indivíduo são consideráveis. Por exemplo, Brown et al. (2005), constataram que a qualidade de vida de um paciente com DMRI precoce é similar a uma pessoa com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) sintomático e, em estágios mais avançados é semelhante ao câncer de próstata metastático com dor pouco controlada. Ainda, com a perda de visão, o indivíduo fica menos ativo e apresenta maior risco de depressão (DATTA et al., 2017).

Tais dados sugerem o grande impacto desta doença no âmbito da saúde pública, adquirindo especial relevância devido ao crescente aumento da longevidade verificado nos últimos anos (BELLINI; FREITAS 2008).

Com relação à DMRI, alguns estudos sugerem que a suplementação alimentar com substâncias que possuem capacidades antioxidantes (ácido ascórbico, α -tocoferol e carotenoides) poderiam trazer benefícios, diminuindo a progressão da doença para as formas mais avançadas (SCRIPSEMA et al., 2015; SOUIED et al., 2015; GARCÍA-MONTALVO; MATÍAS-PÉREZ, 2015; MANIKANDAN; THIAGARAJAN, 2016).

Investigações prévias realizadas em idosos ribeirinhos que vivem no interior da selva amazônica sugeriram que o consumo habitual do pó da semente de guaraná, poderia ter impacto benéfico na saúde dos mesmos diminuindo a prevalência de riscos a doenças cardiovasculares, como a síndrome metabólica (KREWER et al., 2011). Entretanto, estudos sobre o impacto do consumo habitual do guaraná sobre a saúde oftalmológica ainda não foram produzidos.

Assim sendo, o guaraná (*Paullinia cupana*), planta nativa da Amazônia Brasileira, é um fruto que apresenta uma gama de compostos bioativos com propriedades benéficas ao organismo, como: antioxidantes, antiplaquetária, anti-inflamatória, energética, antitumoral, termogênica, antiobesogênica, hipolipemiante e na modulação neuro-cognitiva, antibacteriana e antifúngica (SMITH; ATROCH, 2010; SCHIMPL et al., 2013). A ação antioxidante do guaraná está relacionada à presença de compostos fenólicos e alcaloides que possuem o potencial de capturar as EROs e RL, prevenindo assim doenças degenerativas (RICHELLE; TAVAZZI; OFFORD, 2001; WATANABE; WATANABE; KAWAHARA, 2002).

Portanto, considerando que a DMRI ainda não possui um tratamento eficaz e a sua etiologia não está elucidada, estudos nesse âmbito são de extrema importância, 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 do ponto de vista translacional, a associação entre a qualidade da visão auto relatada e a ingestão diária de guaraná em idosos ribeirinhos e os efeitos da guaraná (*Paullinia cupana*) na linhagem celular do epitélio pigmentar da retina (EPR) expostas ao Paraquat.

1.1.2 Objetivos específicos

In vivo

- Descrever a prevalência de idosos ribeirinhos que auto relataram visão ruim, regular e boa;
- Analisar a associação entre auto relato da qualidade visual com o de consumo habitual do pó de guaraná (> 3 vezes/semana);
- Avaliar o impacto do sexo, idade e outro indicadores de saúde na potencial ação entre consumo de guaraná e auto relato da qualidade visual dos idosos ribeirinhos;

In vitro

A partir da exposição da linhagem celular ARPE-19 ao guaraná e ao Paraquat:

- Avaliar a viabilidade celular;
- Investigar a taxa de genotoxicidade celular;
- Realizar a quantificação das proteínas envolvidas na cascata apoptótica (Caspases 1, 3 e 8);
- Verificar a expressão dos genes Caspase 1, Caspase 3 e Caspase 8;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO

O envelhecimento biológico é considerado a última etapa do desenvolvimento humano, que ocorre após o período reprodutivo. Nesta etapa uma série de modificações moleculares, bioquímicas, celulares e teciduais acontecem, o que leva a alterações morfofisiológicas do organismo. Em geral, o quando envelhece, o organismo como um todo diminui a sua proporção de água corporal, sua taxa metabólica e de proliferação celular. Por outro lado, ocorre um aumento do tecido adiposo, que muitas vezes substitui tecidos funcionais como músculos e ossos (CRUZ; SCHWANKE, 2001).

Os olhos também apresentam alterações associadas ao envelhecimento que aumentam a suscetibilidade deste órgão ao desenvolvimento de doenças crônicas, como a DMRI que possui profundo impacto na vida do idoso e seus familiares (PESCOSOLIDO et al., 2016). Deste modo, a saúde e envelhecimento ocular é um tema de grande interesse científico, epidemiológico, social e clínico.

2.2 ASPECTOS ANATÔMICOS E O ENVELHECIMENTO OCULAR

O globo ocular possui forma esférica, sendo constituído pela córnea, cristalino, humor aquoso e humor vítreo. Sua porção interna é organizada em três camadas semelhantes: a retina, a coróide e a esclera (PARIER; SOUBRANE, 2008; HELENE; HELENE, 2011), figura 1.

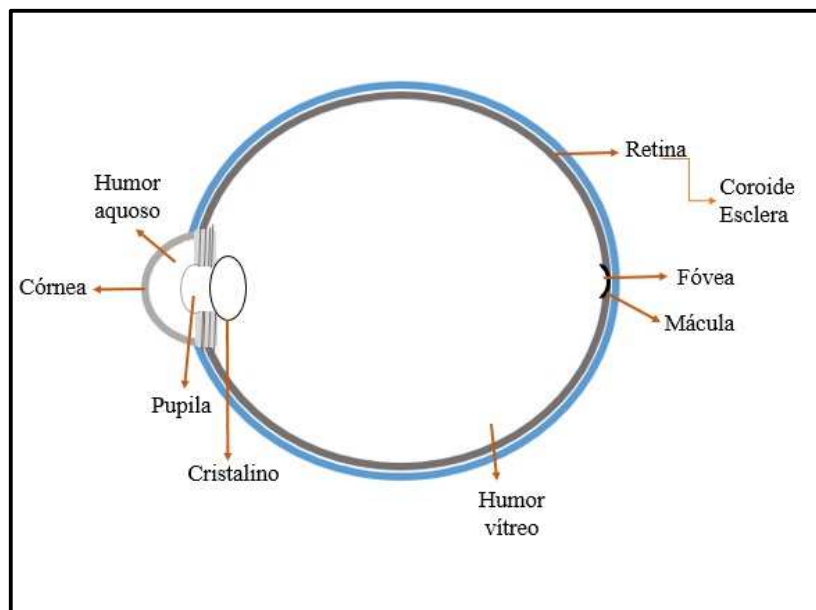
A retina é constituída por fotorreceptores (cones e bastonetes), responsáveis pelo processamento da informação visual. Ligado aos fotorreceptores, encontra-se o EPR que consiste em uma única camada de células responsáveis pela manutenção e funcionamento dos fotorreceptores. O EPR é unido à membrana de Bruch (MB) (membrana permeável situada entre o EPR e a coróide) (STRAUSS, 2005; JAGER; MIELER; MILLER, 2008; BRITO, 2008).

A coróide, uma camada espessa e com muitos vasos sanguíneos, localiza-se imediatamente a seguir à membrana de Bruch, tem como função fornecer oxigênio e nutrientes ao EPR e aos fotorreceptores (PARIER; SOUBRANE, 2008; HELENE; HELENE, 2011).

O EPR desempenha um papel fundamental na manutenção da função visual. Participa na “reciclagem” dos fotorreceptores, 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 a acumulação 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.

Sendo assim, a coróide, a MB e o EPR formam em conjunto a barreira hematorretiniana, que regula as trocas metabólicas locais (QUEIROZ et al., 2010).

Figura 1 – Anatomia do olho humano.



Fonte: A autora, 2017.

Ao longo do envelhecimento, ocorrem alterações morfológicas importantes no olho humano. Geralmente, por volta dos 40-50 anos de idade o primeiro sintoma oftalmológico que surge é a diminuição da capacidade de acomodação ou de focalização de objetos próximos (presbiopia). Com o decorrer dos anos, também passa a ocorrer a diminuição do campo visual periférico, da sensibilidade ao contraste, da discriminação das cores, da capacidade de recuperação após exposição à luz, da adaptação ao escuro e da noção de profundidade (PESCOSOLIDO et al., 2016).

Uma vez que a córnea se torna menos sensível, suas lesões podem passar despercebidas pelo envelhecimento fisiológico. Porém, a atrofia do EPR e a DMRI são as causas mais graves de perda visual em idosos. 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 da catarata já impactar negativamente na vida do idoso, a DMRI é uma das doenças mais importantes dos olhos associadas ao envelhecimento. É importante comentar que, vários estudos têm mostrado que o enfraquecimento da visão provocado pelo envelhecimento fisiológico, por si só já reduz a estabilidade postural e aumenta significativamente o risco de quedas e fraturas em idosos. Estas condições são ainda mais intensificadas quando ocorrem doenças neste órgão, como é o caso da DMRI (PESCOSOLIDO et al., 2016).

2.3 DEGENERAÇÃO MACULAR DA RETINA RELACIONADA A IDADE (DMRI)

A DMRI foi descrita pela primeira vez em 1903 por Oeller. Em 1926, Junius e Kunt a apontaram como a principal causa de cegueira em pessoas com mais de 55 anos de idade (ÁVILA, 2003). 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 (MILLER, 1990; ÁVILA, 2003; YONEKAWA; MILLER; KIM, 2015).

As reações fotoquímicas originadas na retina e no EPR tornam estas estruturas extremamente suscetíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo. O processo de oxidação gera moléculas instáveis, os radicais livres, 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).

A inflamação também pode estar associado a patogênese da DMRI, levando a ativação dos fatores de transcrição sensíveis ao estado *redox* das células, que podem levar a um aumento na expressão de citocinas inflamatórias, funcionando como um elo entre o stress oxidativo e a inflamação durante o envelhecimento (NATOLI et al., 2017).

O dano na visão causado pela degeneração ocorre em decorrência da disfunção dos fotorreceptores, pode estar associado com as formas seca ou exsudativa da doença. Na primeira, ocorre atrofia da rede coriocalilar e do EPR a ela associado. Na segunda, os

neovasos da coriocapilar rompem a MB e o EPR, 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 conseqüente decréscimo da visão central (BELLINI; FREITAS, 2008; CANOVAS et al., 2009).

Os sintomas, no início da doença, ocorrem devido o comprometimento macular. O paciente relata diminuição da sensibilidade ao contraste: tem-se 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), figura 2.

Figura 2 – Visão normal e visão com DMRI.



Fonte: Adaptado de National Eye Institute, 2017.

2.4 DIAGNÓSTICO DA DMRI

O diagnóstico clínico da DMRI é feito inicialmente pelo exame de fundo de olho, idealmente com técnica de biomicroscopia da mácula. Em 1995 o *International Epidemiological Age Related Maculopathy Study Group*, estabeleceu alguns critérios para definição da doença em estado inicial, que são utilizados até hoje em estudos epidemiológicos (BIRD et al., 1995; BELLINI; FREITAS, 2008).

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).

2.5 TRATAMENTO DA DMRI

Até os anos 80, 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 foto-sensível), que ficou conhecida mundialmente por PDT, sua sigla em inglês, sendo esse utilizado até hoje (BELLINI; FREITAS, 2008).

A DMRI seca, apesar de ser a forma mais leve, acomete 90% dos indivíduos. Evidências tem sugerido que a suplementação alimentar com substâncias antioxidantes (ácido ascórbico, α -tocoferol e carotenóides) pode trazer benefícios, diminuindo a progressão da doença para as formas mais avançadas (SCRIPSEMA et al., 2015; SOUIED et al., 2015; GARCÍA-MONTALVO; MATÍAS-PÉREZ, 2015; MANIKANDAN; THIAGARAJAN, 2016).

Além disso, um dos mais importantes trabalhos já realizados é o AREDS – *Age Related Eye Disease Study*, sugere que a combinação 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).

Uma revisão de estudos já publicados Natarajan et al (2017) salientou a relevância da suplementação com polifenóis presentes no suco de uva na saúde ocular. Segundo os autores, o suco de uva tem sido utilizado em todo o mundo por seus potentes valores medicinais, incluindo na promoção da saúde ocular. A bioatividade da uva é altamente atribuída à presença de fitoquímicos. Sugerindo que os esses compostos presentes no suco da uva estão envolvidos na manutenção da pressão intra-ocular, na regulação do metabolismo da glicose e na supressão de citocinas pró-inflamatórias no sistema.

Particularmente, os fitoquímicos derivados da uva parecem minimizar vários defeitos oculares, como degeneração macular, uvea, formação de cataratas, olhos vermelhos, retinopatia diabética e assim por diante. No entanto, apenas um número limitado de estudos foi realizado até agora focando a atividade de promoção ocular de polifenóis de uva. Este trabalho abre a perspectiva de que outros frutos com matriz química rica em polifenóis poderiam agir benéficamente sobre o olho, e em especial sobre a progressão da DMRI (NATARAJAN et al., 2017)

No Brasil, estão disponíveis no mercado os suplementos a base de compostos antioxidantes como luteína e zeaxantina (Neovite Max, Bausch Lomb® e Vielut, Legrand®)

2.6 MODULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA DMRI

O estresse oxidativo é uma situação fisiopatológica definida por um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de EROs. Algumas doenças têm nele a sua principal causa. Nessas condições, as EROs são produzidas de forma inespecífica, como um subproduto da respiração aeróbica, sendo a mitocôndria a principal fonte endógena de EROs (FINKEL; HOLBROOK, 2000; HALLIWELL, 2007; BUENO, 2015).

Dessa forma, a partir de uma série de reações de oxi-redução, as moléculas de oxigênio passam a ter um desemparelhamento de elétrons, tornando-se reativas (RAHA e ROBINSON, 2000). As EROs também podem ser formadas pelas oxidases, que são enzimas específicas, encontradas na membrana plasmática e podem ser produzidas como resposta a fatores de crescimento e citocinas (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004).

Existem, também, fatores ambientais importantes na produção de EROs, como: radiação ionizante, luz ultravioleta, metais pesados, agentes químicos e maus hábitos alimentares. São situações que ocasionam um estado de estresse oxidativo. As mais relevantes EROs formadas metabolicamente são: o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (HALLIWELL, 2007; SHEBIS et al., 2013; BARBISAN et al., 2014).

Entre as EROs, o ânion $O_2^{\bullet-}$, tem papel relevante, por ser constantemente produzido como subproduto da fosforilação oxidativa na mitocôndria. Ademais, pode originar-se a partir de estímulos externos como a irradiação. Nessa perspectiva, o ânion $O_2^{\bullet-}$ é bioquimicamente produzido a partir da redução de um elétron de oxigênio, sendo por isso considerado moderadamente reativo. O $O_2^{\bullet-}$ possui meia-vida de aproximadamente 2-4 μ s (microsegundos), apresentando dessa forma, baixíssima capacidade de atravessar as

membranas biológicas. No entanto, pode se difundir por longas distâncias a partir de seu local de produção (HALLIWELL, 2007; BARBISAN et al., 2014).

Na presença de H_2O_2 , o $O_2^{\bullet-}$ pode ser precursor de espécies oxidantes mais potentes através da reação de Haber-Weiss, na qual metais de transição como Cobre II e Ferro III catalisam a reação, conduzindo a formação do radical OH^{\bullet} . O ânion $O_2^{\bullet-}$ possui grande afinidade com o óxido nítrico (ON), levando a formação de peroxinitrito (ONOO). Esta é uma molécula nitrosativa de oxigênio que tem ampla afinidade com lipídios, ocasionando uma extensa oxidação das membranas celulares. Essa reação é dada como lipoperoxidação. Como as membranas celulares são compostas por uma dupla camada lipídica, os processos de lipoperoxidação levam a danos nas células e em suas organelas (HALLIWELL, 2007; BARBISAN et al., 2014).

O H_2O_2 é outra espécie reativa de grande relevância biológica. Essa molécula exibe potencial oxidante indireto, agindo como precursor na formação de outras EROs. Dessa forma, é capaz de difundir-se por distâncias consideráveis e transpassar membranas. No citoplasma, o H_2O_2 pode reagir com íons de Cobre ou Ferro II produzindo outro importante EROs, a OH^{\bullet} , em uma reação conhecida como reação de Fenton (HALLIWELL, 2007; SHEBIS et al., 2013).

Das EROs conhecidas, o radical OH^{\bullet} é extremamente reativo e causa um maior número de danos. É hábil em reagir com todos os tipos de macromoléculas, causando danos nas proteínas e nos lipídeos e também a mutações no DNA. Em virtude da sua meia-vida curta, raramente pode ser sequestrado *in vivo* (HALLIWELL, 2007).

Em razão das EROs serem moléculas de ampla reatividade, o organismo possui dois sistemas de defesa antioxidantes: endógeno, constituído por uma cadeia enzimática, formada pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPX); e o exógeno, composto por moléculas bioativas com atividade antioxidante, obtidas a partir da alimentação (MONTAGNER et al., 2010; SHEBIS et al., 2013; BARBISAN et al., 2014).

O sistema endógeno é formado pela SOD, primeira enzima na linha de defesa contra EROs, capaz de dismutar $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . Essa enzima é encontrada sob três isoformas nos compartimentos celulares: a CuZnSOD (citossólica – SOD1 e extracelular – SOD3) e a MnSOD (exclusivamente mitocondrial – SOD2). O H_2O_2 por sua vez, também precisa ser removido, participando desse processo também as enzimas CAT e GPX (SINHA et al., 2013).

Sabe-se, ainda, que a formação exacerbada de EROs está relacionada ao processo de envelhecimento e também a fisiopatologia de diversas doenças, como Alzheimer, Parkinson, diabetes e doenças oftalmológicas (EDREY; SALMON, 2014; GAKI; PAPAVALASSILIOU,

2014; ROCHETTE et al., 2014; WANG et al., 2014; BUENO, 2015). Por isso, várias estratégias terapêuticas foram e estão sendo desenvolvidas com o objetivo de amenizar o efeito danoso do estresse oxidativo. Esses métodos envolvem o uso de produtos naturais e/ou compostos sintéticos, que atuam tanto no sequestro de EROs quanto na modulação da atividade das enzimas antioxidantes (MAXWELL, 1995; BUENO, 2015).

Investigações têm sugerido que estresse oxidativo e a inflamação têm papéis fisiológicos potencialmente patológicos associados a degeneração da retina e a própria evolução da AMD. Fontes fisiológicas do estresse oxidativo associados ao olho, incluem estresse foto-oxidativo, ocorrência de fagocitose acentuada dos segmentos externos dos fotorreceptores. Também fatores externos podem aumentar o estresse oxidativo nos olhos contribuindo para a aceleração do seu envelhecimento e estabelecimento de doenças. Este é o caso do tabagismo e da ingestão de altos teores de gordura (DATTA et al., 2017). Neste caso, o efeito de componentes dietéticos parece contribuir positivamente para a desaceleração do envelhecimento ocular e desenvolvimento de doenças como a DMRI.

2.7 DIETA AMAZÔNICA

A região amazônica possui grande diversidade étnica, cultural e social, que produz forte impacto sobre a saúde e envelhecimento da sua população. Cabe ressaltar que é o estado brasileiro que mais tem conservado a cultura alimentar dos povos pré-colombianos da região quando comparado a outras unidades federativas brasileiras, já que nestas a dieta européia - baseada em alimentos ricos em carboidratos simples, como o açúcar, a batata e o trigo - são predominantes (CRUZ, 2003).

Os alimentos consumidos no interior amazônico estão agrupados em três grandes categorias: peixes, frutos e farinhas. No mesmo contexto, a região amazônica destaca-se pela grande produção e consumo de guaraná. É onde o produto começou a ser produzido e melhorado pelo povo indígena Saterê-Mawé (CABRAL, 1932).

Considerando que a dieta tem um papel fundamental na modulação do envelhecimento e longevidade, estudos indicam que o guaraná é um alimento funcional de baixa toxicidade (MACHADO et al., 2015).

2.8 GUARANÁ (*Paullinia cupana*)

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma espécie nativa da Amazônia Brasileira, pertencente à família *Sapindaceae*, popularmente lhe são atribuídas propriedades medicinais, estimulantes, energéticas e afrodisíacas. O Brasil é o único país que produz o fruto em escala comercial, com cerca de 4300 toneladas por ano (SEBRAE, 2012). A comercialização do guaraná é realizada em várias formas: cápsulas gelatinosas, xaropes, bebidas energéticas, refrigerantes, entre outros (KUSKOSKI et al., 2005; SCHIMPL et al., 2013), figura 3.

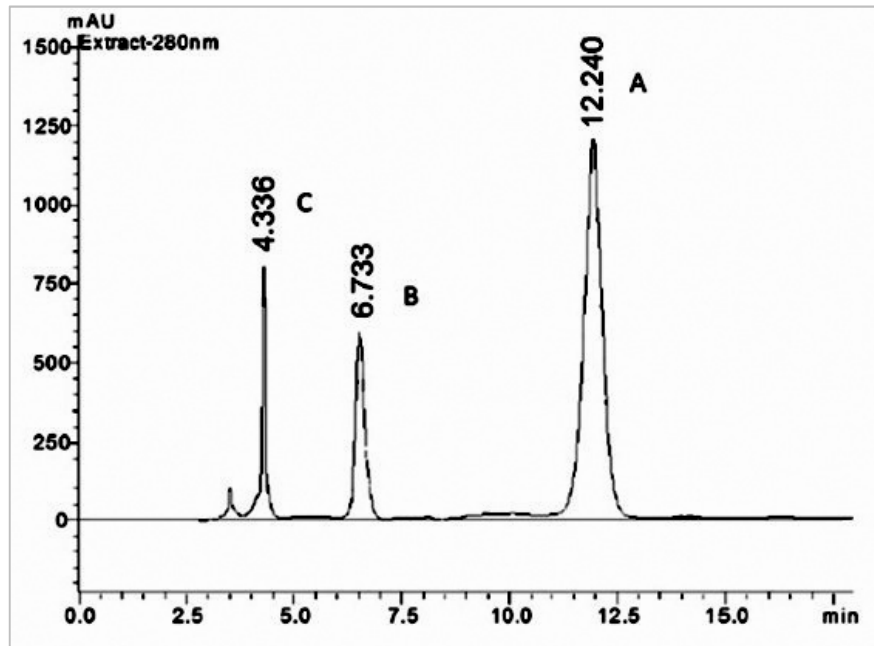
No que se refere à constituição química da *Paullinia cupana*, pode-se citar a presença de alcaloides, como a teofilina, cafeína, teobromina, bem como terpenos, flavonoides e amidas, além de saponinas, gorduras, amido, colina e pigmentos. A cafeína, um dos compostos em maior proporção no guaraná, apresenta-se em concentrações superiores, entre 6,2 a 8%, quando comparado ao café e 30 vezes maior que o cacau (BYDLOWSKI; D'AMIGO; CHAMONE, 1991; ALBUQUERQUE, 1991; ESPINOLA et al., 1997; EDWARDS et al., 2005; HOWELL et al., 2005; MACHADO et al., 2015).

Em uma pesquisa com o guaraná, Majhenic, Skerget e Knez (2007), destacaram a presença de concentrações expressivas de catequina, epigalocatequina e epigalocatequina galato.

Machado et al. (2015) demonstram através da caracterização e quantificação dos compostos químicos do extrato hidroalcoólico de guaraná a partir na análise por cromatografia, que o guaraná possui prioritariamente, 12.240 mg / g de cafeína, 6,733 mg / g de teobromina e 4,336 mg / g de catequinas totais quando comparados com os padrões para esses compostos (figura3).

Além disso, através do ensaio da diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), foi evidenciada a capacidade antioxidante do extrato do fruto no combate ao estresse oxidativo. Dessa forma, o guaraná tornou-se de relevante interesse farmacológico.

Figura 3 – Análise cromatográfica do perfil de compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico de guaraná.



Fonte: Adaptado de Machado et al., 2015.

Consoante a isso, em um estudo *in vitro* utilizando fibroblastos, Bittencourt et al. (2013) também demonstraram a capacidade antioxidante do guaraná. No trabalho, os fibroblastos foram expostos ao nitroprussiato de sódio, que produz óxido nítrico, e a diferentes concentrações de guaraná. O guaraná apresentou efeito protetor importante, incluindo modulação diferencial das enzimas antioxidantes.

Assim sendo, a ação antioxidante do guaraná pode estar relacionada aos compostos fenólicos que apresentam alto potencial em capturar EROs e outros radicais livres, desse modo, auxiliando na prevenção doenças degenerativas, coronarianas e, até mesmo, o câncer (RICHELLE; TAVAZZI; OFFORD, 2001; WATANABE; WATANABE; KAWAHARA, 2002).

Figura 4 – Guaraná (*Paullinia cupana*)

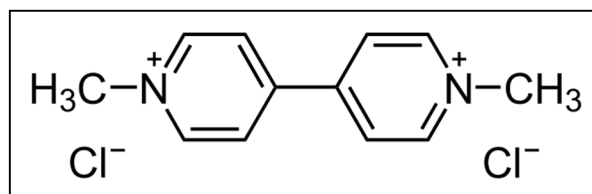


Fonte: Adaptado de Ribeiro; Cruz (2012).

2.9 PARAQUAT

O Paraquat (1,1'-Dimetil-4,4'-bipiridinium dichloride), fórmula química $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$ também conhecido como Gramoxone 2000® ou viológeno de metilo (SUN; KY, 2013; LIU et al., 2017). Ele é um herbicida extensivamente utilizado nas culturas de abacaxi, uva, café, arroz, algodão, feijão, couve, maçã, milho, batata e soja (BRASIL, 2007). Quando utilizado de forma inadequada aumenta a taxa de patologias desencadeadas pelo estresse oxidativo (KANG et al., 2015).

Figura 5 – Estrutura química do Paraquat.



Fonte: Adaptado de Serra; Domingos; Prata (2003)

Pertence ao grupo químico dos bipyridílio, moléculas com atividade relacionada com a formação de radicais O_2^- , cuja detoxificação pela enzima SOD, resulta na formação de H_2O_2 , que peroxida lipídios e danifica membranas do cloroplasto e células (VIDAL, 1997; MARTINS, 2013).

A geração dos RL leva ao estresse oxidativo, dando início a uma cadeia de reações e levando a alterações em proteínas extracelulares e a modificações celulares. O principal dano causado pelo estresse oxidativo é a peroxidação dos ácidos graxos constituintes da dupla camada lipídica da membrana celular resultando em um desequilíbrio no metabolismo aeróbico e uma relevante ameaça à homeostase celular (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004)

Na inexistência de oxigênio, o Paraquat sofre uma redução parcial da sua forma catiônica a um radical estável, recuperando na presença de oxigênio a forma catiônica, com consequente produção de O_2^- . Portanto, na presença de oxigênio e de fornecimento contínuo de elétrons, haverá um ciclo de oxidações e reduções, com produção contínua de ânion superóxido. Os efeitos tóxicos do Paraquat explicam-se, em grande parte, por uma reação de oxidação-redução, que compreende a transferência de um elétron para o NADP, com formação de NADPH celular e formas oxidadas potencialmente tóxicas, como o radical superóxido (SERRA; DOMINGOS; PRATA, 2003; MARTINS, 2013).

Com base na ação oxidativa do Paraquat, esta molécula tem sido utilizada como modelo experimental associado a aceleração dos processos de envelhecimento biológico (BLANCO-AYALA et al., 2014) em modelos experimentais incluindo a mosca das frutas *Drosophila melanogaster* (MÜLLER et al., 2017), em estudos *in vitro* com células neurais (YAN et al., 2017), camundongos (LI et al., 2017) e ratos (ALMEIDA et al., 2017). Estudos com seres humanos também têm relatado que o paraquat induz lesões oculares (WANG et al., 2015; JIANG-WEI et al., 2017)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MANUSCRITO

Os itens “Materiais e Métodos” e “Resultados” referentes a esta dissertação, estão apresentados sob a forma de um manuscrito a seguir. O manuscrito intitulado “*Guarana (Paullinia cupana): cytoprotective effects on age-related eye dysfunction*” está publicado a revista *Journal o Functional Foods*.



Guarana (*Paullinia cupana*): Cytoprotective effects on age-related eye dysfunction



Beatriz da Silva Rosa Bonadiman^{a,h}, Francine Carla Cadoná^{b,h}, Charles Elias Assmann^{b,h}, Grazielle Castagna Cezimbra Weis^{c,h}, Audrei de Oliveira Alves^{a,h}, Marta Frescura Duarte^a, Cláudia Maria Chaves^d, Cláudio do Carmo Chaves^d, Kennya Márcia dos Santos Motta^{e,h}, Euler Esteves Ribeiro^f, Margarete Dulce Bagatini^g, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{a,b,e,h,*}

^a Graduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, Brazil

^b Graduate Program of Biological Sciences (Toxicological Biochemistry), Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, Brazil

^c Graduate Program of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, Brazil

^d Ophthalmology Institute of Manaus, 69005-141 Manaus, Brazil

^e Graduate Program of Gerontology, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, Brazil

^f Open University of the Third Age, 69065-001 Manaus, Brazil

^g Academic Coordination, Campus Chapecó, Federal University of Fronteira Sul, 89815-899 Chapecó, Brazil

^h Laboratory of Biogenomics, Department of Morphology, Health Science Center, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2017

Received in revised form 10 July 2017

Accepted 10 July 2017

Keywords:

Riparian elderly

Guarana

Eye disorders

Visual loss

Macular degeneration

Eye quality

ABSTRACT

Ageing can cause disorders such as age-related macular degeneration (AMD), which leads to irreversible visual loss in elderly people. Given that nutrition may influence some age-related disorders, this study investigated, *in vivo*, the association between self-reported eyesight quality and daily guarana intake in riparian elderly subjects and, *in vitro*, the effects of guarana (*Paullinia cupana*) on retinal pigmented epithelium (RPE) cells exposed to paraquat. Just over half of the elderly subjects self-reported poor vision ($n = 320$, 50.8%), 234 (37.1%) self-reported regular eyesight, whereas just 76 (12.1%) self-reported good vision. Subjects that self-reported good vision presented a higher frequency of habitual guarana consumption. Guarana treatment was able to decrease apoptosis and necrosis events and differentially modulate gene expression and protein levels of caspases 1, 3 and 8 in RPE cells. This work provides new perspectives on the potential use of guarana against eye diseases due to its cytoprotective effects.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ageing biology affects all organs, causing various dysfunctions and susceptibility to non-transmissible diseases (Tarry-Adkings & Ozanne, 2014). In general, eye ageing is considered to lead to reduced diffusion of water from the outside to the inside of the lenses, crystalline changes due to the accumulation of high molecular weight aggregates and insoluble proteins, the production of advanced glycation end-products (AGEs), and the accumulation of lipids and other waste molecules. Moreover, older people may experience problems due to changes in pupillary response and accommodation, which regulate retinal illumination to optimize visual perception (Pescosolido, Barbatto, Giannotti, Komaiha, &

Lenarduzzi, 2016). These alterations contribute to the development of eye disorders such as cataracts, glaucoma and age-related macular degeneration (AMD) (Gerald & Allen, 2013; Jarrett & Boulton, 2012; Wong et al., 2014).

Robust evidence suggests that oxidative stress has a major influence on the retinal pigment epithelium (RPE) and AMD pathophysiology (Datta, Cano, Ebrahimi, Wang, & Handa, 2017). As RPE cells contain a high number of mitochondria related to the energy demands of this tissue, there is a high level of ROS production in these cells (Jager et al., 2008). During the ageing process, mitochondria lose efficiency in energy production and increase ROS levels, causing an undesirable oxidative imbalance (Chen, Raule, Chomyn, & Attardi, 2012). Moreover, photo-oxidative stress due to the processing of sunlight for vision could be considered an additional source of oxidative stress (Beatty, Koh, Phil, Henson, & Boulton, 2000). On the other hand, RPE has endogenous antioxidant mechanisms that are regulated through various transcription

* Corresponding author at: Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Av, Building 19, Room 3101, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: ibmcruz@hotmail.com (I.B.M. da Cruz).

factors including Nf- κ B, AP1, the FoxO family, Wnt and PGC-1 α . In addition, RPE supports autophagic processes that are used to remove faulty cellular components (Datta et al., 2017). However, when the endogenous antioxidant metabolism is not sufficient to control ROS production efficiently and when autophagy reaches high levels, the two processes could result in dysfunctional RPE and contribute to AMD progression (Mitter et al., 2014; Yao et al., 2015).

Due to the crucial effect of oxidative stress on RPE function and AMD development, prior studies have investigated the effect of potential antioxidant molecules on the regulation of RPE oxidative metabolism. The results suggested that molecules such as zeaxanthin, lutein (Manikandan & Thiagarajan, 2016; Scripsema, Hu, & Rosen, 2015) and omega-3 fatty acids (Souied et al., 2015) present in food could help to prevent and control the progression of age-related eye disorders, especially AMD. There is also evidence that caffeine, the most consumed psychostimulant in the world, could have a beneficial effect on eye ageing. For this reason, it has been postulated that caffeine could offer some therapeutic value in the treatment of eye dysfunctions, especially retinal diseases (Beharry, Valencia, Lazzaro, & Aranda, 2016; Boia, Ambrósio, & Santiago, 2016).

However, it is difficult to assess the effects of caffeine on eye disorders in epidemiological terms due to a large number of confounding environmental and social factors. In order to investigate the main factors that influence the ageing of populations living in the Amazon rainforest, in 2009 we started a study on riparian elderly subjects living in Maués, Amazonas, Brazil. This region is geographically isolated from larger urbanized areas, and is only possible to reach by water or air transport. Populations live in a small urban area and in more than 170 riverbank communities. Two previous cross-sectional investigations showed that riparian elderly free-living communities had functional balance and health determinants (Maia Ribeiro et al., 2013). Moreover, Maués is the first Amazon area to cultivate guarana (*Paullinia cupana*), and this caffeine-rich plant is traditionally consumed without restriction by people of all age groups (Schimpl, da Silva, Gonçalves, & Mazzafera, 2013). A previous investigation found that habitual guarana consumption (≥ 5 days/week) by riparian elderly was associated with a lower occurrence of hypertension, obesity and metabolic disorders (Krewer et al., 2011). Complementary investigations found that guarana had lowering effects on oxidized LDL cholesterol (Portella et al., 2013), antioxidant and protective effects on neural cells against rotenone exposure (Bittencourt et al., 2013, 2014), an antitumor effect (Cadoná et al., 2015; Fukumasu et al., 2008), and *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory effects (Krewer et al., 2014).

Another study indicated that *in vitro* guarana supplementation could act on the senescence of adipocyte-mesenchymal cells (ASCs) obtained from human lipoaspirates. Senescent ASCs in the eighth passage lost approximately 25% of their proliferative capacity and presented higher levels of oxidative markers, such as ROS, lipoperoxidation, protein carbonylation and DNA damage, but guarana supplementation reverted many of these changes. These results support the hypothesis that guarana could help to protect against eye dysfunction (Machado et al., 2015).

To test this hypothesis, a translational investigation was performed assessing the association between the self-reported visual condition of riparian elderly living in Maués and habitual guarana intake, and the potential cyto-genoprotective effect of guarana on the ARPE-19 cell line exposed to high levels of superoxide ($O_2^{\cdot -}$) generated by paraquat, an organic compound that interferes with electron transfer by reducing the number of electron donors such as NADPH in the mitochondria (Martins, Bastos, Carvalho, & Capela, 2013).

2. Materials and methods

2.1. General study design

A translational investigation was performed using two complementary *in vivo* epidemiological and *in vitro* protocols. In the *in vivo* study, we evaluated the association between habitual guarana intake and the self-reported visual condition of an Amazon riparian elderly group (>60 years old) living in Maués, an Amazon Rainforest city (Maia Ribeiro et al., 2013).

To evaluate guarana's effect on the oxidative stress of retinal cells, we also performed an *in vitro* assay using adult human retinal pigment epithelial cells ARPE-19 (ATCC[®] CRL-2302[™]), purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virginia, USA) and certified to be free of mycoplasma contamination. These cells have been used as an experimental model of AMD (Hao, Zhang, Wang, Yang, & He, 2011; Marazita et al., 2016). ARPE-19 cells were exposed to paraquat pesticide, which generates large quantities of superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$), which in turn has an important biological role, since it is constantly produced as a by-product of oxidative phosphorylation in mitochondria and by other cell reactions (Halliwell, 2007).

In aged cells, mitochondria generate higher superoxide anion levels than younger cells. In eye cells including the retina, $O_2^{\cdot -}$ can react with nitric oxide (NO) to produce peroxynitrite molecules, which subsequently can cause extensive lipoperoxidation and apoptosis induction (Brand, Orr, Perevoshchikova, & Quinlan, 2013). Therefore, paraquat has been used as a toxicological model that, in part, accelerates biological ageing and shortens the lifespan of animal models such as *Drosophila melanogaster* (Khazaeli & Curtsinger, 2000; Narayanasamy, Simpson, Martin, Grotewiel, & Gronert, 2014). Moreover, paraquat has been used as a mouse model of retinal degeneration to test the preventive effect of some food supplements (Patel, Davis, Rodriguez, Agron, & Hackam, 2016).

2.2. Epidemiological *in vivo* investigation

This was a cross-sectional study including 630 Amazon riparian elderly from Maués who had previously enrolled in a research project investigating the contribution of genetic and environmental factors to ageing in this population (Maia Ribeiro et al., 2013; Schimpl et al., 2013; Silva, Jung, Moresco, et al., 2015). Maués is located on the right bank of the Maués-Açu River, which is part of Parauari-Maués-Açu bay. Maués covers approximately 25,000 km² and extends over 450 km (Maia Ribeiro et al., 2013).

The study was approved by the Ethics Committee of the University of the State of Amazonas (Process number: 807/04). Since the majority of older people in Maués are illiterate, oral consent or fingerprinting was obtained for their participation in the study after the consent form was read out by the researchers.

The baseline riparian elderly study cohort represented 61% of the elderly population (≥ 60 years old) residing in Maués in July 2009 ($n = 2900$), when this study began. Participants were selected from the Family Health Program (FHP), a Brazilian free public healthcare Program that covered 92% of the Maués population when the study was performed (Maia Ribeiro et al., 2013).

As it is difficult to access elderly living in riverbank communities the investigation only included subjects living in Maués headquarter. However, 100% of the elderly reported that when were young lived in rural riverine area. Volunteers included were older persons with certain physical conditions to move to the location where the data collection was performed. Therefore, the investigation did not include elderly people with disabling diseases or severe cognitive impairment.

Information about lifestyle, socioeconomic, cultural and health conditions were obtained from structured interview collected by a research team previously trained to apply the instruments. The team included five physicians, two nurses, one nutritionist, one epidemiologist, one physiotherapist and eight FHP agents. However, information about dietary profile was not obtained by dietary record tools currently used in epidemiological studies because the dietary pattern of riparian persons includes a wide variety of native foods that are not included in validated nutritional tables. To circumvent this problem a qualitative analysis using an open question about what the elderly ate habitually (>5 days/week) throughout the day was applied. When the replies began to be repeated, such questioning ceased. In relation to habitual intake of guarana powder, subjects were initially classified into three groups: GI = those who habitually ingested guarana (>5 days/week), GS = those who sporadically ingested guarana (<3–4 days/week) and NG = those who never ingested guarana (Krewer et al., 2011).

Visual condition was determined by self-report, with elderly people being asked whether their vision was good, fair or bad. Previous eye diseases were also self-reported. Epidemiological investigations have validated the use of self-reporting of visual condition (Cumberland, Chianca, & Rahi, 2016; Høeg et al., 2016).

2.3. *In vitro* protocol

The chemicals, cell culture medium, molecular biology assays reagents, and plastics used in this study were purchased from Gibco® Life Technologies Inc. (Grand Island, New York, USA), Sigma® (St. Louis, Missouri, USA) and Invitrogen Life Technologies (São Paulo, Brazil). The main bioactive molecules found in guarana hydroalcoholic extract were quantified using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Shimadzu Prominence LC-20A, an LC-20AT quaternary pump, a SIL 20 auto sampler-A, a DGU-20A5 on-line degasser, a CBM-20A integrator, and a SPD-20AV DAD detector, Tokyo, Japan). Cells were cultured in a humidified incubator (Biolabs, Cambridge, Massachusetts, USA). The protocols involving spectrophotometric, fluorimetric and immunological analysis were performed in a 96-microplate reader (SpectraMax® i3x Multi-Mode Detection Platform, Molecular Devices, California, USA). Flow cytometry analysis was performed using an Annexin-V-FITC and Propidium Iodide (PI) staining kit (BD Pharmingen™, New Jersey, USA). The Quantikine Human Caspase Immunoassay® kit (BioVision, Mountain View, CA) was used for caspase 1, 3 and 8 quantification and genotoxicity was determined by immunoassay using a kit obtained from TREVIGEN® (Maryland, USA). RNA samples were quantified using the Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer Molecular (Wilmington, USA) and gene expression was performed using Rotor-Gene Q equipment (QIAGEN, Hilden, Germany).

2.4. Cell line and culture conditions

ARPE-19 cells were cultivated with Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU penicillin and 100 µg/mL streptomycin, in a humidified incubator at 37 °C with 5% of CO₂ using 96-well plates or 6-well plates according to protocol.

Two initial protocols were performed to test the potential cytotoxic effect of guarana hydroalcoholic extract on ARPE-19 cells and to determine the dosage of paraquat required to cause damage.

Based on these protocols, the capacity of guarana to prevent and reverse cytotoxicity caused by paraquat was evaluated. Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) has two important toxicological effects on cells: first, by generation of the superoxide anion, which can lead to the formation of more toxic reactive

oxygen species that are highly reactive to cellular macromolecules. Studies of yeast and mammalian mitochondria have confirmed that complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat (Cochemé & Murphy, 2008; Morán, Ortiz-Ortiz, Ruiz-Mesa, & Fuentes, 2010). Second, paraquat is able to oxidize reducing equivalents (e.g., NADPH, reduced glutathione), which results in the disruption of important NADPH-requiring biochemical processes necessary for normal cell function (Morán et al., 2010; Tawara et al., 1996).

Initially the potential cytotoxic effect of guarana extract was tested by constructing a concentration-effect curve (from 25 to 500 mg/mL) for cultures grown for 24, 48 and 72 h. In subsequent assays, we chose to use the 48 h cell culture because the results obtained from this culture were intermediate between those observed for 24 and 72 h cell cultures. A time-curve of paraquat exposure was also constructed before conducting the experiments with guarana. The optimum exposure time was 6 h. Shorter times did not have significant effects on cell viability and longer times induced high mortality. Therefore, cells were exposed to different concentrations (3, 30, 100 and 300 µM) of paraquat for 6 h and to different concentrations of guarana extract (25, 30, 50, 100, 250 and 500 µg/mL).

In the preventive protocol cells were first exposed to guarana for 48 h. Then the culture medium was replaced and cells were exposed to culture medium plus paraquat for a further 6 h before analyzing their viability and other parameters. The potential reversal of cytotoxic effects in ARPE-19 cells previously exposed to paraquat was also evaluated. In this case, cells were exposed to paraquat for 6 h and then the culture medium was replaced and cells were exposed to culture medium containing guarana for 48 h to evaluate viability biomarkers. The experiments were performed using 96-well plates (1 × 10⁵ cell) with 200 µL of culture medium per well. Paraquat and guarana extract were directly diluted in the culture medium.

2.5. Guarana hydroalcoholic extract

The present investigation is part of a project previously authorized by the Brazilian Environmental Ministry to assess the components of genetic patrimony in the national territory (no. 010547/2013-4) according to Brazilian legislation (no. 2186-16). The experiments were performed using a hydroalcoholic guarana extract obtained from powdered guarana provided by Embrapa Western Amazon Co, a non-profit governmental organization located in Maués, Amazon, Brazil. The extract was obtained and characterized as previously described by Bittencourt et al. (2013).

Briefly, the extract was produced using 70:30 alcohol and water to 100 mL of extraction fluid prepared at a concentration of 300 mg/mL. After 24 h of extraction, the solution was centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the supernatant was isolated and filtered through Whatman No. 1 paper. Ethanol was removed from the extract by rotary evaporator at reduced pressure, 25 °C at 115 rpm, and the extract was lyophilized in a freeze-drying equipment (Enterprise II LT 1000; Terroni, São Paulo, Brazil). Phenolics, alkaloids and tannins were measured by Chromatographic analysis with detection of UV absorbance at 272 nm on an HPLC system consisting of a Shimadzu Prominence LC-20 A, an LC-20AT quaternary pump, a SIL 20 auto sampler-A, a DGU-20A5 on-line degasser, a CBM-20 A integrator and a SPD-20 AV DAD detector according to Andrews et al. (2007). A 150 mm × 4.6 mm i.d. ODS-3 column (Phenomenex Prodigy ODS-3 100 A, 5-µm particle size; Torrance, CA, USA) was used for the separation. The Bempong and Houghton (1992) guarana bioactive compound analysis was used as a reference. A stock solution of caffeine (250 µg/mL) was prepared and stored at 5 °C. Working standards were prepared by diluting the stock solution in mobile phase at the following ratios:

200 µL–100 mL, 400 µL–100 mL, 2 mL–100 mL, 4 mL–100 mL and 8 mL–100 mL. The least concentrated standard was designed to achieve a limit of detection of 0.005% based on a 1g sample diluted to 100 mL (LOD = 0.05 mg/g). The guarana sample extract was filtered through a 0.45-µm filter into an autosampler vial for analysis. The HPLC conditions were: flow rate, 1 mL/min; mobile phase A, 0.1% H₃PO₄ in water; mobile phase B and 100% ACN. The chromatographic system was calibrated with at least a five-point standard curve for each set of samples analysed (Belliaro et al., 1985; Bittencourt et al., 2013). Standards were run after every fourth sample. Excellent reproducibility was seen in the standards; typically, the R value for the calibration curve was 0.9999 or better. Based on these results, we prepared the guarana compound to add to the culture medium according to Santa Maria et al. (1998). The lyophilized extract was diluted in distilled water and prepared at a concentration of 200 mg/mL. The mixture was infused for 7 min by boiling, centrifuged (1500 rpm, 15 min) and filtered. The solution was sterilized by filtration (0.20 µM) before adding to the culture medium.

2.6. Cell viability and apoptosis assays

Cell viability was determined after 48 h by MTT 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay. Briefly, cells were cultured in 96-well plates, and after exposure to paraquat, cells were stained for 1 h at 37 °C with 10 µL/well MTT reagent (10% concentration) and 5 mg/mL in phosphate-buffered saline (PBS, pH adjusted). Finally, mitochondrial dehydrogenases metabolized MTT to a purple formazan salt that was solubilized by the addition of 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO), and the absorbance was measured at 560 nm (Fukui, Yamabe, & Zhu, 2010).

Apoptosis and necrosis events were analysed by flow cytometry using an Annexin-V-FITC and Propidium Iodide (PI) staining kit according to the manufacturer's instructions. Annexin-V-FITC can detect early apoptotic processes, whereas PI identifies late or necrotic apoptotic cells. Briefly, cells were seeded in 6-well plates at 1×10^6 per well in 2 mL of culture medium. Following treatment, cells were detached by trypsin (1:2) and washed twice with cold PBS before being resuspended in 1x binding buffer at a concentration of 1×10^6 cells/mL. Then, 100 µL culture containing 1×10^5 cells was placed into a 5 mL culture tube, subjected to gentle vortex and stained with 5 µL of Annexin-V-FITC and 5 µL of PI. Following a short incubation (15 min) in the dark at room temperature, 400 µL of 1x binding buffer was added to each tube, and the cell fluorescence was analysed by flow cytometry according to the manufacturer's specifications and Zhao et al. (2014).

2.7. Genotoxic assay

The genotoxic effect of paraquat and the protective effect of guarana extract were evaluated by immunoassay quantification of 8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine (8-OHdG), which is considered a key marker of oxidative stress produced by the oxidation of guanosine bases in DNA (DNA fragmentation). The 8-OHdG quantification was performed by ELISA using a kit (Trevigen®-HT 8-oxo-dG ELISA Kit II) according to the manufacturer's instructions.

2.8. Immunoassays and gene expression related to apoptosis events

Given the association between the cytotoxicity of paraquat and apoptosis events, complementary analyses were performed to evaluate the expression of the following proteins: initiator caspase-8 (*Casp 8*) and effector caspase-3 (*Casp 3*). Caspase-1 (*Casp1*) was also quantified because this protein is associated with rapid dead cells by pyroptosis. The levels of these molecules were determined by ELISA (Quantikine Human Caspase Immunoassay®

kit) following the manufacturer's instructions and by gene expression using qRT-PCR assay.

Initially, to perform the molecular analysis, total RNA was extracted using Trizol and spectrophotometrically quantified using a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer at 260/280 nm wavelength. For reverse transcription, samples of RNA (1 µg/mL) were added to 0.2 µL of DNAase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 5 min, followed by heating at 65 °C for 10 min. The cDNA was generated with 1 µL of Iscript cDNA and 4 µL of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The reaction consisted of the following steps: heating at 25 °C for 5 min, at 42 °C for 30 min, and at 85 °C for 5 min, followed by incubation at 5 °C for 60 min. qRT-PCR was performed using SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 95 °C for 3 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. Reactions for each sample were made in triplicate, using 0.5 µL of each primer sequence and 2x Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with a final volume of 15 µL. The β-actin gene (forward: TGTGGATCAGCAAGCAGGAGT; reverse: TGC GCAAGTTAGGTTTGTCA) was used as the housekeeping gene and to normalize the expression of all genes studied here (Pfaffl, 2001). Primers used to evaluate the expression of genes related to apoptosis events were: caspase-1 (forward: ACCATCG-GAGTCATGAGACATTCAT; reverse: TGGTCGACTGAACTGAAAG-TATGCT), caspase-3 (forward: CGCACACGCTTGTCTCAT; reverse: TACCAGTGCATGAGAAATGG); caspase-8 (forward: AGGAGCTGCTCTCCGAATT; reverse: CCCTGCTGGTGTCTGAAGT).

2.9. Statistical analysis

In vivo data were statistically analysed using the SPSS/PC statistical package, version 19.0 (SPSS, Inc., IL). The general dietary pattern of the elderly included in the present investigation was described. The association between visual conditions and daily guarana intake was assessed using the Chi-square test. A multivariate analysis was performed using logistic regression (the backward Wald method) to evaluate the potential confounding effect of the following variables in the association between guarana intake and visual condition: age, gender, habitual intake of herbal tea, smoking habit, exercise, type 2 diabetes and cardiovascular diseases.

All *in vitro* tests were performed in triplicate, and data are presented as percentages of the control group and were statistically analysed using *Graphpad Prism software*, version 5.0 (Graphpad Prism Software Company, 2014). The results were compared by one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test. Results with $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Association between self-reported eyesight quality and daily guarana intake

A total of 630 subjects (291 males and 339 females) were included in the study with a mean age of 72.3 ± 8.0 years old (minimum = 60, maximum = 99). As expected, just over half of the elderly self-reported poor vision ($n = 320$, 50.8%), 234 (37.1%) self-reported regular vision, whereas just 76 (12.1%) self-reported good vision. Subjects that self-reported good vision presented a higher frequency of habitual guarana consumption (GI) than subjects that self-reported regular and poor vision. The baseline characteristics of the sample are presented in Table 1.

The odds ratio to GI that presented self-report of good vision was estimated to be 1.323 (1.15–1.659). Multivariate analysis was performed in order to evaluate the potential influence of other

Table 1

Characteristic baselines of Amazon riparian elderly free-living in Maués-AM, Brazil considering self-report to eye vision condition.

Variables	Self-reported eye condition			p	
	Poor n (%)	Regular n (%)	Good n (%)		
Genre	Male	147 (45.9)	103 (44.0)	41 (53.9)	0.318
	Female	173 (54.1)	131 (56.0)	35 (46.1)	
Age (years)	>60–70	129 (40.3)	107 (45.7)	38 (50.0)	0.079
	>70	191 (59.7)	127 (54.3)	38 (50.0)	
Education	Illiterate/≤3 years	231 (72.2)	157 (67.1)	48 (63.2)	0.209
	≥4 years	89 (27.8)	77 (32.9)	28 (36.8)	
Married status		170 (53.1)	121 (51.7)	38 (50.0)	0.837
Smoking habit		35 (10.9)	28 (12.0)	12 (15.8)	0.502
Exercise practice		178 (55.6)	133 (56.8)	49 (64.5)	0.372
Habitual herbal tea intake		269 (81.3)	193 (82.5)	65 (85.5)	0.675
Daily medicine intake		169 (52.8)	109 (46.6)	32 (42.1)	0.146
Diabetes type 2		44 (13.8)	28 (12.0)	07 (9.2)	0.531
CVD		21 (6.6)	14 (6.0)	07 (9.2)	0.615
Guarana intake	GI	97 (30.3)	81 (34.6)	37 (48.7)	0.048
	GS	122 (38.1)	87 (37.2)	23 (30.3)	
	NG	101 (31.6)	66 (28.2)	16 (21.1)	

CVD = previous cardiovascular diseases including myocardial infarction, angina pectoris, stroke and peripheral cardiovascular morbidities; GI = guarana habitual intake (<5 days/week); GS = guarana sporadic intake (3–4 days/week); NG = no guarana intake.

biological, clinical and lifestyle variables on the association between self-reported eye quality and guarana intake. The following variables were included in the equation: sex, age, diabetes, daily medicine intake, habitual daily herbal tea intake, smoking habit and exercise. As Table 2 shows, the association between self-reported vision quality and guarana intake was independent of these variables.

Since guarana consumption could be associated with the intake of other foods that are rich in micronutrients and bioactive molecules that could have some influence on eye physiology, a survey of the main foods habitually eaten by the riparian subjects was conducted (Table 3).

Regardless of self-reported vision quality and guarana intake, subjects reported eating a large number of Amazon foods that are consumed seasonally during the year according to availability. The main nutritional sources reported by all elderly subjects are described in Table 3. Most foods are not cultivated and are harvested directly from the rainforest (fruit) or rivers (fish). The main cultivated products are cassava, corn and guarana. Other foods are collected directly from the trees in the forest. It is important to point out that there are other native foods (mainly fish and fruit) that are not cited here that are consumed more sporadically, and therefore were not reported by all subjects included in this study.

3.2. Protective effects of guarana on ARPE-19 cells exposed to paraquat

In vitro protocols were performed in order to confirm the potential protective effect of guarana on ARPE-19 cells, which are used as

a model for AMD. Based on the concentration-effect curve (3, 30, 100 and 300 μ M) it was estimated that 30 μ M of paraquat killed 50% of ARPE-19 cells after 6 h of cell culture, and this concentration was used to evaluate the protective effect of guarana on ARPE-19 cells (Fig. 1A). The hydroalcoholic guarana extract used in these experiments contains 12.240 mg/g caffeine, 6.733 mg/g theobromine and 4.336 mg/g catechins.

The effect of guarana at different concentrations was also tested (Fig. 1B). No cytotoxic effect was observed for the majority of guarana extract concentrations, except at those under 25 g/mL, where a slight reduction in cell viability was observed.

The results were used to evaluate whether guarana could revert or prevent paraquat toxicity at 30 μ M in 48 h cell cultures. There was no evidence that guarana has any “therapeutic effect on ARPE-19 cells” previously damaged by paraquat (Fig. 1C). On the other hand, when cells were first exposed to guarana, this supplement had a beneficial effect, since damage caused by paraquat exposure was minimized when cells were pretreated with \geq 30 μ g/mL guarana (Fig. 1D).

3.3. Causal mechanisms of guarana protection against paraquat cytotoxicity

In the first moment, we tested the potential preventive or reverse action of guarana on oxidative damage caused by Paraquat on ARPE-19 cells. Results showed that guarana was not able to present some “therapeutic effect on ARPE-cells” previously damaged by paraquat. On the other hand, when cells were previously

Table 2

Multivariate analysis of guarana habitual intake as a dependent variable adjusting for biological, clinical and lifestyle variables in riparian elderly subjects self-reported good eye vision quality.

Variables	Odds ratio	CI 95%	Wald	p
Guarana intake	2.054	1.250–3.375	8.071	0.004
Age	0.977	0.946–1.009	2.039	0.153
Sex	1.329	0.805–2.193	1.238	0.266
Diabetes	0.842	0.354–2.001	0.151	0.697
Exercise practice	1.416	0.849–2.362	1.777	0.183
Smoking habit	1.418	0.715–2.809	1.000	0.317
Daily medicine intake	0.763	0.454–1.282	1.044	0.307
Herbal tea daily intake	1.570	0.783–3.146	1.618	0.203

p value of logistic regression (Backward Wald method).

Table 3

List reported by Amazon riparian elderly (Maués-AM, Brazil) of native foods habitually consumed during meals.

Meals	Main nutritional sources from pre-Colombian dietary
Breakfast (~05 h am)	Guarana drink (sugar/honey) Creamed or banana creamed Boiled cassava or inhame (<i>Manihot esculenta</i> , <i>Dioscorea</i> sp.) Cassava Tapioca flour (<i>Manihot esculenta</i>) Boiled Peach-palm (<i>Bactris gasipaes</i>) Awarra Palm sandwich (<i>Astrocaryum acculeatum</i>) using tapioca flour
Meal in the middle of the morning/afternoon	Season fruits: Brazilian nuts (<i>Bertholletia excelsa</i>), Moriche Palm (<i>Mauritia flexuosa</i>); biriba fruit (<i>Rhollinea orthopetala</i>), mari-mari fruit (<i>Cassia leiandra</i>); sour sop (<i>Annona muricata</i>), starfruit (<i>Averrhoa carambola</i>), guava (<i>Psidium guajava</i>), inga fruit (<i>Inga</i> sp.), abio fruit (<i>Pouteria caimito</i>), cubiu fruit (<i>Solanum sessiliflorum</i>), jambo fruit (<i>Syzygium jambos</i>), mangaba fruit (<i>Hancornia speciosa</i>), araçá-boi (<i>Eugenia stipitata</i>)
Lunch	Main protein/lipid sources Fishes Amazonian fishes: jaraqui (<i>Semaprochilodus insignis</i>), Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>), bodó (<i>Plectranthus barbatus</i>), tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>), pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>), matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>). Generally, the fishes are baked, and traditionally the fishes can be rolled and baked in banana leaves. Fish broth named caldeirada, including fish head and various spices from the region such as jambu leaf (<i>Acmella oleracea</i>) can be eaten, combined with chilis and garlic. Piranha's broth (<i>Serrasalmus nattereri</i>) is also consumed by riparians Poultry meat Duck meat is much appreciated in the Amazonas prepared in a special meal called "duck in tucupi" made with cassava gum and jambu leaves Turtle meat Turtle meat is also much appreciated by riparians. However, the procurement of this meat from forest animals is legally prohibited. It can only be obtained from breeding sites, and this product became expensive to be consumed daily by the riparians Others Currently the consumption of beef and chicken increased (1–2 times/week) and was reported by all subjects Carbohydrates, vitamin, minerals and non-nutrients molecules sources Servings Generally fishes are ate with toasted manioc flour (<i>Manihot esculenta</i>), açai (<i>Euterpe oleracea</i>), fried banana (<i>Musa paradisiaca</i>), "nut milk" (Nut is cut, squeezed and filtered), pumpkin puree (<i>Cucurbita</i> sp.). Consumption of beans, rice, potatoes, milk and dairy products were also reported. However, the use of these foods is more sporadic in relation to the typical Amazon diet Juices Riparians eat and drink many native fruits during lunch time including: cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i>), pineapple (<i>Ananas comosus</i>), cocoa (<i>Theobroma cacao</i>), yellow mombin fruit (<i>Spondias mombin</i>), camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>) sweetened with refined sugar, brown sugar or honey
Dinner	Leftovers from the lunch are usually eaten at dinner

exposed to guarana this supplement showed some preventive effect, since damage caused by paraquat exposure was minimized. Fig. 1 shows that paraquat at 30 μ M caused slight cytotoxicity, suggesting an increase in oxidative stress. As we used paraquat as a chemical ageing model on ARPE-19 cells, we opted to perform subsequent experiments using just 30 μ M paraquat, and not higher concentrations that would cause extensive cell mortality.

Given that paraquat generates high levels of superoxide anion, a reactive molecule that causes extensive oxidative stress, complementary analyses were performed to evaluate the causal mechanisms involved in the protective effect of guarana on ARPE-19 cells (Fig. 2). Initially, we quantified the levels of 8-deoxyguanosine, which indicates direct DNA damage. As expected, cells exposed only to paraquat presented higher levels of 8-deoxyguanosine, indicating the high genotoxicity of this molecule. In relation to the negative control group, a lowering effect on 8-deoxyguanosine levels was observed when cells were supplemented with guarana at 30 μ g/mL. Guarana supplementation was able to partially revert the higher 8-deoxyguanosine levels caused by paraquat exposure (Fig. 2).

In general, the genotoxic effects caused by high ROS concentrations are potent inducers of cellular apoptosis or necrosis events. For this reason, these events were evaluated by flow cytometry (Fig. 3). As expected, in cells exposed only to paraquat there was a decrease in the number of viable cells and a high frequency of cells undergoing necrosis and apoptosis (Fig. 3A and B). These events were completely reverted by guarana supplementation at 30 μ g/mL prior to paraquat exposure. Observation of cellular morphology under optical microscopy revealed vacuolated cells in paraquat-exposed cultures, indicating the occurrence of pyroptosis events (Fig. 3C).

The modulation of caspases 1, 3 and 8 at the protein and gene expression levels was evaluated to identify potential modulation of apoptosis by these treatments (Fig. 4). Higher caspase 1 levels were found in paraquat-treated cells than in the control group. In contrast, cells supplemented with guarana at 30 μ g/mL presented lower caspase 1 levels than the control group. However, guarana supplementation was able to partially revert high caspase 1 levels in cells previously exposed to paraquat. Caspase 1 gene modulation was also influenced by paraquat treatment/guarana supplementation. Guarana caused upregulation of this gene when compared to the negative control, whereas paraquat did not alter *Casp 1* gene expression. However, an antagonistic effect of guarana plus paraquat was observed, since combined treatment caused *Casp 1* gene down-regulation when compared with the control group (Fig. 4A).

Higher caspase 3 levels were detected in cells exposed to paraquat than in control cells. However, a contrasting effect was observed in cells supplemented with guarana. Guarana partially reverted the increase in caspase 1 levels caused by paraquat exposure. *Casp 1* gene expression was up-regulated when cells were exposed to guarana or paraquat. However, an antagonistic down-regulatory effect caused by guarana plus paraquat exposure was detected in *Casp 3* gene expression (Fig. 4B). With regards the *Casp 8* gene, guarana down-regulated expression whereas paraquat induced a significant increase in this apoptotic protein. Guarana partially reverted the high levels of caspase 8 induced by paraquat exposure. *Casp 8* was also differentially modulated by guarana and paraquat treatment. Whereas cells treated only with guarana showed up-regulated expression of this gene, paraquat caused down-regulation in *Casp 8* gene expression. Again, guarana was able to partially revert the down-regulation of *Casp 8* caused by paraquat exposure (Fig. 4C).

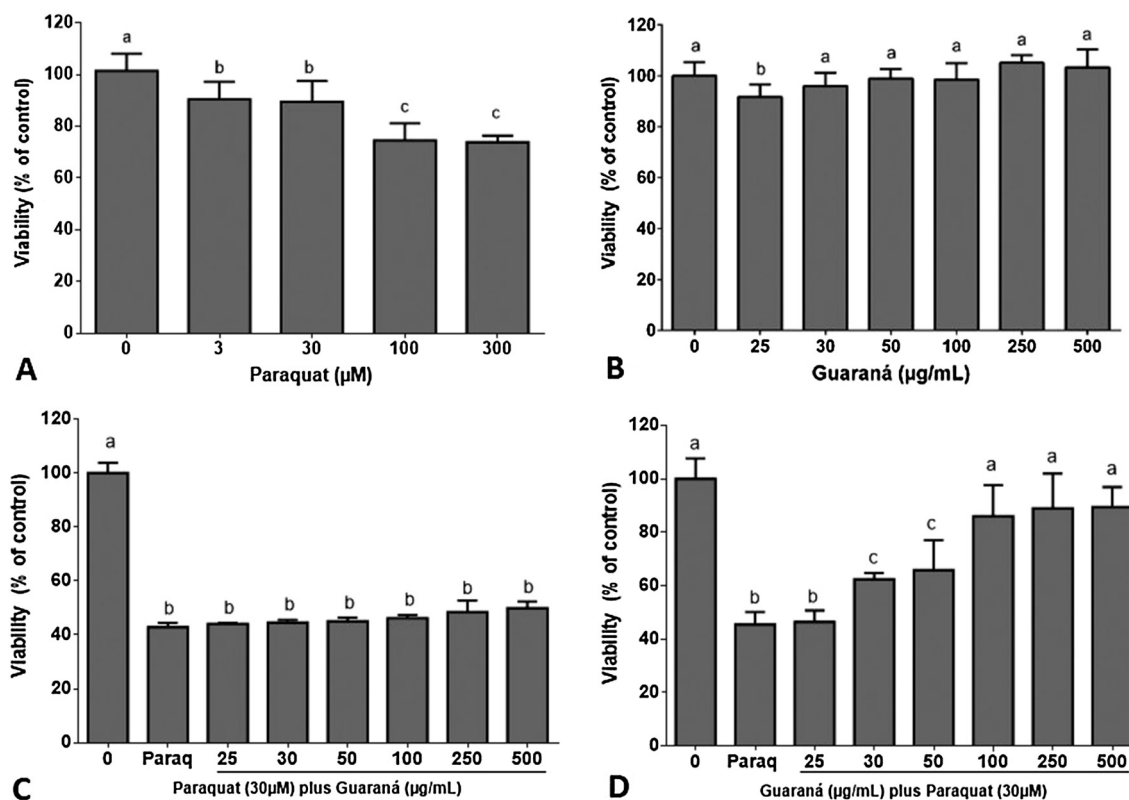


Fig. 1. Guarana protective effects on ARPE-19 cells Paraquat-exposed (A) Cells exposed to different concentrations (3, 30, 100 and 300 μM) of Paraquat for 6 h. (B) Cells exposed to different concentrations (25, 30, 50, 100, 250 and 500 μg/mL) of guarana for 48 h. (C) Cells exposed first to Paraquat (30 μM) for 6 h and after to different concentrations (25, 30, 50, 100, 250 and 500 μg/mL) of guarana hydroalcoholic extract for 48 h. (D) Cells exposed to different concentrations (25, 30, 50, 100, 250, and 500 μg/mL) of the guarana hydroalcoholic extract for 48 h and after to Paraquat (30 μM) for 6 h. All analyses were performed by MTT spectrophotometric assay. Different superscript letters indicate statistical difference among treatments ($p \leq 0.05$). Data are shown as% of untreated control group. Mean \pm sd were obtained from three independent experiments.

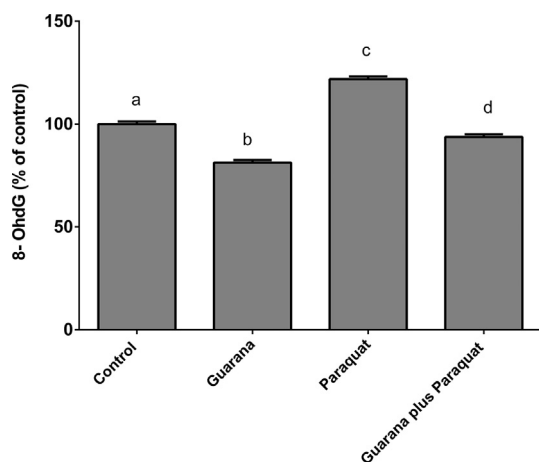


Fig. 2. Causal mechanisms of guarana protection against Paraquat cytotoxicity evaluated by 8-deoxyguanosine immunoassay. DNA damage in ARPE-19 cells exposed to 30 μg/mL of the guarana hydroalcoholic extract for 48 h, and after exposed to Paraquat (30 μM) for 6 h. Different superscript letters indicate statistical difference among treatments ($p \leq 0.05$). Data are shown as% of untreated control group. Mean \pm sd were obtained from three independent experiments.

4. Discussion

The present translational investigation suggests that guarana, an Amazon beverage that is rich in caffeine-catechin molecules, could have beneficial effects on elderly eyesight through preventive effects caused by oxidative stress. An *in vivo* analysis revealed

that riparian elderly who self-reported good eyesight quality had higher habitual guarana intake than others, and this association occurred regardless of several confounding variables. An *in vitro* analysis suggested that guarana was able to prevent some of the cytotoxic and oxidative damage caused by paraquat exposure, but was not able to revert damage caused by previous exposure to paraquat.

As eye dysfunction, especially AMD, is associated with oxidative stress generated by dysfunction of mitochondria and increased superoxide levels, two analyses were performed to evaluate the potential effect of guarana on vision. The first was population-based, and compared the self-reported eyesight quality of elderly that habitually consumed guarana with that of an elderly group that never consumed guarana. The second involved an *in vitro* protocol using paraquat to generate high superoxide levels in order to evaluate causal mechanisms related to the positive effect of guarana on eyesight.

Guarana is a beverage that is rich in caffeine, but also contains high levels of other polyphenols including catechins (Angelo et al., 2008). Although guarana is used to produce energy drinks that are consumed around the world, the use of roasted seed in a beverage is considered a pre-Columbian dietary pattern found in some indigenous communities such as the Sateré-Maués population (Schimpl et al., 2013). Currently, guarana is produced by small farmers, and seed processing involves roasting and grinding. When manually processed, fruits are fermented for 3 days, after which seeds are retrieved, washed and dried in iron or clay pots (2 m in diameter) for 3–5 h while stirring to reduce the chances of burning the product. After this process, seeds can be crushed or macerated until a powder is obtained. Generally, guarana powder is manufac-

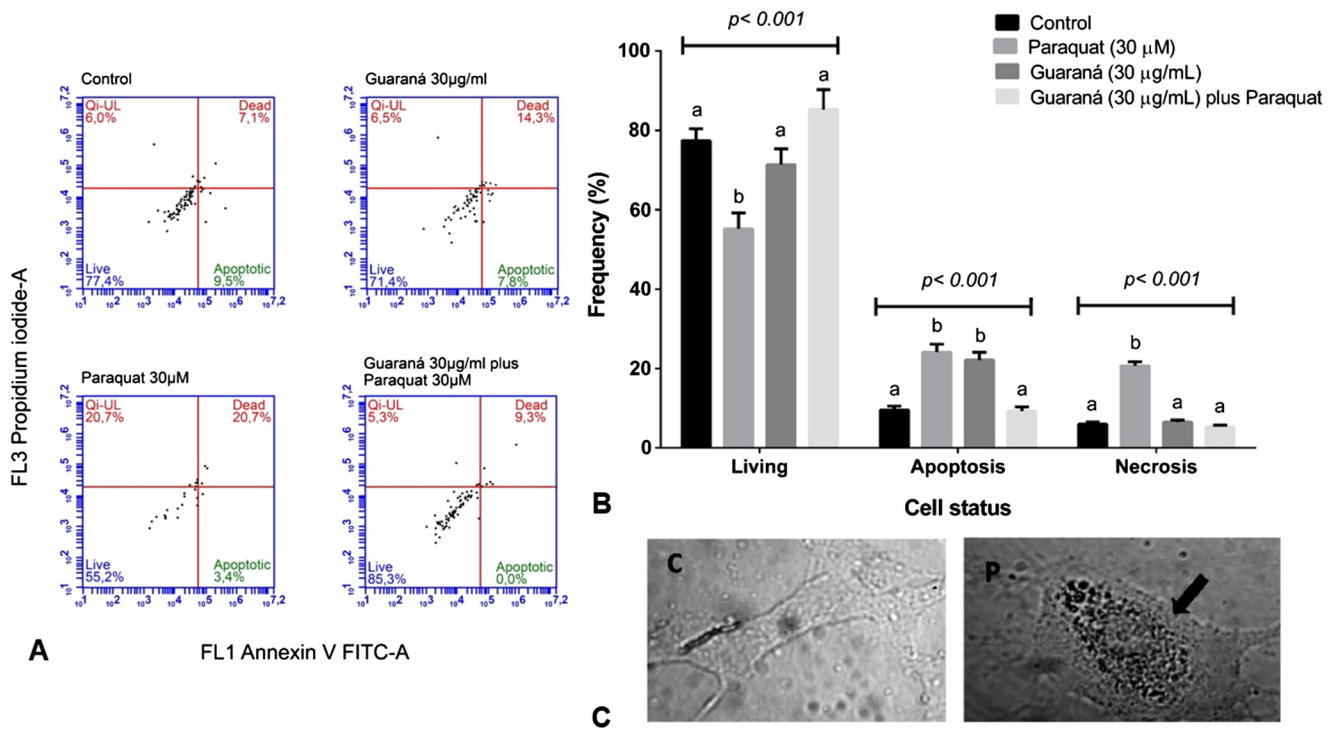


Fig. 3. Causal mechanisms of guarana protection against Paraquat, effects on necrosis/apoptosis induction evaluated by flow cytometry. (A and B) Evaluation of the influence of guarana, Paraquat and guarana plus Paraquat treatments on necrosis/apoptosis induction. Different superscript letters indicate statistical difference among treatments ($p \leq 0.001$). Data are shown as % of untreated control group. Mean \pm sd were obtained from three independent experiments. (C) C indicates live cells for control group; P indicates dead cells for treatment with Paraquat (30 μ M).

tured into sticks, the latter being the form used by Sateré-Maués Indians. Sticks are prepared in a wooden pestle and water is added to form a soft paste, which is shaped into a cylinder that is then smoked for storage and to preserve guarana's properties. When ready to consume, the stick is usually grated using the tongue of the Pirarucu fish (*Arapaima gigas*) (Schimpl et al., 2013). The elderly usually drink a teaspoon of guarana powder (approximately 200–400 mg) mixed with half a glass of water (approximately 150 ml) after waking up in the morning. As guarana is not soluble in water, it is added to the glass, and allowed to settle at the bottom. Then, sugar or honey are added, and the contents of the glass are mixed with a spoon and quickly ingested before the guarana settles back to the bottom.

Other beverages also have caffeine-catechin molecules in their chemical matrix, including green, black and white teas produced from *Camelia sinensis* (Khan & Mukhtar, 2007). The effect of green tea consumption on elderly visual impairment was analysed in an epidemiological study performed by Pan et al. (2016). Data obtained from an investigation among 4579 older adults (≥ 60 years) living in a rural community in Eastern China showed a lower occurrence of visual impairment associated with the intake of three or more glasses of green tea per day. Therefore, the results obtained in the present investigation corroborate this previous report that suggested protective effects of caffeine-catechin beverages on eye health (Sampath, Zhu, Sang, & Ahmedna, 2016).

Moreover, the results presented here are consistent with prior investigations in the literature suggesting that caffeine taken orally could have some effects on the eyes, for instance, by inhibiting cataract formation through multifactorial mechanisms including antioxidant and bioenergetic effects on the lenses (Pescosolido et al., 2016; Varma, 2016). In relation to retinal disorders (Boia et al., 2016), it was suggested that caffeine could have therapeutic value for their treatment. Retinal cells, especially in the macula, are often exposed to oxidative stress, which is considered one of the

major causes of AMD (Marazita et al., 2016). On the other hand, there is evidence that heavy caffeine consumption may increase the risk of glaucoma in susceptible subjects (Kang, Loomis, Rosner, Wiggs, & Pasquale, 2015; Kang, Willett, Rosner, Hankinson, & Pasquale, 2008).

In the present study, the potential causal mechanisms associated with the protective effects of guarana were investigated using a complementary *in vitro* protocol in ARPE-19 cells. These cells were chosen because they are considered an experimental model for AMD, an important age-related eye morbidity that has no effective treatment to date and causes blindness in elderly people (Silván, Reguero, & de Pascual-Teresa, 2016).

Results obtained from the *in vitro* protocol confirmed that prior supplementation with a low guarana concentration (30 μ g/mL) was sufficient to increase the viability of ARPE-19 cells when subsequently exposed to high superoxide levels generated by paraquat.

Several guarana concentrations tested here were also able to revert the high cell mortality caused by oxidative damage due to paraquat. Therefore, guarana could have an important preventive action. However, guaraná exposure was not effective to revert paraquat effect. Since the riparian elderly consume guarana for much of their lives, it could help maintain eyesight quality.

Unfortunately, the effects of guarana on the progression of degenerative eye diseases were not assessed here. However, the *in vivo* and *in vitro* results could be considered relevant since guarana is currently used as a caffeine source to produce energy drinks and is therefore consumed worldwide (Ducan, Patel, & Feucht, 2010).

Catechins in the chemical matrix of guarana could contribute to its protective effects against oxidative stress caused by paraquat exposure. This presumption is based on results described in an *in vitro* study performed with green tea extract and its main bioactive molecules. This study used Human Retinal Pigment Epithelial

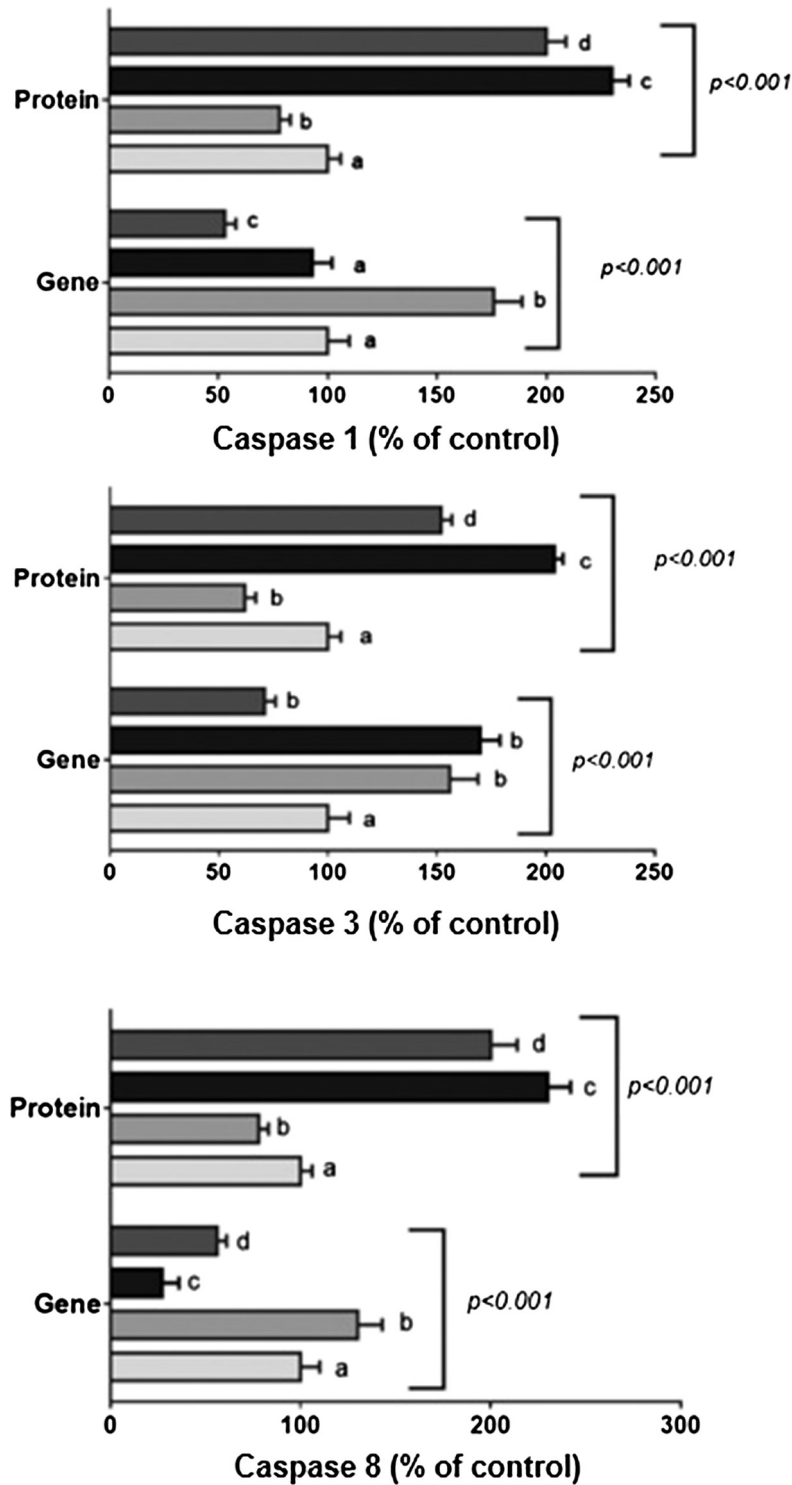


Fig. 4. Modulation of caspases 1, 3 and 8 at protein and gene expression levels were evaluated to identify potential apoptosis modulation of guarana, Paraquat and guarana plus Paraquat treatments. (A) Protein and gene expression of caspase 1. (B) Protein and gene expression of caspase 3. (C) Protein and gene expression of caspase 8. Gene expression data were normalized by β -actin gene. Different superscript letters indicate statistical difference among treatments ($p \leq 0.001$). Data are shown as % of untreated control group. Mean \pm sd were obtained from three independent experiments.

(H-RPE) cells exposed to methylglyoxal (MGO), which is a major precursor of advanced glycation end products (AGEs). The protective effect of eight specific compounds found in tea, apple and ginger were assessed. The authors reported that all bioactive compounds had protective effects related to detoxifying enzymes via the modification of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) function (Sampath et al., 2016; Yang et al., 2016). These results corroborate the idea that the protective effects of guarana

in paraquat-exposed ARPE-19 cells could be associated not only with caffeine, but also other polyphenols present in its nutritional matrix.

The potential causal mechanism associated with the protective effects of guarana against paraquat was investigated in the current study. Paraquat is a nonselective contact herbicide that has a strong intoxicant action, and for this reason this molecule can trigger cellular apoptosis and necrosis events causing an increase in

oxidative stress, and subsequent DNA damage (Kim, Kim, & Moon, 2004). On this basis it has been postulated that the protective effects of guarana could involve antioxidant effects, which could minimize oxidative stress, genotoxicity, and consequent cell mortality. In fact, the lowest guarana concentration (30 µg/mL) that presented cytoprotective effects against paraquat exposure lowered 8-deoxyguanosine levels, which is an important genotoxic marker. Cells supplemented with guarana and subsequently exposed to paraquat showed total reversion of 8-deoxyguanosine levels. These results indicate that control of DNA damage caused by oxidative stress generated by paraquat is an important causal protective mechanism of guarana. These results corroborate previous investigations that showed the genoprotective effects of guarana against exposure to some environmental pollutants and chemical molecules such as CCl₄ (Kober et al., 2016), cadmium (Leite, Wada, Monteiro, Predes, & Dolder, 2010), sodium nitroprusside (Bittencourt et al., 2013) and ethanol (Campos, Barros, Santos, & Rao, 2003).

Apoptosis and necrosis events, including pyroptosis, were observed in paraquat-exposed ARPE-19 cells, probably as a consequence of oxidative damage to DNA and other cellular macromolecules. A previous study performed in human neuron-like SH-SY5Y cells suggested that paraquat-induced apoptosis involves p53 and the mitochondrial pathway (Yang & Tiffany-Castiglioni, 2008). As caspases 3 and 8 participate in this pathway, the results described here confirm apoptosis induction by paraquat. Guarana was able to partially revert these events by modulation of the caspase cascade pathway. Protective effects against apoptotic and necrotic events caused by paraquat have been described for other plant extracts and other cell culture lines. For example, a study performed with PC12 neuron-like cells showed that epigallocatechin-gallate, the most important bioactive molecule of green tea, has a protective effect against apoptosis events caused by paraquat injury (Hou et al., 2008).

As vacuolated cells were observed in paraquat-exposed cells, necrosis induction involving autophagy could occur. This process has previously been described in *in vitro* studies such as the one performed by Jaroowitchawan, Chaicharoenaudomrung, Namkaew, and Noisa (2016). Moreover, a previous investigation demonstrated the occurrence of autophagy involving caspase 1 modulation in ARPE-19 cells (Piippo et al., 2014). For this reason, caspase 1 levels were quantified in this study, showing higher protein levels in paraquat-exposed cells, although there was no evidence of differential gene regulation when compared with control cells. In fact, the modulatory effects on caspase 1 induced by paraquat were previously studied by considering the role of this protein in inflammasomal activation, but not in the modulation of autophagic events (Liu et al., 2015).

Interestingly, guarana supplementation induced strong upregulation of the *Casp 1* gene, but in phenotypic terms, protein levels of this molecule were lower than in untreated cells. In guarana-supplemented and paraquat-exposed cells, lower levels of caspase 1 were observed, as well as gene down-regulation. Therefore, the outcomes indicate that the toxic effects of paraquat involve autophagy mediated by caspase 1, and that guarana has a synergistic effect with paraquat in the modulation of this protein. This could contribute to the protective effects against paraquat observed in cells previously supplemented with guarana.

Considering that guarana habitual intake was associated with self-report good vision of riverine subjects and results obtained from *in vitro* protocols using ARPE-19 cells, it is possible to infer that guarana could present cytoprotective effects on retinal cells due to its antioxidant properties, which could reduce DNA damage and apoptosis events and, thereby, help to maintain a good eye function. Therefore, these results suggest that guarana is a functional food that could offer cytoprotective effects on eye health.

Finally, it is important to comment on the methodological limitations of the protocols used here. The population investigation was a cross-sectional study, therefore it was not possible to determine whether the association between habitual guarana intake and self-reports of eye condition involved a causal effect. The results need to be corroborated by an interventional study. The *in vitro* protocol also presents important limitations related to the digestive absorption of guarana powder. However, Bempong and Houghton (1992) found that the rate of release of caffeine from capsules of guarana and from capsules containing an equivalent amount of caffeine did not differ significantly when using the British Pharmacopoeia dissolution test apparatus. The authors concluded that the release and uptake of caffeine from guarana is the same as for preparations containing free caffeine. Moreover, other *in vitro* studies by independent research groups using guarana extracts showed a protective effect against cellular damage caused by some toxic agents (Bittencourt et al., 2014; de Oliveira et al., 2011). Thus, despite the methodological limitations the results suggest that a protective effect of guarana against oxidative stress in retinal cells could be considered realistic.

5. Conclusions

In summary, this work is innovative, because it provides new perspectives related to guarana (*Paullinia cupana*) supplementation for protection against eye diseases, despite the methodological limitations associated with the *in vivo* and *in vitro* investigations. When it comes to eye disorders, these results are valuable as guarana could have potential nutritional applications for the treatment of disorders such as AMD, which does not yet have an effective therapy.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Financial support

This study was funded by the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Grant Nos. 402325/2013-3, 490760/2013-9 and 311446/2012-4. The funding source had no role in data collection and analysis, preparation of the manuscript or submission to the journal.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to Verônica F. Azzolin, Fernanda Barbisan and Eduardo B. Dornelles, and to the research team at the Laboratory of Biogenomics (UFMS) that helped in the laboratory analysis.

References

- Andrews, K. W., Schweitzer, A., Zhao, C., Holden, J. M., Roseland, J. M., Brandt, M., ... Douglass, L. (2007). The caffeine contents of dietary supplements commonly purchased in the US: Analysis of 53 products with caffeine-containing ingredients. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 231–239.
- Angelo, P. C., Nunes-Silva, C. G., Brígido, M. M., Azevedo, J. S., Assunção, E. N., Sousa, A. R., ... Astolfi-Filho, S. (2008). Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: The seeded-fruit transcriptome. *Plant Cell Reports*, 27, 117–124.
- Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., & Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, 45, 115–134.
- Beharry, K. D., Valencia, G. B., Lazzaro, D. R., & Aranda, J. V. (2016). Pharmacologic interventions for the prevention and treatment of retinopathy of prematurity. *Seminars in Perinatology*, 40, 189–202.

- Belliardo, F., Martelli, A., & Valle, M. G. (1985). HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) and Cola spp. samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 5, 398–401.
- Bempong, D. K., & Houghton, P. J. (1992). Dissolution and absorption of caffeine from guarana. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9, 769–771.
- Bittencourt, L. S., Machado, D. C., Machado, M. M., Dos Santos, G. F., Algarve, T. D., Marinovic, D. R., ... Cruz, I. B. (2013). The protective effects of guarana extract (*Paullinia cupana* Kunth) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 119–125.
- Bittencourt, L. S., Zeidán-Chuliá, F., Yatsu, F. K., Schnorr, C. E., Moresco, K. S., Kolling, E. A., ... Moreira, J. C. (2014). Guarana (*Paullinia cupana* Kunth Mart.) prevents β -amyloid aggregation, generation of advanced glycation-end products (AGEs), and acrolein-induced cytotoxicity on human neuronal-like cells. *Phytotherapy Research*, 28, 1615–1624.
- Boia, R., Ambrósio, A. F., & Santiago, A. R. (2016). Therapeutic opportunities for caffeine and A2A receptor antagonists in retinal diseases. *Ophthalmic Research*, 4, 212–218.
- Brand, M. D., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., & Quinlan, C. L. (2013). The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *British Journal of Dermatology*, 2, 1–8.
- Cadoná, F. C., Machado, A. K., Azzolin, V. F., Barbisan, F., Dornelles, E. B., Glanzner, W., ... da Cruz, I. B. M. (2015). Guarana a richest caffeine food increase oxaliplatin sensitivity of colorectal HT-29 cells by apoptosis pathway modulation. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16, 1055–1065.
- Campos, A. R., Barros, A. I., Santos, F. A., & Rao, V. S. (2003). Guarana (*Paullinia cupana* Kunth Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. *Phytotherapy Research*, 17, 1199–1202.
- Chen, A., Raule, N., Chomyn, A., & Attardi, G. (2012). Decreased reactive oxygen species production in cells with mitochondrial haplogroups associated with longevity. *PLoS ONE*, 7, e46473.
- Cochemé, H. M., & Murphy, M. P. (2008). Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by Paraquat. *Journal of Biological Chemistry*, 4, 1786–1798.
- Cumberland, P. M., Chianca, A., & Rahi, J. S. (2016). Accuracy and utility of self-report of refractive error. *JAMA Ophthalmology*, 7, 794–801.
- Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L., & Handa, J. T. (2017). The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Progress in Retinal and Eye Research*, 17, 30012–30015.
- de Oliveira, D. M., Barreto, G., Galeano, P., Romero, J. I., Holubiec, M. I., Badorrey, M. S., ... Alvarez, L. D. (2011). Paullinia cupana Mart. var. Sorbilis protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 9, 1382–1391.
- Ducan, E., Patel, N. D., & Feucht, C. (2010). Energy drinks: A review of use and safety for athletes. *Physician and Sportsmedicine*, 38, 171–179.
- Fukui, M., Yamabe, N., & Zhu, B. T. (2010). Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. *European Journal of Cancer*, 46, 1882–1891.
- Fukumasu, H., Avanzo, J. L., Nagamine, M. K., Barbutto, J. A., Rao, K. V., & Dagli, M. L. Z. (2008). *Paullinia cupana* Mart var. sorbilis, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*, 41, 305–310.
- Gerald, J. C., & Allen, T. (2013). Preface: The ageing eye: Normal changes, age-related diseases, and sight-saving approaches. *IOVS*, 54, 1–4.
- GraphPad Prism version 7.00 for Windows. (2014). GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147–1150.
- Hao, L. N., Zhang, X. D., Wang, M., Yang, T., & He, S. Z. (2011). Peroxynitrite-induced expression of inducible nitric oxide synthase and activated apoptosis via nuclear factor-kappa B pathway in retinal pigment epithelial cells and antagonism of cholecystokinin octapeptide-8 in vitro. *International Journal of Ophthalmology*, 4, 474–479.
- Høeg, T. B., Moldow, B., Ellervik, C., Klemp, K., Erngaard, D., & Cour, M. (2016). Danish rural eye study: Epidemiology of adult visual impairment. *Ophthalmic Epidemiology*, 1, 53–62.
- Hou, R. R., Chen, J. Z., Chen, H., Kang, X. G., Li, M. G., & Wang, B. R. (2008). Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on paraquat-induced apoptosis in PC12 cells. *Cell Biology International*, 1, 22–30.
- Jaroonwichawan, T., Chaicharoenaudomrung, N., Namkaew, J., & Noisa, P. (2016). Curcumin attenuates paraquat-induced cell death in human neuroblastoma cells through modulating oxidative stress and autophagy. *Neuroscience Letters*, 636, 40–47.
- Jarrett, S. G., & Boulton, M. E. (2012). Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, 33, 399–417.
- Kang, J. H., Loomis, S. J., Rosner, B. A., Wiggs, J. L., & Pasquale, L. R. (2015). Comparison of risk factor profiles for primary open-angle glaucoma subtypes defined by pattern of visual field loss: A prospective study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 4, 2439–2448.
- Kang, J. H., Willett, W. C., Rosner, B. A., Hankinson, S. E., & Pasquale, L. R. (2008). Caffeine consumption and the risk of primary open-angle glaucoma: A prospective cohort study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 5, 1924–1931.
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 26, 519–533.
- Khazaali, A. A., & Curtsinger, J. W. (2000). Genetic analysis of extended lifespan in *Drosophila melanogaster* III. On the relationship between artificially selected and wild stocks. *Genetica*, 3, 245–253.
- Kim, S. J., Kim, J. E., & Moon, I. S. (2004). Paraquat induces apoptosis of cultured rat cortical cells. *Molecules and Cells*, 1, 102–107.
- Kober, H., Tatsch, E., Torbitz, V. D., Cargnin, L. P., Sangoi, M. B., Bochi, G. V., ... Moresco, R. N. (2016). Enoprotective and hepatoprotective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Kunth Mart. var. sorbilis) on CCl4-induced liver damage in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 39, 48–52.
- Krewer, C. C., Ribeiro, E. E., Ribeiro, E. A., Moresco, R. N., da Rocha, M. I., Montagner, G. F., & da Cruz, I. B. M. (2011). Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population. *Phytotherapy Research*, 25, 1367–1374.
- Krewer, C. C., Suleiman, L., Duarte, M. M. M. F., Ribeiro, E. E., Mostardeiro, C. P., Montano, M. A. E., ... Cruz, I. B. M. (2014). Guarana, a supplement rich in caffeine and catechin modulates cytokines: Evidence from human in vitro and in vivo protocols. *European Food Research and Technology*, 239, 49–57.
- Leite, R. P., Wada, R. S., Monteiro, J. C., Predes, F. S., & Dolder, H. (2010). Protective effect of Guarana (*Paullinia cupana* Kunth var. sorbilis) pre-treatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. *Biological Trace Element Research*, 141, 262–274.
- Liu, Z., Zhao, H., Liu, W., Li, T., Wang, Y., & Zhao, M. (2015). NLRP3 inflammasome activation is essential for paraquat-induced acute lung injury. *Inflammation*, 1, 433–444.
- Machado, A. K., Cadoná, F. C., Azzolin, V. F., Dornelles, E. B., Barbisan, F., Ribeiro, E. E., ... Cruz, I. B. M. (2015). Guarana (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human liposarcomas. *Food Research International*, 67, 426–433.
- Maia Ribeiro, E. A., Ribeiro, E. E., Viegas, K., Teixeira, F., dos Santos Montagner, G. F., Mota, K. M., ... de Paz, J. A. (2013). Functional, balance and health determinants of falls in a free living community Amazon riparian elderly. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 56, 350–357.
- Manikandan, R., & Thiagarajan, R. (2016). Zeaxanthin and ocular health, from bench to bedside. *Fitoterapia*, 109, 58–66.
- Marazita, M. C., Dugour, A., Marquioni-Ramella, M. D., Goutham, G., Arumugam, M., Beulaja, M., ... Nabavi, S. M. (2016). Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: Implications for age-related macular degeneration. *Redox Biology*, 7, 78–87.
- Martins, J. B., Bastos, M. R., Carvalho, F., & Capela, J. P. (2013). Differential effects of methyl-4-phenylpyridinium ion, rotenone, and paraquat on differentiated SH-SY5Y cells. *Journal of Toxicology*, 2013, 1–10.
- Mitter, S. K., Song, C., Qi, X., Mao, H., Rao, H., Akin, D., ... Boulton, M. (2014). Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy*, 10, 1989–2005.
- Morán, J. M., Ortiz-Ortiz, M. A., Ruiz-Mesa, L. M., & Fuentes, J. M. (2010). Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 6, 402–409.
- Narayanasamy, S. K., Simpson, D. C., Martin, I., Grotewiel, M., & Gronert, S. (2014). Paraquat exposure and Sod2 knockdown have dissimilar impacts on the *Drosophila melanogaster* carbonylated protein proteome. *Proteomics*, 14, 2566–2577.
- Pan, C. W., Qian, D. J., Sun, H. P., Ma, Q., Xu, Y., & Song, E. (2016). Visual impairment among older adults in a rural community in Eastern China. *Journal of Ophthalmology*, 2016, 1–6.
- Patel, A. K., Davis, A., Rodriguez, M. E., Agron, S., & Hackam, A. S. (2016). Protective effects of a grape-supplemented diet in a mouse model of retinal degeneration. *Nutrition*, 3, 384–390.
- Pescosolido, N., Barbato, A., Giannotti, R., Komaiha, C., & Lenarduzzi, F. (2016). Age-related changes in the kinetics of human lenses: Prevention of cataract. *International Journal of Ophthalmology*, 10, 1506–1517.
- Pfaffl, M. C. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2003–2007.
- Piippo, N., Korkmaz, A., Hytti, M., Kinnunen, K., Salminen, A., Atalay, M., ... Kauppinen, A. (2014). Decline in cellular clearance systems induces inflammasome signaling in human ARPE-19 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 12, 3038–3046.
- Portella, R. L., Barcelos, R. P., Rosa, E. J. F., Ribeiro, E. E., Cruz, I. B. M., Suleiman, L., & Soares, A. A. (2013). Guarana (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: An in vitro and in vivo study. *Lipids in Health and Disease*, 12, 1–9.
- Samath, C., Zhu, Y., Sang, S., & Ahmedna, M. (2016). Bioactive compounds isolated from apple, tea, and ginger protect against dicarbonyl induced stress in cultured human retinal epithelial cells. *Phytotherapy Research*, 2, 200–213.
- Santa Maria, A., Lopez, A., Diaz, M. M., Muñoz-Mingarro, D., & Pozuelo, J. M. (1998). Evaluation of the toxicity of guaraná with in vitro bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39, 164–167.
- Schimpl, F. C., da Silva, J. F., Gonçalves, J. F., & Mazzafera, P. (2013). Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 1, 14–31.
- Scripsema, N. K., Hu, D. N., & Rosen, R. B. (2015). Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin in the clinical management. *Journal of Ophthalmology*, 2015, 1–13.
- Silva, T. O., Jung, I. E., Moresco, R. N., et al. (2015). Association between advanced oxidation protein products and 5-year mortality risk among amazon riparian elderly population. *Free Radical Research*, 49, 204–209.

- Silvan, J. M., Reguero, M., & de Pascual-Teresa, S. (2016). A protective effect of anthocyanins and xanthophylls on UVB-induced damage in retinal pigment epithelial cells. *Food & Function*, 7, 1067–1076.
- Souied, E. H., Aslam, T., Garcia-Layana Holz, F. G., Leys, A., Silva, R., & Delcourt, C. (2015). Omega-3 fatty acids and age-related molecular degeneration. *Ophthalmic*, 55, 62–69.
- Tarry-Adkings, J. L., & Ozanne, S. E. (2014). The impact of early nutrition on the ageing trajectory. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73, 289–301.
- Tawara, T., Fukushima, T., Hojo, N., Isobe, A., Shiwaku, K., Setogawa, T., & Yamane, Y. (1996). Effects of paraquat on mitochondrial electron transport system and catecholamine contents in rat brain. *Archives of Toxicology*, 9, 585–589.
- Varma, S. D. (2016). Effect of coffee (caffeine) against human cataract blindness. *Clinical Ophthalmology*, 10, 213–220.
- Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M., Klein, R., Cheng, C. Y., & Wong, T. Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, 2, 106–116.
- Yang, Y., Qin, Y. J., Yip, Y. W., Chan, K. P., Chu, K. O., Chu, W. K., ... Chan, S. O. (2016). Green tea catechins are potent anti-oxidants that ameliorate sodium iodate-induced retinal degeneration in rats. *Scientific Reports*, 6, 1–10.
- Yang, W., & Tiffany-Castiglioni, E. (2008). Paraquat-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Involvement of p53 and mitochondria. *Journal of Toxicology and Environment Health*, 4, 289–299.
- Yao, J., Jia, L., Khan, N., Lin, C., Mitter, S. K., Boulton, M. E., ... Zacks, D. N. (2015). Deletion of autophagy inducer RB1 CC1 results in degeneration of the retinal pigment epithelium. *Autophagy*, 11, 939–953.
- Zhao, X., Huang, S., Luo, H., Wang, X., Gui, Y., Li, J., & Wu, D. (2014). Evaluation of vesicular stomatitis virus mutant as an oncolytic agent against prostate cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7, 1204–1213.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo translacional sugere que o guaraná, que é um fruto rico em compostos bioativos como: cafeína e catequina, poderia ter efeitos benéficos na visão de idosos através da prevenção dos danos causados pelo estresse oxidativo. A análise *in vivo* revelou que os idosos ribeirinhos que auto relataram boa qualidade da visão consumiam habitualmente guaraná, quando comparados com os demais indivíduos que não consumiam, essa associação ocorreu independentemente das variáveis como, sexo e idade. Nos testes *in vitro*, o tratamento prévio das células ARPE-19 com guaraná foi capaz de prevenir alguns danos citotóxicos e oxidativos causados pelo paraquat. Porém, quando estas células foram expostas primeiramente ao paraquat, e posteriormente ao guaraná, o mesmo não foi capaz de reverter os danos causados.

O guaraná, fruto nativo da Amazônia Brasileira, é amplamente produzido por pequenos agricultores, o processamento das sementes envolve o cozimento e a moagem. Quando processados manualmente, as sementes são fermentadas por 3 dias, após são recuperadas, lavadas e secadas em recipiente de ferro ou argila (2 m de diâmetro) durante 3 a 5 horas, enquanto se agita para evitar a queima do produto. Após este processo, as sementes podem ser trituradas ou maceradas até se obter um pó (SCHIMPL et al., 2013).

Os idosos ribeirinhos costumam beber uma colher de chá de guaraná em pó (aproximadamente 200-400 mg) misturado com meio copo de água (aproximadamente 150 ml) pela manhã, em jejum. Como o guaraná não é solúvel em água, o conteúdo do copo é misturado com uma colher e rapidamente ingerido antes que o guaraná assente no fundo do copo (SCHIMPL et al., 2013).

Atualmente, por conter altas quantidade de cafeína e catequinas, o guaraná é utilizado para produzir bebidas energéticas que são consumidas no mundo inteiro (ANGELO et al., 2008).

Como a DMRI, está associada ao estresse oxidativo gerado pela disfunção das mitocôndrias e ao aumento dos níveis de superóxido, e ainda não apresenta um tratamento eficaz, os compostos bioativos presentes na matriz química de guaraná poderiam contribuir para seus efeitos protetores contra o estresse oxidativo causado pela exposição ao paraquat. Esta suposição baseia-se nos resultados descritos em um estudo *in vitro* realizado com extrato de chá verde e suas principais moléculas bioativas. O estudo utilizou células do EPR (H-RPE) expostas a metilglioxal (MGO), que é um importante precursor de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os autores relataram que todos os compostos bioativos tinham efeitos

protetores relacionados às enzimas antioxidantes através da modificação da função do fator fator-eritróide 2-fator 2 (Nrf2) nuclear (SAMPATH et al., 2016; YANG et al., 2016). Esses resultados corroboram a ideia de que os efeitos protetores do guaraná nas células ARPE-19 expostas ao paraquat podem estar associadas não apenas à cafeína, mas também a outros polifenóis presentes na sua matriz nutricional.

O efeito do consumo de chá verde sob a visão de idosos também foi analisado em um estudo epidemiológico realizado por Pan et al. (2016). Foram investigados 4.579 idosos (> 60 anos) que vivem em uma comunidade rural no leste da China mostraram menor ocorrência de deficiência visual associada à ingestão de três ou mais copos de chá verde por dia. Portanto, os resultados obtidos na presente investigação corroboram com o relatório de Pan et al. (2016) onde é sugerido que as bebidas que possuem moléculas como cafeína-catequina podem melhorar a AV dos indivíduos.

Além disso, os resultados apresentados aqui são consistentes com pesquisas anteriores na literatura, sugerindo que a cafeína ingerida por via oral poderia ter alguns efeitos na visão, como por exemplo, inibindo a formação de cataratas através de mecanismos multifatoriais, incluindo efeitos antioxidantes e bioenergéticos na córnea (PESCOSOLIDO et al. 2016; VARMA, 2016). Em relação aos distúrbios da retina, sugeriu-se que a cafeína poderia ter valor terapêutico para seu tratamento (BOIA; AMBRÓSIO; SANTIAGO, 2016). Por outro lado, há evidências de que o consumo exagerado de cafeína pode aumentar o risco de glaucoma em indivíduos susceptíveis (KANG et al., 2008; KANG et al., 2015).

Dessa forma, os resultados obtidos a partir do protocolo *in vitro* confirmaram que a suplementação prévia com baixa concentração de guaraná (30µg/mL) aumentou a viabilidade das células ARPE-19 quando subsequentemente expostas a altos níveis de superóxido gerados pelo Paraquat. Várias concentrações de guaraná foram testadas, e preveniram a mortalidade celular acarretada pelos danos oxidativos causado pelo Paraquat.

O paraquat utilizado com agente oxidante nesse estudo, é um herbicida de contato não seletivo que possui uma forte ação intoxicante e, por essa razão, esta molécula pode desencadear eventos de apoptose e necrose celulares causando aumento do estresse oxidativo e subsequente dano no DNA (KIM; KIM; MOON, 2004). Nesta base, postulou-se que os efeitos protetores da guaraná poderiam envolver efeitos antioxidantes, o que poderia minimizar o estresse oxidativo, a genotoxicidade e a consequente mortalidade celular. Sendo assim, a menor concentração de guaraná (30 µg/mL) que apresentou efeitos citoprotetores contra a exposição ao paraquat baixou os níveis de 8-desoxiguanosina, que é um importante marcador genotóxico. As células suplementadas com guaraná e posteriormente expostas ao

paraquat mostraram prevenção dos níveis de 8-desoxiguanosina. Estes resultados indicam que o controle do dano do DNA causado pelo estresse oxidativo gerado pelo paraquat é um importante mecanismo de proteção causal do guaraná. Esses resultados corroboram investigações anteriores que mostraram os efeitos genoprotetores da guaraná contra a exposição a alguns poluentes ambientais e moléculas químicas como CCl₄ (KOBBER et al., 2016), cádmio (LEITE et al., 2010), nitroprussiato de sódio (BITTENCOURT et al., 2013) e etanol (CAMPOS et al., 2003).

Os eventos de apoptose e necrose, incluindo a piropitose, também foram observados nas células ARPE-19 expostas ao paraquat, provavelmente como consequência do dano oxidativo ao DNA e outras macromoléculas celulares. Um estudo anterior realizado em células SH-SY5Y semelhantes a neurônios humanos sugeriu que a apoptose induzida por paraquat envolve a via p53 e a via mitocondrial (YANG; TIFFANY-CASTIGLIONI, 2008). À medida que as caspases 3 e 8 participam desta via, os resultados aqui descritos confirmam a indução da apoptose pelo paraquat. O guaraná foi capaz de proteger parcialmente esses eventos por modulação da via de cascata de caspase. Os efeitos de proteção contra eventos apoptóticos e necróticos causados pelo paraquat foram descritos para outros extratos vegetais e outras linhas de cultura celular. Por exemplo, um estudo realizado com células do tipo neurônio PC12 mostrou que a epigallocatequina-galato, a molécula bioativa mais importante do chá verde, tem um efeito protetor contra os eventos de apoptose causados pelo paraquat (HOU et al., 2008).

Como células vacuoladas foram observadas em células expostas ao paraquat, poderia ocorrer indução de necrose envolvendo autofagia. Este processo já foi descrito em estudos *in vitro*, como o realizado por Jaroonwitchawan et al. (2016). Além disso, uma investigação anterior demonstrou a ocorrência de autofagia envolvendo modulação de caspase 1 em células ARPE-19 (PIIPPO et al., 2014). Por esta razão, os níveis de caspase 1 foram quantificados neste estudo, mostrando maiores níveis de proteína em células expostas ao paraquat, embora não haja evidência de regulação diferencial do gene quando comparadas com células de controle. De fato, os efeitos moduladores sobre a caspase 1 induzida pelo paraquat foram previamente estudados considerando o papel desta proteína na ativação da inflamação, mas não na modulação de eventos autofágicos (LIU et al., 2015).

Curiosamente, a suplementação de guaraná induziu uma forte regulação positiva do gene Casp 1, mas em termos fenotípicos, os níveis de proteína desta molécula foram menores do que nas células não tratadas. Nas células expostas ao guaraná e às expostas ao paraquat, observaram-se níveis mais baixos de caspase 1, bem como a regulação negativa de genes.

Portanto, os resultados indicam que os efeitos tóxicos do paraquat envolvem autofagia mediada pela caspase 1 e que a guaraná tem um efeito sinérgico com o paraquat na modulação desta proteína. Isso poderia contribuir para os efeitos protetores contra o paraquat observados em células previamente suplementadas com guaraná.

Considerando que a ingestão habitual de guaraná foi associada ao auto relato de boa visão dos indivíduos ribeirinhos e os resultados obtidos a partir dos protocolos *in vitro* utilizando as células ARPE-19, é possível inferir que o guaraná pode apresentar efeitos citoprotetor nas células da retina por suas propriedades antioxidantes. O que poderia reduzir o dano do DNA, os eventos de apoptose, auxiliando na manutenção das funções oculares.

Assim, apesar das limitações metodológicas, os resultados sugerem que um efeito protetor da guaraná contra o estresse oxidativo nas células da retina, dessa forma poderia auxiliar na prevenção da DMRI bem como na melhora da qualidade de vida dos pacientes idosos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados sugerem que a prevalência de idosos ribeirinhos que relatavam visão ruim foi aproximadamente de 50%, estando dentro do esperado para populações desta faixa etária. Os idosos que auto-relataram consumo habitual de guaraná apresentaram menor prevalência de visão ruim, quando comparado com os que não consomem guaraná. A associação entre menor prevalência de visão ruim com maior consumo de guaraná foi independente do sexo e da idade.

Nos resultados *in vitro* utilizando a linhagem celular ARPE-19, foi observado que o guaraná protegeu células do EPR da mortalidade induzida pelo estresse oxidativo causado pela exposição ao Paraquat. O guaraná diminuiu a ocorrência de apoptose avaliada através dos níveis e da expressão dos genes das caspases 1, 3 e 8, bem como, o guaraná diminuiu os níveis dos danos ao DNA (genotoxicidade) avaliados pela produção de 8-deoxiguanosina;

Portanto, esses resultados sugerem que o guaraná, fruto nativo brasileiro, é um alimento funcional e se apresenta como um promissor agente terapêutico, podendo proporcionar a melhoria da acuidade visual e na qualidade de vida aos pacientes acometidos pela DMRI.

REFERÊNCIAS

Aged-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 visual loss: AREDS report no 8. **Arch. Ophthalmol.**, v. 119, n. 10, p. 1417-1436, 2001.

ALBUQUERQUE, L. Guaraná: A vitalidade em grãos. **Amazônia em Foco.**, v. 1, n. 1, p. 9-14, 1991.

ALMEIDA, L.L., et al. Effects of melatonin in rats in the initial third stage of pregnancy exposed to sub-lethal doses of herbicides. **Acta Histochemica**, v. x, n.x, 2017.

ANGELO, P.C. et al. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Rep**, v. 27, n.1, p. 117–124, 2008.

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

BAHADORANI, S.; SINGER, M. Recent advances in the management and understanding of macular degeneration. **F1000Research**, v. 6, n. 516, p. 1-7, 2017.

BARBISAN, F. et al. Methotrexate related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. **Plos One**, v. 9, n. 10, p.1-10, 2014.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA repair**. v.3, n. 8-9, p.1109-1115, 2004.

BELLINI, L. P.; FREITAS, A. M. Highlights on age-related macular degeneration diagnosis and treatment. **Revista da AMRIGS**, v. 3, p. 204-208, 2008.

BIRD, A.C. et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. **Surv. Ophthalmol.**, v. 39, n. 5, p. 367-374, 1995.

BITTENCOURT, L. S. et al. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food Chem. Toxicol.**, v. 53, n. 1, p. 119-125, 2013.

BLANCO-AYALA., et al. News insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. **Free Radical Research**, v.48, n.6, p. 623-640, 2014.

BOIA, R; AMBRÓSIO, A.F; SANTIAGO, A.R. Therapeutic opportunities for caffeine and A2A receptor antagonists in retinal diseases. **Ophthalmic Res**, n. 4, v.1 p. 212-218, 2016.

BRASIL, Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). **Consulta pública n. 60, de 26 de junho de 2007**. [Capturado 2017 jun 20]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/P01%2B%2BParaquate.pdf/0ec98b27-1b1f-49de-b788-7bbaa9dfb191>

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.

BROWN, G.C. et al. The burden of age-related macular degeneration: a value-based medicine analysis. **Transactions of American Ophthalmology Society**, v. 103, n. 1, p. 173-184, 2005.

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

BYDŁOWSKI, S. P.; D'AMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. An aqueous extract of guaraná (*Paullinia cupana*) decreases platelet thromboxane synthesis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, v. 4, p. 421-424, 1991.

CABRAL, C. O guaraná, a planta, propriedades gerais e classificação botânica. **Agricultura e Pecuária**, Rio de Janeiro, v. 94, p.727-729, 1932.

CAMPOS, A.R., et al. Guarana (*Paullinia cupana* Kunth Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytother Res**, v. 17, n.1, p. 1199 – 202, 2003

CANOVAS, R. et al. Macular pigments. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 72, n. 6, p. 839-844, 2009.

CRUZ, I. B. M. da. et al. Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Polymorphism in Two Ethnic Groups Living in Brazil's Southern Region: Association With Age. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, n. 58, v.9, 2003.

CRUZ, I. B. M.; SCHWANKE, C. H. A. Reflexões sobre biogerontologia como uma ciência generalista, integrativa e interativa. **Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento**, Porto Alegre, v. 3, 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.

EDREY, Y. H.; SALMON, A. B. Revisiting an age-old question regarding oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 71, n. 1, p. 368-378, 2014.

EDWARDS, H. G. M. et al., FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. **Analytica Chimica Acta**. v. 532, p. 177-186, 2005.

ESPINOLA, E. B. et al. Pharmacological activity of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **J Ethnopharmacol**, v. 55, n. 3, p. 223-229, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

GAKI, G. S.; PAPAVALASSILOU, A. G. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. **NeuroMolecular Med.**, v. 16, n. 2, p. 217- 230, 2014.

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

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, n. 5, p.1147-1150, 2007.

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

HIRATA, L. L.; SATO, M. E.; SANTOS, C. A. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, n. 3, p. 418-424, 2004.

HOU, R.R., et al. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on paraquat-induced apoptosis in PC12 cells. **Cell Biol Int**, v. 1, n.1, p. 22-30, 2008.

HOWELL, E. G. M. et al., FT-Raman spectroscopic studies of guaraná and some extracts. **Anal. Chim. Acta.** v. 532, p. 177-186, 2005.

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.

JAGER, R.D; MIELER, W.F; MILLER, J.W. Age-related macular degeneration. **N Engl J Med.** v. 358, n. 24, p. 2606-17, 2008.

JAROONWITCHAWAN T., et al. Curcumin attenuates paraquat-induced cell death in human neuroblastoma cells through modulating oxidative stress and autophagy. **Neurosci Lett**, v. 636, n.1, 40-47, 2016.

JIAN-WEI, L., et al. Effectiveness of heparin eye drops in paraquat-induced ocular injury. **Cutan Ocul Toxicol**. v. 1, n.1, p. 1-4, 2017.

KANG. X., et al. The volume ratio of ground glass opacity in early lung CT predicts mortality in acute paraquat poisoning. **Plos One**, v.1 n.10. 2015.

KANG, J.H., et al. Comparison of risk factor profiles for primary open-angle glaucoma subtypes defined by pattern of visual field loss: a prospective study. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.4, n.1, p.2439–2448, 2015.

KANG, J.H., et al. Caffeine consumption and the risk of primary open-angle glaucoma: a prospective cohort study. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 5, n.1, p.1924–1931, 2008.

KIM, S.J; KIM, J.E; MOON, I.S. Paraquat induces apoptosis of cultured rat cortical cells. **Mol Cells**, v.1, n.1, p.102–7, 2004.

KOBER, H., et al. Enoprotective and hepatoprotective effects of Guarana (*Paullinia cupana Kunth Mart. var. sorbilis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Drug Chem Toxicol**, v. 39, n.1, p. 48-52, 2016.

KREWER, C. C., et al. Habitual intake of guaraná and metabolic morbities: na epidemiological study of an alderly population. **Phytotherapy research**, v.25, n.1, p.1367-1374, 2011.

KUSKOSKI, E. M. et al. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista de La facultad de Química Farmacéutica**. v. 12, p. 45-52, 2005.

LEITE R.P., et al. Protective effect of Guarana (*Paullinia cupana Kunth var. sorbilis*) pre-treatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. **Biol Trace Elem Res**, v. 141, n.1, p.262-74, 2010.

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

LI, K., et al. The toxic influence of paraquat on hippocampal neurogenesis in adult mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 1, n.1, 2017.

LIU, X.W. et al. Predictive values of urine paraquat concentration, dose of poison, arterial blood lactate and APACHE II score in the prognosis of patients with acute paraquat poisoning. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, n. 1, p. 79-86, 2017.

LIU, Z., et al. NLRP3 inflammasome activation is essential for paraquat-induced acute lung injury. **Inflammation**, v.1, n.1, p. 433-44, 2015.

MACHADO, A.K. et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells devived from human lipoaspirates. **Food Research International**, v. 67, n. 1, p. 426-433, 2015.

MACULAR PHOTOCOAGULATION STUDY GROUP. Krypton laser photocoagulation for neo-vascular lesions of age-related macular degeneration: results of a randomized clinical trial. **Arch. Ophthalmol.**, v. 108, n. 6, p. 816-824, 1990.

MACULAR PHOTOCOAGULATION STUDY GROUP. Laser photocoagulation of subfoveal neo-vascular lesions of age-related macular degeneration: updated findings from two clinical trials. **Arch Ophthalmol**, v. 111, n.9, p. 1200-1209, 1993.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**. v. 104, p. 1258-1268, 2007.

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

MARTINS, T. Herbicide Paraquat: concepts, mode of action and related diseases. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 175-186, 2013.

MAXWELL, S. R. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, v. 49, n.3, p. 345-361, 1995.

MILLER, J.W. Age-related macular degeneration revisited—Piecing the puzzle: The nical trial. **Arch. Ophthalmol.**, v. 108, n. 6, p. 816-824, 1990.

MIRANDA, M. et al. Antioxidants rescue photoreceptors in rd1 mice: Relationship with thiolmetabolism. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 48, n. 2, p. 216-222, 2010.

MONTAGNER, G. F. F. S. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different Manganese Superoxide Dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology in vitro**. v. 24, n. 5, p. 1410-1416, 2010.

MÜLLER, R.M., et al. Anacardium microcarpum extract and fractions protect against paraquat-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **EXCLI Journal**, v. 16, n.1, p. 302-312, 2017.

NATARAJAN, S.B. et al. Ocular promoting activity of grape polyphenols-A review. **Environ Toxicol Pharmacol**. v. 50, n.1, p. 83-90, 2017.

National Eye Institute (NEI). Photos age-macular degeneration. Disponível em: <https://www.flickr.com/photos/nationaleyeinstitute/7544733860/>. Acesso em: Julho de 2017.

NATOLI, R. et al. Microglia-derived IL-1 β promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal retinal degeneration. **Molecular Neurodegeneration**, v. 1, n.1, p. 12-31, 2017.

PAN, C.W. et al. Visual Impairment among Older Adults in a Rural Community in Eastern China. **J Ophthalmol**. v. 2016, n.1, p.1-6, 2016.

PARIER, V; SOUBRANE, G. Age-related macular degeneration. **Rev Med Interne**. v. 29, n. 3, p 215-23, 2008.

PESCOSOLIDO, N., et al. Age-related changes in the kinetics of human lenses: prevention of cataract. **Int J Ophthalmol.** v.10, n.1, p.1506-1517, 2016.

PIIPPO, N., et al. Decline in cellular clearance systems induces inflammasome signaling in human ARPE-19 cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 12, n.1, p.3038-46, 2014.

QUEIROZ, J. M. et al. Age-related macular degeneration: histopathological considerations. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v, 6, n. 1, p. 400-406, 2010.

RAHA, S.; ROBINSON, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends Biochem. Sci.** v. 25, n. 10, p. 502-508, 2000.

RATTNER, A; NATHANS, J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. **Nat Rev Neurosci.** v.7, n. 11, p. 860-72, 2006.

RIBEIRO, E.E; CRUZ, I.B.M. Dieta Amazônica: Saúde e Longevidade. **Editora Cultural**, ed. 2, 2012.

RICHELLE, M.; TAVAZZI, I.; OFFORD, E. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 7, p. 3438-3442, 2001.

ROCHETTE, L. et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, p. 2709-2729, 2014.

SAMPTH. C., et al. Bioactive compounds isolated from apple, tea, and ginger protect against dicarbonyl induced stress in cultured human retinal epithelial cells. **Phytomedicine**, v. 2, n.1, p. 200-213, 2016.

SCHIMPL, F. C. et al. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **J. Ethnopharmacol.**, v. 150, n. 1, p. 14-31, 2013.

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

SEBRAE. **Informações de Mercado sobre o Guaraná**. 2012. Disponível em: <[http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/EA4413F15EF0A2938325754C0063C9C8/\\$File/NT0003DC32.pdf](http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/EA4413F15EF0A2938325754C0063C9C8/$File/NT0003DC32.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2015.

SERRA, A.; DOMINGOS, F.; PRATA, M. M. Intoxicação por Paraquat. **Acta Médica Portuguesa, Lisboa**, v. 16, n.1, p. 25-32, 2003.

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

SINHA, K., et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Arch. Toxicology**, v. 87, n. 7, p.1157–1180, 2013.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guaraná's Journey from Region Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 7, n. 3, p. 279-282, 2010.

SOUBRANE, G. et al. Age-related macular degeneration. **Presse Med.**, v. 27, p. 1282-1287, 2002.

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. 845-81, 2005.

SUN, I.O; LEE, K.Y. Cyclophosphamide dose: How much is needed to win the war against paraquat poisoning. **Korean J Intern Med**. v. 28, n.1, p. 410-412, 2013.

VARMA, S.D. Effect of coffee (caffeine) against human cataract blindness. **Clin Ophthalmol**, v. 10, n.1, p. 213-20, 2016.

VIDAL, R. A. *Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas*. **Porto Alegre: Palotti**, 1997.

WANG, T., et al. Total ocular surface amniotic membrane transplantation for paraquat-induced ocular surface injury. **Can J.Ophthalmol**, v. 50, n. 4, p. 462-5, 2015.

WANG, X. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 1, p. 1240-1247, 2014.

WATANABE, T.; WATANABE, W.; KAWAHARA, S. Manufacture of guarana extracts and their use for improvement of liver functions, stimulation of tumor immunity, and for functional foods. **Tokyo: Jpn. Kokai**; 2002.

YANG, M., et al. Integrated analysis of Paraquat-induced microRNAs-mRNAs changes in human neural progenitor cells. **Toxicology in Vitro**, v. 1, n.1, 2017.

YANG, Y., et al. Green tea catechins are potent anti-oxidants that ameliorate sodium iodate-induced retinal degeneration in rats. **Sci Rep.**, v.6, n.1, p.1-10, 2016.

YANG, W; TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Paraquat-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: involvement of p53 and mitochondria. **J Toxicol Environ Health**, v.4, n.1, p.289-99, 2008.

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. 343-59, 2015.