

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS *IN VITRO* E
NEUROPROTETORES *IN VIVO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS
FOLHAS E RAÍZES DO YACON (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*)**

TESE DE DOUTORADO

PATRÍCIA MARTINEZ OLIVEIRA

URUGUAIANA

2019

PATRÍCIA MARTINEZ OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS *IN VITRO* E
NEUROPROTETORES *IN VIVO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS
FOLHAS E RAÍZES DO YACON (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*)**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanusa Manfredini

URUGUAIANA

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

M385a Martinez-Oliveira, Patrícia
Avaliação dos efeitos toxicológicos in vitro e
neuroprotetores in vivo do extrato hidroalcoólico das folhas e
raízes do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) / Patrícia Martinez-
Oliveira.
126 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM BIOQUÍMICA, 2019.
"Orientação: Vanusa Manfredini".

1. Yacon. 2. Toxicidade. 3. Alzheimer. 4. Neuroproteção. I.
Título.

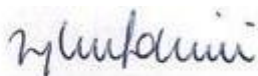
PATRÍCIA MARTINEZ OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS *IN VITRO* E
NEUROPROTETORES *IN VIVO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS
FOLHAS E RAÍZES DO YACON (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*)**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.
Área de concentração: Bioprospecção molecular

Tese defendida e aprovada em: 10 de maio de 2019.


Banca examinadora:



Prof. Dra. Vanusa Manfredini
Orientadora (UNIPAMPA)



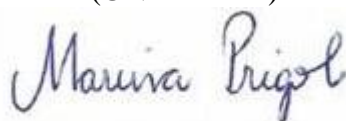
Prof. Dra. Luciane Noal Calil
(UFRGS)



Prof. Dra. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia
(UNIPAMPA)



Prof. Dra. Francielli Weber dos Santos Cibir
(UNIPAMPA)



Prof. Dra. Marina Prigol
(UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de ir atrás dos meus sonhos.

Aos meus pais, Ercília e Francisco, pelo amor, carinho e apoio incondicional. Muito obrigada!! Amo vocês!!

Ao meu namorado, Jonatan, pelo amor, incentivo, companheirismo e paciência. Te amo!

Ao meu vô, Eloi, *in memoriam*, pelo carinho e amor.

À minha orientadora, Prof. Dra. Vanusa Manfredini pela oportunidade, amizade e principalmente pela confiança. Muito obrigada!!

À prof. Dra. Pâmela Mello Carpes, pela realização de experimentos e principalmente pelos ensinamentos e oportunidade de trabalharmos juntas. MUITÍSSIMO obrigada!

À prof. Dra. Cristiane Denardin, pela realização de experimentos e ensinamentos. Obrigada!

Ao prof. Dr. Michel Machado, pelo auxílio no laboratório e na realização de testes. Obrigada!

As colegas do Gestox, em especial a Micaela, Deise, Luísa, Ritiéle, Bruna, Elizandra Patrícia sem vocês não poderia desenvolver esse projeto. MUITÍSSIMO obrigada!

A UNIPAMPA e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBIOQ) pela oportunidade.

Ao grupo GPFis em especial a Niége Alves pelo auxílio nos experimentos. Obrigada!

Ao grupo LEFQPN, em especial ao Prof. Dr. Elton Denardin e Jefferson Soares pelo empréstimo de equipamentos.

À prof. Maristela Cortez pelo empréstimo de equipamentos.

Aos meus colegas do Laboratório Municipal de Análises Clínicas de Alegrete em especial a Rita Hartmann pelo incentivo e compreensão. Obrigada!

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliarem este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa. Muito obrigada!!

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Fundação Universidade Federal do Pampa

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS *IN VITRO* E NEUROPROTETORES *IN VIVO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS E RAÍZES DO YACON (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*)

Autora: Patrícia Martinez Oliveira

Orientadora: Vanusa Manfredini

Local e Data da Defesa: Uruguaiana, 10 de Maio de 2019.

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma raiz tuberosa originária dos Andes, que vem despertando interesse devido suas propriedades medicinais. Popularmente a raiz é consumida *in natura* e as folhas na forma de chá para o tratamento do diabetes e distúrbio do colesterol. No entanto, pouco se sabe sobre outras propriedades dessa planta. Sendo assim o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos das folhas e raízes do yacon, e também o efeito *in vivo* desses extratos sobre a neurotoxicidade induzida pela proteína β -amilóide (A β). Foi determinado o perfil fitoquímico da folha e raiz por cromatografia líquida de alto desempenho e para os testes *in vitro* foi realizado teste de viabilidade celular, atividade genotóxica e mutagênica em cultura de leucócitos nas concentrações de 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 50 μ g/mL e 100 μ g/mL; citotoxicidade e morte celular por apoptose na linhagem celular 3T3 (1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL e 500 μ g/mL). Investigamos também os efeitos da suplementação da folha e raiz do yacon na memória, no estado oxidativo do hipocampo e perfil bioquímico em um modelo de doença de Alzheimer (DA). Os animais dos grupos suplementados receberam o extrato por gavagem durante 14 dias consecutivos, no 15º dia os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção intrahipocampal de β -amilóide (A β). A suplementação foi mantida por mais 10 dias, até iniciarem os testes comportamentais. Foi realizado o teste de memória de reconhecimento de objetos (RO) e testes comportamentais. Parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados no hipocampo através de metodologias clássicas. Os parâmetros bioquímicos foram analisados no soro por equipamento automatizado. Os principais compostos encontrados nas raízes e nas folhas foram os flavonóides quercetina e apigenina,

respectivamente. Não foi observada atividade mutagênica nem citotóxica na cultura de leucócitos, já o potencial genotóxico foi observado nas doses mais elevadas de extrato de folhas (50 e 100 µg/mL) e raízes (100 µg/mL). As maiores concentrações do extrato da folha do yacon (50, 100 e 500 µg/mL) apresentaram atividade citotóxica e todas as concentrações induziram a apoptose nas células 3T3. Marcadores bioquímicos não mostraram diferença entre os grupos, com exceção dos níveis de glicose que estavam significativamente menores nos animais não-suplementados e submetidos a injeção intrahipocampal de Aβ. A folha e a raiz reduziram o estresse oxidativo no hipocampo, mas somente a suplementação com o extrato da folha do yacon evitou o déficit de memória induzido pela Aβ, no teste de memória de curta e longa duração. Estes resultados sugerem que o yacon é rico em compostos fenólicos e, em altas doses, pode apresentar um potencial tóxico. Hipotetizamos que os efeitos *in vivo* se devem pela maior concentração do composto fitoquímico apigenina nas folhas do yacon, já que estudos recentes indicam que esse composto possui um importante efeito neuroprotetor. Portanto, esse estudo demonstra as folhas do yacon como um candidato para futuro uso na prevenção e/ou tratamento da DA.

Palavras-chave: Yacon, toxicidade, Alzheimer, β-amilóide, neuroproteção, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Doctoral thesis
Program of Postgraduate in Biochemistry
Foundation Federal University of Pampa

EVALUATION OF *IN VITRO* TOXICOLOGICAL EFFECTS AND *IN VIVO* NEUROPROTECTORS OF THE HYDROALCOOLIC EXTRACT OF THE YACON LEAF AND ROOTS (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*)

Author: Patrícia Martinez Oliveira
Advisor: Vanusa Manfredini
Date and Place of Defense: Uruguiana, may 10, 2019.

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a tuberous root originating in the Andes, which has aroused interest due to its medicinal properties. Popularly the root is consumed *in natura* and leaves in the form of tea for the treatment of diabetes and cholesterol disorder. However, little is known about other properties of this plant. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* toxicity of the hydroalcoholic extracts of the leaves and roots of yacon, as well as the *in vivo* effect of these extracts on β -amyloid (A β) protein-induced neurotoxicity. The phytochemical profile of the leaf and root by high performance liquid chromatography was determined and the cell viability test, genotoxic and mutagenic activity in leukocyte culture at the concentrations of 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 50 μ g/ml and 100 μ g/ml; cytotoxicity and cell death by apoptosis in the 3T3 cell line (1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL and 500 μ g/mL). We also investigated the effects of yacon leaf and root supplementation on memory, oxidative status of the hippocampus and biochemical profile in a model of Alzheimer's disease (AD). The animals in the supplemented groups received the extract by gavage for 14 consecutive days, on the 15th day the animals underwent stereotactic surgery for intrahippocampal β -amyloid (A β) injection. The supplementation was maintained for another 10 days, until the behavioral tests were started. The object recognition memory (RO) test and behavioral tests were performed. Oxidative stress parameters were evaluated in the hippocampus through classical methodologies. Biochemical parameters were analyzed in serum by automated equipment. The main compounds found in the roots and leaves were the flavonoids quercetin and apigenin, respectively. No mutagenic or cytotoxic activity was observed in the leukocyte

culture, and the genotoxic potential was observed at the highest doses of leaf extract (50 and 100 µg/mL) and roots (100 µg/mL). The highest concentrations of yacon leaf extract (50, 100 and 500 µg/mL) showed cytotoxic activity and all concentrations induced apoptosis in 3T3 cells. Biochemical markers showed no difference between groups, except for glucose levels that were significantly lower in non-supplemented animals and submitted to intrapostoperative A β injection. Leaf and root reduced oxidative stress in the hippocampus, but only supplementation with the yacon leaf extract prevented the A β -induced memory deficit in the short- and long-term memory test. These results suggest that yacon is rich in phenolic compounds and, at high doses, may present a toxic potential. We hypothesize that the in vivo effects are due to the higher concentration of the apigenin phytochemical compound in the yacon leaves, since recent studies indicate that this compound has an important neuroprotective effect. Therefore, this study demonstrates the yacon leaves as a candidate for future use in the prevention and / or treatment of AD.

Keywords: Yacon, toxicity, Alzheimer, β -amyloid, neuroprotection, phenolic compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Atividade da Presenilina normal e com alterações mutantes	19
Figura 2 – Espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (ROS e RNS) e suas fontes de fatores endógenos e ambientais	26
Figura 3 - Folha yacon.....	41
Figura 4 – Raiz yacon.....	41

ARTIGO

Figure 1 - Experimental design	79
Figure 2 - Representative reverse-phase HPLC analyses of Yacon extracts.....	80
Figure 3 – Effect of yacon extract in object recognition memory.....	80
Figure 4 - Effect of yacon in beta-amyloid-induced neurotoxicity rats	81
Figure 5 – Biochemical markers of liver and kidney function.....	82
Figure 6 – Biomarkers of oxidative damage in beta-amyloid-induced neurotoxicity rats after treatment of yacon extract	83
Figure 7 – Antioxidant defenses markers in beta-amyloid-induced neurotoxicity rats after treatment of yacon extract	84
Figure 8 – Histological section of the cerebral cortex rats with beta-amyloid-induced neurotoxicity after treatment of yacon extract.....	85

MANUSCRITO

Figure 1 - Effect of yacon in human leukocytes culture.....	105
Figure 2 - Effect of yacon in 3T3 cell line	106

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1 - Composition of yacon extracts.....	85
Table 2 - Behavioral control tests	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

AChE - Acetilcolinesterase

APP - Proteína precursora β -amilóide

A β - Proteína β -amilóide

ALT - Alanina transaminase

AST - Aspartato transaminase

ATP - Trifosfato de adenosina

CAT – Catalase

COX - Ciclooxygenase

CT - Colesterol total

DCV – Doença cerebrovascular

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNPH - 2,4Dinitrofenilhidrazina

ER - Espécies reativas

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

FOS - Frutooligossacarídeos

GPx - Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH - Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

HO₂[•] - Hidroperoxila

HClO - Ácido hipocloroso

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HNE - 4- hidroxinonenal

HNO₂ - Ácido nitroso

HPLC-DAD - Cromatografia à líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos

IDE - Enzima que degrada a insulina

IL-1 - Interleucina-1

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LOX - Lipoxigenases
LOOH - Hidroperóxido lipídico
MDA - Malondialdeído
NADH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NMDA - N-metil-D-aspartato
NEP - Neprilissina
N₂O - Óxido nitroso
NO[•] - Óxido nítrico
NO₂⁻ - Nitrito
NO₃⁻ - Nitrato
O₂- Oxigênio singleto
O₂⁻ - Ânion superóxido
OH[•] - Radical hidroxila
OMS - Organização Mundial de Saúde
ONOO⁻ - Peroxinitrito
8-oxoG - 8-Oxoguanine
PS1 – Presenilina 1
PPO - Polifenol oxidase
PGG₂- Hidroperóxido cíclico instável
PGH₂ - Endoperóxido
PUFA - Ácido graxo poliinsaturado
RL - Radicais livres
RO[•] - Radical alcóxila
ROO[•] - Radical peróxila
SOD - Superóxido dismutase
SNC – Sistema Nervoso Central
STZ – Estreptozotocina
TBARS - Ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Doença de Alzheimer	17
2.1.2 Patogênese	17
2.1.3 Diagnóstico	22
2.1.4 Tratamento	24
2.2 Estresse Oxidativo	25
2.2.1 Espécies reativas	26
2.2.2 Dano oxidativo às biomoléculas	30
2.3. Defesas antioxidantes	33
2.3.1 Sistema enzimático	34
2.3.2 Sistema não enzimático	35
2.4 Yacon	38
2.4.1 Origem	38
2.4.2 Aspectos agronômicos	39
2.4.4 Atividades biológicas	43
2.5 Toxicidade	45
3 OBJETIVOS	49
3.1 Geral	49
3.1 Específicos	49
4 ARTIGO	50
5. MANUSCRITO	87
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
7. PERSPECTIVAS.....	108
REFERÊNCIAS	109
8. ANEXOS	125

8.1 Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA.....	125
--	------------

APRESENTAÇÃO

A presente tese foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO**, o **REFERENCIAL TEÓRICO** e os **OBJETIVOS**. As seções **MATERIAL E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** e as respectivas **REFERÊNCIAS** estão apresentadas sob a forma de um artigo e um manuscrito, os quais compõem a **parte II** deste trabalho e representam a íntegra deste estudo. As seções **CONCLUSÃO** e **REFERÊNCIAS** encontram-se na **parte III** desta tese, sendo que as referências referem-se somente às citações utilizadas na introdução e nos conceitos gerais e revisão da literatura da mesma.

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma planta andina, pertencente à família *Asteraceae*, que é utilizada popularmente como alimento e para fins medicinais (Borges *et al.*, 2012; Santos, K. C. dos *et al.*, 2017). No entanto, faltam evidências sobre seu uso seguro e os ensaios toxicológicos são extremamente importantes para a avaliação da segurança das plantas. Muitos produtos naturais podem exibir atividade mutagênica, carcinogênica ou genotóxica podendo trazer prejuízos irreversíveis a saúde humana (Akhtar *et al.*, 2016).

Pesquisas indicam que tanto as folhas como as raízes do yacon são ricas em compostos fenólicos com importantes atividades antioxidantes (Arnao *et al.*, 2012; Ojansivu, Ferreira e Salminen, 2011), mostrando-se um excelente candidato para estudos de prevenção e tratamento de doenças, principalmente as relacionadas ao estresse oxidativo como a doença de Alzheimer (DA).

A DA é uma doença neurodegenerativa caracterizada pelo decréscimo progressivo das funções cognitivas, de memória e comportamento, e atinge milhões de pessoas, especialmente idosos, no mundo todo (Reitz e Mayeux, 2014). O acúmulo extracelular do peptídeo β -amilóide (A β), com formação de placas amilóides, é considerado um dos principais aspectos fisiopatológicos da DA, e está fortemente correlacionado com o estresse oxidativo (Zhou *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo é consequência do desequilíbrio no estado redox do organismo, com a produção excessiva de radicais livres (RL) (Halliwell, Barry, 2006). Os RL são definidos como quaisquer espécies que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na última camada molecular (Halliwell, 2011) podendo oxidar diretamente biomoléculas (lipídios, proteínas e DNA) (Halliwell, 2012; Valko *et al.*, 2007). Os antioxidantes desempenham importante função nesses processos, pois são moléculas que protegem o alvo biológico do dano oxidativo causado pelos RL, e podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos (Gomathi *et al.*, 2013; Halliwell, 2011).

Baseado no exposto acima, este trabalho pretende avaliar a toxicidade *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos das folhas e raízes do yacon, e também o efeito *in vivo* desses extratos sobre a neurotoxicidade induzida pela proteína A β .

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doença de Alzheimer

A DA é o tipo de demência mais prevalente no mundo, atingindo aproximadamente 35 milhões de pessoas, principalmente idosos, e a previsão é que esse número crescerá assustadoramente nos próximos anos (Reitz e Mayeux, 2014; Sen *et al.*, 2017). No Brasil há cerca de 1,2 milhões de casos, a maioria deles ainda sem diagnóstico. A estimativa é que essa conta dobre até 2030, segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ). A organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que até 2050 o número de casos suba em até 500% em toda a América Latina (ABRAZ, 2019a; OPAS, 2019).

A DA foi citada primeiramente em 1906, na Alemanha, por Alois Alzheimer como um "processo de doença grave peculiar do córtex cerebral" (Hippius e Neundörfer, 2003). Atualmente ela é considerada uma doença crônica e neurodegenerativa do sistema nervoso central, caracterizada pelo déficit progressivo da memória e declínio de outras funções cognitivas (pensamento, percepção, orientação, raciocínio, aprendizagem, linguagem, imaginação e julgamento) (Nanaware *et al.*, 2017; Williamson *et al.*, 2017). Apesar de ser considerada uma doença de idosos, atingindo uma faixa etária entre 65 e 85 anos a DA, também pode afetar pessoas mais jovens (Zhou *et al.*, 2016).

2.1.2 Patogênese

A neurodegeneração ocorre espontaneamente durante o envelhecimento, com diferentes intensidades, dependendo das características individuais de cada pessoa. Porém, na DA o sintoma inicial mais comum é a dificuldade em lembrar-se de acontecimentos recentes, denomina-se perda de memória de curto prazo. À medida que a doença progride outras funções são prejudicadas, acarretando a perda da memória de longo prazo, podendo evoluir para a morte (Duong, Patel e Chang, 2017; Tarawneh e Holtzman, 2012).

A DA é uma neuropatologia com peculiaridades que incluem placas A β , emaranhados neurofibrilares compreendendo agregados de proteína tau hiperfosforilada, angiopatia amiloide cerebral, perda neuronal e disfunção sináptica (Zenaro *et al.*, 2015). Alguns fatores como processos inflamatórios, estresse oxidativo e resposta imune

podem influenciar nesse processo (Chen e Zhong, 2014). Células neuronais específicas quando afetadas apresentam disfunção e morte, contribuindo para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como DA (Corrêa-Velloso *et al.*, 2017).

As causas da doença ainda não estão claras existindo diversas hipóteses, entre elas:

✓ **Hereditariedade genética:** Podendo ser classificada em:

Início precoce - causada por mutações específicas em genes que codificam a presenilina (PS1 e PS2), e a proteína precursora β -amilóide (APP); A proteína presenilina 1 (PS1), cujo gene está no cromossomo 14, e a presenilina 2 (PS2) no qual o gene situa-se no cromossomo 1, mostram ter papel importante no desenvolvimento da DA, desde a produção de peptídeo $A\beta$, pois levam a clivagem anormal da APP por secretases (Figura 1) (Contino *et al.*, 2017).

Início tardio - causado por mutações em genes que codificam a apolipoproteína E (ApoE). Esses efeitos possivelmente se devem a fatores ambientais e/ou genéticos (Giri *et al.*, 2017; Ojopi, Bertoncini e Dias-Neto, 2004).

A ApoE é uma glicoproteína sintetizada principalmente pelo fígado (75 % total), e o cérebro é o segundo sítio de maior síntese, sendo produzida fundamentalmente por astrócitos. Essa glicoproteína está envolvida no transporte de colesterol e outras substâncias hidrofóbicas, sendo um importante fornecedor de lipídios aos neurônios para a manutenção de sinapses, e também para promover reparo de lesões (Liu *et al.*, 2013). O gene da apoE possui três alelos comuns, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. O alelo $\epsilon 4$ da apoE está geneticamente ligado à DA de aparecimento tardio esporádico e familiar e está associado ao aumento do risco de angiopatia amilóide cerebral e declínio cognitivo durante o envelhecimento normal. Estudos demonstram que um aumento na expressão de apoE $\epsilon 4$ aumenta a deposição de $A\beta$ (Poirier *et al.*, 2014).

Além do transporte de lipídios a ApoE também regula o metabolismo de $A\beta$, agregação e deposição, iniciando assim eventos tóxicos que levam à disfunção sináptica e neurodegeneração na DA. As isoformas da ApoE regulam diferencialmente a agregação e a depuração de $A\beta$ no cérebro e têm funções na regulação do transporte lipídico cerebral, metabolismo da glicose, sinalização neuronal, neuroinflamação e função mitocondrial. ApoE contribui para a patogênese da DA através de ambas as vias dependentes de $A\beta$ e independentes de $A\beta$ (Kanekiyo, Xu e Bu, 2014; Liu *et al.*, 2013; Yu, Tan e Hardy, 2014).

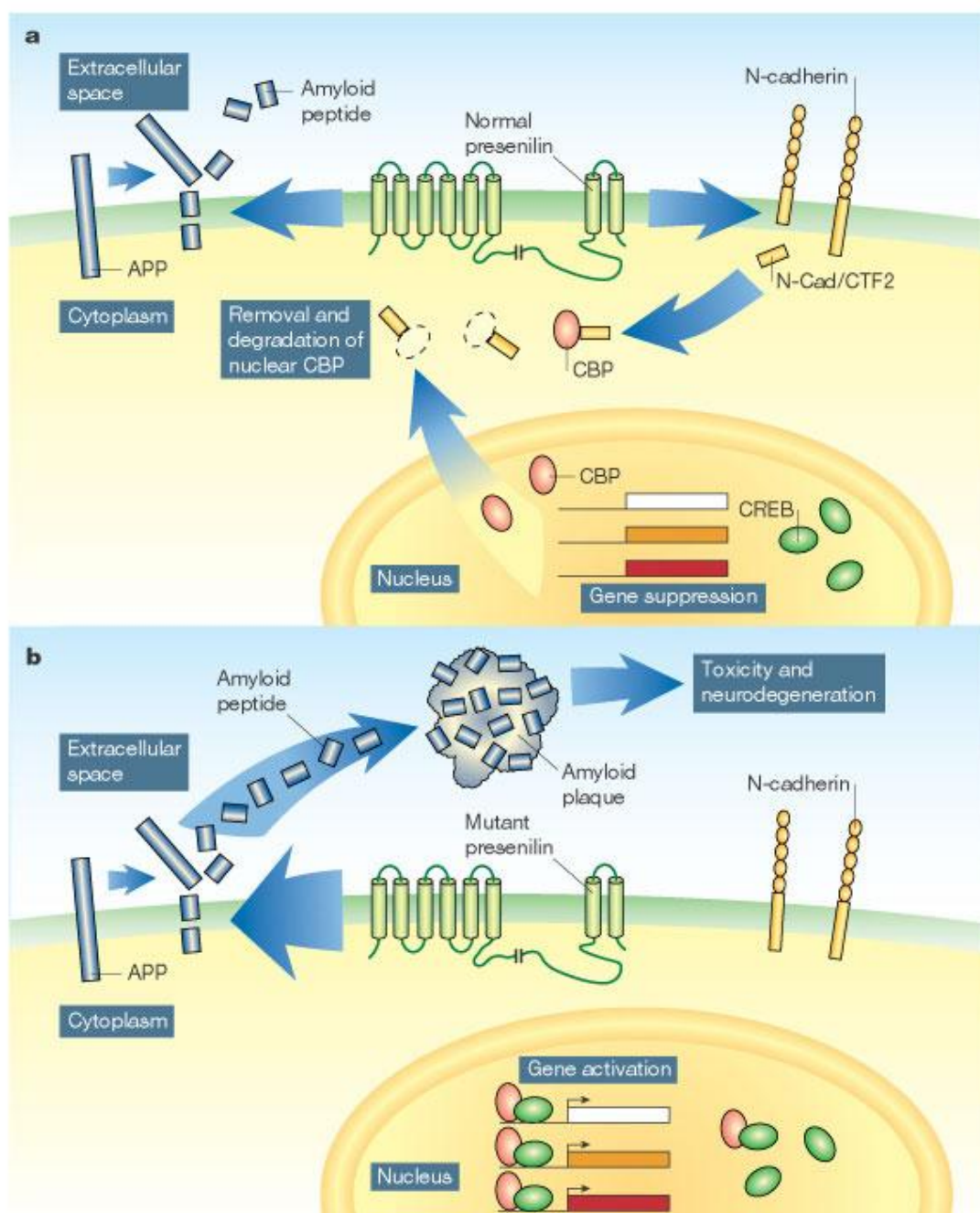


Figura 1 – a: Presenilina normal; b: Presenilina com alterações mutantes.

Fonte: Internet

✓ Hipótese Colinérgica

A íntima ligação com neurotransmissor acetilcolina e a função cognitiva levou o surgimento da hipótese colinérgica. De acordo com essa hipótese, há uma hipofunção colinérgica, onde a degeneração dos neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal e a perda associada de neurotransmissão colinérgica no córtex cerebral e em outras áreas

contribuem significativamente para o surgimento desse distúrbio (Fotiou *et al.*, 2015, 2009).

A acetilcolina é um neurotransmissor que funciona como propagador do impulso nervoso nas fendas sinápticas, onde a enzima sintetizadora e metabolizadora são Colina acetiltransferase e acetilcolinesterase (AChE), respectivamente. Atualmente, os tratamentos medicamentosos mais comuns são baseados nessa hipótese, sendo os inibidores da colinesterase a opção terapêutica recomendada, apesar da eficácia terapêutica não estar totalmente clara (Chang *et al.*, 2018). Para a "hipótese amilóide" a AChE executa atividades secundárias não colinérgicas que contribuem para deposição de A β , formação das placas senis/emaranhados neurofibrilares no cérebro com Alzheimer (Anand e Singh, 2013).

✓ **Hipótese proteína Tau**

Normalmente proteína Tau promove a montagem de microtúbulos, porém em condições patológicas, se hiperfosforila através da ação de quinases, acumulando-se e formando os emaranhados neurofibrilares, tornando os microtúbulos instáveis e causando a perda da funcionalidade dos neurônios (Corrêa-Velloso *et al.*, 2017; Reitz e Mayeux, 2014).

✓ **Hipótese Amilóide**

A "hipótese da cascata amilóide" é fortemente associada a DA. Alterações genéticas em um dos genes que codificam APP, PSEN1 ou PSEN2 levam ao depósito de grandes quantidades do fragmento amilóide A β (1-42) no cérebro, que é tóxico para os neurônios e conseqüente levam ao desenvolvimento da DA (Butterfield *et al.*, 2001).

A geração de peptídeos A β de 40 ou 42 aminoácidos ocorre a partir da APP, uma proteína transmembrana tipo 1 expressa em vários tecidos, especialmente no sistema nervoso central (SNC). O acúmulo, agregação, e deposição no parênquima cerebral desses peptídeos, como as placas senis, e em regiões perivasculares, como a angiopatia amilóide cerebral, que são eventos que ocorrem na patogênese da DA. Além de depósitos há um prejuízo nas funções sinápticas desencadeando vias tóxicas levando a possível neurodegeneração e déficits cognitivos (Cheignon *et al.*, 2018; Kanekiyo, Xu e Bu, 2014). A função fisiológica da APP não está totalmente clara, no entanto, acredita-se que ela desempenha um importante papel no desenvolvimento do cérebro, aprendizagem, memória e plasticidade sináptica (Chow *et al.*, 2011; Dawkins e Small, 2014).

A DA é caracterizada principalmente por placas senis que são formadas por A β , derivados da clivagem anormal da APP por proteases (β - e γ -secretases) que endoproteolizam a APP para liberar o peptídeo A β . A β se agrega espontaneamente, acumulando-se extracelularmente e formando as placas senis (Corrêa-Velloso *et al.*, 2017; Reitz e Mayeux, 2014). Apesar da patogênese não estar totalmente clara, fortes evidências sugerem que esse acúmulo de proteína A β é um dos principais aspectos fisiopatológicos da DA (Zhou *et al.*, 2016). A função de degradação de A β são desempenhadas principalmente pela neprilissina (NEP) e pela enzima que degrada a insulina (IDE). Nos processos fisiológicos ou patológicos (envelhecimento ou na DA), a expressão de NEP e IDE decresce, gerando um aumento na concentração de A β no cérebro. Em pacientes com AD, a redução do número e atividade da NEP ocorre especialmente no córtex e no hipocampo, e não em outras áreas do cérebro (Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverría e Monge-Bonilla, 2017).

O hipocampo parece ser a área mais afetada, com alterações já no estágio inicial da doença, apresentando redução da neurogênese e consequente neurodegeneração. Essa área tem um papel fundamental na memória (aquisição, consolidação e recuperação) e na orientação espacial (Cheignon *et al.*, 2018; Corrêa-Velloso *et al.*, 2017; Mehdizadeh *et al.*, 2017). Esses danos no hipocampo parecem ser mediados pelo estresse oxidativo que leva a perda de sinapses e neurônios contribuindo para a evolução da doença (Chen e Zhong, 2014; Zhou *et al.*, 2016).

➤ **Fatores de risco não-genéticos**

✓ **Doença cerebrovascular (DCV)**

A DA e a DCV possuem vários fatores de risco em comum, e a coexistência de ambas é amplamente observada. Alterações cerebrovasculares como infartos hemorrágicos e outros eventos aumentam o risco de demência devido a dano das regiões do cérebro que são importantes na função da memória, além de que redução do fluxo sanguíneo cerebral aumentaria a produção de A β através da modulação de β e γ -secretase, promovendo a deposição de A β , pois nas DCV a depuração de A β encontra-se prejudicada, uma vez que é principalmente dirigida por sistemas vasculares, incluindo o transporte ativo através da barreira hematoencefálica e sistemas de drenagem linfática perivascular / linfáticos para-vasculares. Esses eventos podem gerar o declínio cognitivo ou induzir respostas inflamatórias prejudicando a função cognitiva (Saito e Ihara, 2016).

✓ **Pressão sanguínea**

Estudos demonstram que pressão sanguínea elevada na meia-idade (40-60 anos) aumenta o risco de comprometimento cognitivo da velhice, demência e DA. A hipertensão pode aumentar o risco de DA através de um efeito na integridade vascular da barreira hematoencefálica, resultando em extravasamento de proteínas no tecido cerebral, gerando danos celulares, redução da função neuronal ou sináptica, apoptose e aumento do acúmulo de A β e consequente comprometimento cognitivo (Santos, C. *et al.*, 2017).

✓ **Diabetes tipo 2**

Estudos demonstram que o diabetes tipo 2 (DM2) quase duplica o risco de DA. Possíveis mecanismos de ligação não cerebrovasculares incluem hiperinsulinemia e produtos avançados de glicosilação. A insulina pode atravessar a barreira hematoencefálica e a infusão de insulina periférica em idosos aumenta os níveis de A β no líquido cefalorraquidiano (LCR). Existem receptores de insulina no cérebro, incluindo o hipocampo e o córtex, estruturas afetadas precocemente na DA. A IDE tem sido associada à depuração de A β no cérebro, e a insulina e A β são ambos substratos concorrentes para a IDE. A insulina no cérebro pode aumentar a deposição da A β e fosforilação da proteína tau, que são centrais na patogênese da DA (Reitz e Mayeux, 2014).

2.1.3 Diagnóstico

Apesar de um enorme avanço no diagnóstico de DA durante os últimos tempos, a medicina ainda carece de ferramentas mais exatas para uma detecção precoce desta doença incurável. Atualmente não há nenhum método que isoladamente confirme a presença de DA com absoluta precisão. O diagnóstico continua sendo clínico com exclusão de outras causas de demência, por meio dos exames complementares (laboratoriais e de imagem). O diagnóstico precoce é fundamental para melhores condições do paciente. As placas amilóides e aglomerados neurofibrilares são características microscópicas que auxiliam na caracterização da doença. Para o diagnóstico de DA, os testes neuropsicológicos são realizados em diferentes esferas das funções cognitivas associados a biomarcadores do LCR. Na atualidade três fases da DA

têm sido sugeridas: o processo fisiopatológico da DA, comprometimento cognitivo leve e demência (Picanço *et al.*, 2016; Pietrzak *et al.*, 2018).

✓ **Fase fisiopatológica da DA:**

A fase fisiopatológica da DA é assintomática, e o diagnóstico é extremamente difícil. Essa fase se caracteriza por amiloidose (Fase 1); disfunção sináptica, processos inflamatórios, disfunção neuronal, hiperfosforilação da proteína tau, acúmulo de emaranhados neurofibrilares (NFTs) e neurodegeneração (Fase 2); e alterações cognitivas sutis (Fase 3). Assim pesquisa de biomarcadores no LCR é indicada nesse estágio (Aggarwal, Shah e Bennett, 2015).

- **Marcadores biológicos:**

A A β e proteína fosfo-tau são utilizados como marcadores biológicos. Normalmente a proteína A β é eliminada pelo líquido. No entanto na DA ela se acumula no cérebro e a concentração no líquido decresce. Simultaneamente ocorre a fosforilação da proteína tau e com a morte neuronal a fosfo-tau é eliminada pelo líquido, aumentando sua concentração. Entretanto a alteração na concentração desses marcadores não garante o diagnóstico da DA, o qual deve ter correlação com os sintomas clínicos. Estudos sugerem que os níveis dos biomarcadores A β 42 podem decrescer no LCR pelo menos 20-25 anos antes da demência clínica. Além disso, a neuroimagem com amilóide e tau, podem auxiliar e facilitar o diagnóstico precoce (ABRAZ, 2019b; Nordberg, 2015).

➤ **Comprometimento cognitivo leve (CCL):**

Essa fase caracteriza-se principalmente na avaliação de alteração na capacidade cognitiva, comprometimento de funções cognitivas (orientação, linguagem, atenção, função executiva, memória) ou queixas de dificuldades leves na realização de tarefas complexas, antes realizadas facilmente, sem comprometimento profundo no funcionamento social ou ocupacional. Esta informação clínica, associada à pesquisa de neuroimagem mostra-se um alvo de diagnóstico para futuros tratamentos. Pacientes com comprometimento cognitivo leve demonstraram massa cinzenta atrofiada em exames de ressonância magnética, especialmente no hipocampo e no córtex entorrinal, enquanto tomografia por emissão de pósitrons 18-fluordesoxiglicose (^{18}F -FDG PET) mostra

alterações fisiológicas como redução do metabolismo no córtex temporoparietal e diminuição do metabolismo glicêmico o córtex cingulado posterior (Aggarwal, Shah e Bennett, 2015).

➤ Demência:

Nesse estágio há mudanças severas na memória episódica e outras funções cognitivas, como a função executiva e a disfunção de linguagem, havendo prejuízo no funcionamento social ou ocupacional com elevado grau de dependência. Além disso, os exames de ressonância magnética tipicamente mostram atrofia acentuada do hipocampo, enquanto dados volumétricos demonstram atrofia pronunciada no lobo temporal médio associada a um funcionamento executivo e função cognitiva mais baixa (Aggarwal, Shah e Bennett, 2015).

2.1.4 Tratamento

O tratamento da DA tem o objetivo de amenizar os sintomas e desacelerar a progressão da doença. Atualmente, apenas duas classes de intervenção farmacêutica são disponíveis para esses pacientes. Os inibidores da AChE para pacientes com demência leve, moderada ou grave; e antagonistas N-metil-D-aspartato (NMDA) para pacientes com DA moderada a grave (Weller e Budson, 2018).

O glutamato é um neurotransmissor que está associado com o aprendizado e memória. O NMDA funciona através da regulação da atividade de glutamato. A ativação crônica dos receptores NMDA com excesso de glutamato leva à neurodegeneração - um estado chamado de "excitotoxicidade" que é caracterizado pelo influxo patológico de íons cálcio na célula neuronal. Antagonista NMDA como a memantina bloqueia parcialmente esses receptores evitando o dano causado pelo excesso de cálcio. A desregulação do sistema glutamatérgico pode ser associado com a deposição de placas A β , hiperfosforilação da proteína tau, estresse oxidativo, entre outros (Agostini e Fasolato, 2016; Danysz e Parsons, 2012).

Outra classe de fármacos anti-alzheimer amplamente usadas são os inibidores da colinesterase (donepezil, rivastigmina e galantamina) que aumentam diretamente os níveis de acetilcolina inibindo a enzima AChE que hidrolisa esse neurotransmissor. O sistema colinérgico é importante para a regulação dos processos de aprendizagem e

memória e tem sido alvo para o desenvolvimento de fármacos para portadores de DA (Anand e Singh, 2013; Picanço *et al.*, 2016).

Medicamentos mais recentes ampliam a memória e atenção, no entanto não melhoram a expectativa de vida ou progressão global da demência. A estratégia terapêutica do futuro concentra-se na terapia anti-amilóide e anti-tau embora ainda sem muito sucesso. Modificações no estilo de vida, dieta balanceada e exercícios físicos mostram-se as únicas práticas eficazes com prevenção do decréscimo cognitivo global. Como o estresse oxidativo tem sido amplamente associado a etiologia da doença, há uma forte tendência ao uso da fitoterapia e tem se mostrado valiosa no tratamento e prevenção da DA. (Bhardwaj *et al.*, 2017; Ohta *et al.*, 2017).

2.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesa antioxidante. Os radicais livres (RL) e outras espécies reativas (ER) são produzidos naturalmente na cadeia respiratória ou por alguma disfunção biológica. A produção dessas espécies através do metabolismo celular resulta de reações enzimáticas e não enzimáticas, desempenhando importantes funções biológicas como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. As reações enzimáticas formadoras de RL, incluem aquelas envolvidas na cadeia respiratória da mitocôndria, fagocitose, síntese de prostaglandinas e no sistema do citocromo P-450, sendo NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, cicloxigenase, lipoxigenase, óxido nítrico sintase (NOS) grandes fontes enzimáticas de ER. Eles também podem ser formados através de fontes extrínsecas, tais como radiação, tabagismo, álcool e produtos químicos industriais, entre outros (Halliwell e Whiteman, 2004; Otunola *et al.*, 2014; Silva, Cerchiaro e Honório, 2011) (Figura 2).

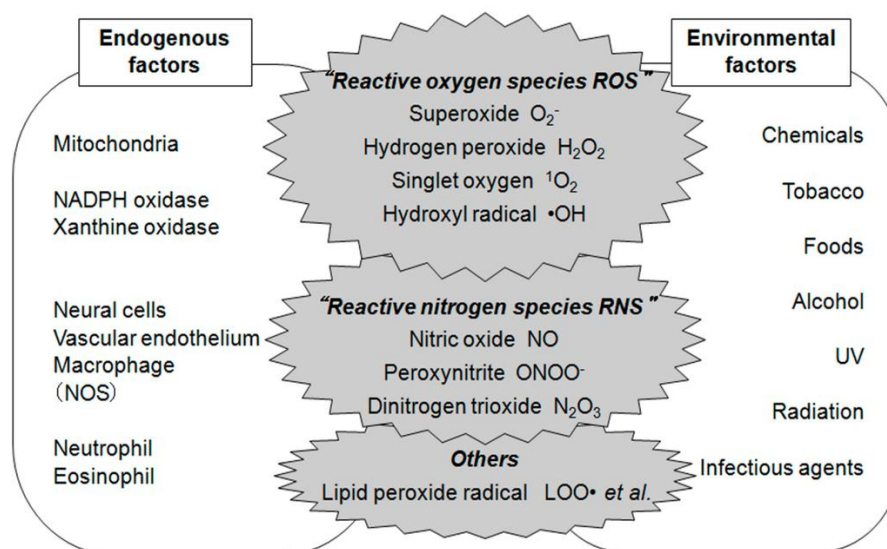


Figura 2– Espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (ROS e RNS) e suas fontes de fatores endógenos e ambientais.

Fonte: Adaptado de Thanan et al., 2015.

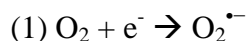
2.2.1 Espécies reativas

Segundo Halliwell (2011) "RL pode ser definido como molécula ou fragmento molecular com um ou mais elétrons desemparelhados na última camada e com capacidade de existência independente". Esses radicais são fortemente instáveis e reativos que procuram estabilidade ligando o elétron não-pareado, doando ou retirando elétrons de moléculas próximas como proteínas, lipídios e material genético (Reis *et al.*, 2008; Young e Woodside, 2001). Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são aquelas que o elétron não-pareado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, respectivamente (Poprac *et al.*, 2017; Valko *et al.*, 2007). Oxidação é receber oxigênio ou retirada de elétrons, enquanto redução é uma perda de oxigênio ou um ganho de elétrons. Assim chamado "pró-oxidantes" que causam dano oxidativo. O dano causado pelos radicais às biomoléculas pode resultar em alteração nas propriedades da membrana, disfunção protéica, mutações e até morte celular (Gutteridge e Halliwell, 2010; Sharma *et al.*, 2012; Thanan *et al.*, 2015). As principais ERO dividem-se em dois grupos, radicais (com um ou mais elétrons desemparelhados): hidroxila ($OH\cdot$) superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peroxila ($ROO\cdot$) e alcoxila ($RO\cdot$); e não-radicaís: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso ($HClO$). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($NO\cdot$), óxido nitroso (N_2O), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$).

As espécies não-radicais não são RL, mas podem facilmente levar a formação destes (Halliwell, B., 2006).

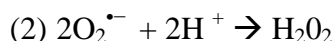
✓ **Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)**

A redução de um elétron de oxigênio, através de reações de auto-oxidação na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, leva à produção do radical $O_2^{\bullet-}$ (Reação 1). A reatividade desse radical é baixa, no entanto, o mecanismo importante pelo qual o $O_2^{\bullet-}$ é tóxico para as células é de liberar o ferro das proteínas de armazenamento e de ferro-sulfoproteínas, necessário para a reação de Fenton. Outro mecanismo de destaque é a sua rápida reação com o NO^{\bullet} para gerar o não radical $ONOO^-$ (Halliwell, 2012; Young e Woodside, 2001).



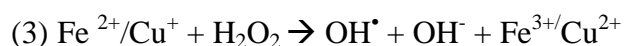
✓ **Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)**

O radical $O_2^{\bullet-}$ recebe íons de hidrogênio, formando H_2O_2 , essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Reação 2). Nas moléculas orgânicas o H_2O_2 é pouco reativo na ausência de metais de transição. No entanto, tem um papel fundamental no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares prontamente e gerar o OH^{\bullet} (Barreiros, David e David, 2006).

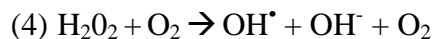


✓ **Radical hidroxila (OH^{\bullet})**

O radical OH^{\bullet} é um radical extremamente reativo, gerado principalmente pela reação de H_2O_2 com íons ferro (Fe^{2+}) ou cobre (Cu^+), reação é conhecida como Reação de Fenton (Reação 3). Esse radical é considerado o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*, podendo reagir fortemente com biomoléculas como DNA, proteínas, lipídios e causar graves danos às células. Além disso através da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação, sendo considerado o principal causador desse processo (Halliwell, 2012; Halliwell e Chirico, 1993).



Íons Fe^{2+} ou Cu^+ também podem catalisar a reação entre H_2O_2 e O_2 originando igualmente OH^\bullet essa reação é chamada de Haber-Weiss (Reação 4) (Barbosa *et al.*, 2010).



✓ **Peroxinitritos (ONOO^-)**

O ONOO^- é formado pela reação do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ com NO^\bullet (Reação 5). O NO^\bullet é lento em suas reações com a maioria das biomoléculas, mas muito reativo com os radicais livres, incluindo superóxido. NO^\bullet é produzido por vários tipos de células (especialmente fagócitos e células endoteliais vasculares) atua sobre células do músculo liso nas paredes dos vasos para produzir relaxamento. Já o $\text{O}_2^{\bullet-}$, age em oposição ao NO^\bullet pode atuar como um vasoconstritor, levando a efeitos nocivos em algumas circunstâncias clínicas. O ONOO^- é um poderoso agente oxidante e pode danificar diretamente as biomoléculas, além de ser um agente de nitração (Halliwell, B., 2006; Phaniendra, Jestadi e Periyasamy, 2015).

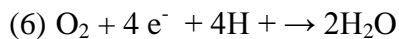


➤ **Vias intrínsecas de formação de espécies reativas**

✓ **Cadeia respiratória**

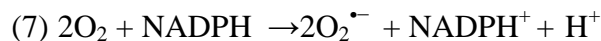
O oxigênio é indispensável para o metabolismo e produção de energia para a maioria das espécies. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, mais de 95% do oxigênio que respiramos sofre redução tetravalente combinada em uma reação catalisada pela citocromo oxidase (citocromo c, oxigênio, oxidoreductase) do complexo IV na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Reação 6) com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . A citocromo oxidase é o receptor de elétrons terminal na cadeia e deve renunciar a seus equivalentes redutores para permitir o transporte contínuo de elétrons com a produção de trifosfato de adenosina (ATP). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$, hidroperoxila (HO_2^\bullet) e OH^\bullet e o H_2O_2 . Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ER é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons. A geração mitocondrial de $\text{O}_2^{\bullet-}$ representa a principal fonte intracelular de radicais de oxigênio sob condições fisiológicas. Na mitocôndria, o ciclo de Krebs gera nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), que doa elétrons para a cadeia

transportadora de elétrons para produzir ATP. No entanto, o ciclo de Krebs também produz substratos que regeneram a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que, por sua vez, regenera enzimas antioxidantes (Cadenas e Davies, 2000; Ferreira e Matsubara, 1997; Kovacic *et al.*, 2017).



✓ **NADPH oxidase**

A NADPH oxidase é um complexo enzimático ligado à membrana que catalisa a produção de superóxido a partir de oxigênio e NADPH (Reação 7). A NADPH oxidase é encontrada principalmente em fagócitos e também no endotélio do tecido cardiovascular (Mohammed *et al.*, 2015).



✓ **Fagocitose**

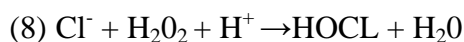
Os fagócitos como monócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, entre outros compõem a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos e eliminação de células mortas ou por morrer através da fagocitose, sendo de extrema importância para o organismo. No entanto ao longo das atividades dessas células são produzidos inúmeros ER como $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , ácido hipocloroso (HOCL), ONOO^- que danificam o alvo, e também tecidos próximos através da atividade de enzimas como NADPH oxidase, SOD, NOS e mieloperoxidase (no caso de eosinófilos, peroxidase de eosinófilos) (Babior, 2000).

✓ **Xantina oxidase**

A xantina oxidase é uma enzima importante no catabolismo das bases purinas que catalisa a oxidação de hipoxantina para xantina e conseqüentemente a ácido úrico. Essa enzima doa elétrons ao oxigênio gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 dentro da célula (Kim *et al.*, 2015).

✓ **Mieloperoxidase**

A enzima mieloperoxidase está presente em grânulos citoplasmáticos de neutrófilo. No processo inflamatório a mieloperoxidase de neutrófilos ativados catalisa a reação entre H_2O_2 e íons cloreto gerando HOCL um potente oxidante e agente antimicrobiano (Reação 8) (Nimse e Pal, 2015; Phaniendra, Jestadi e Periyasamy, 2015).



✓ **Ciclooxigenase**

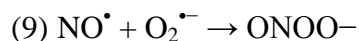
A ciclooxigenase (COX) possui 2 isoformas principais COX-1 e COX-2 e apresenta-se como enzima bifuncional (atividades de COX e peroxidase) que libera o ácido araquidônico dos fosfolipídios da membrana e catalisa a conversão desse ácido em prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano). A COX adiciona duas moléculas de O₂ ao ácido araquidônico pela sua atividade de bioxigenase resultando em um hidroperóxido cíclico instável (PGG₂). PGG₂ é reduzido a endoperóxido (PGH₂) pela sua atividade de peroxidase, convertendo em prostanóides estáveis por várias sintases. Essa atividade gera radicais NAD[•] e NADP[•] que podem gerar O₂^{•-} (Bhattacharyya *et al.*, 2014).

✓ **Lipoxigenase**

As lipoxigenases (LOX) formam uma família de enzimas de peroxidação lipídica que catalisam a oxidação de ácidos graxos livres e esterificados. LOX desempenham um papel principal na oxidação de fosfolipídios e são as enzimas responsáveis pela geração de leucotrienos a partir de ácido araquidônico (Anthonymuthu, Kenny e Bayir, 2016).

✓ **Óxido nítrico sintase (NOS)**

A enzima óxido nítrico sintase produz espécies reativas de nitrogênio (RNS), como NO[•] a partir da arginina. O NO[•] e o O₂^{•-} reagem para produzir ONOO⁻ um forte oxidante que pode atacar vários alvos biológicos (Reação 9) (Nimse e Pal, 2015)



Quando há produção excessiva dessas espécies que supera a capacidade antioxidante surge o estresse oxidativo.

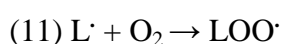
2.2.2 Dano oxidativo às biomoléculas

O desequilíbrio oxidativo induzido por Aβ causa dano à biomoléculas, sendo considerado a principal causa de neurodegeneração, possivelmente através de meios apoptóticos. O estresse oxidativo leva ao ataque de ER às células neurais que sofrem perda funcional ou sensorial contribuindo assim para a neurodegeneração. Nessa condição há aumento dos níveis dos subprodutos relacionados à peroxidação lipídica (4-hidroxinonal, malonidialdeído), oxidação de proteínas (carbonila) e oxidação de DNA /

RNA (por exemplo, 8-hidroxildeoxiguanosina e 8-hidroxilguanosina) (Fischer e Maier, 2015; Thanan *et al.*, 2015; Uttara *et al.*, 2009).

✓ Peroxidação lipídica

Lipídios são componentes essenciais da membrana celular exercendo uma importante função estrutural e de controle. A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia que pode ser dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação que resulta em perda de propriedades da membrana. Inicialmente ER atacam lipídeos contendo ligações duplas carbono-carbono (-CH₂-), especialmente ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (LH) de membrana retirando hidrogênio ou adicionando oxigênio, formando assim um radical lipídico (L[•]) e H₂O (Reação 10). L[•] reage com O₂ formando o radical peroxila (LOO[•]) (Reação 11). O LOO[•] é capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de outro PUFA e assim iniciar uma reação em cadeia (etapa da propagação) com a geração de hidroperóxido lipídico (LOOH). Íons de metais de transição, como ferro e cobre, podem participar dessa sequência catalisando a geração de radicais lipídicos RO[•], ROO[•] e OH[•] a partir dos hidroperóxidos. Finalmente os radicais formados geram produtos não radicalares (fase de terminação). A partir dos radicais RO[•] e ROO[•] também pode se formar aldeídos e outros subprodutos. Outros lipídios também são alvos dos danos oxidativo como glicolipídios, fosfolipídios e colesterol. A lipoperoxidação também pode ocorrer por via enzimática pela ação de enzimas como lipoxigenases, ciclooxigenases e citocromo P450 (Ayala, Muñoz e Argüelles, 2014; Gaschler e Stockwell, 2017; Repetto, Semprine e Boveris, 2012).



$\text{LOOH} + \text{M}^{n+} \rightarrow \text{LO}^{\bullet} + \text{HO}^- + \text{M}^{n+1}$ reação 10 (reação da formação dos radicais)

$\text{LOOH} + \text{M}^{n+1} \rightarrow \text{LOO}^{\bullet} + \text{H}^+ + \text{M}^{n+}$ reação 11

LOOH e aldeídos, como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal (HNE) e isoprostanos, são subprodutos da lipoperoxidação que podem ser encontrados em amostras biológicas e utilizados como indicador do estresse oxidativo. A peroxidação lipídica resulta na alteração na fluidez e na permeabilidade da membrana, podendo levar a morte celular (Halliwell e Chirico, 1993; Sharma *et al.*, 2012).

A peroxidação é um mecanismo importante de neurodegeneração no cérebro com DA. O cérebro é abundante em PUFA ácido araquidônico e ácido

docosohexenóico, que são altamente oxidáveis e, assim constituintes vulneráveis dos fosfolípidios da membrana. Há uma forte relação entre as alterações de membrana e patogênese da DA. Nessa condição há altos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), composição fosfolipídica, níveis de aldeídos α - e β -insaturados e isoprostanos em diferentes regiões do cérebro, principalmente hipocampo (Butterfield *et al.*, 2001).

✓ Carbonilação proteica

A carbonilação proteica é uma das formas fundamentais de oxidação de proteínas sendo muito utilizada como indicador de estresse oxidativo. A formação de proteínas carboniladas (aldeídos e cetonas) pode ocorrer de três formas principais: ataque direto de ERO a específicas cadeias laterais de aminoácidos (Glutamato, Treonina, Aspartato, Lisina, Arginina e Prolina); alteração de resíduos de histidina, cisteína e lisina por subprodutos da peroxidação lipídica, como MDA e 4-HNE; reação com açúcares redutores. A introdução de grupos carbonila nas cadeias laterais de aminoácidos específicos é um processo oxidativo irreversível que desencadeia a sua degradação pela célula (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Dasgupta *et al.*, 2013; Yan e Forster, 2011). No entanto, essas proteínas podem conseguir evitar a degradação, formando agregados de alto peso molecular que se acumulam com o tempo tornando-se citotóxicos e estão altamente associados a algumas patologias como a DA (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Nyström, 2005). O aumento da susceptibilidade à proteólise e a inativação enzimática são algumas das principais consequências da oxidação proteica. As cadeias laterais das proteínas oxidadas podem reagir com 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas, produto detectável (Figura 3) (Sharma *et al.*, 2012; Stadtman e Levine, 2000).

➤ Dano ao DNA

O excesso de RL pode levar a oxidação direta dos ácidos nucleicos, gerando dano ao DNA pela quebra das cadeias ou por ligações cruzadas. Quando os mecanismos celulares essenciais são afetados pode levar a morte celular, ou mutações genômicas sendo transmitidas para as gerações futuras (Berra e Menck, 2006).

O oxigênio é vital para todas as células vivas, assim como as neuronais, no entanto o excesso podem levar ao dano oxidativo e mutação ao DNA. O oxigênio participa do metabolismo da glicose na mitocôndria através da fosforilação oxidativa e

gera energia (ATP). Qualquer mutação no DNA mitocondrial leva a geração de ATP prejudicada e altera a cascata da fosforilação oxidativa afetando a função neuronal (Uttara *et al.*, 2009).

As quebras de DNA de fita simples e dupla são particularmente detectadas no cérebro com doenças neurodegenerativas como DA. Sendo as quebras de DNA de fita dupla as lesões de DNA mais genotóxicas e as lesões não reparadas podem levar a morte celular neural, e conseqüente neurodegeneração (Thanan *et al.*, 2015). O dano cumulativo no DNA contribui para a perda progressiva das células neuronais. Com o aumento do estresse oxidativo no cérebro com Alzheimer, há oxidação de várias bases no DNA nuclear e mitocondrial com acúmulo de 8-oxoguanina (8-oxoG), reconhecido como principal marcador no cérebro com DA. O acúmulo de 8-oxoG é um evento precoce, ocorrendo antes do início da demência (Abolhassani *et al.*, 2017). Outra forma de avaliar o dano no DNA é através da frequência de micronúcleos, que são cromossomos ou fragmentos de cromossomos que ficam para trás durante a anáfase e não estão incluídos no núcleo principal, sendo menores, porém morfológicamente semelhantes (Milić *et al.*, 2015; Schmid, 1975).

Sendo assim, o estresse oxidativo está relacionado com surgimento e progressão de patologias através da oxidação de biomoléculas e modificações de vias de sinalização acarretando o desequilíbrio dos ciclos celulares, interferência no metabolismo celular, instabilidade, mudança epigenética e mutação (Thanan *et al.*, 2015). Estudos mostram que o estresse oxidativo é uma condição marcante no início e no avanço da DA, mas não está totalmente claro por qual mecanismo isso ocorre. Uma das hipóteses mais aceita é que o acúmulo de A β leva ao estresse oxidativo e vice-versa (Chen e Zhong, 2014). Como o estresse oxidativo é fundamental no desenvolvimento da DA, antioxidantes podem ser importantes aliados no tratamento dessa doença (Zhao e Zhao, 2013).

2.3. Defesas antioxidantes

O excesso de RL no organismo é combatido por mecanismos de defesas antioxidantes que são produzidos *in vivo* ou absorvidos da dieta. Os antioxidantes impedem danos nos tecidos induzidos por RL prevenindo a formação desses radicais, através da atividade sequestradora ou promovendo a sua decomposição (Halliwell, 2008; Young e Woodside, 2001). Antioxidante é definido como “qualquer substância

que, quando presentes em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou evita a oxidação do referido substrato” (Halliwell e Gutteridge, 1999). O sistema de defesa antioxidante pode ser enzimático (catalase - CAT, SOD, glutathione peroxidase - GPx) ou não enzimático (glutathione reduzida-GSH, vitamina C e E, polifenóis, entre outros), também podem ser produzidas endogenamente ou absorvidos da dieta (Halliwell, 2008) e atuam por vários mecanismos antioxidantes (Sen *et al.*, 2010).

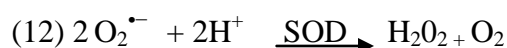
Os antioxidantes endógenos e exógenos previnem e reparam os danos nos tecidos causados pelos RL evitando sua formação, através da atividade sequestradora ou promovendo a sua decomposição, reduzindo assim, o risco do surgimento e progressão de várias doenças, como as neurodegenerativas, com efeitos neuroprotetores sobre neurônios em DA (Bhat *et al.*, 2015; Poprac *et al.*, 2017). Além disso, a ingestão de antioxidantes naturais tem sido associada a vários efeitos benéficos a saúde (Gomathi *et al.*, 2012).

2.3.1 Sistema enzimático

Dentre os antioxidantes enzimáticos mais importantes estão SOD, CAT e GPX. O sistema antioxidante enzimático e a GSH estão presentes, predominantemente, no meio intracelular, utilizando o eritrócito para sua análise (Sharma *et al.*, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2007).

➤ Superóxido dismutase (SOD)

A SOD foi descoberta por MacCord e Fridovich em 1968, sendo identificada como a primeira enzima conhecida por atuar em um substrato de RL. As principais formas de SOD encontradas em humanos são a Cu/ZnSOD localizada no citosol, e a MnSOD encontrada na mitocôndria. A SOD é uma importante enzima antioxidante endógena atuando como o primeiro sistema de linha de defesa contra ERO, pois catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet -}$ à H_2O_2 e O_2 (Reação 12) (Gutteridge e Halliwell, 2000; Sen *et al.*, 2010).



➤ **Catalase (CAT)**

A CAT é uma enzima antioxidante localizada principalmente em peroxisomos celulares e citoplasma, e catalisa a conversão de H₂O₂ a O₂ e H₂O (Reação 13) (Chen *et al.*, 2012).



➤ **Glutathione peroxidase (GPx)**

A GPx é uma das 25 classes conhecidas de selenoproteínas. Elas catalisam a redução de peróxidos em geral à água ou álcoois utilizando GSH como um doador de elétron sendo oxidada a dissulfeto da glutathione (GSSG) (Reação 14). Os elétrons podem ser regenerados através glutathione reductase (GR) que promove a transferência de hidrogênio do NADPH (Reação 15) (Battin e Brumaghim, 2009; Margis *et al.*, 2008)



2.3.2 Sistema não enzimático

O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a GSH, sintetizado no organismo, e os antioxidantes ingeridos pela dieta como, ascorbato, tocoferóis e compostos fenólicos. Sistema antioxidante não enzimático localiza-se, principalmente, no meio extracelular, sendo por isso analisado em plasma e soro (Sharma *et al.*, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2007).

➤ **Glutathione (GSH)**

A GSH é um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), que existe no organismo em suas formas reduzida e oxidada, atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, destacando-se na função de cofator da família de enzimas GPx, em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a GSSG. A GSH é o único tiol não proteico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de ERO, muitas das suas reações envolvem o grupo sulfidril (SH), que é altamente polarizável (Huber, Almeida e Fátima, 2008; Júnior *et al.*, 2001).

➤ **Vitamina C**

A Vitamina C (ácido ascórbico) é definida como o principal antioxidante hidrossolúvel que desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra o dano oxidativo. Em pH fisiológico nos sistemas biológicos, 99,95% da vitamina C encontra-se na forma de ascorbato (Asc⁻), que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um H• ou [H⁺ + e⁻] para um radical. Atua eficientemente sobre o O₂•⁻, o H₂O₂, o hipoclorito (ClO⁻) e os radicais OH• e ROO•. O Asc⁻ pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana (Puertollano *et al.*, 2011; Vasconcelos *et al.*, 2007)

➤ **Vitamina E**

A vitamina E é constituída, principalmente, por quatro tocoferóis, e secundariamente por quatro tocotrienóis, sendo o α -tocoferol o mais ativo. A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel e um potente inibidor da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e lipoproteínas. Estas substâncias agem como doadores de H para o radical ROO•, resultante com formação do radical tocoferila, que pode ser regenerado por outros antioxidantes como ascorbato, GSH a tocoferol (Barreiros, David e David, 2006; Hamid *et al.*, 2010).

➤ **Polifenóis**

Os polifenóis ou compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes na dieta. E são produtos do metabolismo secundário de plantas e possuem diversas bioatividades, como antimicrobiana, antiviral, antialérgica, antiinflamatória e protetora contra o envelhecimento celular e cutâneo, devido ao seu potencial antioxidante (Mocan *et al.*, 2017). A expressão "compostos fenólicos" se deve as substâncias que possuam um anel aromático tendo um ou mais substituintes hidroxila. São divididos em várias classes diferentes, sendo os flavonóides e ácidos fenólicos os compostos fenólicos mais frequentes na natureza (Geleijnse e Hollman, 2008; Scalbert *et al.*, 2005). Os flavonóides podem ser categorizados como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianidinas e chalconas, esses compostos têm poderosas atividades antioxidantes *in vitro*, sendo capazes de inibir uma ampla variedade de ERO e ERN (Chua, 2013; Halliwell, 2008). Os ácidos fenólicos podem ser classificados em dois grupos principais, os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos, que são derivados de moléculas não fenólicas do ácido benzóico e do ácido cinâmico, respectivamente (Heleno *et al.*, 2015). Compostos identificados em nosso estudo:

✓ Ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico)

É um composto fenólico da família do ácido hidroxicinâmico e pode ser encontrado em maçãs, alcachofras, cenouras, grãos de café, berinjelas, uvas, kiwis, peras, batatas, chá e tomates (Santana-Gálvez, Cisneros-Zevallos e Jacobo-Velázquez, 2017). Este polifenol possui várias propriedades promotoras de saúde, como uma forte atividade antimicrobiana (Bajko *et al.*, 2016), efeito anti-inflamatório, entre outros (Ye *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2016).

✓ Ácido cafeico

O ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico) é um fitoquímico derivado do ácido cinâmico e está presente em frutas, chá, vinho e especialmente no café (apesar dessa abundância, o ácido cafeico não está quimicamente relacionado à cafeína) (Deshmukh *et al.*, 2016). O ácido cafeico e seus derivados demonstraram um amplo espectro de atividades biológicas, tais como propriedades antioxidantes (Cheng *et al.*, 2014; Migliori *et al.*, 2015), anticancerígenas (Chiang *et al.*, 2014; Duan *et al.*, 2017) e antiinflamatórias (Basu Mallik *et al.*, 2016).

✓ Ácido elágico

Ácido elágico (2,3,7,8-tetra-hidroxicromeno [5,4,3-cde] cromen-5,10-diona) é um derivado do ácido benzóico, pertencente à classe dos taninos hidrolisáveis, e é encontrado em várias frutas (especialmente em frutas vermelhas e nozes) e alimentos à base de frutas ou bebidas, como sucos, geleias e compotas. Estudos demonstraram que o ácido elágico tem efeitos anti-hiperglicêmicos, anti-inflamatórios e antioxidantes (Amin e Arbid, 2017; Bensaad *et al.*, 2017; Dalvi *et al.*, 2017).

✓ Rutina

Rutina (3',4',5,7-tetrahidroxi-flavona-3-rutinosídeo) é um flavonoide com importantes atividades farmacológicas e tem provado ser eficaz na redução do risco de doenças crônicas. A rutina demonstra um efeito antidiabético que é importante para a prevenção de complicações diabéticas, além de seus efeitos cardioprotetores, antioxidantes e anticancerígenos (Saklani *et al.*, 2016; Sghaier *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2016).

✓ Quercetina

A quercetina (3,3,4,5,7-pentaidroxiflavona) é um flavonoide natural encontrado em frutas, vegetais e chá, que é conhecido por ter múltiplas propriedades bioativas, como o efeito cardioprotetor pelo decréscimo dos marcadores inflamatórios, aumento das proteínas de normalização e enzimas endógenas antioxidantes (Ballmann *et al.*, 2017) e

um efeito anticancerígeno, aumentando a apoptose celular e inibindo a progressão do ciclo celular (Liu *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2017).

✓ Apigenina

A apigenina (4,5,7-tri-hidroxi-flavona) é um flavonoide amplamente encontrado em várias frutas, ervas medicinais e vegetais, como repolho, aipo, pimentão e ervas medicinais, e devido à sua capacidade ou à capacidade de seus metabólitos de atravessar a barreira cérebro-sangue, tem sido de interesse na prevenção e tratamento de distúrbios neurodegenerativos, tais como a DA, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras. A apigenina é considerada muito segura e, mesmo em altas doses, nenhuma toxicidade foi relatada (Venigalla, Gyengesi e Munch, 2015; Zhao *et al.*, 2013).

Estudos sugerem fortemente uma contribuição de antioxidantes naturais para a prevenção e tratamento de várias doenças neurodegenerativas como Alzheimer mostrando importantes efeitos neuroprotetores (Colizzi, 2018; Kim *et al.*, 2015; Schimidt *et al.*, 2017)

2.4 Yacon

2.4.1 Origem

Yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] pertence à família *Asteraceae* – também denominada de *Compositae* – algumas bibliografias também utilizam *Polymnia sonchifolia* Poepp. & Endl. e *Polymnia edulis* Wedd (Santana e Cardoso, 2008). O Yacon é uma planta perene nativa da região andina da América do Sul, cultivada principalmente na Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e noroeste da Argentina, mas também tem seu cultivo expandido por outros lugares do mundo (Estados Unidos, Nova Zelândia, Japão, República Checa, Coreia do Sul, Tailândia, Filipinas, Rússia, Estônia, Eslováquia, China, Taiwan, entre outros). Nos Andes seu cultivo é desde a antiga civilização Inca, sendo utilizada como alimento e para fins medicinais para a população local (Borges *et al.*, 2012; Moura, de *et al.*, 2012). No Brasil essa espécie chegou, por volta de 1989, na região de Capão Bonito (SP), trazida por imigrantes japoneses, que faziam uso das folhas e raízes para tratamento do diabetes (Oliveira *et al.*, 2009). Também é chamado de “llaqon”, “llacum”, “llacuma”, “yacumpi”, “aricoma”, “Chicama”, “jiquima” e “jiquimilla” nos Andes, além de poire de terre (francês) e Yacon strawberry (Estados Unidos). No entanto, é conhecido

principalmente pelo termo espanhol yacon derivado da palavra “yaku”, que significa “aguado”, devido ao alto teor aquoso das raízes (Caetano *et al.*, 2016; Ojansivu, Ferreira e Salminen, 2011).

No uso popular, as raízes tuberosas do yacon são consumidas *in natura* devido a sua suculência e doçura, possuem gosto semelhante a frutas como maçã ou pera. As folhas desidratadas são usadas na forma de chá para tratamento de diabetes e distúrbios do colesterol (Valentová *et al.*, 2006).

2.4.2 Aspectos agronômicos

O yacon é uma espécie do tipo perene, cujos caules aéreos são cilíndricos, de coloração esverdeada. Apresentam pilosidade em toda superfície e as hastes aéreas podem atingir de 2 a 3 m de altura. A planta apresenta eixos aéreos, com folhas (Figura 3) e gemas vegetativas e florais (Duarte, Wolf e Paula, De, 2008). O sistema subterrâneo é constituído de três partes distintas: os rizóforos que são ricos em frutanos e fibras não digeríveis, dos quais se originam gemas que darão origem a uma nova planta; as raízes de absorção e fixação; e as raízes tuberosas ou de reserva, também ricas em frutanos, porém menos fibrosas, mais suculentas, translúcidas (Vilhena, Câmara e Kakihara, 2000). As raízes do yacon são semelhantes à batata doce em aparência, pesando aproximadamente 500 g cada (Figura 4). Cada planta de yacon tem cerca de 20 unidades e pode produzir até 10 kg de raízes. As raízes do yacon têm cerca de 10 cm de espessura e 20 cm de comprimento, com formas e tamanhos variados (Cao e Ma, 2018).

É uma planta que cresce em 3500 metros de altitude, em uma faixa ideal de temperatura de 18 a 25 °C, não requer fertilizantes, pesticidas ou cuidados especiais, estas facilidades permitem a adaptação em diferentes regiões climáticas e solos (Arnao *et al.*, 2012; Caetano *et al.*, 2016). Por ter sabor doce na parte comestível é considerado um fruto, porém um estudo anatômico realizado em 2004 demonstrou que a organização do sistema vascular desta planta é típica de raiz, e com isso justifica-se apenas a utilização do termo raiz tuberosa (Machado *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado que o melhor período para a colheita de yacon em regiões tropicais é entre 31 e 35 semanas após o cultivo, devido a uma maior quantidade de frutanos (Olivera, de e Nishimoto, 2004).

Em vários países existe uma grande variedade de produtos derivados das raízes de yacon, como farinha, produtos desidratados, fatias ou "chips", sucos, purês e

adoçantes na forma de xarope com um alto teor de fruto-oligossacarídeos (FOS) (Delgado *et al.*, 2013). Durante o processamento destes produtos, é preciso controlar o escurecimento enzimático que está relacionado com a oxidação de compostos fenólicos principalmente pela enzima polifenol oxidase (PPO), sendo este, o maior responsável pela perda da qualidade do produto. Atualmente, as principais alternativas para contornar esse problema é por tratamento térmico, uso de antioxidantes ou ambos. A desidratação é a medida mais indicada, sendo realizada o mais rápido possível após a colheita (Neves e Silva, Da, 2007; Scher, Oliveira Rios, De e Noreña, 2009).

2.4.3 Composição nutricional

O yacon possui raiz tuberosa constituída principalmente de água (aproximadamente 70% do peso fresco) e carboidratos. A cada 1 g de raiz de yacon há aproximadamente 750 mg de carboidratos, sendo que 58% são FOS, 24,7% frutose, 8,5% glicose e 7,6% de sacarose, esse composição varia de acordo com tipo de cultura, condições climáticas e solo (Genta *et al.*, 2005).

FOS são polímeros curtos de frutose com uma polimerização de 3 a 10 frutanos. Esses FOS são fermentados no colón e esse processo resulta em importante efeito bifidogênico e outros benefícios à saúde humana (Caetano *et al.*, 2016; Gomes da Silva *et al.*, 2017; Ojansivu, Ferreira e Salminen, 2011).

Diferentemente da maioria das outras raízes tuberosas no qual o principal carboidrato de reserva é o amido, o yacon é rico em FOS e por isso vêm sendo considerado um alimento funcional devido a presença de grande quantidade desse frutano. Alimentos funcionais são aqueles que podem contribuir para a manutenção da saúde além de desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas (Moraes e Colla, 2006; Moura, de *et al.*, 2012).

Além disso, as raízes e, principalmente as folhas do yacon são ricas em compostos fenólicos, sendo estes responsáveis por inúmeros efeitos benéficos na saúde humana. Estudos fitoquímicos demonstraram que os principais compostos antioxidantes presentes no yacon são o ácido fenólicos (ácido clorogênico, ferúlico, caféico) e flavonóides (rutina, quercetina, apigenina, entre outros) (Arnao *et al.*, 2012; Khajehei *et al.*, 2018; Martinez-Oliveira *et al.*, 2018; Simonovska *et al.*, 2003; Takenaka *et al.*, 2003). O conteúdo de compostos varia de acordo com o tipo de extração e origem do material (Valentova *et al.*, 2003)



Figura 3- Folhas do yacon

Fonte: o autor



Figura 4 – Raízes

Fonte: O autor

FOS

FOS são frutanos compostos por cadeias curtas lineares de moléculas de frutose. Os frutanos são sintetizados a partir da sacarose nos vacúolos das células das folhas, caules e raízes e tem como função a proteção contra a secagem e como carboidratos de reserva de inúmeras plantas. FOS estão presentes em vários alimentos naturais como alho, cebola, aspargos, alcachofra, banana, trigo e principalmente no yacon (Caetano *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2017). Os FOS são designados como fibras alimentares solúveis e prebióticos (Borges *et al.*, 2012). Prébiotico foi definido por Gibson e Roberfroid, (1995) como “ingredientes nutricionais não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado bactérias benéficas do cólon, melhorando a saúde do seu hospedeiro”. Os prebióticos são carboidratos não digeríveis quimicamente estáveis a ampla temperatura e intervalos de pH (Singh *et al.*, 2017).

Os FOS resistem à hidrólise das enzimas digestivas humanas devido à presença das ligações $\beta - (2 \rightarrow 1)$ e à ausência de enzimas capazes de quebrar essas ligações em humanos, passando pelo trato gastrointestinal superior sem qualquer prejuízo na sua estrutura, sendo fermentados no cólon (Paredes *et al.*, 2018; Teixeira *et al.*, 2009). Esse processo fermentativo provoca um efeito bifidogênico, estimulando seletivamente a proliferação de bactérias não patogênicas, como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., enquanto reduz ou controla o crescimento de populações patogênicas (*Clostridium* spp. e *Escherichia coli*). Ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) (acetato, propionato e butirato) e outros metabólitos são os produtos finais da fermentação FOS pela microbiota intestinal e exercem funções fisiológicas importantes (Caetano *et al.*, 2016; Campos *et al.*, 2012; Rolim *et al.*, 2010).

A microbiota intestinal é de extrema importância exercendo funções como auxílio na digestão de substâncias complexas, síntese de compostos bioativos benéficos, aumento da biodisponibilidade de minerais, inibição do crescimento de patógenos e prevenção de várias patologias. Assim a ingestão de prebióticos como FOS é importante para a manutenção da saúde. Em geral, os FOS são associados a inúmeros benefícios a saúde humana, como baixo valor energético, aumento da absorção de minerais como cálcio, magnésio e ferro, inibição dos estágios iniciais do câncer de colón, redução de lipídios plasmáticos através da redução da absorção intestinal do colesterol, entre outros (Coudray *et al.*, 2003; Martins, Delmaschio e Cordeiro, 2011; Roselino *et al.*, 2012).

2.4.4 Atividades biológicas

O yacon possui várias atividades biológicas descritas:

➤ **Hipoglicêmico, Hipolipêmico, Perda de peso.**

- ✓ Genta *et al.* (2009) avaliaram o consumo diário de xarope, obtido pela concentração do suco de raízes de yacon, em mulheres dislipidêmicas e obesas na pré-menopausa. demonstrando que o consumo diário recomendado de yacon de 0.14 g FOS/kg, proporcionou decréscimo no peso corporal, aumento da frequência de defecação, sensação de saciedade e melhora na resistência à insulina desses pacientes (Genta *et al.*, 2009).
- ✓ Oliveira, Braga e Fernandes (2013) analisaram o efeito do extrato aquoso de raízes de yacon em ratos saudáveis e com diabetes mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina (STZ). Nos ratos diabéticos o tratamento com yacon controlou os níveis de glicemia e dislipidemia e ainda reduziu os níveis de ALT sugerindo um efeito hepatoprotetor em ratos com DM1 induzido por STZ.
- ✓ Aybar *et al.* (2001) pesquisaram o efeito do extrato das folhas do yacon em ratos normais, transitoriamente hiperglicêmicos e diabéticos induzidos por STZ. Observou-se que a administração de chá de yacon a 2% *ad libitum* durante 30 dias diminuiu significativamente a hiperglicemia nos ratos diabéticos, além de melhorar os níveis plasmáticos de insulina, peso corporal e parâmetros renais.
- ✓ Miura, Itoh e Ishida (2004) notaram que a administração do extrato aquoso de folhas de yacon (500mg/kg) por 6 semanas reduziu a hiperglicemia e a hiperlipidemia em camundongos diabéticos tipo 2 e não afetou a glicose em ratos normais.

➤ **Anti-inflamatório e neuroprotetor**

- ✓ Baek *et al.* (2018) determinaram os efeitos do extrato etanólico da folha de yacon 40 mg/kg/dia por 7 dias sobre a neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeos (LPS) *in vitro* (células microgliais da linhagem BV2) e *in vivo* (ratos). Extrato da folha do yacon reduziu a produção de NO e a expressão de sinais inflamatórios (óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase (COX) -2, interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em células BV2 estimulada por LPS. *In vivo* a administração do extrato reduziu o dano tecidual e regulou os níveis dos fatores inflamatórios. Assim o extrato da folha do yacon atenua a neuroinflamação, mostrando-se neuroprotetor.

➤ **Antioxidante**

- ✓ Habib *et al.* (2015) avaliaram a atividade antioxidante de ratos diabéticos induzidos por STZ e suplementados com farinha da raiz do yacon por 90 dias. Marcadores de estresse oxidativo foram medidos em homogenatos de fígado e rim e foi constatada uma alta atividade antioxidante avaliada através dos seus marcadores (CAT, SOD, GPx e GSH), bem como uma redução na peroxidação lipídica em ambos os órgãos.

➤ **Antimicrobiana**

- ✓ Lin, Hasegawa e Kodama, (2003) isolaram e identificaram seis lactonas sesquiterpênicas do tipo melampolide da folha do yacon com atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* por disco difusão.
- ✓ Joung *et al.* (2010) avaliaram os efeitos antibacterianos e sinérgicos do extrato metanólico das folhas de yacon e suas frações contra seis cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e um padrão sensível a meticilina usando o método de disco-difusão e determinando concentração inibitória mínima na presença e na ausência de luz. Esse estudo demonstrou o aumento da atividade antimicrobiana de folhas de yacon contra MRSA na presença de luz e apresentou um importante sinergismo com ampicilina ou oxacilina.

➤ **Prebiótica**

- ✓ Campos *et al.* (2012) demonstraram que a farinha de yacon adicionada a dieta de porcos-da-índia por oito semanas promoveu um efeito prébiotico com crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, resultando em altos níveis de ácidos graxos de cadeia curta no material cecal e outros efeitos demonstrando um exercer papel importante na saúde do cólon.
- ✓ Lobo *et al.* (2007) avaliaram ratos alimentados com farinha de yacon (5 ou 7,5% de FOS) por 27 dias e observaram um aumento na profundidade e número de criptas totais e bifurcadas com alteração significativa na histologia do ceco, maior retenção mineral óssea (Ca e Mg) e propriedades biomecânicas (pico de carga e rigidez). Esses resultados demonstram que o consumo do yacon pode ser um aliado na manutenção da saúde dos ossos.

➤ **Segurança**

- ✓ Genta *et al.* (2005) analisaram os efeitos subcrônicos (4 meses) do consumo da raiz de yacon em ratos normais, que recebiam duas doses diárias equivalentes a

340 e 6800 mg FOS/ peso corporal. Os animais não apresentaram resposta negativa, toxicidade ou efeitos adversos nessas doses, apenas foi observado hipertrofia do ceco nos animais que receberam na dose mais elevada.

2.5 Toxicidade

A fitoterapia está em alta devido às propriedades dos fitoquímicos com efeitos benéficos em várias doenças como a DA. No entanto alguns compostos podem trazer prejuízos à saúde, induzindo a citotoxicidade e danos ao DNA (Mocan *et al.*, 2017), tornando fundamental uma avaliação toxicológica para avaliar os riscos no uso de plantas como o yacon (Mellado-García *et al.*, 2017).

A redução na viabilidade celular indica potencial citotóxico. Danos causados ao DNA por agentes tóxicos são os principais responsáveis por modificações genéticas e conseqüentemente, pelas alterações cromossômicas. A genotoxicidade pode ocorrer de uma ruptura de cadeias de DNA, levando a apoptose, carcinogênese ou alteração do fenótipo. Já a mutagenicidade está associada a dano ao cromossomo, resultando em mutações genéticas (Akhtar *et al.*, 2016; Ari *et al.*, 2012).

➤ Citotoxicidade

Agentes físicos e químicos podem prejudicar o metabolismo celular causando toxicidade através de inúmeros mecanismos, tais como dano das membranas celulares, inibição de síntese protéica, ligação irreversível a receptores, inibição do alongamento de polidesoxinucleotídeos e reações enzimáticas. Os testes de viabilidade celular e citotoxicidade *in vitro* são importantes indicadores de toxicidade e utilizam células de tecidos para avaliar o efeito de drogas e outros agentes no crescimento celular, reprodução e efeitos morfológicos. O índice de viabilidade e/ou taxas de proliferação de células indicam as condições celulares. Esses testes baseiam-se em diversas atividades da célula como permeabilidade da membrana celular, função enzimática, aderência celular, formação de ATP, geração de coenzima e atividade de captação de nucleotídeos. O teste de citotoxicidade é vantajoso, pois é simples, rápido, com alta sensibilidade e não requer uso de animais. Entretanto, estes ensaios ainda não evoluíram o suficiente para substituírem completamente testes *in vivo*. Os ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular podem ser classificados em: Exclusão de corante (azul tripan, eosina, vermelho do Congo, ensaios de eritrosina B); Ensaios colorimétricos (ensaio MTT, ensaio MTS, ensaio XTT, ensaio WST-1, ensaio WST-8,

ensaio LDH, ensaio SRB, ensaio NRU e ensaio cristal violeta); Ensaios fluorométricos (ensaio alamarBlue e ensaio CFDA-AM); Ensaios luminométricos (ensaio de ATP e ensaio de viabilidade em tempo real) (Aslantürk, 2018; Kubásek *et al.*, 2016; Li, Zhou e Xu, 2015).

Um dos métodos mais utilizados na atualidade para determinar a citotoxicidade é o ensaio MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, um teste colorimétrico que avalia a viabilidade celular. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água que desidrogenases mitocondriais de células vivas que pode clivar o anel de tetrazólio e o MTT amarelo é transformado em formazan, um composto roxo insolúvel em soluções aquosas. O formazan é impermeável às membranas celulares e, conseqüentemente acumula-se em células viáveis. Portanto, a quantidade de formazan produzido tem uma correlação positiva com o número de células e sua atividade, refletindo o estado funcional da cadeia respiratória (Fotakis e Timbrell, 2006; Stockert *et al.*, 2012; Terpilowska e Siwicki, 2018).

Outro método bastante utilizado é o azul de tripan que se baseia no princípio de exclusão de corante distinguindo células vivas das células mortas. As células vivas com membranas celulares íntegras barram a entrada do corante azul de tripan, enquanto que as células mortas com membranas comprometidas permitem a passagem do corante. Portanto as células mortas são coradas e células viáveis não, podendo ser visualizadas e quantificadas com um microscópio de campo claro (Bellamakondi *et al.*, 2014; Mbeh *et al.*, 2014).

➤ Mutagenicidade

Inúmeras substâncias podem ser danosas ao DNA e as células reagem a esses danos por dois mecanismos: reparo do DNA ou apoptose. Quando há um dano ao DNA e a replicação celular ocorre antes de completar o reparo pode gerar mutações. Atualmente há vários testes disponíveis para avaliar o potencial mutagênico de substâncias de interesse, entre eles podemos citar: ensaio de mutação reversa bacteriana (teste Ames) e o teste de micronúcleo (Akhtar *et al.*, 2016; Meintières *et al.*, 2001).

O teste do micronúcleo permite a detecção de danos como quebra de cromossomo ou dano ao fuso mitótico causado por agentes tóxicos (clastogênicos ou aneugênicos) no material genético de células expostas. Micronúcleo é um núcleo independente formado por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que não foram incluídos no núcleo principal durante o processo de divisão celular permanecendo no

citoplasma, ou seja, o micronúcleo é o resultado de uma mutação a nível cromossômico que foram transmitidas a células-filhas e devem preencher os seguintes requisitos: estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ao do núcleo principal; borda notória, indicando uma membrana nuclear; ter forma arredondada; situado no citoplasma; diâmetro inferior a 1/5 do núcleo principal. O teste do micronúcleo pode ser usado *in vitro* e *in vivo* para avaliar atividade de agentes clastogênicos e aneugênicos (Araldi *et al.*, 2015; Hintzsche *et al.*, 2017; Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2016; Schmid, 1975).

➤ Genotoxicidade

Genotoxicidade ocorre quando substâncias têm a capacidade de interagir com ácidos nucleicos levando a aberrações cromossômicas e/ou alterações na estrutura de DNA, acarretando prejuízos irreversíveis na célula. A predisposição a doenças, aumento da morbidade/mortalidade, mudanças nas características hereditárias, capacidade reprodutiva prejudicada são algumas das prováveis consequências desse dano ao material genético. Diretrizes sobre testes de genotoxicidade de substâncias destinadas ao uso humano foram estabelecidas nos anos 90 pela Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 1997a, 1997b, 1997c, 2014a, 2014b, 2014c, 2014d, 2014e) (Pukalskienė *et al.*, 2018; Ragazzo *et al.*, 2017; Sponchiado *et al.*, 2016).

O ensaio cometa é um dos métodos mais utilizado para pesquisa ou rastreamento prematuro de danos no DNA. É uma técnica altamente sensível, com exigência de pequeno número de células, baixo custo e simples execução. Pequenas alterações no ensaio do cometa permitem a detecção de vários tipos de lesões de DNA. O ensaio cometa possibilita identificar quebras nos filamentos de DNA, que podem ser observadas pelo crescimento da migração de segmentos de DNA livre, gerando imagens equivalentes a cometas, justificando o nome do ensaio (Araldi *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 1988).

➤ Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico considerado um dos principais mecanismos de controle celular, ou seja, é um tipo de morte celular programada e a capacidade de uma célula sobreviver ou morrer é definido pelo repertório de produtos gênicos. Sua expressão diferencial é um determinante crítico da sensibilidade celular e tecidual a uma substância tóxica. A apoptose remove células com DNA danificado do *pool* de células replicadoras, evitando a introdução de mutações no genoma. A sinalização apoptótica inicia principalmente na ativação de caspases intracelulares, que são proteases

específicas de aspartato de cisteína, uma família de proteínas intracelulares relacionadas com a iniciação e execução da apoptose. A ativação de caspases iniciadoras promove a apoptose em resposta a sinais que podem ser por duas vias principais; a via mitocondrial ou regulada por Bcl-2 (intrínseca – resposta ao estresse celular como fármacos citotóxicos, danos no DNA) e a via do receptor de morte (extrínseca) (Ayed-Boussema *et al.*, 2007; Sagrillo *et al.*, 2015). As caspases-2, -3,-6, -7, -8, -9 e -10 dos mamíferos são consideradas as caspases apoptóticas e são subdivididas em iniciadores (-2,-8 , -9 e -10) e efetores (-3,-6, -7) baseados na presença ou ausência de domínios de interação proteína-específica em direção ao N-terminal (Shalini *et al.*, 2015).

Devido ao exposto acima, o yacon vem se destacando como um alimento com múltiplas funções principalmente devido a sua fitoquímica, entretanto os possíveis efeitos citotóxicos da raiz e principalmente da folha do yacon são poucos conhecidos (Almeida Paula, de, Abranches e Ferreira, de Luces Fortes, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos toxicológicos *in vitro* e neuroprotetores *in vivo* do extrato hidroalcoólico das folhas e raízes do yacon (*Smallanthus sonchifolius*).

3.1 Específicos

- Obter o extrato liofilizado das folhas e raízes de *Smallanthus sonchifolius*;
- Determinar perfil fitoquímico das folhas e raízes do yacon;

In vitro:

- Analisar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos da folha e raiz do yacon em cultura de leucócitos e nas culturas de células 3T3;
- Avaliar a indução de apoptose nas células 3T3;
- Avaliar atividade genotóxica e mutagênica dos extratos em cultura de leucócitos;

In vivo:

- Induzir modelo tipo Alzheimer em ratos Wistar;
- Avaliar a memória de curta e longa duração nos animais;
- Realizar testes comportamentais (ansiedade, depressão e capacidade exploratória e locomotora);
- Traçar o perfil glicêmico e lipídico (colesterol total e frações e triglicerídeos) dos animais;
- Determinar marcadores de função hepática e renal;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes no hipocampo: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx);
- Obter os níveis de GSH no hipocampo;
- Determinar o dano oxidativo em proteínas e lipídios no hipocampo;
- Determinar o dano oxidativo no material genético em leucócitos.

PARTE II**4 ARTIGO**

Yacon leaf extract supplementation demonstrates neuroprotective effect against memory deficit related to β -amyloid-induced neurotoxicity

Publicado no periódico “Journal of Functional Foods”



**YACON LEAF EXTRACT SUPPLEMENTATION DEMONSTRATES
NEUROPROTECTIVE EFFECT AGAINST MEMORY DEFICIT RELATED
TO β -AMYLOID-INDUCED NEUROTOXICITY**

Patrícia Martinez Oliveira^{a,*}, Micaela Federizzi de Oliveira^b, Niége Alves^c, Ritiéle Pinto
Coelho^a, Bruna Cocco Pilar^a, Angélica Aparecida Güllich^a, Deise Stroher^a, Aline
Boligon^d, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli^a, Pâmela Mello Carpes^{a,c}, Vanusa
Manfredini^{a, b, c}.

Affiliation

^aPostgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bCourse of Pharmacy, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cPostgraduate Program Physiological Sciences, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

^dFederal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Corresponding author. Federal University of Pampa – Campus Uruguaiana, BR 472, Km 585, Uruguaiana, RS, Brazil, CEP: 97500-970. Tel.:5555 3413-4321. Fax: 55553414-1484

E-mail address: pattymartinez87@hotmail.com

ABSTRACT

Yacon is an Andean plant used as food and medicine; it is rich in phenolic compounds with several activities described. Thus, we investigated the neuroprotective effects of the leaves and roots of yacon in β -amyloid ($A\beta$)-induced neurotoxicity in rats. Wistar male rats were supplemented with extracts of the leaves or roots of yacon for 14 d before intra-hippocampal injection with 2 μ L of $A\beta$ -25–35. The groups were submitted to memory tests and euthanized, and oxidative stress parameters (hippocampus) and biochemical parameters (serum) were analyzed using classical methodologies. Yacon leaf and root extract supplementation decreased oxidative stress and damage in the hippocampus of Alzheimer-like disease (AD-like), but only the leaf extract prevented $A\beta$ -induced memory deficits. The leaf presents more effective neuroprotection than the root and appears to be a likely candidate for future use in the prevention and/or treatment of AD, however further studies are needed to prove this hypothesis.

Keywords: Alzheimer's disease; Yacon; memory; oxidative stress.

1. Introduction

Yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson] is a functional food that has been extensively studied because of its antioxidant properties and ability to lower blood lipid and glucose levels, thus reducing the risk of chronic diseases (Habib, Honoré, Genta, & Sánchez, 2011; Oliveira, Braga, & Fernandes, 2013; Oliveira et al., 2017). This plant is originated from Andean regions, belonging to the family Asteraceae (Ojansivu, Ferreira, & Salminen, 2011; Valentová et al., 2006) and due to their sweet taste and succulence, the tuberous roots of the plant are often consumed in their natural form and the leaves are used in tea (Delgado, Tamashiro, Maróstica Junior, & Pastore, 2013). Roots are rich in fructo-oligosaccharides (FOS) with important bifidogenic effects (Caetano et al., 2016). Research indicates that the beneficial properties of yacon are due to the presence of phenolic compounds (Baroni et al., 2016; Valentova, Cvak, Muck, Ulrichova, & Simanek, 2003) at high concentrations in its roots and, especially, leaves (Arnao, Suárez, Cisneros, & Trabucco, 2012).

Alzheimer's disease (AD), the most prevalent cause of dementia, affects millions of people, especially the elderly, worldwide (Zhou, Li, Shi, & Ma, 2016). AD is a neurodegenerative disease characterized by progressive decrease of cognition, memory, and behavior (Reitz & Mayeux, 2014).

In AD, the initial signs of pathophysiological changes occur in the hippocampus, which suggests that this brain region is the most affected by mass loss; this area plays a fundamental role in the acquisition, consolidation, and recovery of memory (Corrêa-Velloso et al., 2017). The pathogenesis of AD is not entirely clear, but one of the main pathological changes observed in the brain tissue is extracellular accumulation of β -amyloid peptide ($A\beta$), which is considered one of the main factors favoring the emergence of the disease (Verdurand & Zimmer, 2017).

Evidence shows that oxidative stress is a remarkable and early specificity in the pathogenesis of neuronal damage, particularly since reactive oxygen species (ROS) intensify the production and aggregation of A β and vice versa (Xie, Tan, Zheng, Du, & Liu, 2017). Thus, natural products may be important allies in the prevention and treatment of AD due to the antioxidative action of their phytochemical compounds (Nanaware, Shelar, Sinnathambi, Mahadik, & Lohidasan, 2017).

Thus, the objective of this study is to evaluate the neuroprotective and biochemical effects of the leaves and roots of yacon in A β -induced neurotoxicity in rats.

2. Materials and methods

2.1 Animals

For this study, 60 d-old male Wistar rats were used. The rats were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. During treatment, the rats were housed four per cage at a constant room temperature, humidity, and light cycle (12 h:12 h light:dark) with free access to tap water and fed with standard chow *ad libitum*. Experiments were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Local Institution Animal Care and Use Committee (Protocol No. 040/2015).

2.2 Sample plant and extract preparation

Yacon roots were provided by the Emater/RS and cultivated in a property in Alegrete/RS/Brazil. Fresh roots and leaves were then harvested and transported to Uruguaiana/RS, Brazil, where they were processed immediately.

Hydroalcoholic yacon leaf and root extracts were obtained from 70% ethanol (v/v) solutions. The leaf and roots were washed and dried at 37 °C. Leaf were dried for 5 hours and roots for 72 hours, and placed in contact with the solvent for 7 days in the

dark, according to a slightly modified method previously described (Baroni, Suzuki-Kemmelmeier, Caparroz-Assef, Cuman, & Bersani-Amado, 2008). Thereafter, the extract was filtered and concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator at 40 °C, and the remaining water portion was lyophilized. The lyophilized powder was stored in a closed amber flask, dried at room temperature, until further use and diluted in water for administration to the animals.

2.3 Phytochemical analysis

2.3.1 Apparatus and general procedures

High-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector, and LC solution 1.22 SP1 software.

2.3.2 Phenolic compounds analysis by HPLC-DAD

Yacon (root and leaf) extracts at 15 mg/mL (diluted in the mobile phase) were injected into a reversed-phase Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm) packed with 5 µm-diameter particles. The mobile phases were 0.5% (v/v) aqueous formic acid (solvent A) and 1% (v/v) acetic acid in methanol (solvent B). The binary elution system was as follows: 2% B for 5 min to wash the column and a linear gradient of 8% B (15 min), 12% B (30 min), and 24% B (45 min). After 50 min, the organic phase concentration was brought back to 2% (B) and maintained for 10 min for column equilibration. The flow rate was 0.7 mL/min, and the injection volume was 40 µL (Boligon, Feltrin, Machado, Janovik, & Athayde, 2009; Salawu et al., 2016). The wavelengths used were 325 nm for caffeic acid and chlorogenic acid, and 280, 366, 340 and 350 nm for ellagic acid, quercetin, apigenin and rutin, respectively. The extract and

mobile phase were filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore) and then degassed in an ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standard references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030–0.250 mg/mL. Chromatography peaks were confirmed by comparing retention times with those of reference standards and the DAD spectra (200–500 nm). All chromatography procedures were carried out at ambient temperature and in triplicate.

2.3.3 Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope from three independent analytical curves, as defined by Oboh et al. (2015). LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S , respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

2.4 Experimental design

The animals were divided into six groups with eight animals in each group:

- G1 (control): Animals not supplemented and submitted to surgery for intrahippocampal injection of saline (sham);
- G2 (YR): Animals supplemented with yacon root extract (40 mg/kg) and submitted to surgery for intrahippocampal injection of saline (sham);
- G3 (YL): Animals supplemented with yacon leaf extract (40 mg/kg) and submitted to surgery for intrahippocampal injection of saline (sham);
- G4 ($A\beta$): Animals not supplemented and submitted to surgery for intrahippocampal injection of $A\beta$;
- G5: (YR + $A\beta$): Animals supplemented with yacon root extract (40 mg/kg) and submitted to surgery for intrahippocampal injection of $A\beta$; and
- G6: (YL + $A\beta$): Animals supplemented with yacon leaf extract (40 mg/kg) and submitted to surgery for intrahippocampal injection of $A\beta$.

The animals in the supplementation groups received extracts by gavage for 14 consecutive days. On the 15th day, the animals were submitted to stereotactic surgery for intrahippocampal injection of A β or saline. The animals in groups G1 and G4 also received gavage but only with the vehicle, not the plant extract. Supplementation was maintained for another 10 d, which is the time necessary for A β aggregation and plaque formation (Maurice, 2016); thereafter, the animals were submitted to behavioral tests and euthanized. Blood and the hippocampus were removed for further analysis. Figure 1 demonstrates the experimental design.

2.5 Surgery

Injection of the A β protein to mimic one of the main AD characteristics was done by stereotactic surgery with bilateral intrahippocampal administration of a single dose (2 μ L) of A β protein (fragments 25–35) using an infusion pump and following the coordinates of the atlas of Paxinos and Watson (1986) (Paxinos & Watson, 1986). The entire procedure was performed on animals anesthetized with ketamine and xylazine administered intraperitoneally at doses of 0.75 and 0.10 mg/kg, respectively. Once the anesthetic plane of the animal was confirmed, it was fixed in a stereotaxic device and scalp asepsis was performed with 70% ethanol and PVPI. After surgery, the animals were placed back in their housing boxes and kept under observation for 10 d.

2.6 Memory testing

Ten days after surgery, the object recognition memory (OR) test was performed (Ennaceur & Delacour, 1988). Initially, the animals were habituated to the behavioral apparatus, a rectangular box measuring 50 cm \times 50 cm \times 50 cm with a glass front, for 4 days. On the fifth day, training was performed. Here two objects (A and B) were placed for free exploration in the apparatus, and a blind experimenter counted the exploration time of each object over 5 min. The objects were made of metal, glass, or glazed

ceramic. Exploration was defined as sniffing or touching of the objects with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the objects was not considered exploratory behavior. Three hours later, the short-term memory test (STM) was performed, and, the following day (24 h after), the long-term test (LTM) was administered. In the tests, one of the objects was replaced by a new object (C or D). The animal that did not have memory deficit was expected to further explore the new object in the tests. In each test, the apparatus and objects were cleaned with 70% ethanol to avoid olfactory clues.

2.7 Behavioral control tests

Preservation of exploratory and locomotor activities was ensured after surgery. Each rat was placed on the left quadrant of a 50 cm × 50 cm × 39 cm open-field arena made of wood and with a frontal glass wall. Black lines were drawn to divide the floor into 12 quadrants. Crossing and rearing were measured as indicators of locomotor and exploratory activity, respectively, over 5 min (Bonini et al., 2006).

Anxiety state was analyzed using an elevated plus maze. The total number of entries into the open arms were recorded over 5 min (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985).

A forced swimming test was used to analyze depressive-like behavior. Five-minute swimming sessions were conducted by placing the rat in cylinders containing 25 ± 1 °C water at such a depth that the rats could not support themselves by touching the bottom of the vessel with their hind paws or tail. Floating in the water without struggling and only making movements necessary to keep its head above the water were regarded as immobility (Nomura, Shimizu, Kinjo, Kametani, & Nakazawa, 1982).

2.8 Biochemical analysis

2.8.1 Sample preparation

Animals were euthanized 24 h after the behavioral tests. The brain was removed and the bilateral hippocampus were quickly separated and homogenized in 50 mM Tris–HCl, pH 7.4 (1/5 w/v). The samples were centrifuged for 10 min at 2500 rpm, and the supernatants were used for the assay.

Total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, glucose, enzymatic markers of liver function (aspartate transaminase-AST, alanine transaminase-ALT and Alkaline phosphatase), and renal (creatinine, acid uric and urea) levels were measured from the serum of the animals using a BS 200 Mindray automatic analyzer (Mindray, Shenzhen, China) for *in vitro* diagnostics. All biochemical assays were carried out in triplicate.

2.8.2 Oxidative damage

Oxidative parameters, such as lipid peroxidation (Ohkawa, Ohishi, & Yagi, 1979) and protein carbonyls (Levine, 2002), were measured in the hippocampus using spectrophotometric methods. Assessment of DNA damage was made by determining the frequency of micronuclei in leukocytes (Schmid, 1975).

2.8.3 Antioxidants defenses

Levels of reduced glutathione (GSH) (Akerboom & Sies, 1981) and the activities of superoxide dismutase (SOD) (RANSOD Kit; RANDOX Brasil LTDA), catalase (CAT) (Aebi, 1984), and glutathione peroxidase (GPx) (RANSEL Kit; RANDOX Brasil LTDA) were determined from hippocampus samples. All assays were carried out in triplicate.

2.9 Histopathological analysis

The brains of the animals were rapidly dissected and fixed by immersion at room temperature in a 10% formalin solution for 48 h. Subsequently, the samples were packed in glass bottles with alcoholic solutions (Tolosa, Rodrigues, Behmer, & De Freitas Neto, 2003). For histological analyses, brain tissue samples were blocked in

paraffin. Histological sections were obtained by a microtome and placed in a digital histological bath to shape the cut on the slide. The samples were then stained with Congo red dye, which causes amyloid deposits to be stained red and nuclei to be stained blue, examined, and photographed under an optical microscope (LEICA®, DM500) coupled to a 10 MP camera (Alafuzoff, 2017).

2.10 Statistical analysis

The object recognition test data were converted to a percentage of the total time of exploration. The samples were tested for their normality by the Kolmogorov-Smirnov test ($p > 0.05$ considered normal distribution) and homogeneity was tested by Levene's test ($p > 0.05$ considered homogeneous) and after a one-sample t -test, considering a theoretical mean of 50%, was performed.

In the remaining tests, comparisons between groups were performed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test for *post hoc* analysis.

All data are presented as mean \pm standard deviation. Results were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Identification and quantification of compounds.

HPLC of the Yacon extracts revealed the presence of chlorogenic acid, caffeic acid, ellagic acid, rutin, quercetin, and apigenin (Table 1 and Figure 2).

3.2 Object recognition memory test

In the training portion of the OR task, all groups spent about 50% of the exploration time exploring each object (A and B), which was expected since the two objects were new to the animals (Figure 3, training, $P > 0.05$).

In the STM test, animals in the control, YR, and YL groups spent more than 50% of the total test time exploring the new object, thus demonstrating learning

(Figure3A, $P = 0.009$ for the control; $P = 0.0005$ for YR; $P = 0.0006$ for YL). By comparison, animals in the hippocampal A β -protein group spent about 50% of the test time exploring the familiar object and 50% of the time exploring the new object, thus demonstrating memory deficit (Figure3A, A β , $P = 0.69$). Only supplementation with the leaf extract of yacon prevented the observed A β -induced memory deficit (Figure3A, $P = 0.04$ for YF + A β ; $P = 0.21$ for YR).

The same results were observed in the LTM test (Figure3B). Animals in the control, YR, and YL groups spent over 50% of the total test time exploring the new object, thus demonstrating learning (Figure3A, $P < 0.0001$ for the control; $P = 0.003$ for YR; $P = 0.01$ for YL). By comparison, animals in the hippocampal A β -protein group spent about 50% of the test time exploring the familiar object and 50% of the time exploring the new object, thus demonstrating memory deficit (Figure3A, A β , $P = 0.38$). Only supplementation with the leaf extract of yacon prevented the observed A β -induced memory deficit (Figure3A, $P = 0.04$ for YF + A β ; $P = 0.50$ for YR).

3.3 Behavioral control tests

Behavioral activities (motor and exploratory; anxiety and depressive-like behavior) monitored relative to those of the control were not influenced by the surgery, A β injection to the hippocampus, or yacon supplementation ($P > 0.01$; Table 2).

3.4 Biochemical analysis

Glucose levels in the A β group were significantly lower than those in the other groups ($P = 0.0045$; Figure4A). Evaluation of the lipid profile ($P > 0.05$; Figure. 4B, 4C, 4D) and markers of renal ($P > 0.05$; Figure. 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 5F) and hepatic function revealed no differences between the groups.

3.4 Oxidative damage

The A β group showed increased lipid peroxidation in the hippocampus. By contrast, the YR + A β and YL + A β groups showed significant reductions in MDA level relative to the A β group. Surprisingly, this reduction was so extensive in the YL + A β group that no significant difference in comparison with the YL group was observed ($P=0.0001$; Figure 6A).

High levels of protein carbonylation were also observed in the A β group. The YR + A β and YL + A β groups showed significant reductions in carbonylation levels when compared with the A β group and did not present differences in comparison with the control, YR, or YL groups ($P=0.0001$; Figure 6B).

A β injection increased the frequency of micronuclei in peripheral blood leukocytes (A β group). However, extract treatment of the YR + A β and YL + A β groups significantly reduced ($P < 0.05$) this count ($P=0.0001$; Figure 6C).

3.5 Antioxidant defenses

Fig.7 shows the results of the biomarkers of enzymatic (SOD, CAT, and GPx) and non-enzymatic (GSH) antioxidant defense. The A β group demonstrated low antioxidant enzyme activities and reduced levels of GSH. By comparison, a significant increase ($P < 0.05$) in the activity of these enzymes and GSH levels was observed in the YR + A β and YL + A β groups ($P=0.0001$; Figure 7A, 7B, 7C, 7D).

3.6 Histopathological analysis

Histopathological analysis of the cerebral cortex of the rats demonstrated intense deposition of amyloid plaques in the A β group; by comparison, fewer plaque deposits were observed in the YR + A β and YL + A β groups (Figure 8)

4. Discussion

Our findings demonstrate, for the first time, the neuroprotective activity of yacon, specifically in a model of A β neurotoxicity. The main results suggest that yacon leaf and root extract supplementation decreases oxidative stress and damage to the

hippocampus of AD-like rats; however, only the leaf extract prevented β -amyloid-induced memory deficits.

While the initial cognitive change in aging involves memory changes that are also observed in pathological aging, this cognitive change occurs drastically in AD. The prefrontal cortex is the first structure to change during normal aging; by contrast, in AD, the initial change occurs in the hippocampus and results in a decline in neurogenesis and consequent neurodegeneration. Alterations in this region are believed to be mediated by oxidative stress (Corrêa-Velloso et al., 2017; Tromp, Dufour, Lithfous, Pebayle, & Després, 2015). Thus, the trend in research on antioxidant treatments is avoidance of memory deficits related to neurodegenerative diseases. Evidence suggests that natural products, through the antioxidative action of their phytochemicals, exert neuroprotective effects against the harmful effects of oxidative stress and could be recommended as potential therapies for treating or preventing various diseases related to AD (Hartman & Ross, 2017; Nanaware et al., 2017).

The AD-like rats showed high levels of oxidative damage in lipids and proteins, thereby demonstrating that the induced neurotoxicity model is effective and contributes to oxidative stress, as corroborated by other findings (França, Lima, & Eleutherio, 2017). Oxidative stress can cause neuronal apoptosis and lead to cognitive dysfunction (Sah, Lee, Jang, & Park, 2017); it occurs when an imbalance is present between the production of reactive species and antioxidant defense molecules (Halliwell & Whiteman, 2004). These species, such as free radicals, can directly oxidize biomolecules (e.g., proteins, lipids, and DNA) and contribute to the development of several pathologies, including AD (X. Chen, Guo, & Jiming, 2012).

Carbonylation of proteins refers to a process that forms reactive ketones or aldehydes when the side chains of proteins are oxidized, causing increased

susceptibility to proteolysis and enzymatic inactivation (Sharma, Jha, Dubey, & Pessarakli, 2012). Measurement of protein carbonylation is important in assessing the extent of oxidative damage in proteins associated with AD (Gella & Durany, 2009). Malondialdehyde (MDA) is one of the main by-products of lipoperoxidation (Halliwell & Chirico, 1993). The interaction of reactive species with polyunsaturated fatty acids results in highly reactive electrophilic aldehydes, leading to a change in membrane fluidity and permeability (Sharma et al., 2012).

Reactive species can damage DNA by several mechanisms, including degradation of bases, DNA breaks, mutations, deletions or translocations, and cross-linking with other proteins. Most of these DNA modifications are determinants of the emergence of neurodegenerative diseases (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012). One way to assess DNA damage is through determination of the frequency of micronuclei. Micronuclei are structures made up of chromatin, a mass of genetic material composed of chromosomes or fragments of chromosomes that cannot be incorporated into the nucleus during cell division; instead, this mass forms a small independent nucleus with a nuclear envelope and cytoplasm that is exposed to toxic agents. Determination of the micronucleus frequency provides an estimate of the presence of chromosomal changes (Milić et al., 2015). Our findings demonstrate that AD-like DNA damage occurred in leukocytes, which means the oxidative stress associated with AD affects not only the brain or hippocampus but the whole organism as well (Wang et al., 2014).

Excess free radicals in the body are counteracted by antioxidant defense mechanisms that are produced *in vivo* or absorbed from the diet (Halliwell, 2008). Antioxidant defense systems minimize the harmful effect of reactive species via various mechanisms (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy, & De, 2010). Among the most

important enzymatic antioxidants are SOD, CAT, and GPx; non-enzymatic antioxidants include GSH (Sharma et al., 2012).

Studies indicate that the yacon leaf presents important antioxidative effects in different assays (Sugahra et al., 2015). In this study, AD-like groups treated with yacon showed increased antioxidant defenses in the hippocampus. We assume that the neuroprotective effects of yacon are related to its antioxidant activity, since oxidative stress is considered one of the major causes of AD neurotoxicity and progression (Nanaware et al., 2017).

A previous study demonstrated that Alzheimer's patients who consumed a beverage with high antioxidant power daily for 8 months showed increased levels of GPx and SOD and decreased levels of protein carbonyls (Rubio et al., 2016). In another study, an AD animal model treated with 6 g of raisin, which is rich in antioxidant compounds, for 60 days demonstrated spatial memory improvement and reduced MDA levels in its plasma (Gol et al., 2017).

Caffeic, ferulic and chlorogenic acids are often reported as major compounds (Campos et al., 2012; Simonovska, Vovk, Andrenšek, Valentová, & Ulrichová, 2003; Valentova et al., 2003) instead of flavonoids apigenin and quercetin, which were found in our study. The phytochemical composition of a plant is a determinant of its medicinal properties. Different extracts and/or origins of the plant materials could explain the differences observed.

Flavonoids can be categorized into six major classes (flavonols, flavanones, flavones, isoflavones, catechins, and anthocyanidins) based on differences in their molecular skeletal structure. Flavonoids contain various phenolic hydroxyl groups attached to ring structures, which can act as antioxidants, free-radical scavengers, and anti-inflammatory agents (Ferreira, Rius, & Casati, 2012; Panche, Diwan, & Chandra,

2016). Biological activity frequently seems to be related to the presence of a hydroxyl group at position 3 of the C-ring, a carbonyl group at C4 of the C-ring, and a C2=C3 double bond. This C2=C3 double bond conjugated to the ketone function in the C-ring is responsible for the displacement of electrons of the B-ring, and the association of these double bonds with the hydroxyls at the 3 and 5 positions are responsible for the antioxidant activity of flavonoids (Chen, 2018; Halbwirth, 2010). Such activity of flavonoids is primarily attributed to their ability to reduce free radicals to their stable forms by donating hydrogen atoms and chelating metal ions (Fe^{3+} and Cu^{2+}) via complexation (Halliwell, 1992). Current trends indicate that the antioxidant potential of flavonoids could reduce oxidative stress and have beneficial effects on memory and learning (Choi et al., 2014; Ojo et al., 2018).

Natural phenolic acids have also been highlighted for their protective potential against diseases related to oxidative stress. This property is related to their ability to scavenge free radicals, donate hydrogen atoms or electrons, or chelate metal cations (Heleno, Martins, Queiroz, & Ferreira, 2015; Soobrattee, Neergheen, & Luximonramma, 2005). The antioxidant properties of phenolic acids can be affected by substituents on the aromatic ring, numbers and positions of the hydroxyl groups in relation to the carboxyl functional group, esterification, and glycosylation (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996).

The better effects observed after leaf extract supplementation in comparison with root extract supplementation may be explained by the higher concentration of apigenin in leaves compared with that in roots; recent studies indicate that apigenin presents important neuroprotective effects against several factors related to the progression of AD (Balez et al., 2016). Our findings corroborate the results of a previous study carried out in which rat AD models were treated with 40 mg/kg/d

apigenin by oral gavage for 12 weeks and showed impeded memory deficits, improved learning, and increased antioxidant enzyme activity (Zhao et al., 2013). In a separate study investigating the therapeutic effect of apigenin on neuroinflammation in glial fibrillary acidic protein-interleukin 6 expressing mice using both immunohistochemical and behavioral tests, the results revealed that apigenin reduced the inflammatory process and improved the spatial memory of the animals, and can be a potent anti-inflammatory and neuroprotective agent (Liang et al., 2017). The antioxidant properties of the extract demonstrate that antioxidant flavonoids can reduce cellular oxidative stress and possibly play a significant neuroprotective role.

Although supplementation with the root extract did not prevent memory deficit, it presented important results in the reduction of oxidative stress in the hippocampus; this effect could be attributed to the presence of quercetin, a flavonoid with antioxidant properties. Studies demonstrate that this phytochemical reduces oxidative stress, thereby preventing neurotoxicity induced in the hippocampus (Costa, Garrick, Roquè, & Pellacani, 2016; Godoy et al., 2017). Research has shown that quercetin has low oral bioavailability but is associated with piperine, which exerts neuroprotective effects against induced toxicity and significantly reduces oxidative stress (Singh, Jamwal, & Kumar, 2017).

Our research indicates no difference in lipid profile between the analyzed groups; some recent studies also indicate no relationship between AD and lipemic levels (Schilling et al., 2017). One study evaluated the lipid profile and uric acid levels of AD patients and healthy individuals and did not observe differences in lipemic levels between groups; however, the serum uric acid levels of AD patients were significantly lower than those of the control group, which differs from our findings (Al-khateeb, Althaher, Al-khateeb, Al-musawi, & Azzouqah, 2015).

Markers of liver and renal function did not differ between groups, thus indicating that the leaf and root extracts of yacon do not present hepato- or nephrotoxic effects at the doses applied. We note here that, during supplementation, we considered the possible therapeutic or prophylactic use of the extracts.

Our findings indicate a significant reduction in blood glucose in the AB group, which corresponds to findings in the literature. In cases of severe dementia, a reduction in blood glucose is observed. Evidence suggests that oxidative stress (caused by A β) impairs the transport of glucose through lipid peroxidation to the GLUT3 glucose transport neuronal protein, thus compromising energy metabolism (Gella & Durany, 2009).

In the memory tests, we observed a deficit of STM and LTM caused by A β -induced neurotoxicity, as previously demonstrated (Schmidt, Garcia, Martins, Mello-Carpes, & Carpes, 2017). Although the STM and LTM consolidation mechanisms are not identical (Izquierdo et al., 1998), we observed the same results in both cases: only the yacon leaf extract was able to avoid the memory deficits caused by A β despite both the leaf and root demonstrating antioxidative activity in the hippocampus. This finding could be related to the properties and composition of each part of the plant, as discussed above. We emphasize here that the control behavioral tests showed that the AD-like model used or yacon supplementation did not induce depression or anxiety or alter locomotor and exploratory functions, which could alter the memory test results.

Histopathological analysis shows the presence of neuritic plaques in the AD-like model throughout the cerebral cortex, thus confirming the diagnosis of AD. Supplementation with yacon prevented the deposition of amyloid plaques, thereby confirming the neuroprotective effects of this plant.

5. Conclusion

Treatment with yacon leaf and root extracts improved oxidative stress parameters in the hippocampus of the test animals. Yacon leaf extract supplementation demonstrated better neuroprotective effects than root extract and also protected against memory deficits related to A β -protein-induced neurotoxicity. It is suggested that from the results obtained, yacon leaf extracts could be potential candidate for future use in the prevention and / or treatment of AD, however further studies are needed to prove this hypothesis.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants from UNIPAMPA (Universidade Federal do Pampa), UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).PBMC was supported by For Women in Science Program, L'Oreal Foundation & UNESCO.

References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, *105*, 121–126.
- Akerboom, T., & Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*, *77*, 373–382.
- Al-khateeb, E., Althaher, A., Al-khateeb, M., Al-musawi, H., & Azzouqah, O. (2015). Relation between Uric Acid and Alzheimer's Disease in Elderly Jordanians, *44*, 859–865. <https://doi.org/10.3233/JAD-142037>
- Alafuzoff, I. (2017). Techniques in neuropathology. *Handbook of Clinical Neurology*,

145, 3–7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00001-8>

- Arnao, I., Suárez, S., Cisneros, R. Y., & Trabucco, J. (2012). Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la raíz y las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (YACÓN). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 78(2), 120–125.
- Balez, R., Steiner, N., Engel, M., Muñoz, S. S., Lum, J. S., Wu, Y., ... Ooi, L. (2016). Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 6(1), 31450. <https://doi.org/10.1038/srep31450>
- Baroni, S., da Rocha, B. A., Oliveira de Melo, J., Comar, J. F., Caparroz-Assef, S. M., & Bersani-Amado, C. A. (2016). Hydroethanolic extract of *Smallanthus sonchifolius* leaves improves hyperglycemia of streptozotocin induced neonatal diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(5), 432–436. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.033>
- Baroni, S., Suzuki-Kemmelmeier, F., Caparroz-Assef, S. M., Cuman, R. K. N., & Bersani-Amado, C. A. (2008). Effect of crude extracts of leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) on glycemia in diabetic rats. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(3), 521–530. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300024>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Boligon, A. A., Feltrin, A. C., Machado, M. M., Janovik, V., & Athayde, M. L. (2009). HPLC analysis and phytoconstituents isolated from ethyl acetate fraction of *Scutia buxifolia* Reiss. leaves. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(1), 121–124.

- Bonini, J. S., Bevilaqua, L. R., Zinn, C. G., Kerr, D. S., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006). Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval, *50*, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.03.016>
- Caetano, B. F. R., de Moura, N. A., Almeida, A. P. S., Dias, M. C., Sivieri, K., & Barbisan, L. F. (2016). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: Health-promoting benefits of fructooligosaccharides. *Nutrients*, *8*(7), 436. <https://doi.org/10.3390/nu8070436>
- Campos, D., Betalleluz-Pallardel, I., Chirinos, R., Aguilar-Galvez, A., Noratto, G., & Pedreschi, R. (2012). Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, *135*(3), 1592–1599. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.088>
- Chen, L. (2018). Dietary phenolic compound with the presence of C 2 = C 3 double bond take the pre-emptive opportunities to enhance its biological effects . *Journal of Food Microbiology*, *2*(1), 4–6.
- Chen, X., Guo, C., & Jiming, K. (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, *7*(5), 376–385. <https://doi.org/http://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.05.009>
- Choi, S. M., Kim, B. C., Cho, Y. H., Choi, K. H., Chang, J., Park, M. S., ... Kim, J. K. (2014). Effects of Flavonoid Compounds on β -amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons. *Chonnam Medical Journal*, *50*(2), 45–51. <https://doi.org/10.4068/cmj.2014.50.2.45>
- Corrêa-Velloso, J. C., Gonçalves, M. C. B., Naaldijk, Y., Oliveira-Giacomelli, Á., Pillat, M. M., & Ulrich, H. (2017). Pathophysiology in the comorbidity of Bipolar Disorder and Alzheimer's Disease: Pharmacological and stem cell approaches.

- Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 80(Pt A), 34–53. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.033>
- Costa, L. G., Garrick, J. M., Roquè, P. J., & Pellacani, C. (2016). Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2986796. <https://doi.org/10.1155/2016/2986796>
- Delgado, G. T., Tamashiro, W. M., Maróstica Junior, M. R., & Pastore, G. M. (2013). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(3), 222–228. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0362-0>
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59.
- Ferreira, M., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
- França, M. B., Lima, K. C., & Eleutherio, E. C. A. (2017). Oxidative Stress and Amyloid Toxicity: Insights From Yeast. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(6), 1442–1452. <https://doi.org/10.1002/jcb.25803>
- Gella, A., & Durany, N. (2009). Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration*, 3(1), 88–93. <https://doi.org/10.4161/cam.3.1.7402>
- Godoy, J. A., Lindsay, C. B., Quintanilla, R. A., Carvajal, F. J., Cerpa, W., & Inestrosa, N. C. (2017). Quercetin Exerts Differential Neuroprotective Effects Against H₂O₂ and A β Aggregates in Hippocampal Neurons: the Role of Mitochondria. *Molecular Neurobiology*, 54, 7116–7128. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0203-x>
- Gol, M., Ghorbanian, D., Soltanpour, N., Faraji, J., Gol, M., Ghorbanian, D., & Soltanpour, N. (2017). Protective effect of raisin (currant) against spatial memory

- impairment and oxidative stress in Alzheimer disease model. *Nutritional Neuroscience*, 1–9. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1354959>
- Habib, N. C., Honoré, S. M., Genta, S. B., & Sánchez, S. S. (2011). Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: Biochemical approach. *Chemico-Biological Interactions*, 194(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.08.009>
- Halbwirth, H. (2010). The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway, 11, 595–621. <https://doi.org/10.3390/ijms11020595>
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 59(5), 1609–23.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.028>
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715S–725S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.715S>
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hartman, R. E., & Ross, D. M. (2017). Effects and mechanisms of actions of phytochemicals on Alzheimer's disease neuropathology. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 10, 300–333.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015).

- Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393(6686), 635–636.
- Levine, R. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 790–796. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00765-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00765-7)
- Liang, H., Sonogo, S., Gyengesi, E., Rangel, A., Niedermayer, G., Karl, T., & Münch, G. (2017). OP-25 - Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effect of Apigenin: Studies in the GFAP-IL6 Mouse Model of Chronic Neuroinflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 108(1), s10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.064>
- Maurice, T. (2016). Protection by sigma-1 receptor agonists is synergic with donepezil, but not with memantine, in a mouse model of amyloid-induced memory impairments. *Behavioural Brain Research*, 296, 270–278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.020>
- Milić, M., Rozgaj, R., Kašuba, V., Jazbec, A., Starčević, B., Ravegnini, G., ... Angelini, S. (2015). Polymorphisms in DNA repair genes: link with biomarkers of the CBMN cytome assay in hospital workers chronically exposed to low doses of ionising radiation. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 66(2), 109–120. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2655>
- Nanaware, S., Shelar, M., Sinnathambi, A., Mahadik, K. R., & Lohidasan, S. (2017). Neuroprotective effect of Indian propolis in b-amyloid induced memory deficit: Impact on behavioral and biochemical parameters in rats. *Biomedicine &*

- Pharmacotherapy*, 93, 543–553. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.072>
- Nomura, S., Shimizu, J., Kinjo, M., Kametani, H., & Nakazawa, T. (1982). A new behavioral test for antidepressant drugs. *European Journal of Pharmacology*, 83(3–4), 171–175.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358.
- Ojansivu, I., Ferreira, C. L., & Salminen, S. (2011). Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.005>
- Ojo, O. A., Ojo, A. B., Ajiboye, B. O., Olaiya, O., Okesola, M. A., Boligon, A. A., ... Kappo, A. P. (2018). HPLC-DAD fingerprinting analysis, antioxidant activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray leaves and its inhibition of key enzymes linked to Alzheimer's disease. *Toxicology Reports*, 5(May), 585–592. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.05.003>
- Oliveira, G., Braga, C., & Fernandes, A. (2013). Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.& Endl.)] treatment. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 256–260. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.050>
- Oliveira, P. M., Coelho, R. P., Pilar, B. C., Golke, A. M., Güllich, A. A., Maurer, P., ... Manfredini, V. (2017). Antioxidative properties of 14-day supplementation with Yacon leaf extract in a hypercholesterolemic rat model. *Brazilian Journal of Biosciences*, 15(4), 178–186.
- Panche, A., Diwan, A., & Chandra, S. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(e47), 1–15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (2nd ed).

Sydney: Academic Press.

- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open "closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *14*, 149–167.
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, *88*(4), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*(7), 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Rubio, J. M., Maria, P., Pilar, D. A., Vidal, M. L., Juana, G., & Ruiz, M. M. (2016). Effects of an antioxidant beverage on biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's patients. *European Journal of Nutrition*, *55*(6), 2105–2116. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1024-9>
- Sah, S. K., Lee, C., Jang, J.-H., & Park, G. H. (2017). Effect of high-fat diet on cognitive impairment in triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *493*(1), 731–736. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.122>
- Salawu, S. O., Alao, O. F., Faloye, O. F., Akindahunsi, A. A., Boligon, A. A., & Athayde, M. L. (2016). Antioxidant potential of phenolic-rich two varieties of Nigerian local rice and their anti-cholinesterase activities after in vitro digestion. *Nutrition & Food Science*, *46*(2), 171–189. <https://doi.org/10.1108/NFS-08-2015-0093>
- Schilling, S., Tzourio, C., Soumare, A., Kaffashian, S., Dartigues, J., Ancelin, M., ... Debette, S. (2017). Differential associations of plasma lipids with incident dementia and dementia subtypes in the 3C Study: A longitudinal, population-

- based prospective cohort study. *PLoS Medicine*, *14*(3), e1002265.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002265>
- Schmidt, H. L., Garcia, A., Martins, A., Mello-Carpes, P. B., & Carpes, F. P. (2017). Green tea supplementation produces better neuroprotective effects than red and black tea in Alzheimer-like rat model. *Food Research International*, *100*(July), 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.026>
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, *31*(1), 9–15.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8)
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., & De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *3*(1), 91–100. <https://doi.org/10.1002/ptr.1897>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, *2012*, 1–26.
<https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Simonovska, B., Vovk, I., Andrenšek, S., Valentová, K., & Ulrichová, J. (2003). Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A*, *1016*(1), 89–98.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01183-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01183-X)
- Singh, S., Jamwal, S., & Kumar, P. (2017). Neuroprotective potential of Quercetin in combination with piperine against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Neural Regeneration Research*, *12*(7), 1137–1144.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.211194>
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., & Luximon-ramma, A. (2005). Phenolics as

- potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>
- Sugahra, Y., Ueda, Y., Fukuhara, K., Kamamuta, Y., Matsuda, Y., Murata, T., ... Yasuda, S. (2015). Antioxidant Effects of Herbal Tea Leaves from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on Multiple Free Radical and Reducing Power Assays, Especially on Different Superoxide Anion Radical Generation Systems. *Journal of Food Science.*, 80(11), 2420–9.
- Tolosa, E. M. C., Rodrigues, C. J., Behmer, O. A., & De Freitas Neto, A. G. (2003). *Manual de técnicas histológicas normal e patológica* (2^a ed.). São Paulo: Manole.
- Tromp, D., Dufour, A., Lithfous, S., Pebayle, T., & Després, O. (2015). Episodic memory in normal aging and Alzheimer disease: Insights from imaging and behavioral studies. *Ageing Research Reviews*, 24, 232–262. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.08.006>
- Valentova, K., Cvak, L., Muck, A., Ulrichova, J., & Simanek, V. (2003). Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. *European Journal of Nutrition*, 42(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0402-x>
- Valentová, K., Lebeda, A., Doležalová, I., Jirovský, D., Simonovska, B., Vovk, I., ... Ulrichová, J. (2006). The biological and chemical variability of yacon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1347–1352. <https://doi.org/10.1021/jf052645u>
- Verdurand, M., & Zimmer, L. (2017). Hippocampal 5-HT 1A receptor expression changes in prodromal stages of Alzheimer's disease: Beneficial or deleterious? *Neuropharmacology*, 123, 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.021>
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and

mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta Journal*, 1842, 1240–1247. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.015>

Xie, Y., Tan, Y., Zheng, Y., Du, X., & Liu, Q. (2017). Ebselen ameliorates β -amyloid pathology, tau pathology, and cognitive impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease mice. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22(6), 851–865. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1463-2>

Zhao, L., Wang, J. L., Liu, R., Li, X. X., Li, J. F., & Zhang, L. (2013). Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecules*, 18(8), 9949–9965. <https://doi.org/10.3390/molecules18089949>

Zhou, X., Li, Y., Shi, X., & Ma, C. (2016). An overview on therapeutics attenuating amyloid β level in Alzheimer's disease: Targeting neurotransmission, inflammation, oxidative stress and enhanced cholesterol levels. *American Journal of Translational Research*, 8(2), 246–269.

FIGURES

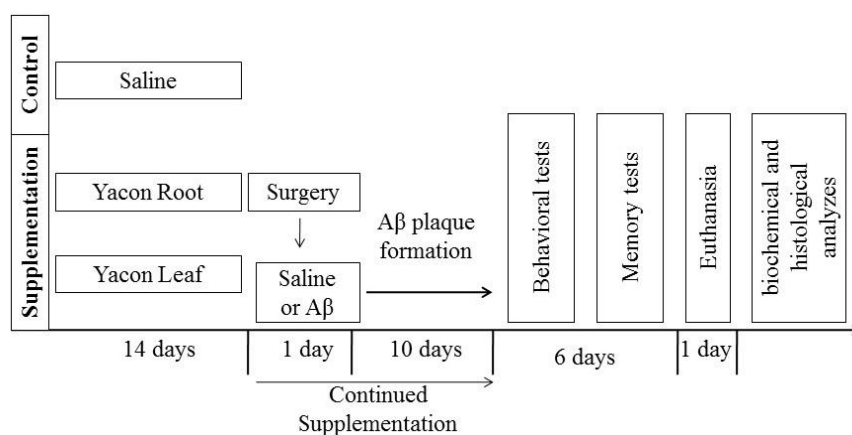


Fig. 1. Experimental design. Rats were supplemented with leaves and root Yacon for 14 days. Behavioral testing started 10 days after surgery. Euthanasia occurred 16 days after surgery; biochemical and histological testing was the last step of the study.

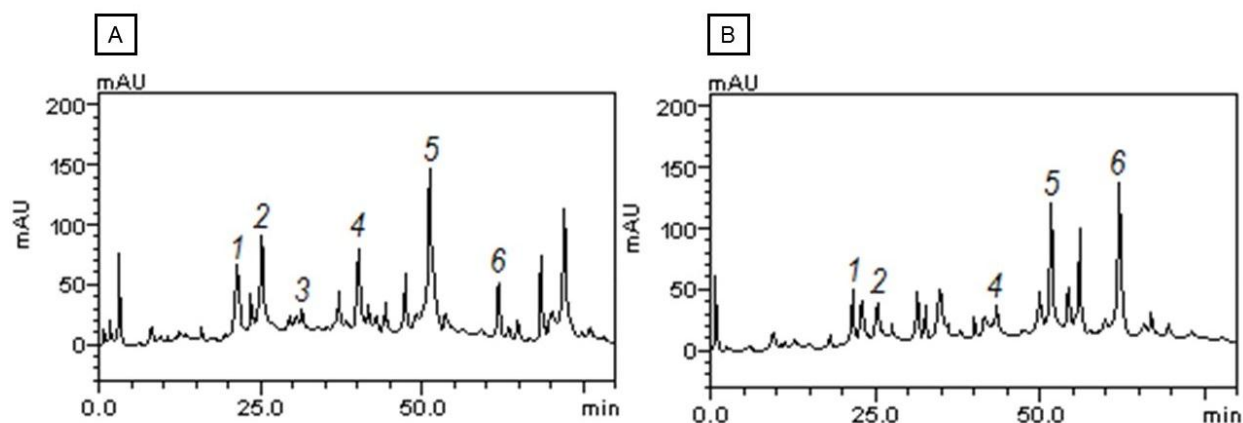


Fig. 2. Representative reverse-phase HPLC analysis of Yacon extracts. In A: Yacon Root Extract; B: Yacon Leaf Extract. Chlorogenic acid(peak 1),caffeic acid (peak 2), ellagic acid (peak 3), rutin (peak 4), quercetin (peak 5) and apigenin (peak 6) Using standard and spectral analysis, peaks 1, 2, 3, 4, 5 and 6 were identified as chlorogenic acid, caffeic acid, ellagic acid, rutin, quercetin and apigenin respectively.

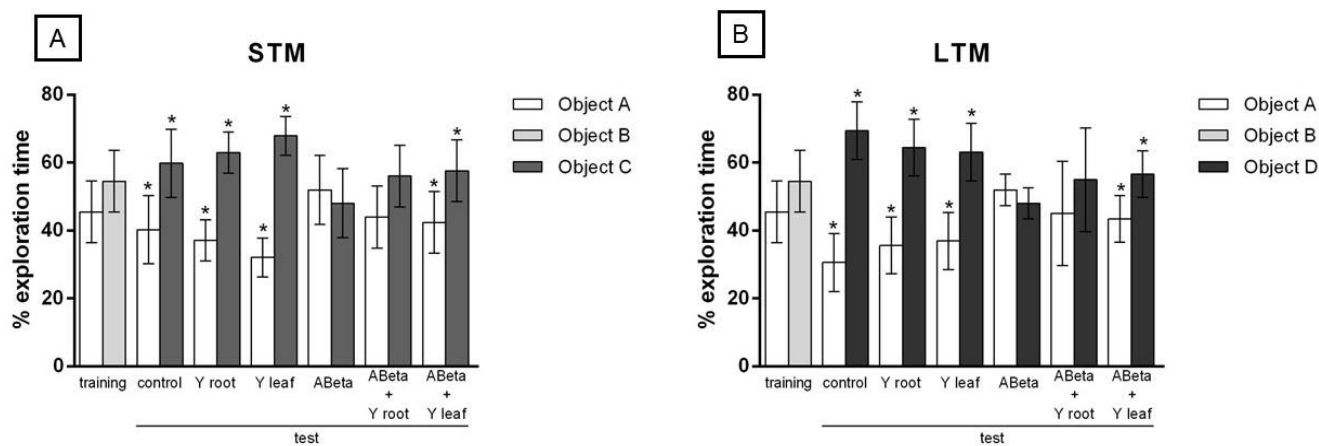


Fig. 3. Effect of yacon extract in object recognition memory. A: short-term memory (STM); B: long-term memory (LTM). One-sample t-test was performed. * $P < 0.05$.

Data are presented as mean \pm SD. $n=8$ per group.

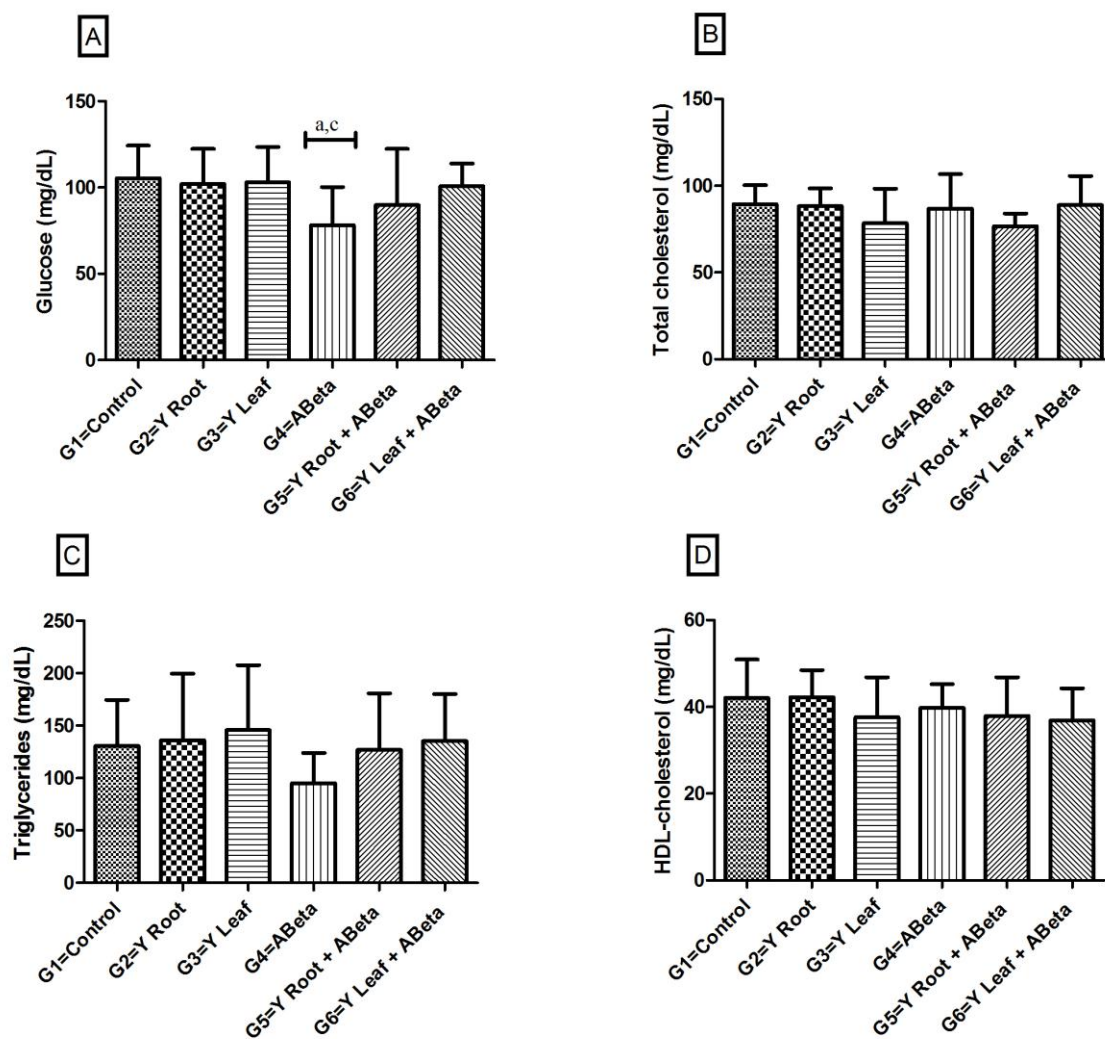


Fig. 4. Effect of yacon in beta-amyloid-induced neurotoxicity rats. In A: glucose levels; B: serum total cholesterol levels; C: triglycerides levels; D: HDL-cholesterol levels. Data are expressed as means \pm S.D. Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group. $P < 0.05$ was considered significant.

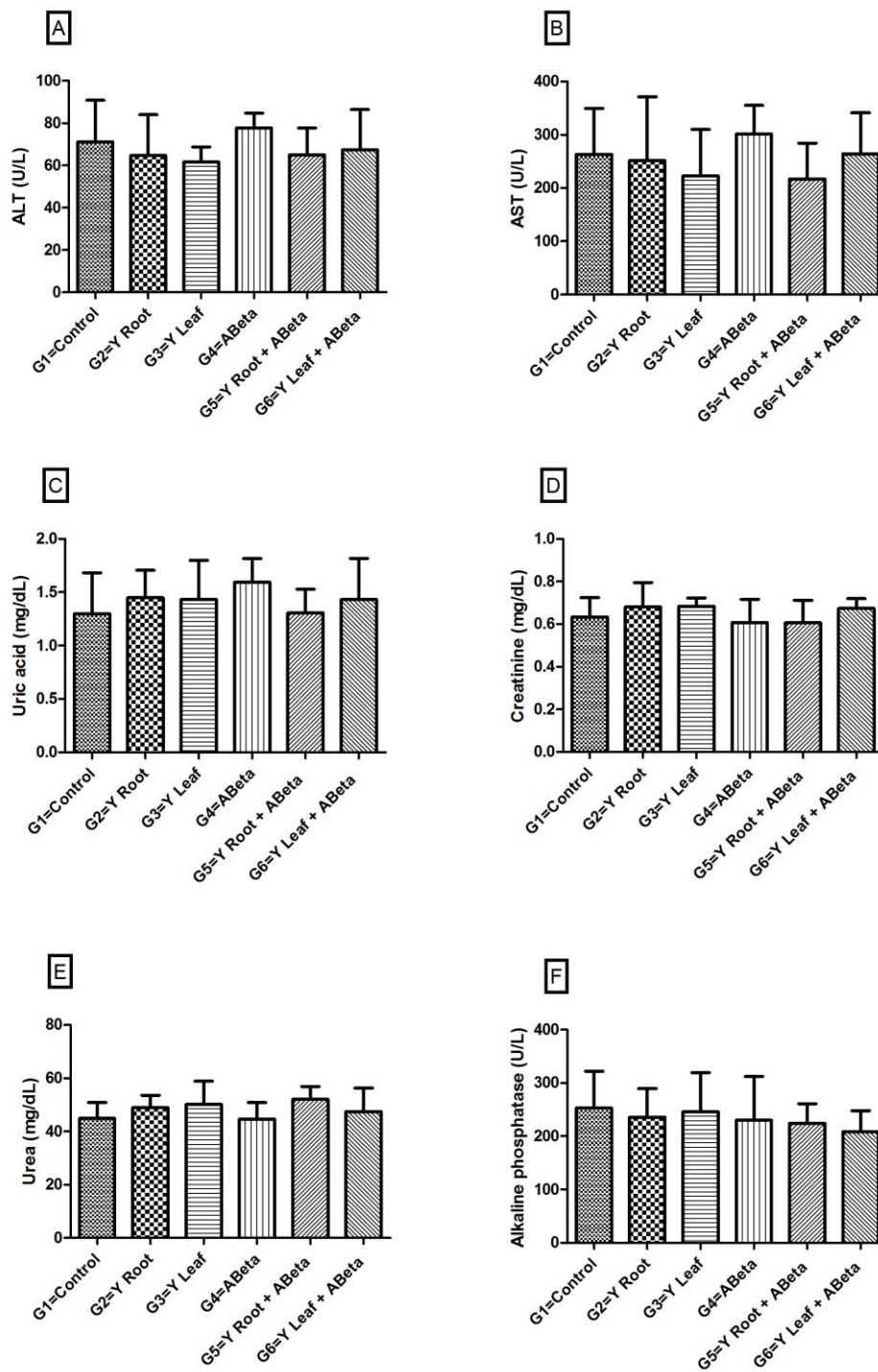


Fig. 5. Biochemical markers of liver and kidney function. A: AST; B: ALT; C: Uric acid; D: creatinine; E: Urea; F: Alkaline Phosphatase. Data are expressed as means \pm S.D

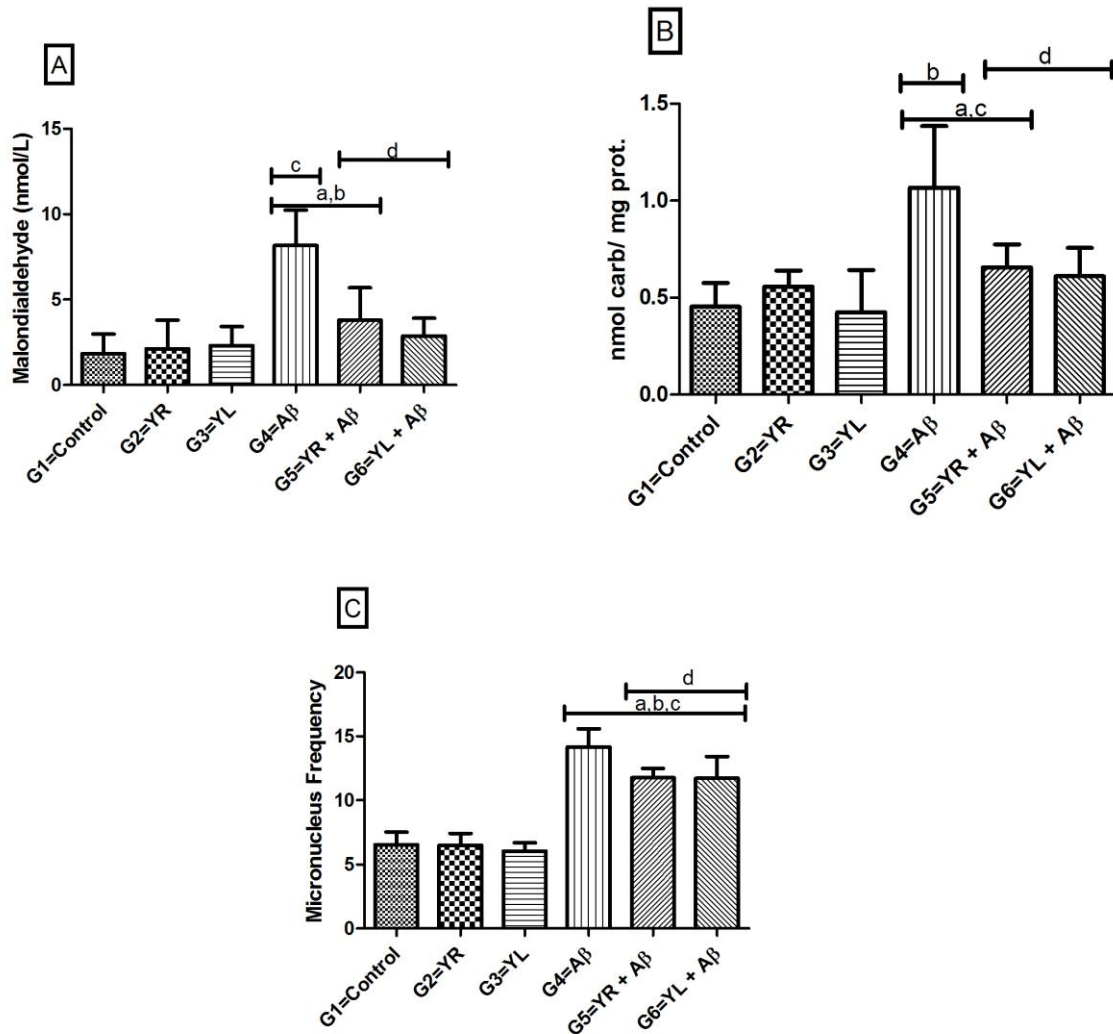


Fig. 6. Biomarkers of oxidative damage in beta-amyloid-induced neurotoxicity rats after treatment of yacon extract. In A: lipid peroxidation levels; B: carbonyl protein contents; C: frequency of micronucleus; Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group 3; d: Significantly different from Group 4. $P < 0.05$ was considered significant.

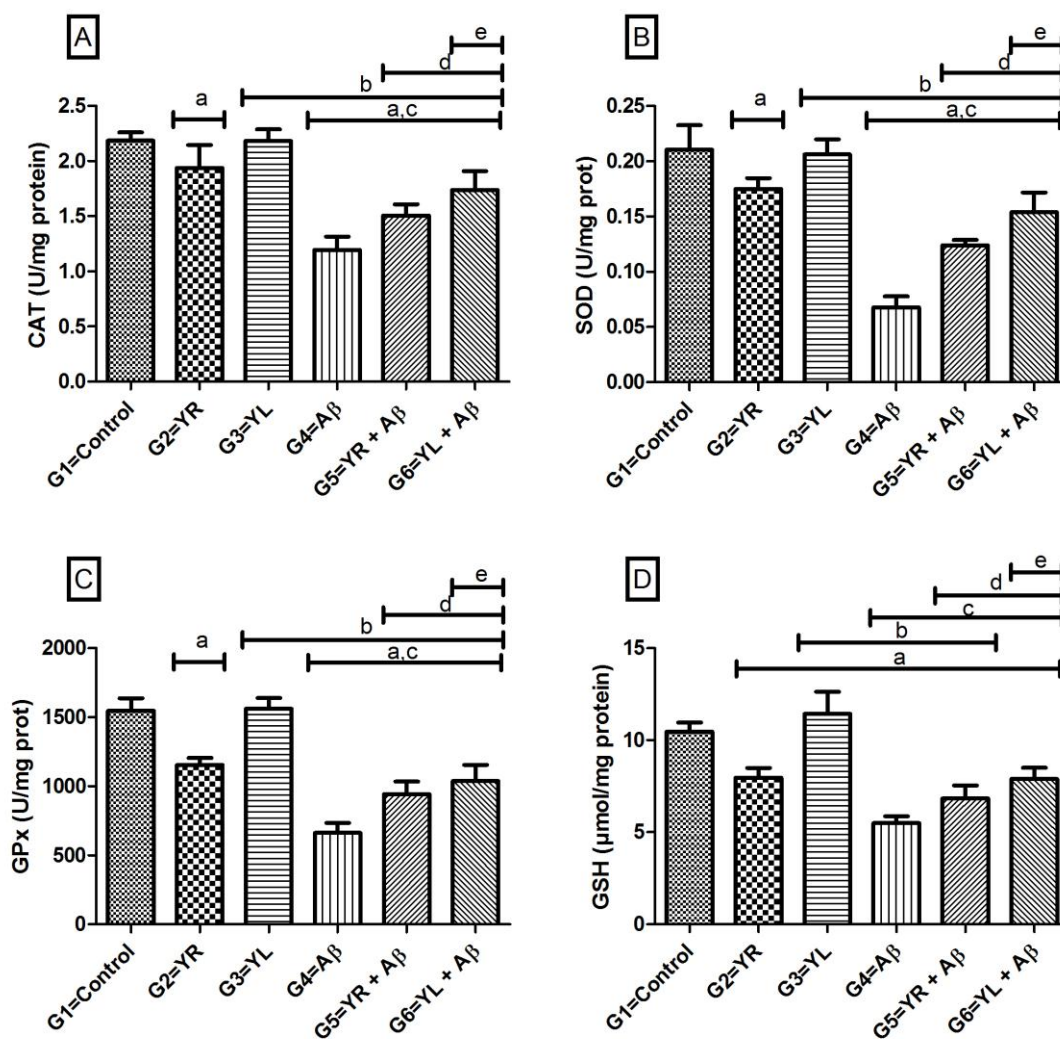


Fig. 7. Antioxidant defenses markers in in beta-amyloid-induced neurotoxicity rats after treatment of Yacon extract. In A: SOD activity; B: CAT activity; C: GPx activity; D: GSH levels. Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group 3; d: Significantly different from Group 4; e: Significantly different from Group 5. $P < 0.05$ was considered significant.

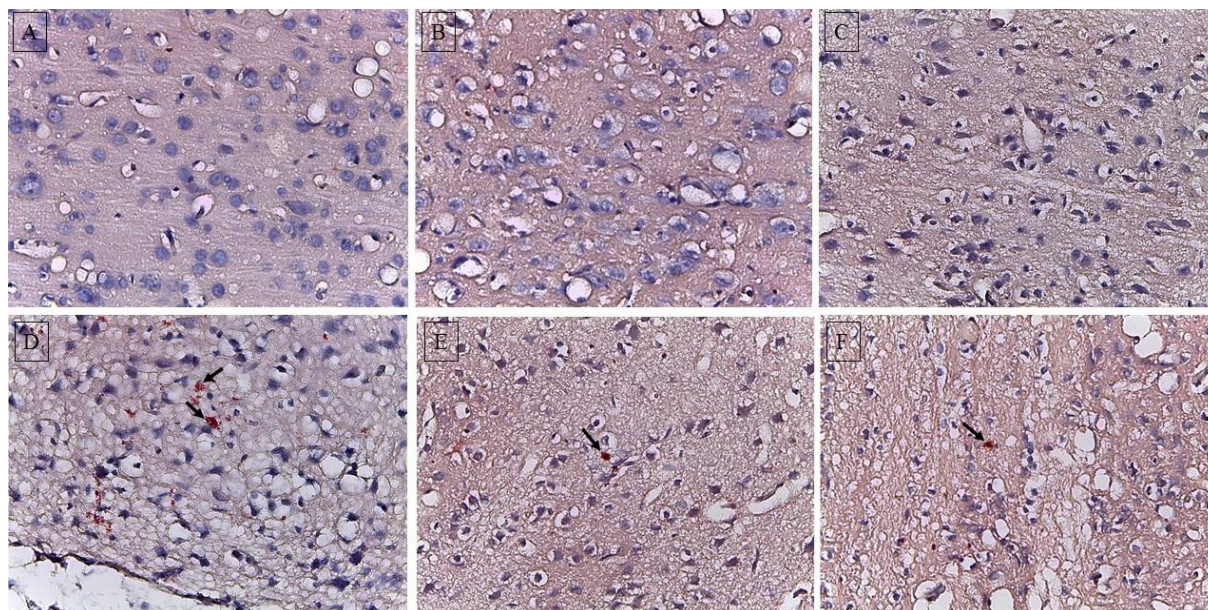


Fig. 8. Histological section of the cerebral cortex rats with beta-amyloid-induced neurotoxicity after treatment of yacon extract. In A: control (40×); B: YR (40×); C: YL (40); D: AB (40×) E: YR + AB (40 ×); F: YL + AB (40 ×). (Red congo). Arrows indicate the presence of deposits of amyloid plaque.

Table 1 – Composition of Yacon extracts.

	Yacon Root (mg/g)	Yacon Leaf (mg/g)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	Standard Curve	Correlation Coefficient (r)
Chlorogenic acid	3.24 ± 0.02 a	2.81 ± 0.02 a	0.008	0.026	$y = 12158x + 1174.9$	0.9996
Caffeic acid	4.17 ± 0.05 b	2.49 ± 0.01 b	0.017	0.057	$y = 20367x - 1162400$	0.9890
Ellagic acid	0.53 ± 0.01 c	–	0.023	0.075	$y = 13485x + 1195.9$	0.9993
Rutin	3.28 ± 0.03 a	2.35 ± 0.03 b	0.028	0.093	$y = 19217x - 16913$	0.9998
Quercetin	7.46 ± 0.02 d	7.08 ± 0.04 c	0.011	0.035	$y = 32214x - 259717$	0.9968
Apigenin	2.91 ± 0.01 e	7.25 ± 0.01 d	0.015	0.049	$y = 12,873x + 1325.6$	0.9998

Results are expressed as mean \pm standard deviations (SD) of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$. LOD: limit of detection and LOQ: limit of quantification.

Table 2- Behavioral control tests -Supplementation with yacon extract and the AD-like rat model had no effect on locomotor and exploratory activities, anxiety and depression. Test results [mean (standard deviation)], number of crossing and rearing (open field), number of entries and time spent in open arms (plus maze), and the Immobility time (Forced swimming).

		Control	YR	YL	A β	YR + A β	YL + A β	P value
Open Field	Crossings	28.82 \pm	33.00	30.67	39.20	30.00	32.88	
	(n)	9.22	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	0.14
			4.86	5.20	5.76	5.65	5.85	
	Rearings	13.64 \pm	10.75	12.33	13.40	12.00	14.25	
	(n)	4.47	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	0.57
			3.80	4.63	3.13	4.30	3.69	
Plus maze	Entries in the closed arm (n)	8.63 \pm	10.75	7.16	6.50	8.40	9.00	
		2.61	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	0.07
			2.81	2.13	3.69	2.60	0.92	
Forced swimming	Immobility time (sec)	11.50 \pm	11.75	13.83	9.60	10.80	13.25	
		3.20	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	0.59
			4.77	4.11	2.07	6.01	5.17	

P > 0.05, ANOVA one-way, n=8 per group.

5. MANUSCRITO

Evaluation *in vitro* of cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and apoptosis of hydroalcoholic extract of leaves and roots from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

Submetido ao periódico “Toxicology and Applied Pharmacology”



CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO**Submission Confirmation to Toxicology and Applied Pharmacology**

TAAP <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Qua, 17/04/2019 17:25

Para: pattymartinez87@hotmail.com <pattymartinez87@hotmail.com>

Article Type: Research Paper

Dear Mrs. Martinez-Oliveira,

Your submission entitled "Evaluation in vitro of cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and apoptosis of hydroalcoholic extract of leaves and roots from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)" has been received for consideration in Toxicology and Applied Pharmacology.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your work to Toxicology and Applied Pharmacology.

Kind regards,

Toxicology and Applied Pharmacology

Evaluation *in vitro* of cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and apoptosis of hydroalcoholic extract of leaves and roots from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

Patrícia Martinez-Oliveira^{a,*}, Luísa Zuravski^a, Micaela Federizzi de Oliveira^b, Deise Jaqueline Ströher^a, Ritiéle Pinto Coelho^a, Bruna Cocco Pilar^a, Luís Flávio Souza de Oliveira^{b,c}, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli^{b,c}, Michel Mansur Machado^{b,c}, Cristiane Casagrande Denardin^a, Vanusa Manfredini^{a,b}

Affiliation

^a Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, RioGrande do Sul, Brazil.

^b Course of Pharmacy, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

^c Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiiana, Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica, BR 472, Km 585, Uruguaiiana, RS, Brazil, CEP: 97500-970. Tel.: +55 (55) 3413-4321. Fax: +55 (55) 3414-1484. E-mail address: pattymartinez87@hotmail.com

ABSTRACT

Yacon is an Andean plant that has been used in folk medicine for its medicinal properties. The beneficial effects of this plant are possibly due to the high content of phenolic compounds present in its leaves and roots. This study evaluated the *in vitro* toxicity of the hydroalcoholic extract of leaves and roots from yacon (1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL) through cell viability tests, genotoxic and mutagenic activity in leukocytes culture cells; and cytotoxicity and apoptosis death cell (1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL and 500 µg/mL) in the 3T3 cell line. No mutagenic and cytotoxic activity was observed in leukocyte cultures. Cytotoxic activity was evidenced in the highest concentrations of yacon leaf extract (50 µg/mL and 100 µg/mL), while all concentrations tested with yacon leaf extract there was induction of apoptosis in the 3T3 cells. Genotoxic potential was observed only at higher doses of leaf (50 µg/mL and 100 µg/mL) and root (100 µg/mL) extract. These results suggest that yacon leaf at high concentrations may present toxic potential showing concentration-dependent behavior, however, *in vivo* studies should be performed to validate these results.

Keywords: Yacon; cytotoxicity; genotoxic activity; mutagenic activity; apoptosis.

Abbreviations:

CEP: Committee of Ethics in Research in Humans; CO₂: carbon dioxide; DNA: Deoxyribonucleic acid; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium; H₂O₂: hydrogen peroxide; MTT: (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide); PBS: phosphate-buffered saline.

1. Introduction

The yacon is a plant originating from the Andean regions and has been used in folk medicine for its medicinal properties for the treatment of diabetes and cholesterol disorders (Delgado et al., 2013; Honoré et al., 2015). This plant belongs to the family *Asteraceae*, also known as Compositae, and its scientific name is *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. The names *Polymnia sonchifolia* Poepp. & Endl. and *Polymnia edulis* Wedd are also used in the scientific literature (Santana and Cardoso, 2008).

The yacon is a tuberous root containing fructooligosaccharides as carbohydrate reserves, substances that can benefit human health (Campos et al., 2012). It has been reported that the medicinal properties of yacon are due to the presence of phenolic compounds (Ojansivu et al., 2011), which have a high concentration in the leaves and roots (Arnao et al., 2012). Studies have shown that Yacon has hypoglycemic (Aybar et al., 2001; Satoh et al., 2013; Scheid et al., 2014), antioxidant (Lachman et al., 2007; Oliveira et al., 2015) and hypolipidemic activities (Habib et al., 2011).

Phytotherapy and the use of medicinal plants is an ancient practice with a great current trend in folk medicine. This increasing use of "natural products" without sufficient data on side effects, dose and toxicity is becoming a major problem today (Nasri, 2016). A study demonstrated that consumption of the yacon leaf may conduct the renal toxicity (Oliveira, Rejane BarbosaPaula et al., 2011). However, other reports on its toxicology, possible consequences on genetic material and safety in use are rare in the literature. Thus, the objective of this study was to investigate the cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of the hydroalcoholic extract of leaves and roots from yacon in cell cultures of human leukocytes and cytotoxicity and apoptosis response in the 3T3 cell line.

2. Materials and methods

2.1 Plant material and preparation of the extract

The yacon roots were provided by Emater/RS and cultivated in a property in Alegrete/RS, Brazil (Geographical coordinates: 29° 48' 88'' S and 55° 40' 22'' W). The roots and leaves were duly transported fresh to Uruguaiana/RS, Brazil (Geographical coordinates: 29° 44' 58" S and 57° 5' 18" W), where they were processed immediately.

The hydroalcoholic yacon extract was obtained from 70% ethanol: water (v/v). The roots were washed, peeled, and dried at 37°C for 72 h, and the leaves were washed and dried at 37°C for 5 h. Both roots and leaves were placed in contact with the solvent for 7 days in the dark, according to a slightly modified method previously described (Baroni et al., 2008). After filtering in filter paper to remove the vegetal residue, the extract was concentrating under reduced pressure using a rotary evaporator at 40 °C, the remaining water portion was lyophilized. The lyophilized product was stored at -70 °C until further use.

2.2 Human blood samples and Cell cultures of human leukocyte preparation

Peripheral blood was collected from a male human volunteer by venipuncture into sterile vials containing 68 I.U. of sodium heparin (BD Vacutainer®; Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) per mL of blood, and then whole-blood cultures were established. This study was approved by the Committee of Ethics in Research in Humans (CEP) of the Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil (Authorization No. 27045614.0.0000.5323).

The leukocyte cultures were prepared with 1 mL of whole-blood sample and immediately transferred to 9 mL of RPMI 1640 culture medium supplemented with 25% fetal bovine serum, 1% streptomycin/penicillin, and 2% *phytohemagglutinin* (Danielli et al., 2017; Güez et al., 2017; Krüger et al., 2015). The cells were then placed in a microaerophilic environment with 5% carbon dioxide (CO₂) at 37°C for 72 h. The solutions analyzed included

the extract of leaves and roots from yacon diluted in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, at concentrations of 1.0, 10, 50, 100, and 500 µg/mL. PBS was used as negative control, and 100 µM hydrogen peroxide (H₂O₂) was used as positive control. Each group consisted of three culture flasks. Genetic parameters were analyzed after 72 h of growth, which included cellular viability, comet assay, and micronucleus test.

2.3 Cellular viability in cell cultures of human leukocyte

The viability was determined using trypan blue solution, which is assessed by the loss of membrane integrity. This test was performed by mixing 100 µL of each sample with 100 µL of 0.4% trypan blue solution and checking after 3 min. A total of 100 cells were counted for each survival determination. The test cytotoxic is based on the principle that living cells have intact cell membranes that exclude the dye, while the dead cells do not. Thus, a viable cell will have a clear cytoplasm, and an already nonviable cell will have a blue cytoplasm as it absorbs the dye. The cells were analyzed through microscopic observation, and the percentage of viable cells was determined (Burow et al., 1998).

2.4 Comet assay and Micronucleus test

The principle of this technique is DNA migration in an agarose matrix under electrophoretic conditions. After incubation, the samples were mixed with low-melting point agarose and placed on a microscope slide precoated with normal melting point agarose. The slides were immersed in a lysis solution, and electrophoresis was performed for 20 min at 300 mA and 25 V. Then, the slides were neutralized and left to dry overnight at room temperature. The dry slides were rehydrated and then fixed for 10 min and left to dry again. The last stage was coloring and the use of stop solution (Singh et al., 1988). The slides were analyzed under blind conditions. DNA damage was defined as DNA damage index (DI) by counting 100 cells in the slides and visually scored according to tail length, with scores ranging from 0 (no migration, cells without morphological alterations) to 4 (maximal migration, fragmented

DNA totally, comet tail format, maximum injury). When observed under a microscope, the cells have the appearance of a comet, with a head (nuclear region) and a tail containing DNA fragments that migrated toward the positive (Hartmann et al., 2003).

For the micronucleus, slides were stained by panoptic method and then analyzed under an optical microscope with immersion lens. For each slide, 100 cells were counted, and the micronucleus frequency was determined (Schmid, 1975).

2.5 Cell line culture and treatments

The 3T3-Swiss albino cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC® CCL-92™). Cell treatment and all experimental procedures were performed at Federal University of Pampa (Uruguaiana, RS, Brazil). Cells were routinely maintained in Dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 2 g/L HEPES buffer (pH 7.4). Cells were plated (5×10^4 cells/mL) in 24-well plates and cultured under 37 °C and 5 % CO₂ conditions for 24 h to reach 60–70 % of confluence before treatment. Yacon leaf and root extract was diluted in culture medium to final concentrations of 1, 10, 50, 100 and 500 µg/mL just before use. The 3T3 cells were treated in the dark for 24 h.

2.6 Colorimetric MTT assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma Inc., Saint Louis, MO, USA) is a yellow tetrazolium salt that is reduced to purple formazan crystals. The MTT assay is widely used for the assessment of cytotoxicity, cell viability and proliferation studies in cell biology. Preconfluent 3T3 cells were incubated with different concentrations of yacon leaf and root extract for 24h. Cells were then incubated with 1 mg/ml MTT for 2 h at 37°C. Purple crystals were dissolved in dimethylsulfoxide (Sigma Inc.). The absorbance was measured using a spectrophotometric microplate reader (Spectra Max M5;

Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 570 nm and 630 nm. Percentages of cell viability were calculated relative to cell controls.

2.7 Cell apoptosis assay in yacon leaf extract

Induction of apoptosis was evaluated through Caspase 3/7 activity was measured with the CellEvent™ caspase 3/7 Green Detection Reagent (Life Technologies). On cleavage by activated caspase 3/7, the probe becomes fluorescent and free to bind to DNA. After treatment with the extracts the cells were incubated for 10 min according to kit instructions and the green fluorescence was evaluated using Flouo Cell Imaging (Life Technologies).

2.9 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by *post hoc* Bonferroni test for multiple comparisons. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$. These analyses were performed using the free software R version 3.1.1 (R Core Team, 2014).

3. Results

3.2. Cellular viability in cell cultures of human leukocyte

Result of the cellular viability assay is demonstrated in Fig. 1A. All treatments resulted in significantly higher ($p < 0.05$) viability than that of positive control, being similar to negative control.

3.3. Comet assay

Fig. 1B shows the results of comet assay. Leaf extract at both 10 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations and root extract at 50, 10, and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations showed similar results to those of the negative control but were significantly smaller ($p < 0.05$) than that of the positive control. Leaf extract at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration showed significantly higher results than those of the positive control. At 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration (leaf extract) and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

concentration (root extract), similar results to those of the positive control were obtained. Leaf extract (100 and 50 µg/mL) and root extract (100 µg/mL) showed genotoxic activity at higher concentrations tested, whereas the root extract showed lesser DNA damage than that with leaf extract.

3.4. Micronucleus test

The results of micronucleus frequency are demonstrated in Fig. 1C. All treatments showed significantly smaller ($p < 0.05$) values than those of the positive control, but were similar to those of the negative control. These results demonstrated that there was no mutagenic activity at all the concentrations tested for both extracts.

3.5. Effect of yacon in 3T3 cell line

In the yacon root extract treatment, none of the test groups showed a decrease in cell viability compared to the control group, as well as the concentrations of 1 µg / mL and 10 µg / mL of the leaf extract, however the doses 50 µg / mL, 100 µg / mL and 500 µg/mL, a percentage of reduced cell viability was found to be 72%, 46% and 22% respectively (Fig. 2A).

3.6. Cell apoptosis assay

The figure 3 showed monitoring apoptosis by fluorescent detection of caspase -3/7 in leaf extract yacon treatment. There was an increase in the activity of caspase -3/7 in all concentrations tested.

4. Discussion

Our findings demonstrate, for the first time the toxic effects of the hydroalcoholic extract of leaves and roots from yacon in cell cultures of human leukocytes and 3T3 cell line. The main results suggest that, there was cytotoxic activity in the highest concentrations of leaf extract. Genotoxic potential was observed only at higher doses of leaf and root extract, while no mutagenic activity was observed at any dose tested.

Plants are rich in natural antioxidants that can have play an important role in protecting the human body against various diseases besides great potential in improving these processes (Gomathi et al., 2013). Thus, many plants as yacon are being used indiscriminately without any data on the safety and tolerability of these phytoterapic in humans. Therefore cytotoxic, mutagenic, and genotoxic assays are needed to establish the safety of these compounds. Cell cultures, because of their ability to multiply *in vitro*, are an attractive alternative to assess the toxicity of natural products and thus estimate the initial doses for *in vivo* toxicity studies (Barcellona et al., 2012).

Our study demonstrated that leaf extract at the highest concentrations in 3T3 cell line (500, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed a significant decrease in cell viability, indicating a concentration-dependent cytotoxic effect. The other concentrations of the leaf and root extracts did not alter the cellular viability, indicating no cytotoxic activity. Our findings corroborate with those of Barcellona et al. (Barcellona et al., 2012) that although using cell lines and different concentrations also observed cell viability decreased with increasing concentrations of the 10% decoction of yacon leaves. This study evaluate the potential toxicity of the 10% decoction (2, 10, 20, 100 and 200 μg of dry extract/ mL) of yacon leaves in four different cell lines (Hep-G2, COS1, CHO-K1 and Vero cell lines). The concentration at which cell viability was inhibited to 50% of control values (IC50) was 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hep-G2 and CHO-K1 cell lines), 175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (COS1 cell line) and 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Vero cell line).

On the basis of cytotoxicity data of the leaf extract in 3T3 cell line we carry out additional studies on apoptosis, caspase-3/7 activation were examined. Apoptosis is a programmed and orderly form of cell death that eliminates undesirable cells without inflammatory consequence close to the tissue, is also important for the maintenance of tissue homeostasis or may contribute to the pathogenesis of diseases. Apoptosis is characterized by morphological changes (shrinkage, depolarization of mitochondria, condensation and nuclear

fragmentation), biochemical and molecular, and can be measured by several methods that evaluate these changes that occur in the cell during this process (Choudhary et al., 2015; Hanson and Finkelstein, 2019). The most evident biochemical characteristic of apoptosis is the activation of caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) which are a large family of cysteine proteases that have the ability to recognize and cleave substrates on the carboxy-terminal side of specific aspartic acid residues. Caspases in relation to their function can be classified as initiators (caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) or executors (caspases-3, -6 and -7). All caspases are synthesized as inactive zymogens and activated by a series of cleavages or allosteric conformational changes. In general, the activity of caspase-3/7 is greatly enhanced in the apoptosis process and activity detection is considered a reliable marker for cells that are dying or apoptosed (Balderstone et al., 2019; Shoja et al., 2015; Zeng et al., 2018). In this study, we observed through intense fluorescence that there was induction to apoptosis at all concentrations tested of yacon leaf extract, including those that did not present differences in cell viability. These results suggest that possibly longer treatment with yacon leaf extract would result in cytotoxicity even at the lower doses.

There are several methods to evaluate genotoxic influence, and in this study, we used the comet assay and micronucleus frequency test. Genotoxic activity was determined through the comet assay involving electrophoresis of lysed cells embedded in agarose on a microscope slide. Undamaged DNA stays within the core, whereas fragmented DNA migrates from the core toward the anode, forming an image resembling a comet with a head and a tail, and the relative content of DNA in the tail indicates the frequency of breaks (Dusinska and Collins, 2008; Lee et al., 2013).

Genotoxicity is usually a result of hereditary mutation characteristics or breakage of DNA strands, leading to apoptosis, carcinogenesis, or alteration of phenotype (Akhtar et al.,

2016). Our findings demonstrated that these extracts have genotoxic potential at higher concentrations.

Mutagenic activity was determined through the micronucleus frequency assay. Micronuclei are structures constituted of chromatin genetic material and can be whole chromosomes or acentric chromosome fragments that cannot incorporate into the nucleus during cell division, thereby forming a small independent nucleus, appearing around the nuclear envelope or the cytoplasm of cells exposed to toxic agents. Micronucleus frequency determination provides an estimate of the presence of chromosomal changes (OECD, 2010). No mutagenic activity was observed in for any of the doses administered. These results corroborate with the findings of Sakuma et al. (2009) (Sakuma K, Narita T, Kaitou K, Yamamoto M, Furuya M, Oku Y, Yui R, 2009) who evaluated the mutagenic potential of the extract from the leaf and stem of yacon by the bacterial reverse mutation test (Ames test) and the mouse bone marrow micronucleus test and did not observe gene mutations or clastogenic activity *in vivo*. Another study carried out by Cuyacot (Cuyacot et al., 2014) evaluated the effect of the ethanolic extract of yacon (5, 15, 25, 35, 50 mg/mL) on *Allium cepa* and no chromosomal aberration was found with the frequency of micronuclei and chromosome fragments being equal to that of the control.

5.0 Conclusion

Yacon can be considered as a plant with multiple functions, in addition to not exhibiting mutagenic activity. We observed that leaf extract induce concentration-dependent cytotoxicity and apoptosis in 3T3 cell line. Genotoxic potential was demonstrated only at higher concentrations of leaf and root extracts. These results suggest that yacon leaf at high concentrations may present toxic potential showing concentration-dependent behavior, however, *in vivo* studies should be performed to validate these results.

Authors' contributions

P.M.O. is responsible for conception, design, and drafting of the manuscript. L.Z., M.F.O., D.J.S., R.P.C., B.C.P., L.F.S.O., collected and processed the samples. J.C.EP contributed in statistical analysis. M.M.M., C.C.D., V.M supervised the study. All authors approved the final version for submission.

Conflict of interest statement

The authors report no conflict of interests.

REFERENCES

- Akhtar, M.F., Saleem, A., Sharif, A., Akhtar, B., Nasim, M. Bin, Peerzada, S., Raza, M., Ijaz, H., Ahmed, S., Shabbir, M., Ali, S., Akbar, Z., Ul Hassan, S.S., 2016. Genotoxic and cytotoxic action potential of terminalia citrina, a medicinal plant of ethnopharmacological significance. EXCLI J. 15, 589–598.
<https://doi.org/10.17179/excli2016-551>
- Arnao, I., Suárez, S., Cisneros, R.Y., Trabucco, J., 2012. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la raíz y las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (YACÓN). Rev. la Soc. Química del Perú 78, 120–125.
- Aybar, M.J., Sánchez Riera, A.N., Grau, A., Sánchez, S.S., 2001. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 74, 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00351-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00351-2)
- Balderstone, L.A., Dawson, J.C., Welman, A., Serrels, A., Wedge, S.R., Brunton, V.G., 2019. Development of a fluorescence-based cellular apoptosis reporter Development of a fluorescence-based cellular apoptosis reporter.
- Barcellona, C.S., Cabrera, W.M., Honoré, S.M., Mercado, M.I., Sánchez, S.S., Genta, S.B., 2012. Safety assessment of aqueous extract from leaf *Smallanthus sonchifolius* and its main active lactone, enhydrin. J. Ethnopharmacol. 144, 362–370.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.09.021>

Baroni, S., Suzuki-Kemmelmeier, F., Caparroz-Assef, S.M., Cuman, R.K.N., Bersani-Amado, C.A., 2008. Effect of crude extracts of leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) on glycemia in diabetic rats. *Rev. Bras. Ciências Farm.* 44, 521–530.

<https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300024>

Burow, M.E., Weldon, C.B., Tang, Y., Navar, G.L., Krajewski, S., Reed, J.C., Hammond, T.G., Clejan, S., Beckman, B.S., 1998. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer Res.* 58, 4940–4946.

Campos, D., Betalleluz-Pallardel, I., Chirinos, R., Aguilar-Galvez, A., Noratto, G., Pedreschi, R., 2012. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chem.* 135, 1592–1599. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.088>

Choudhary, G., Al-Harbi, S., Almasan, A., 2015. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol. Biol.* 1219, 1–9.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1661-0_1

Cuyacot, A.R., Mahilum, J.J.M., Madamba, R.M.S.B., 2014. Cytotoxicity potentials of some medicinal plants in Mindanao, Philippines. *Asian J. Plant Sci. Res.* 4, 81–89.

<https://doi.org/10.13140/2.1.3165.4404>

Danielli, L.J., Pippi, B., Soares, K.D., Duarte, J.A., Maciel, A.J., Machado, M.M., Oliveira, L.F.S., Bordignon, S.A.L., Fuentefria, A.M., Apel, M.A., 2017. Chemosensitization of filamentous fungi to antifungal agents using *Nectandra* Rol. ex Rottb. species essential oils. *Ind. Crops Prod.* 102, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.013>

Delgado, G.T., Tamashiro, W.M., Maróstica Junior, M.R., Pastore, G.M., 2013. Yacon

(*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. *Plant Foods Hum. Nutr.* 68, 222–228.

<https://doi.org/10.1007/s11130-013-0362-0>

Dusinska, M., Collins, A.R., 2008. The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23, 191–205.

<https://doi.org/10.1093/mutage/gen007>

Gomathi, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Devaki, K., Uma, C., 2013. Efficacy of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. on insulin and antioxidants activity in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. *J. Diabetes Metab. Disord.* 12, 39.

<https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-39>

Güez, C.M., de Souza, R.O., Fischer, P., Leão, M.F. de M., Duarte, J.A., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Zuravski, L., de Oliveira, L.F.S., Machado, M.M., 2017. Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on oxidative, anti-genotoxic and anti-inflammatory effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 53. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000115098>

Habib, N.C., Honoré, S.M., Genta, S.B., Sánchez, S.S., 2011. Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: Biochemical approach. *Chem. Biol. Interact.* 194, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.08.009>

Hanson, K.M., Finkelstein, J.N., 2019. An accessible and high-throughput strategy of continuously monitoring apoptosis by fluorescent detection of caspase activation. *Anal. Biochem.* 564–565, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.10.022>

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45–51.
<https://doi.org/10.1093/mutage/18.1.45>

Honoré, S.M., Genta, S.B., Sánchez, S.S., 2015. *Smallanthus sonchifolius* (Yacon) leaves : an emerging source of compounds for diabetes management. *J. Res. Biol.* 5, 21–42.

- Krüger, C., Malheiros, C., Sayonara, J., Silva, B., Hofmann, T.C., Messina, T.M., Manfredini, V., Escobar, C., Flávio, L., Oliveira, S., Machado, M.M., Farias, F.M., 2015. Preliminary in vitro assessment of the potential toxicity and antioxidant activity of *Ceiba speciosa* (A . St . -Hill) Ravenna (Paineira). *Brazilian J. Pharm. Sci.* 53, 1–12.
- Lachman, J., Fernández, E.C., Viehmannová, I., Šulc, M., Èepková, P., 2007. Total phenolic content of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) rhizomes, leaves, and roots affected by genotype. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 35, 117–123.
<https://doi.org/10.1080/01140670709510175>
- Lee, R.F., Bulski, K., Adams, J.D., Peden-adams, M., Bossart, G.D., King, L., Fair, P.A., 2013. DNA strand breaks (comet assay) in blood lymphocytes from wild bottlenose dolphins. *Mar. Pollut. Bull.* 77, 355–360<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.017>
- Nasri, H., 2016. Herbal drugs and new concepts on its use 1, 2015–2016.
- OECD, 2010. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1787/9789264091016-en>
- Ojansivu, I., Ferreira, C.L., Salminen, S., 2011. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 40–46.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.005>
- Oliveira, Rejane BarbosaPaula, D.A.C., Rocha, B.A., Franco, J.J., Gobbo-Neto, L., Uyemura, S.A., Dos Santos, W.F., Da Costa, F.B., 2011. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. *J. Ethnopharmacol.* 133, 434–441.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.019>
- Oliveira, P., Maurer, P., Pilar, B., Coelho, R., da Costa Gullich, A., Nunes, V., da Costa Escobar Piccoli, J., Manfredini, V., 2015. Evaluation of hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects in vivo of extracts hydroalcoholic of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Diabetol. Metab. Syndr.* 7, A64. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-7-S1->

A64

- Sakuma K, Narita T, Kaitou K, Yamamoto M, Furuya M, Oku Y, Yui R, 2009. Mutagenicity Tests of the Extract from the Leaf and Stem of Yacon. *Life Sci. Tokyo* 37, 405–410.
- Santana, I., Cardoso, M.H., 2008. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. *Ciência Rural* 38, 898–905. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000300050>
- Satoh, H., Audrey Nguyen, M.T., Kudoh, A., Watanabe, T., 2013. Yacon diet (*Smallanthus sonchifolius*, Asteraceae) improves hepatic insulin resistance via reducing Trb3 expression in Zucker fa/fa rats. *Nutr. Diabetes* 3, e70. <https://doi.org/10.1038/nutd.2013.11>
- Scheid, M.M.A., Genaro, P.S., Moreno, Y.M.F., Pastore, G.M., 2014. Freeze-dried powdered yacon: effects of FOS on serum glucose, lipids and intestinal transit in the elderly. *Eur. J. Nutr.* 53, 1457–1464. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0648-x>
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31, 9–15.
- Shoja, M.H., Reddy, N.D., Nayak, P.G., Srinivasan, K.K., Rao, C.M., 2015. Glycosmis pentaphylla (Retz .) DC arrests cell cycle and induces apoptosis via caspase-3 / 7 activation in breast cancer cells. *J. Ethnopharmacol.* 168, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.048>
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Zeng, L., Qian, J., Luo, X., Zhou, A., 2018. CHSY1 promoted proliferation and suppressed apoptosis in colorectal cancer through regulation of the NF κ B and / or caspase - 3 / 7 signaling pathway 000, 6140–6146. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9385>

FIGURE 1

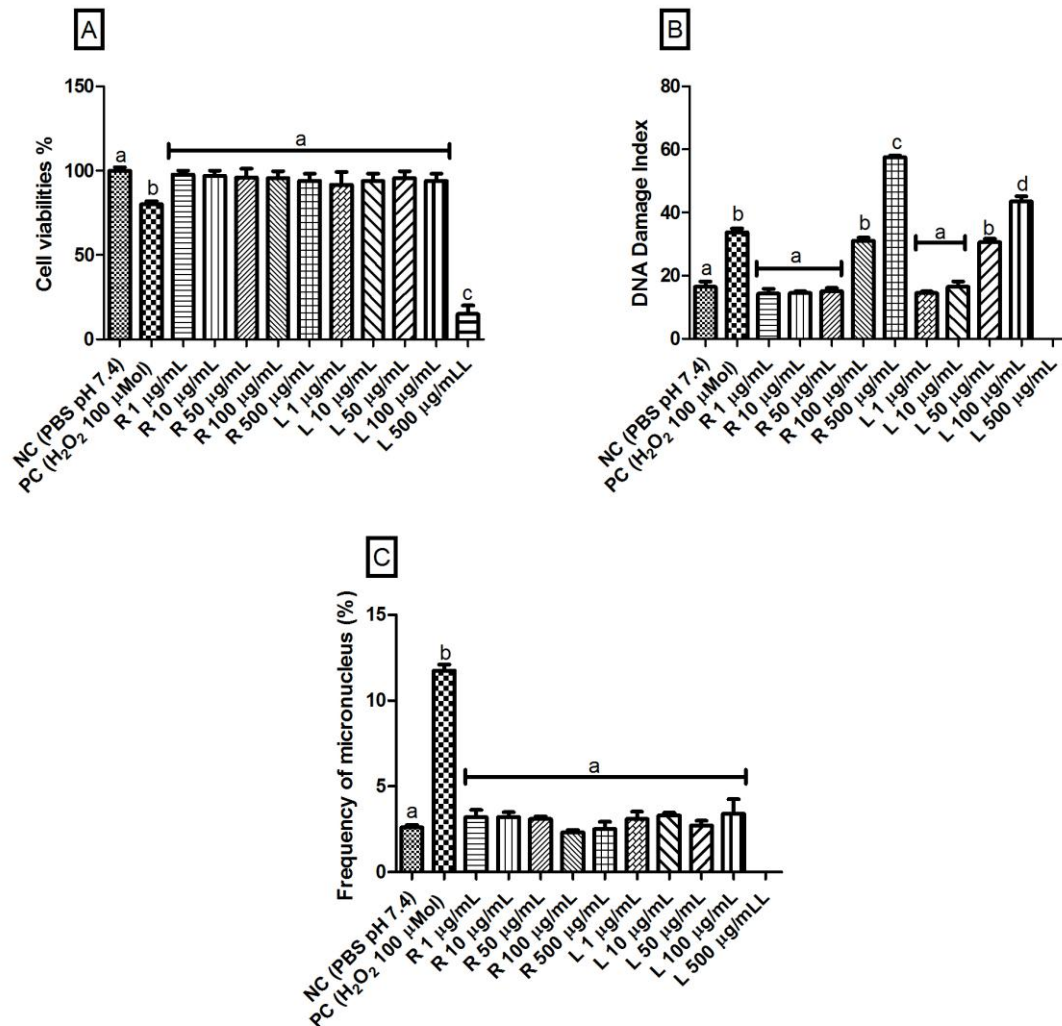


Fig. 1. Effect of yacon in human leukocytes culture. In A: Cellular viability; B: Comet assay; C: Frequency of micronucleus. NC: negative control; PC: positive control; L: Yacon leaf extract; R: Yacon root extract. Averages followed by different letters differ by one-way ANOVA followed by Bonferroni's comparison *post hoc* test at $p < 0.05$.

FIGURE 2A

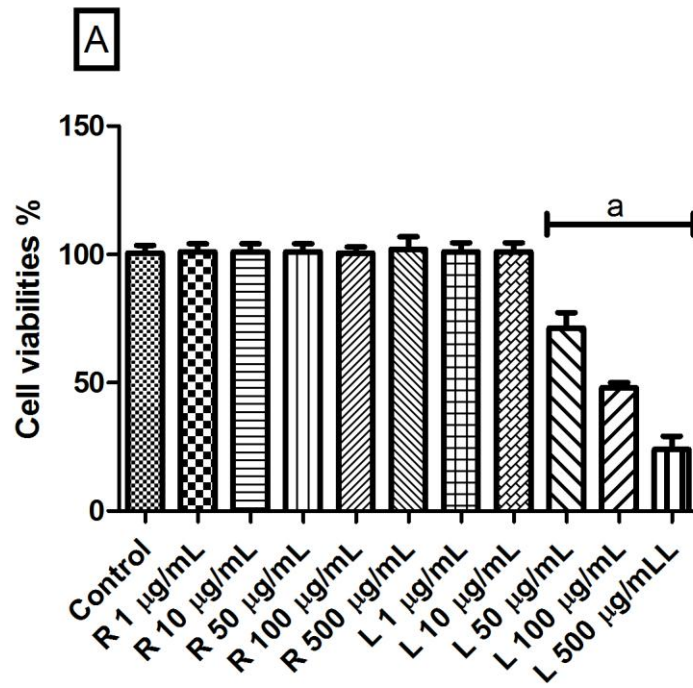


FIGURE 2B

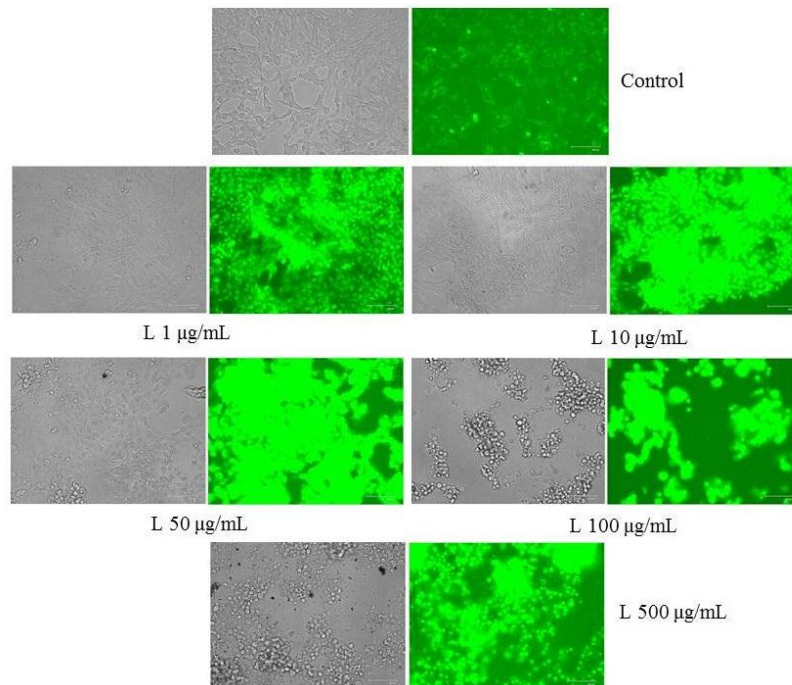


Fig. 2. Effect of yacon in 3T3 cell line. In A: Cellular viability; B: Cell apoptosis assay. L: Yacon leaf extract; R: Yacon root extract. Averages followed by different letters differ by one-way ANOVA followed by Bonferroni's comparison *post hoc* test at $p < 0.05$.

PARTE III

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho indicam que:

- os compostos majoritários das folhas e raízes são apigenina e quercetina, respectivamente.

In vitro:

- não foi evidenciada atividade mutagênica com as folhas ou raízes do yacon;
- foi identificada uma atividade citotóxica somente na maior concentração de extrato da folha;
- houve potencial genotóxico apenas em doses mais elevadas de extrato de folhas e raízes;
- o extrato da folha do yacon apresentou atividade citotóxica nas maiores concentrações na cultura de células 3T3;
- o extrato da folha do yacon induziu a apoptose em todas as concentrações nas células 3T3;

In vivo:

- a suplementação com a folha reduziu o déficit de memória induzido pela A β ;
- a suplementação com yacon, não levou a depressão ou ansiedade;
- perfil lipídico não foi alterado nos animais;
- a indução com A β reduziu os níveis glicêmicos;
- o extrato das folhas e raízes não se mostrou hepatotóxico nem nefrotóxico;
- a suplementação com yacon melhorou parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo dos animais, tais como peroxidação lipídica, carbonilação proteica, e também reduziu a frequência de micronúcleos em leucócitos;
- o tratamento com yacon aprimorou as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas no hipocampo;

Assim, a folha do yacon mostrou ser uma planta medicinal de futuro promissor na prevenção ou tratamento do Alzheimer, pois nossos resultados demonstraram ter efeito benéfico sobre vários parâmetros importantes nessa condição. No entanto, testes *in vivo* devem ser realizados para avaliar a atividade toxicológica dessa planta, já que nossos testes *in vitro* sugerem um potencial toxicológico.

7 PERSPECTIVAS

- Determinar marcadores inflamatórios como proteína C reativa ultrasensível, TNF- α , IL-1, IL-6 em plasma em modelo de Alzheimer.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato das folhas e raízes do yacon.
- Investigar os efeitos do extrato da folha e raiz do yacon em modelo de obesidade (dieta de cafeteria, síndrome metabólica).
- Investigar o efeito neuroprotetor das folhas e raízes do yacon em modelo de acidente vascular encefálico em ratos

REFERÊNCIAS

ABOLHASSANI, N. *et al.* Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain.

Mechanisms of Ageing and Development, v. 161, p. 95–104, 2017.

ABRAZ. “O que é Alzheimer”? Disponível em: <<http://abraz.org.br/web/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer/>>. Acesso em: 26 mar. 2019a.

_____. **Atualizações Científicas: Exame de marcadores biológicos**. Disponível em: <<http://abraz.org.br/web/sobre-alzheimer/atualizacoes-cientificas/>>. Acesso em: 28 mar. 2019b.

AGGARWAL, N. T.; SHAH, R. C.; BENNETT, D. A. Alzheimer's disease: Unique markers for diagnosis & new treatment modalities. **The Indian journal of medical**, v. 142, n. 4, p. 369–382, 2015.

AGOSTINI, M.; FASOLATO, C. When, where and how? Focus on neuronal calcium dysfunctions in Alzheimer's Disease. **Cell Calcium**, v. 60, n. 5, p. 289–298, 2016.

AKHTAR, M. F. *et al.* Genotoxic and cytotoxic action potential of terminalia citrina, a medicinal plant of ethnopharmacological significance. **EXCLI Journal**, v. 15, p. 589–598, 2016.

ALMEIDA PAULA, H. A. DE; ABRANCHES, M. V; FERREIRA, DE LUCES FORTES, C. L. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a food with multiple functions. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 1, p. 32–40, 2015.

AMIN, M.; ARBID, M. Estimation of ellagic acid and/or repaglinide effects on insulin signaling, oxidative stress, and inflammatory mediators of liver, pancreas, adipose tissue, and brain in insulin resistant/type 2 diabetic rats. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 42, n. 2, p. 181–192, 2017.

ANAND, P.; SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 4, p. 375–399, 2013.

ANTHONYMUTHU, T. S.; KENNY, E. M.; BAYIR, H. Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. **Brain Research**, v. 1640, p. 57–76, 2016.

ARALDI, R. P. *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, 2015.

ARI, F. *et al.* Genotoxic , Cytotoxic , and Apoptotic Effects of Hypogymnia physodes (L .)

- Nyl . on Breast Cancer Cells. n. 2008, p. 804–813, 2012.
- ARNAO, I. *et al.* Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la raíz y las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (YACÓN). **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 78, n. 2, p. 120–125, 2012.
- ASLANTÜRK, Ö. **In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages**. [s.l.: s.n.]. v. 2
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–31, 2014.
- AYBAR, M. J. *et al.* Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 125–132, 2001.
- AYED-BOUSSEMA, I. *et al.* Toxicities induced in cultured cells exposed to zearalenone: Apoptosis or mutagenesis? **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 21, n. 3, p. 136–144, 2007.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v. 109, n. 1, p. 33–44, 2000.
- BAEK, S. *et al.* *Smallanthus sonchifolius* leaf attenuates neuroinflammation. v. 22, n. 2, p. 31–35, 2018.
- BAJKO, E. *et al.* 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 471–479, 2016.
- BALLMANN, C. *et al.* Long-term dietary quercetin enrichment as a cardioprotective countermeasure in mdx mice. **Experimental Physiology**, v. 102, n. 6, p. 635–649, 2017.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BASU MALLIK, S. *et al.* Neuroscience Letters Caffeic acid attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour and neuroinflammation in mice. **Neuroscience Letters**, v. 632, p. 218–223, 2016.

- BATTIN, E. E.; BRUMAGHIM, J. L. Antioxidant activity of sulfur and selenium: A review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 55, n. 1, p. 1–23, 2009.
- BELLAMAKONDI, P. K. *et al.* In vitro cytotoxicity of caralluma species by mtt and trypan blue dye exclusion. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 2, p. 17–19, 2014.
- BENSAAD, L. A. *et al.* Anti-inflammatory potential of ellagic acid , gallic acid and punicalagin A & B isolated from Punica granatum. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–10, 2017.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse Oxidativo, Lesões no Genoma, Processos de Sinalização e Controle do Ciclo Celular. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340–1344, 2006.
- BHARDWAJ, D. *et al.* Alzheimer's Disease-Current Status and Future Directions. **Journal of medicinal food**, v. 20, n. 12, p. 1141–1151, 2017.
- BHAT, A. H. *et al.* Oxidative stress , mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases ; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101–110, 2015.
- BHATTACHARYYA, A. *et al.* Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological reviews**, v. 94, n. 2, p. 329–354, 2014.
- BORGES, J. T. DA S. *et al.* Yacon na alimentação humana: aspectos nutricionais, funcionais, utilização e toxicidade. **Scientia Amazonia**, v. v.1, n. 3, p. 3–16, 2012.
- BUTTERFIELD, D. A. *et al.* Evidence of oxidative damage in Alzheimer ' s disease brain : central role for amyloid β -peptide. v. 7, n. 12, p. 548–554, 2001.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 222–230, 2000.
- CAETANO, B. F. R. *et al.* Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: Health-promoting benefits of fructooligosaccharides. **Nutrients**, v. 8, n. 7, p. 436, 2016.
- CAMPOS, D. *et al.* Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1592–1599, 2012.
- CAO, Y.; MA, Z. F. Phytochemical Properties and Nutrigenomic Implications of Yacon as a Potential Source of Prebiotic : Current Evidence and Future Directions. 2018.
- CHANG, Y. S. *et al.* Higher levels of thyroxine may predict a favorable response to donepezil

treatment in patients with Alzheimer disease: A prospective, case-control study. **BMC Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 5–10, 2018.

CHEIGNON, C. *et al.* Redox Biology Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer ' s disease. **Redox Biology**, v. 14, n. October 2017, p. 450–464, 2018.

CHEN, H. *et al.* Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 363, n. 1–2, p. 85–91, 2012.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer ' s disease. v. 30, n. 2, p. 271–281, 2014.

CHENG, Y. T. *et al.* DJ-1 plays an important role in caffeic acid-mediated protection of the gastrointestinal mucosa against ketoprofen-induced oxidative damage. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 10, p. 1045–1057, 2014.

CHIANG, E. P. I. *et al.* Caffeic acid derivatives inhibit the growth of colon cancer: Involvement of the PI3-K/Akt and AMPK signaling pathways. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99631, 2014.

CHOW, V. *et al.* An Overview of APP Processing Enzymes and Products. **Neuromolecular medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2011.

CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 805–817, 2013.

COLIZZI, C. The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: A systematic review. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, p. 1–14, 2018.

CONTINO, S. *et al.* Presenilin 2-Dependent Maintenance of Mitochondrial Oxidative Capacity and Morphology. v. 8, n. October, p. 1–11, 2017.

CORRÊA-VELLOSO, J. C. *et al.* Pathophysiology in the comorbidity of Bipolar Disorder and Alzheimer's Disease: Pharmacological and stem cell approaches. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 80, n. Pt A, p. 34–53, 2017.

COUDRAY, C. *et al.* Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 375–380, 2003.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 169–176, 2003.

_____. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389–406, 2006.

DALVI, L. T. *et al.* Ellagic acid inhibits iron-mediated free radical formation. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 910–917, 2017.

DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine - Searching for the connections. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 2, p. 324–352, 2012.

DASGUPTA, A. *et al.* Increased Carbonylation, Protein Aggregation and Apoptosis in the Spinal Cord of Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **ASN Neuro**, v. 5, n. 2, p. AN20120088, 2013.

DAWKINS, E.; SMALL, D. H. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: Beyond Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 129, n. 5, p. 756–769, 2014.

DELGADO, G. T. *et al.* Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 3, p. 222–228, 2013.

DESHMUKH, R. *et al.* Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 81, p. 56–62, 2016.

DUAN, J. *et al.* Direct interaction between caffeic acid phenethyl ester and human neutrophil elastase inhibits the growth and migration of PANC-1 cells. **Oncology Reports**, v. 37, n. 5, p. 3019–3025, 2017.

DUARTE, M. D. R.; WOLF, S.; PAULA, B. G. DE. *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. (yacón): Identificação microscópica de folha e caule para o controle de qualidade farmacognóstico. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 1, p. 157–164, 2008.

DUONG, S.; PATEL, T.; CHANG, F. Dementia: What pharmacists need to know. **Canadian Pharmacists Journal**, v. 150, n. 2, p. 118–129, 2017.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema

de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease : Role of TNF. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–18, 2015.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.

FOTIOU, D. *et al.* Evaluation of the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease with neuropsychological methods. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 27, n. 5, p. 727–733, 2015.

FOTIOU, D. F. *et al.* Cholinergic deficiency in Alzheimer's and Parkinson's disease: Evaluation with pupillometry. **International Journal of Psychophysiology**, v. 73, n. 2, p. 143–149, 2009.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 419–425, 2017.

GELEIJNSE, J. M.; HOLLMAN, P. C. H. Flavonoids and cardiovascular health: Which compounds, what mechanisms? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 1, p. 12–13, 2008.

GENTA, S. *et al.* Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 182–187, 2009.

GENTA, S. B. *et al.* Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 11, p. 1657–1665, 2005.

GIBSON, G.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.

GIRI, M. *et al.* Unraveling the genes implicated in Alzheimer ' s disease (Review). p. 105–114, 2017.

GOMATHI, D. *et al.* HPTLC fingerprinting analysis of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. **Journal of Acute Medicine**, v. 2, n. 3, p. 77–82, 2012.

_____. Efficacy of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. on insulin and antioxidants activity in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of diabetes and metabolic disorders**, v. 12,

n. 1, p. 39, 2013.

GOMES DA SILVA, M. F. *et al.* Yacon syrup : Food applications and impact on satiety in healthy volunteers. **Food Research International**, v. 100, n. May, p. 460–467, 2017.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136–147, 2000.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561–564, 2010.

HABIB, N. C. *et al.* Yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) improve oxidative stress in diabetic rats Yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) improve oxidative stress in diabetic rats. v. 0209, 2015.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634–1658, 2006.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 107–112, 2008.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130, 2011.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American journal of clinical nutrition**, v. 57, n. 5, p. 715–724, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed ed. NY: Oxford University Press: [s.n.].

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

HAMID, A A *et al.* Antioxidants : Its medicinal and pharmacological applications. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 142–151, 2010.

- HELENO, S. A. *et al.* Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.
- HINTZSCHE, H. *et al.* Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85–98, 2017.
- HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 101–108, 2003.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.
- JOUNG, H. *et al.* Antibacterial and synergistic effects of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* under light intensity. **Journal of natural medicines**, v. 64, n. 2, p. 212–215., 2010.
- JÚNIOR, L. R. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112–119, 2001.
- KANEKIYO, T.; XU, H.; BU, G. ApoE and A β in Alzheimer's disease: Accidental encounters or partners? **Neuron**, v. 81, n. 4, p. 740–754, 2014.
- KHAJEHEI, F. *et al.* Yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) as a Novel Source of Health Promoting Compounds: Antioxidant Activity, Phytochemicals and Sugar Content in Flesh, Peel, and Whole Tubers of Seven Cultivars. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 1–18, 2018.
- KIM, G. *et al.* The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325–340, 2015.
- KOVACIC, J. C. *et al.* Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 2, p. 212–229, 2017.
- KUBÁSEK, J. *et al.* Structure, mechanical characteristics and in vitro degradation, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of novel biodegradable Zn-Mg alloys. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 24–35, 2016.
- LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review). **Biomedical Reports**, v. 3, n. 5, p. 617–620, 2015.
- LIN, F.; HASEGAWA, M.; KODAMA, O. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Bioscience**,

biotechnology, and biochemistry, v. 67, n. 10, p. 2154–2159, 2003.

LIU, C. *et al.* Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy.

Nature reviews. Neurology., v. 9, n. 2, p. 106–118, 2013.

LIU, Y. *et al.* Quercetin induces protective autophagy and apoptosis through ER stress via the p-STAT3 / Bcl-2 axis in ovarian cancer. **Apoptosis**, v. 22, n. 4, p. 544–557, 2017.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. *et al.* Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 98, p. 240–250, 2016.

LOBO, A. *et al.* Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl .) flour on caecum mucosal morphometry , calcium and magnesium balance , and bone calcium retention in growing rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 776–785, 2007.

MACHADO, S. *et al.* Morfoanatomia do sistema subterrâneo de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 1, p. 115–123, 2004.

MARGIS, R. *et al.* Glutathione peroxidase family - An evolutionary overview. **FEBS Journal**, v. 275, n. 15, p. 3959–3970, 2008.

MARTINEZ-OLIVEIRA, P. *et al.* Yacon leaf extract supplementation demonstrates neuroprotective effect against memory deficit related to β -amyloid-induced neurotoxicity. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 665–675, 2018.

MARTINS, M.; DELMASCHIO, K.; CORDEIRO, A. Efeitos da utilização de *Smallanthus sonchifolius* (yacon) no tratamento de indivíduos com Diabetes Mellitus. **Ceres**, v. 6, n. 1, p. 35–43, 2011.

MBEH, D. A. *et al.* Applied Surface Science Cytotoxicity of protein corona-graphene oxide nanoribbons on human epithelial cells. **Applied Surface Science**, v. 320, p. 596–601, 2014.

MEHDIZADEH, M. *et al.* Protective effects of *Cyperus Rotundus* extract on amyloid β -peptide (1-40)-induced memory impairment in male rats: A behavioral study. **Basic and Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 249–254, 2017.

MEINTIÈRES, S. *et al.* Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays of chemicals , the chromosomal aberrations and micronu- potential of molecules and lead to false positive results . demonstrate the interference of apoptosis in two muta-. **Mutagenesis**, v. 16, n. 3, p. 243–250, 2001.

- MELLADO-GARCÍA, P. *et al.* In vitro toxicological assessment of an organosulfur compound from *Allium* extract: Cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 99, p. 231–240, 2017.
- MIGLIORI, M. *et al.* Caffeic acid, a phenol found in white wine, modulates endothelial nitric oxide production and protects from oxidative stress-associated endothelial cell injury. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–21, 2015.
- MILIĆ, M. *et al.* Polymorphisms in DNA repair genes : link with biomarkers of the CBMN cytome assay in hospital workers chronically exposed to low doses of ionising radiation. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 66, n. 2, p. 109–120, 2015.
- MIURA, T.; ITOH, Y.; ISHIDA, T. **Hypoglycemic and hypolipidemic activity of the leaf of *Smallanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice** *Journal of Traditional Medicines*, 2004.
- MOCAN, A. *et al.* Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile, and computational studies. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 153–168, 2017.
- MOHAMMED, T. *et al.* Free Radicals and Human Health. **International Journal of Innovation Sciences and Research**, v. 4, n. 6, p. 218–223, 2015.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos Funcionais E Nutracêuticos: Definições, Legislação E Benefícios À Saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 14, 2006.
- MOURA, N. A. DE *et al.* Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2902–2910, 2012.
- NANAWARE, S. *et al.* Neuroprotective effect of Indian propolis in b-amyloid induced memory deficit: Impact on behavioral and biochemical parameters in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 543–553, 2017.
- NEVES, V. A.; SILVA, M. A. DA. Polyphenol oxidase from yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2424–2430, 2007.
- NGUYEN, L. T. *et al.* Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. **The Korean journal of physiology & pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 205–213, 2017.

- NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.
- NORDBERG, A. Dementia in 2014 : Towards early diagnosis in Alzheimer disease. **Nature reviews. Neurology.**, v. 11, n. 2, p. 69–70, 2015.
- NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **EMBO Journal**, v. 24, n. 7, p. 1311–1317, 2005.
- OHTA, Y. *et al.* Therapeutic effects of drug switching between acetylcholinesterase inhibitors in patients with Alzheimer’s disease. **Geriatrics and Gerontology International**, v. 17, n. 11, p. 1843–1848, 2017.
- OJANSIVU, I.; FERREIRA, C. L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 40–46, 2011.
- OJOPI, E. B.; BERTONCINI, A. B.; DIAS-NETO, E. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. **Revista psiquiatria clínica**, v. 31, n. 11, p. 26–33, 2004.
- OLIVEIRA, G.; BRAGA, C.; FERNANDES, A. Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.& Endl.)] treatment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 256–260, 2013.
- OLIVEIRA, L. A. *et al.* Glycemic reply in diabetic rats receiving with yacon water solution. **Alimentos e Nutricao**, v. 20, n. 1, p. 61–67, 2009.
- OLIVERA, M. A. DE; NISHIMOTO, E. K. Evaluation of the development of yacon plants (*Polymnia sonchifolia*) and characterization of the carbohydrates by HPLC. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 1/2, p. 215–220, 2004.
- OPAS. **Determinantes Sociais e Riscos para a Saúde, Doenças Crônicas não transmissíveis e Saúde Mental**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5560:dementia-numero-de-pessoas-afetadas-triplicara-nos-proximos-30-anos&Itemid=839>. Acesso em: 26 mar. 2019.
- OTUNOLA, G. A. *et al.* Selected spices and their combination modulate hypercholesterolemia-induced oxidative stress in experimental rats. **Biological Research**, v. 47, n. 1, p. 2–7, 2014.
- PAREDES, L. L. R. *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Yacon fructans

(*Smallanthus sonchifolius*) extraction, characterization and activation of macrophages to phagocyte yeast cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1074–1081, 2018.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.

PICANÇO, L. *et al.* Alzheimer's disease: A review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 26, 2016.

PIETRZAK, K. *et al.* New Perspectives of Alzheimer Disease Diagnosis – the Most Popular and Future Methods. **Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 34–43, 2018.

POIRIER, J. *et al.* Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 1–19, 2014.

POPRAC, P. *et al.* Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017.

PUERTOLLANO, M. A. *et al.* Dietary Antioxidants: Immunity and Host Defense. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1752–1766, 2011.

PUKALSKIENĖ, M. *et al.* Genotoxicity and antioxidant activity of five Agrimonia and Filipendula species plant extracts evaluated by comet and micronucleus assays in human lymphocytes and Ames Salmonella/microsome test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 113, p. 303–313, 2018.

RAGAZZO, P. *et al.* Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid. **Water Research**, v. 116, p. 44–52, 2017.

REIS, J. S. *et al.* Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 7, p. 1096–105, 2008.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–651, 2014.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. **Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination**. [s.l.] IntechOpen, 2012.

ROLIM, P. *et al.* Principal component analysis of sliced bread formulated with yacon meal (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 1, p. 12–17, 2010.

ROSELINO, M. N. *et al.* A potential synbiotic product improves the lipid profile of diabetic rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 114, 2012.

SAGRILLO, M. R. *et al.* Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**, v. 173, p. 741–748, 2015.

SAITO, S.; IHARA, M. Interaction between cerebrovascular disease and Alzheimer pathology. **Current opinion in psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 168–173, 2016.

SAKLANI, R. *et al.* Cardioprotective effects of rutin via alteration in TNF- α , CRP, and BNP levels coupled with antioxidant effect in STZ-induced diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 420, p. 65–72, 2016.

SANABRIA-CASTRO, A.; ALVARADO-ECHEVERRÍA, I.; MONGE-BONILLA, C. Molecular pathogenesis of alzheimer's disease: An update. **Annals of Neurosciences**, v. 24, n. 1, p. 46–54, 2017.

SANTANA-GÁLVEZ, J.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 358, 2017.

SANTANA, I.; CARDOSO, M. H. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 898–905, 2008.

SANTOS, C. *et al.* Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. **Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring**, v. 7, p. 69–87, 2017.

SANTOS, K. C. DOS *et al.* Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Leaf Extract Attenuates Hyperglycemia and Skeletal Muscle Oxidative Stress and Inflammation in Diabetic Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

SCALBERT, A. *et al.* Antioxidants and Beyond. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, p. 215S, 2005.

SCHER, C. F.; OLIVEIRA RIOS, A. DE; NOREÑA, C. P. Z. Hot air drying of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its effect on sugar concentrations. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 11, p. 2169–2175, 2009.

SCHIMIDT, H. L. *et al.* Green tea supplementation produces better neuroprotective effects than red and black tea in Alzheimer-like rat model. **Food Research International**, v. 100, n.

Pt 1, p. 442–448, 2017.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation research**, v. 31, n. 1, p. 9–15, 1975.

SEN, D. *et al.* Taming Alzheimer ' s disease : New perspectives , newer horizons. v. 16, n. 3, p. 146–155, 2017.

SEN, S. *et al.* Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: Current status and future prospect. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n. 1, p. 91–100, 2010.

SGHAIER, M. *et al.* Rutin inhibits proliferation , attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1972–1978, 2016.

SHALINI, S. *et al.* Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 4, p. 526–539, 2015.

SHARMA, P. *et al.* Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300–305, 2011.

SIMONOVSKA, B. *et al.* Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, n. 1, p. 89–98, 2003.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SINGH, S. P. *et al.* Prebiotic Oligosaccharides : Special Focus on Fructooligosaccharides , Its Biosynthesis and Bioactivity. v. 81, p. 613–635, 2017.

SPONCHIADO, G. *et al.* Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 289–296, 2016.

STADTMAN, E.; LEVINE, R. Protein Oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 889, p. 191–208, 2000.

STOCKERT, J. C. *et al.* MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785–796, 2012.

TAKENAKA, M. *et al.* Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 793–796, 2003.

- TARAWNEH, R.; HOLTZMAN, D. M. The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 5, p. 1–16, 2012.
- TEIXEIRA, A. P. *et al.* O Efeito Da Adição De Yacon No Suco De Laranja Industrializado Sobre a Curva Glicêmica De Estudantes Universitários. **Alimentação e Nutrição**, v. 20, n. 2, p. 313–319, 2009.
- TERPILOWSKA, S.; SIWICKI, A. K. Interactions between chromium(III) and iron(III), molybdenum(III) or nickel(II): Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity studies. **Chemosphere**, v. 201, p. 780–789, 2018.
- THANAN, R. *et al.* Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. p. 193–217, 2015.
- TIAN, R. *et al.* Rutin ameliorates diabetic neuropathy by lowering plasma glucose and decreasing oxidative stress via Nrf2 signaling pathway in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 84–92, 2016.
- UTTARA, B. *et al.* Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases : A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. p. 65–74, 2009.
- VALENTOVA, K. *et al.* Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smilax alata*. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 61–66, 2003.
- VALENTOVÁ, K. *et al.* The biological and chemical variability of yacon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1347–1352, 2006.
- VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.
- VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.
- VENIGALLA, M.; GYENGESI, E.; MUNCH, G. Curcumin and Apigenin - novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 9, n. 18, p. 1696–1702, 2015.
- VILHENA, S. M. C.; CÂMARA, F. L. A.; KAKIHARA, S. T. O cultivo de yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 5–8, 2000.

WELLER, J.; BUDSON, A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. **F1000Research**, v. 7, n. 0, p. 1161, 2018.

WILLIAMSON, R. L. *et al.* Disruption of amyloid precursor protein ubiquitination selectively increases amyloid beta (A β) 40 levels via presenilin 2-mediated cleavage. **Journal of Biological Chemistry**, n. 1, p. jbc.M117.818138, 2017.

YAN, L. J.; FORSTER, M. J. Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: A review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 17–18, p. 1308–1315, 2011.

YE, H.-Y. *et al.* Chlorogenic Acid Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting TLR4/NF- κ B Signal Pathway. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 523–529, 2017.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, p. 176–186, 2001.

YU, J.; TAN, L.; HARDY, J. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. **Annual review of neuroscience.**, v. 37, p. 79–100, 2014.

ZENARO, E. *et al.* Neutrophils promote Alzheimer ' s disease – like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. v. 21, n. 8, 2015.

ZHAO, L. *et al.* Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9949–9965, 2013.

ZHAO, Y.; ZHAO, B. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease. v. 2013, 2013.

ZHENG, Z. *et al.* Chlorogenic acid suppresses monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome: The potential contribution of NF κ B, Egr1, Nrf2, MAPKs and PI3K signals. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 46, p. 80–89, 2016.

ZHOU, X. *et al.* An overview on therapeutics attenuating amyloid β level in Alzheimer's disease: Targeting neurotransmission, inflammation, oxidative stress and enhanced cholesterol levels. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 2, p. 246–269, 2016.

8. ANEXOS

8.1 Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: **040/2015**

Título: Avaliação dos efeitos dos extratos hidroalcoólicos das folhas e raízes do Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e compostos majoritários em ratos Wistar com síndrome metabólica.

Data da aprovação: **18/01/2016**

Período de vigência do projeto: De: **01/2016** Até: **01/2019**

Pesquisador: Vanusa Manfredini

Campus: **Uruguiana**

Telefone: (55) 3402-0227

E-mail: vanusamanfredini@unipampa.edu.br

Marcelo Dal Pozzo
Médico Veterinário
Coordenadora Pro Tempore da CEUA/UNIPAMPA