



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAFAELLA FARIAS DA NÓBREGA

**ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EUGENOL EM
MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

RECIFE

2013

RAFAELLA FARIAS DA NÓBREGA

**ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EUGENOL EM
MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Simone Sette Lopes

Co-Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

RECIFE

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Recife, 30 de agosto de 2013.

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Rafaella Farias da Nóbrega** defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 30 de agosto de 2013 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Prof^a. Dr^a. Simone Sette Lopes Lafayette

(Depto. de Fisiologia em Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza

(Depto. de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura: _____

PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Prof^a. Dr^a. Alice Valença Araújo

(Depto. de Fisiologia em Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice-Diretora do Centro de Ciências da Saúde

Profa. Dra. Vania Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Dalci José Brondani

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas**

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

*Dedico aos meus pais e em especial a
Rafael Freire por todo amor, incentivo e
confiança.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho e minha vida e por ter me dado força para concluir este trabalho.

Aos meus pais Zélia e Renan, pela educação que me deram, por me ensinarem a ser a pessoa que sou e que sempre estiveram e estão ao meu lado, me dando força e me ajudando a ter coragem de enfrentar os desafios da vida.

A minha família (irmão, sobrinhas e tias) que sempre me deu o amor e o incentivo que necessitava e necessito para seguir em frente.

A meu namorado, Rafael, por seu amor, paciência, companheirismo, ajuda durante os experimentos e pelos momentos de risos quando minha maior vontade era chorar. E sem seu incentivo não teria conseguido concluir esta etapa.

A meus amigos, pela amizade, companheirismo, apoio e momentos de descontração.

A minha orientadora, Prof^a Simone Sette por sua paciência, ensinamentos, orientação e amizade durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

A professora Cláudia Lagranha e ao Diorginis (CAV), pela colaboração.

A Juciene, que iniciou esta linha de pesquisa e que me ensinou muito durante a iniciação científica o que contribui no meu mestrado.

A Jamilka e Davizinho (ainda dentro da barriga da mamãe) por todo apoio e ajuda.

A Cybelle e Adriano pela ajuda nos experimentos.

Aos IC's, pela imensa contribuição durante os experimentos.

A Sr. Fredson pela ajuda e pelos momentos de descontração.

A Alice, Juliano e Samara pelos momentos de risos e conversas.

A todos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré – Clínica de Compostos Bioativos pela amizade, carinho e incentivo.

Enfim, agradeço a todos por acreditarem no meu potencial e que me ajudaram para conclusão dessa etapa.

E ainda se vier noites traiçoeiras,
Se a cruz pesada for, Cristo estará contigo.
O mundo pode até fazer você chorar,
Mas Deus te quer sorrindo.

"Não deixe que seus medos tomem o lugar dos seus sonhos" (Walt Disney)

RESUMO

O envelhecimento da população é um dos maiores triunfos da humanidade e também um dos grandes desafios. No entanto, o crescimento da expectativa de vida da população tem levado a um aumento na incidência de doenças características do envelhecimento e tem proporcionado um interesse, cada vez maior, em estudos que visam novas estratégias para a prevenção e cura destas patologias. Várias evidências têm demonstrado que alterações mitocondriais e elevados níveis de estresse oxidativo estão fortemente associados ao desenvolvimento de muitas doenças típicas do envelhecimento como a doença de Huntington (DH). Vários modelos animais vêm sendo utilizados para estudar as características neuropatológicas e bioquímicas dessas doenças e determinar novas abordagens terapêuticas. O ácido 3-nitropropiónico (3-NP) é uma neurotoxina que inibe a enzima succinato desidrogenase, que está presente no ciclo de Krebs e no complexo II da cadeia respiratória mitocondrial. Sua inibição leva a um déficit energético, alteração na homeostase do cálcio, estresse oxidativo e morte celular, mimetizando muitos dos sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos da doença de Huntington. Atualmente, não há nenhum tratamento que possa impedir, retardar ou inverter a progressão da DH, e compostos naturais com atividade antioxidante têm demonstrado efeito neuroprotetor. O eugenol, dentre suas diversas atividades, apresenta ação antioxidante e diante disso pode ter um efeito neuroprotetor frente a DH. Então, objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade neuroprotetora do eugenol sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos induzidos pela administração intraperitoneal de 3-NP. Avaliações comportamentais foram realizadas utilizando os modelos de campo aberto, rotarod e labirinto em cruz elevado. Foi avaliada também a atividade antioxidante *in vitro* do eugenol através do método de captura do radical livre DPPH[•]; a atividade antioxidante *in vivo*, por meio da determinação da peroxidação lipídica (TBARS) e sua toxicidade aguda. A administração intraperitoneal de 3-NP (20 mg/kg por 7 dias) causou significativa perda de peso corporal, déficit motor e perda de retenção de memória quando comparado aos animais controle. Análises bioquímicas revelaram significativo aumento na peroxidação lipídica nas regiões cerebrais analisadas (substância negra, estriado e córtex). O tratamento diário com eugenol, por via oral, durante os 7 dias em que o 3-NP foi administrado, melhorou significativamente o peso corporal, o desempenho motor e cognitivo quando comparado ao grupo 3-NP. Além disso, o tratamento com eugenol atenuou a peroxidação lipídica. Foi observado que o eugenol apresenta boa atividade antioxidante *in vitro* (IC₅₀ = 33,12 µg/ml) em comparação com o padrão ácido ascórbico (IC₅₀ = 3,676 µg/mL). A dose letal mínima do eugenol foi superior a 2g/kg. Estes resultados sugerem que o eugenol tem efeito neuroprotetor contra degeneração induzida pela neurotoxina 3-NP, provavelmente por ser um composto fenólico e possuir atividade antioxidante, sendo assim, um possível agente terapêutico para a DH.

Palavras-chave: Doença de Huntington. Ácido 3-nitropropiónico. Estresse oxidativo. Eugenol.

ABSTRACT

The aging of the population is one of the greatest triumphs of humanity and also one of the major challenges. However, the increase in life expectancy of the population has led to an increase in the incidence of diseases characteristics, and this has provided an increasing interest in studies aiming new strategies for prevention and cure of such pathologies. Several lines of evidence have shown that mitochondrial alterations and high oxidative stress levels are strongly associated to the development of many typical diseases of aging and Huntington's disease (HD). Several animal models have been used to study the neuropathological and biochemical characteristics of these diseases and to determine new therapeutic approaches. 3-nitropropionic acid (3-NP) is a neurotoxin that inhibits the enzyme succinate dehydrogenase, which is present in the Krebs cycle and in complex II of the mitochondrial respiratory chain. Its inhibition leads to an energy deficit, alteration in calcium homeostasis, oxidative stress and cell death, mimicking many of motor, cognitive and psychiatric symptoms of Huntington's disease. Currently, there is no treatment that can prevent, slow or reverse the progression of HD, and natural compounds with antioxidant activity have shown neuroprotective effect. The eugenol, among its various activities, displays antioxidant and before it can have a neuroprotective effect against DH. So the objective of this study was to evaluate the neuroprotective activity of eugenol on behavioral and biochemical parameters induced by intraperitoneal administration of 3-NP. Behavioral assessments were conducted by using open field, rotarod and elevated plus maze models. It was also evaluated *in vitro* antioxidant activity of eugenol by the method of free radical DPPH[•] capture; antioxidant activity *in vivo* by the determination of lipid peroxidation (TBARS) and its acute toxicity. Intraperitoneal administration of 3-NP (20 mg/kg for 7 days) caused significant body weight loss, motor impairment and loss of memory retention when compared to control animals. Biochemical analysis revealed a significant increase in lipid peroxidation in brain regions analyzed (substantia nigra, striatum and cortex). Daily treatment with eugenol orally for 7 days in the 3-NP was administered, significantly improved the body weight, motor and cognitive performance when compared to group 3-NP. Furthermore, the treatment with eugenol attenuated lipid peroxidation. It was observed that eugenol exhibits good *in vitro* antioxidant activity ($IC_{50} = 33.12 \mu\text{g/ml}$) in comparison with the ascorbic acid standard ($IC_{50} = 3.676 \mu\text{g/mL}$). The minimum lethal dose of eugenol was higher than 2g/kg. These results suggest that the eugenol has neuroprotective effect against the degeneration induced by the neurotoxin 3-NP, probably because it is a phenolic compound having antioxidant activity and, thus, a possible therapeutic agent for HD.

Keywords: Huntington's disease. 3-nitropropionic acid. Oxidative stress. Eugenol.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1 - Representação da natureza autossômica dominante da Doença de Huntington.....	19
Figura 2 - George Huntington e a primeira página do artigo “On Chorea”	22
Figura 3 - Circuito normal dos gânglios da base.....	29
Figura 4 - Estrutura química do 3-NP e do succinato	33
Figura 5 - Estrutura molecular do eugenol.....	39

Artigo: Neuroprotective efficacy of eugenol against 3-nitropropionic acid-induced behavioral alterations and oxidative stress in rats

Figure 1 - Effect of Eugenol (12.5; 25; 37.5; 50 mg/kg, p.o.) on body weight in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg, i.p.)	65
Figure 2 - Effect of Eugenol (12.5; 25; 37.5; 50 mg/kg, p.o.) on locomotor activity in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg, i.p.) as assessed by open field. Latency (A), Frequencies of locomotion (B), Rearing (C) and time of resting (D).....	66
Figure 3 - Effect of Eugenol (12.5; 25; 37.5; 50 mg/kg, p.o.) on fall off time in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg, i.p.) on Rotarod performance.....	67
Figure 4 - Effect of Eugenol (12.5; 25; 37.5; 50 mg/kg, p.o.) on memory performance (% retention) in elevated plus maze task in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg, i.p.)	68
Figure 5 - Effect of Eugenol (12.5; 25; 37.5; 50 mg/kg, p.o.) on lipid peroxidation in the substantia nigra, striatum and cortex in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg, i.p.)	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-NP	Ácido 3-nitropropiónico
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHT	Butylated hydroxytoluene
CAG	Citosina-Adenina-Guanina
DH	Doença de Huntington
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido gama-amino-butírico
HTT	Huntingtina
i.p.	Intraperitoneal
IT 15	Interesting Transcript 15
MDA	Malonaldeído
Mtt	Huntingtina mutante
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O ₂ ⁻	Aniôn Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxila
SDH	Succinato desidrogenase
SNC	Sistema Nervoso Central
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	Doença de Huntington.....	19
2.1.1	Características Gerais.....	19
2.1.2	Aspectos Históricos.....	20
2.1.3	Manifestações Clínicas.....	22
2.1.4	Etiologia.....	23
2.1.5	Disfunção Mitocondrial e Estresse Oxidativo.....	26
2.1.6	Neuropatologia.....	28
2.1.7	Modelos Animais.....	31
2.1.8	Diagnóstico.....	35
2.1.9	Tratamento.....	36
2.2	Eugenol.....	38
3.	OBJETIVOS.....	41
3.1	Objetivo Geral.....	42
3.2	Objetivos Específicos.....	42
4.	ARTIGO: Neuroprotective efficacy of eugenol against 3-nitropropionic acid-induced behavioral alterations and oxidative stress in rats.....	43
	ABSTRACT.....	45
	INTRODUCTION.....	45
	MATERIAL AND METHODS.....	47
	RESULTS.....	52
	DISCUSSION.....	54
	CONCLUSION.....	58
	REFERENCES.....	58
5.	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	72

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população é um dos maiores triunfos da humanidade e também um dos grandes desafios. O prolongamento da vida, decorrente do declínio da mortalidade, associado ao aumento do percentual de pessoas que atingem idades avançadas, provocam uma alteração radical no perfil de mortalidade e morbidade de uma população (CAMARGOS E ALVES, 2004). Desse modo, doenças que acometiam mais a população infantil, como as infecciosas e parasitárias, apesar de persistirem, vão dando espaço também a doenças crônico-degenerativas mais incidentes na população ativa e idosa (LIMA-COSTA e VERAS, 2003). Dentre as doenças degenerativas, temos as doenças neurodegenerativas que são caracterizadas por uma perda neuronal no sistema nervoso central (SNC), conduzindo a uma disfunção cognitiva progressiva, distúrbios do movimento, e distúrbios psiquiátricos. Como exemplos, podemos citar as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington.

Embora o envelhecimento da população seja uma aspiração natural de qualquer sociedade, isso não basta por si só. Viver mais é importante desde que se consiga agregar qualidade aos anos adicionais de vida. Por isso, são necessários investimentos no desenvolvimento de agentes que melhorem a qualidade de vida da população, que curem ou impeçam, de forma efetiva, a progressão dessas doenças crônicas degenerativas.

A doença de Huntington (DH) ou coreia de Huntington é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante caracterizada por disfunções motoras, distúrbios psiquiátricos e declínio intelectual (BANO et al, 2011). Está relacionada a uma mutação no gene que codifica a proteína huntintina (htt), localizado no braço curto do cromossomo 4 (CARDOSO, 2009).

De acordo com estudos, realizados em modelos celulares e animais, muitas hipóteses têm sido apresentadas para elucidar os mecanismos envolvidos na patogênese da DH, dentre elas: excitotoxicidade (ZERON et al, 2002, 2004; TANG et al., 2005; SHEHADEH et al., 2006; FERNANDES et al., 2007), toxicidade dopaminérgica (GIL E REGO, 2008), estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (TABRIZI et al., 2000; OLIVEIRA, 2010), alterações no transporte axonal (PINEDA et

al., 2005), desregulação transcricional (THOMAS et al., 2008; QUINTI et al., 2010; MIELCAREK, et al., 2011; MOUMNE, et al., 2012) e perda do fator neurotrófico derivado do cérebro - BDNF (ZUCCATO et al., 2001; ZUCCATO et al., 2005). Muitos desses mecanismos podem desenvolver-se lentamente ao longo do tempo, tornando-se cada vez mais pronunciados nos últimos estágios da doença.

A disfunção mitocondrial é um dos principais contribuintes para o estresse oxidativo, que, juntamente com a ativação excitotóxica da óxido nítrico sintase (NOS) e do metabolismo da dopamina, podem conduzir a um aumento dos níveis tóxicos de espécies reativas do oxigênio (EROs) que desempenham um papel crucial no processo neurodegenerativo da DH. Altos níveis de EROs podem promover cascatas intracelulares de estresse oxidativo, por oxidação de proteínas e do DNA e desencadear a peroxidação lipídica (GIL E REGO, 2008).

A compreensão do mecanismo patogênico, bem como a investigação de possíveis abordagens terapêuticas a serem testadas em modelos experimentais da DH são de fundamental interesse. Toxinas e modelos genéticos utilizando animais, que mimetizam de perto os sintomas neurobiológicos e clínicos desta doença podem proporcionar uma abordagem alternativa para o estudo da patogênese molecular e o desenvolvimento de tratamentos e estratégias terapêuticas para a DH (FERRANTE, 2009). Dentre os diversos modelos experimentais já descritos, sabe-se que a administração do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) constitui um modelo adequado para a doença de Huntington, por provocar degeneração neuronal e alterações comportamentais semelhantes aquelas observada nos pacientes com DH (BEAL et al., 1993; BROUILLET et al., 1998; TUNEZ et al., 2010; ROSSIGNOL et al., 2011).

Atualmente, não há nenhum tratamento que possa impedir, retardar ou inverter a progressão da DH. Há, no entanto, fármacos que podem melhorar os sintomas da doença, ou seja, eles não impedem a degeneração neural, apenas retardam a sua evolução (HALLIWELL, 2006). E as substâncias naturais ou sintéticas que atuam protegendo as células desse evento são fortes candidatas aos estudos que visam desenvolver novas abordagens terapêuticas de neuroproteção, em busca da cura e/ou da prevenção.

Há muito que as civilizações utilizam os recursos da natureza como matéria-prima na obtenção de cura ou alívio de diversas doenças. O conhecimento e o uso empírico das plantas medicinais pela população em virtude de seus efeitos

terapêuticos vêm sendo acumulados durante séculos e, em muitas comunidades e grupos étnicos, ainda é considerado como único recurso terapêutico (DI STASI, 1996).

Inúmeras substâncias químicas obtidas de plantas e microorganismos têm proporcionado à indústria farmacêutica uma das mais importantes fontes de componentes para a pesquisa de novos medicamentos, sendo que, nas últimas décadas, houve um grande incentivo às pesquisas que têm como objetivo identificar produtos naturais com propriedades terapêuticas (SILVA JÚNIOR, 1997).

O efeito benéfico neuroprotetor de compostos naturais antioxidantes tem sido amplamente comprovado *in vitro*. No entanto, estudos clínicos têm apresentado resultados controversos (DAJAS et al., 2003). Por um lado, estes resultados podem estar relacionados ao caráter multifatorial das doenças neurodegenerativas, o que demanda diversos níveis de proteção. Por outro lado, estariam relacionados à capacidade dos compostos antioxidantes de cruzar ou não a barreira hematoencefálica em quantidades suficientes para proteger o SNC (BIANCHI E ANTUNES, 1999; DAJAS et al., 2003; MANDEL E YUODIM, 2004). Consequentemente, há um crescente interesse em desenvolver novas estratégias terapêuticas e dietas, enfocando a ingestão combinada de antioxidantes de diversas naturezas, que possam atuar sinergicamente para combater o estresse oxidativo induzido no SNC e, desta forma, exercer um efeito neuroprotetor protegendo de diversas doenças neurodegenerativas, como doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington.

Na literatura, são descritas diversas propriedades medicinais do eugenol, incluindo sua ação antioxidante, o que poderia contribuir frente a doença de Huntington. Então, neste trabalho foi avaliado o efeito neuroprotetor do eugenol (4-alil-2-metoxifenol), um composto fenólico que ocorre no cravo, manjeriço, canela e noz-moscada. Este estudo avaliou a atividade do eugenol sobre parâmetros neurocomportamental e bioquímico em modelo animal da DH, utilizando o ácido 3-nitropropiónico como neurotoxina.

2. Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença de Huntington

2.1.1 Características Gerais

A doença de Huntington (DH), também conhecida como Coréia de Huntington, é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante, ou seja, se o pai ou a mãe possuir uma cópia mutante, os filhos têm uma chance de 50% de herdar o gene mutante (Figura 1). Caracteriza-se por uma disfunção motora progressiva, declínio cognitivo, demência e perda de peso, sendo a manifestação neurológica mais marcante a ocorrência de movimentos coreicos (HADDAD E CUMMINGS, 1997).

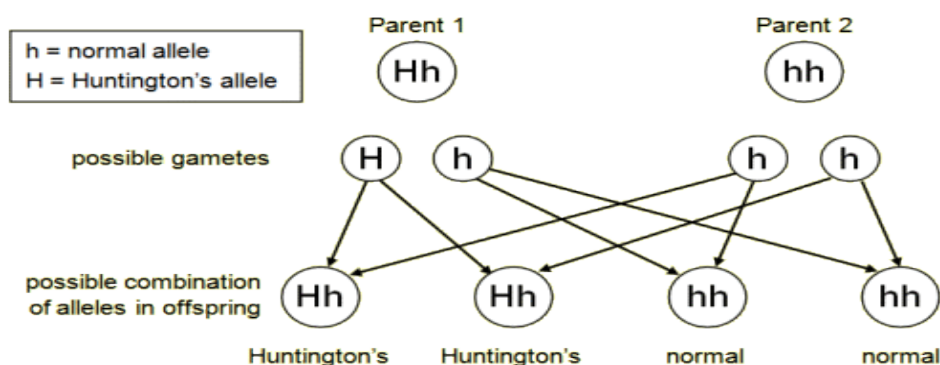


Figura 1 - Representação da natureza autossômica dominante da Doença de Huntington

Fonte: http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/add_aqa_pre_2011/celldivision/inheritance3.shtml

A DH ocorre em todo o mundo, em todas as raças e grupos étnicos, e da mesma forma em ambos os sexos (KREMER et al., 1994). A idade média de início é 37 anos de idade, mas pode abranger desde a infância até a nona década de vida (HERSCH E ROSAS, 2008). A doença progride ao longo do tempo, tornando-se fatal entre 15 a 20 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas. (HO et al., 2001; ROSS E TABRIZI, 2011).

2.1.2 Aspectos Históricos

A DH foi primeiramente descrita pelo médico norte americano George Huntington, em 1872, que identificou as características clínicas da doença e o padrão de transmissão familiar (BATES, 2005). Antes disso, não se fazia diferenciação entre esta e outras condições que apresentavam a coreia (dança) como manifestação (AZAMBUJA, 2006).

Os primeiros pacientes que exibiram a dança (coreia) como movimentos característicos podem ser rastreados em 1237, em Erfurt, na Alemanha. Grandes epidemias foram posteriormente documentadas (1374 e 1518) em toda a Europa (PARK E PARK, 1990).

No século XIV existem relatos de uma epidemia que ficou conhecida como “A mania Dançante” ou coreomania caracterizada por excitação e grande atividade. Esta manifestação iniciou-se na França, mas logo atingiu a Alemanha e posteriormente Estrasburgo, onde recebeu a denominação de Dança ou Coréia de São Vito, um mártir cristão invocado para proteger os sofredores desse mal. Esta doença atingiu outros países da Europa e recebeu diversos nomes e explicações, mas atualmente considera-se que a coreomania não tivesse base orgânica, mas fosse uma manifestação psicológica ou de superstição. No entanto, é possível que entre esses casos já houvesse manifestações da coreia verdadeira, de etiologias variadas, inclusive a hereditária (BRUYN, 1968).

No século XVI, a “mania dançante” passou a ser denominada coréia, por Paracelsus, que também foi um dos primeiros a reconhecer que a mesma poderia ter diferentes etiologias (HAYDEN, 1981).

Sydenham, no capítulo XVI, “sobre a dança de São Vito”, de seu último livro, *Schedula Monitoria de Novae Febris Ingressa* (1686), usou o termo “coreia de São Vito” como um transtorno específico de movimento, em sua descrição de coreia aguda na criança. A descrição da coreia na criança foi reconhecida nos séculos XIX e XX como uma manifestação de febre reumática (JUMANI E OKUN, 2001; PARK E PARK, 1990).

Em 1841, Charles Waters, enviou uma carta ao seu professor de medicina, Dr. Robley Dunglison, descrevendo um distúrbio, “que é marcadamente hereditário,

muito raramente faz a sua aparição antes da vida adulta, cujos distúrbios de movimento desapareciam durante o sono, evoluindo de forma incidiosa para um quadro demencial e que não cessa enquanto durar a vida" (WATERS, 1842).

Johan Christian Lund, médico norueguês, fez uma completa descrição da coreia hereditária em seu relatório médico de 1860: esta "doença crônica, progressiva, hereditária que afeta adultos... caracteriza-se por movimentos coreicos e pode resultar em demência" (LUND, 1860).

Irving W. Lyon, médico do Hospital Bellevue, em Nova York, publicou um artigo intitulado "Chronic Inherited Chorea" na revista *American Medical Times* em 19 de dezembro de 1863. Ele enfatizou a natureza hereditária desses movimentos anormais, mas não conseguiu documentar a demência (LYON, 1863).

Waters e Lund descreveram as características principais da coreia hereditária, no entanto os artigos foram publicados em lugares inacessíveis: o de Waters em um livro de medicina e o de Lund, em um relatório de saúde e condições médicas da Noruega.

George Huntington tinha apenas oito anos de idade, acompanhava seu pai e seu avô em suas rondas médicas em Long Island, Nova York, quando viu pela primeira vez pacientes com coreia hereditária. Mais tarde, com 21 anos de idade, depois de se formar na Universidade de Columbia, começou a estudar as anotações de seu pai, sobre pacientes "com o transtorno". Mudou-se para Pomeroy, Ohio, onde apresentou seu trabalho inédito no Meigs and Mason Academy of Medicine, em Middleport, Ohio, em fevereiro de 1872. Foi bem recebido e apresentou o artigo "On Chorea" para os editores do *Medical and Surgical Reporter of Philadelphia* onde foi publicado em 13 de abril de 1872 (Figura 2). Esta foi a única contribuição de George Huntington para a literatura. Ele concluiu, em seu artigo: "três peculiaridades marcantes da doença": (1) sua natureza hereditária, (2) a tendência à loucura e ao suicídio, e (3) a sua manifestação como uma grave doença na vida adulta. A partir desta descrição seu nome foi associado à doença em todo mundo (HAYDEN, 1983).

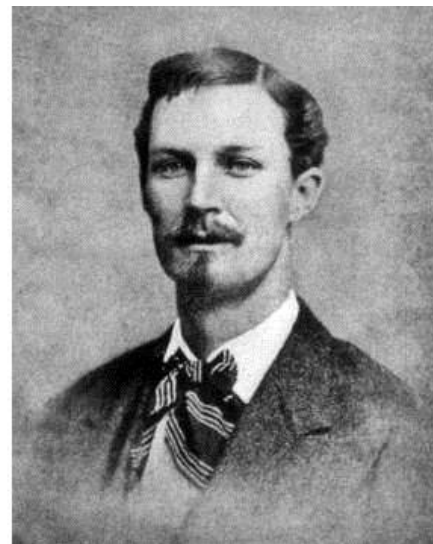
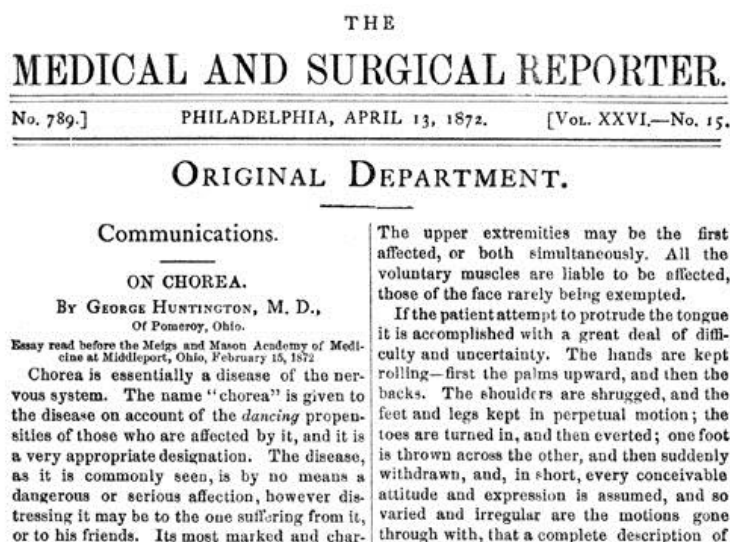


Figura 2 - George Huntington e a primeira página do artigo "On Chorea"

Fonte: BATES, 2005

2.1.3 Manifestações Clínicas

A doença de Huntington está associada a alterações cognitivas e comportamentais, além dos transtornos de movimento. As características clínicas incluem: disfunção motora progressiva (coreia), declínio cognitivo, e distúrbios psiquiátricos (ROSS et al., 1997; WALKER, 2007).

Tem início insidioso e os primeiros sinais da patologia são sutis. Na fase inicial da doença, os pacientes apresentam alterações moderadas na personalidade, cognição e controle motor (WALKER, 2007).

As alterações motoras, associadas à perda de coordenação dos movimentos voluntários, progridem de forma lenta. Os movimentos involuntários dos músculos (especialmente membros superiores, inferiores e de face) tornam-se mais graves e os pacientes perdem gradualmente a capacidade de movimento, fala e deglutição em fases mais avançadas da doença. Os estados mais avançados da doença são também caracterizados por bradicinesia (lentidão anormal dos movimentos voluntários) e rigidez severa (THOMPSON et al., 1988; GARCIA RUIZ et al., 2000; ROOS, 2010).

Além das alterações motoras, as funções cognitivas são também afetadas nos pacientes com DH (GIL-MOHAPEL E REGO, 2011). A disfunção cognitiva muitas vezes poupa a memória de longo prazo, mas prejudica as funções executivas, tais como organização, planejamento, dificuldade em aprender novas informações e recuperação de informações previamente aprendidas. Em alguns casos, esses declínios da capacidade intelectual e de memória podem ser detectados décadas antes do aparecimento dos sintomas motores (GIL-MOHAPEL E REGO, 2011) e tendem a piorar ao longo do tempo, os doentes em fase tardia podem apresentar quadro de demência severa (FOLSTEIN et al., 1983).

Sintomas psiquiátricos, como mudança de personalidade, irritabilidade, apatia, instabilidade emocional e agressividade, são frequentes. A depressão é típica e o suicídio é estimado em aproximadamente cinco a dez vezes mais do que a população em geral (LACCONE et al., 1999).

Nos pacientes com formas juvenis da DH (início da doença antes dos 20 anos de idade) a sintomatologia é consideravelmente diferente, sendo caracterizada por bradicinesia, tremores, rigidez e distonia, e a coreia pode mesmo estar ausente. As crianças afetadas pela DH podem também sofrer ataques epiléticos e as psicoses são bastante típicas (VAN DIJK et al., 1986).

São observados também sintomas metabólicos como perda de peso, disfunção endócrina e distúrbio do sono (NOVAK E TABRIZI, 2010). A maioria dos pacientes sofre de caquexia (estado patológico caracterizado por extrema magreza e mal estar geral grave), com emaciação (emagrecimento muito acentuado), que surgem de forma inexplicável (DJOUSSE et al., 2002).

À medida que os déficits motores e cognitivos se tornam graves, os pacientes morrem, geralmente devido a complicações respiratórias e/ou cardiovasculares, quedas, inanição ou disfagia (dificuldade em engolir alimentos) (WALKER, 2007).

2.1.4 Etiologia

A DH está associada a uma expansão instável de repetições do trinucleotídeo CAG – citosina, adenina, guanina - no gene IT-15 (*Interesting Transcript 15*) no

cromossomo 4 que codifica a proteína huntingtina (htt). O gene IT-15 compreende 67 exons (regiões codificadoras) e é no exon 1 que ocorre a expansão CAG. Em média, indivíduos normais apresentam 26 repetições CAG. Já em pacientes afetados pela DH, já foram descritos mais de 40 repetições desse trinucleótido (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH, 1993).

Quando há 40 ou mais repetições, o gene tem penetrância completa e os portadores certamente manifestarão a doença durante a vida. Entre 36-39 repetições, a penetrância é incompleta e há instabilidade meiótica, significando que o indivíduo pode desenvolver a DH (especialmente se tiver uma vida longa) e pode ou não passar esta repetição expandida a seus filhos. Entre 27 a 35 repetições o indivíduo não vai desenvolver a doença, mas pode passar uma repetição expandida a seus filhos (THE AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS/ AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS HUNTINGTON DISEASE GENETIC TESTING WORKING GROUP – ACMG/ASHG, 1998).

É importante ressaltar que o aparecimento e a gravidade da patologia estão diretamente correlacionados com o número de repetições CAG, embora a verdadeira função do trecho trinucleotideo permaneça desconhecida (ANDREW et al., 1993; RUBINSZTEIN et al., 1993). Há uma forte relação inversa entre o número de repetições CAG e a idade de início dos sintomas. Pacientes com um grande número de repetições tendem a desenvolver os sintomas em idade precoce. Repetições maiores que 60, por exemplo, são frequentemente associadas com um início da doença na infância ou adolescência (DH juvenil) (ANDREW et al., 1993; RANEN et al., 1995; BRINKMAN et al., 1997).

Estudos acerca da estabilidade no número de repetições CAG na DH indicam que quando a mãe passa o gene para a criança, há um aumento ou diminuição de 3 ou 4 repetições. Entretanto, no caso da transmissão paterna, a instabilidade no número de repetições é muito maior, sendo que pode haver um aumento marcante no número de repetições (SNELL et al., 1993). Isto explica porque na maioria dos casos de DH juvenil a herança foi transmitida pelo pai. E também permite compreender a origem do aparecimento de mutações espontâneas na DH (ANDREW et al., 1993).

O trinucleotídeo CAG codifica o aminoácido glutamina. No momento da transcrição do gene IT15 e da tradução, é originada uma cadeia expandida de

glutaminas (poliglutaminas/poliQ) na porção N-terminal originando, então a proteína huntingtina mutante (mhtt) (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH, 1993).

A huntingtina é uma proteína de 348 kilodaltons, e está presente no núcleo e no citoplasma do corpo celular, dendritos e terminais nervosos dos neurônios (DIFIGLIA et al., 1995; LANDLES E BATES, 2004). No citoplasma, onde é principalmente encontrada, a huntingtina está associada a organelas como mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vesículas sinápticas e diversos componentes do citoesqueleto (HOFFNER et al., 2002).

Embora a sua função permaneça desconhecida, vários estudos sugerem que a huntingtina possa exercer importante papel na sobrevivência celular por controlar vias de apoptose, regular o transporte intracelular, o tráfego e a secreção de vesículas, mediar processos de endocitose, promover a sinalização celular e regulação transcricional (HARJES E WANKER, 2003; LI E LI, 2004). Todas essas funções estão relacionadas com a sua capacidade de interação com outras proteínas nas células (ZUCCATO et al., 2010).

Na DH, a mutação no gene da proteína huntingtina é responsável pela modificação conformacional da mesma. A proteína mutante pode ser clivada por proteases, a fragmentos N-terminais, os quais podem formar agregados protéicos. (DIFIGLIA et al., 1997; GAFNI E ELLERBY, 2002; SUN et al., 2002). A presença desses agregados em regiões como o estriado (caudado e putâmen) e o córtex cerebral é altamente tóxica (KIM et al., 2001) e é responsável por causar disfunção neuronal e eventual morte celular em que a deficiência da transcrição, excitotoxicidade, dano oxidativo, disfunção mitocondrial, inflamação e apoptose estão todos envolvidos (KROBITSCH E KAZANTSEV, 2011).

Apesar do notável progresso na compreensão dos processos subjacentes a patogênese da DH, os mecanismos moleculares pelos quais a huntingtina mutante provoca a progressão da doença permanecem incertos. No entanto, evidências, através de estudos tanto em modelos animais como em humanos com DH, mostram uma ligação entre a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo na fisiopatologia da DH (AYALA-PEÑA, 2013).

2.1.5 Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo

A mitocôndria é uma das organelas mais importantes para a sobrevivência neuronal. Elas são os principais fornecedores de energia para os neurônios, são necessárias para manter o potencial de membrana em repouso e captação e liberação de neurotransmissores. Assim, os danos à mitocôndria podem ter graves repercussões e a função mitocondrial prejudicada tem sido observada em vários modelos da DH (KAPLAN E STOCKWELL, 2012).

Estudos realizados em pacientes com Huntington e em tecido *post-mortem* destes doentes permitiram evidenciar alterações metabólicas e mitocondriais, como: **(1)** Aumento da concentração de lactato no estriado e córtex cerebral (KOROSHETZ et al., 1997); **(2)** Diminuição no metabolismo da glicose no córtex e no estriado de indivíduos assintomáticos e sintomáticos, portadores da mutação para a DH (FEIGIN et al., 2001; CIARMIELLO et al., 2006); **(3)** Reduções nas atividades dos complexos II, III e IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial no estriado e no córtex cerebral de indivíduos afetados (BRENNAN et al., 1985; GU et al., 1996; BROWNE et al., 1997; TABRIZI et al., 1999). Além disso, uma significativa alteração na atividade de algumas enzimas mitocondriais também foi observada: **(1)** Redução da atividade da piruvato desidrogenase, enzima envolvida na conversão do piruvato em acetil-CoA usado na fosforilação oxidativa (BUTTERWORTH et al., 1985); **(2)** Diminuição significativa da atividade da enzima aconitase no estriado e córtex cerebral, um indicador indireto da formação de EROs (TABRIZI et al., 1999); **(3)** Diminuição da atividade da creatina quinase, uma enzima que catalisa a fosforilação da creatina em fosfocreatina para gerar ATP (trifosfato de adenosina), no estriado e córtex (ZHANG et al., 2011). Assim, os pontos vistos acima mostram que os marcadores do metabolismo energético e a atividade de enzimas metabólicas associadas à função mitocondrial e à síntese de ATP estão alterados e prejudicados no cérebro de pacientes com DH.

A principal função da mitocôndria é a geração de ATP pela fosforilação oxidativa, o que por sua vez resulta na produção de radicais livres, como subprodutos dos processos metabólicos normais (BOVERIS E CHANCE, 1979).

Os radicais livres são espécies químicas, altamente instáveis e extremamente reativas, que, por terem um número ímpar de elétrons na sua órbita externa, são ávidos por interagir com outras substâncias em busca de um elétron para atingir a estabilidade. Em sistemas biológicos, a maioria destes radicais são espécies reativas do oxigênio (EROs), sendo as mais comuns o radical aniônico superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$) (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

As EROs são fundamentais para a sobrevivência dos organismos vivos por participarem de processos de defesa. No entanto, seu excesso pode produzir danos celulares, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana (lipoperoxidação), promovendo mudanças na estrutura e permeabilidade, induzindo à morte celular (GILGUN-SHERKI et al., 2001) e agressão às proteínas dos tecidos, das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (HUSAIN et al., 1987).

Para proteger-se dos danos produzidos pelo excesso de EROs, as células possuem mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante como a superóxido dismutase, que catalisa a reação de O_2^- em H_2O_2 , a catalase e a glutational peroxidase, que catalisam a degradação de H_2O_2 em H_2O . Estes mecanismos são capazes de neutralizar os agentes oxidantes e mantê-los em níveis adequados no organismo (TRABER, 1997). Quando há um excesso de EROs nas células e, conseqüentemente, um desbalanço dos processos pró-oxidantes e antioxidantes do organismo, em favor da atividade pró-oxidante, há um aumento no dano celular que, quando não reparado, acaba comprometendo o funcionamento da célula levando a morte (SIES, 1993; HALLIWELL, 2001).

Os efeitos nocivos que as EROs causam às macromoléculas (proteínas, lipídios, polissacáridos e ácidos nucleicos) são denominados de estresse oxidativo. O dano oxidativo está bem documentado no plasma de pacientes com DH, em tecido cerebral *post-mortem*, linfoblastos e no líquido cefalorraquidiano (BROWNE E BEAL, 2006; BROWNE et al., 1999; KLEPAC et al., 2007; SOROLLA et al., 2008; STACK et al., 2008; TASSET et al., 2009).

2.1.6 Neuropatologia

Neuropatologicamente, a DH é caracterizada por disfunção e degeneração de áreas específicas nos gânglios basais e no córtex cerebral (REINER et al., 1988; STOREY E BEAL, 1993).

Os gânglios basais constituem um conjunto de estruturas cerebrais subcorticais envolvidos em diversos aspectos do controle motor e da cognição (GRAYBIEL, 1990; MITCHELL et al., 1999). Nesta região, o processo neurodegenerativo se inicia no estriado (VONSATTEL et al., 1985), uma região que recebe projeções (aferências) de diversas áreas corticais (MITCHELL et al., 1999), e a morte neuronal ocorre principalmente no núcleo caudado e no putâmen (REINER et al., 1988; VONSATTEL E DIFIGLIA, 1998).

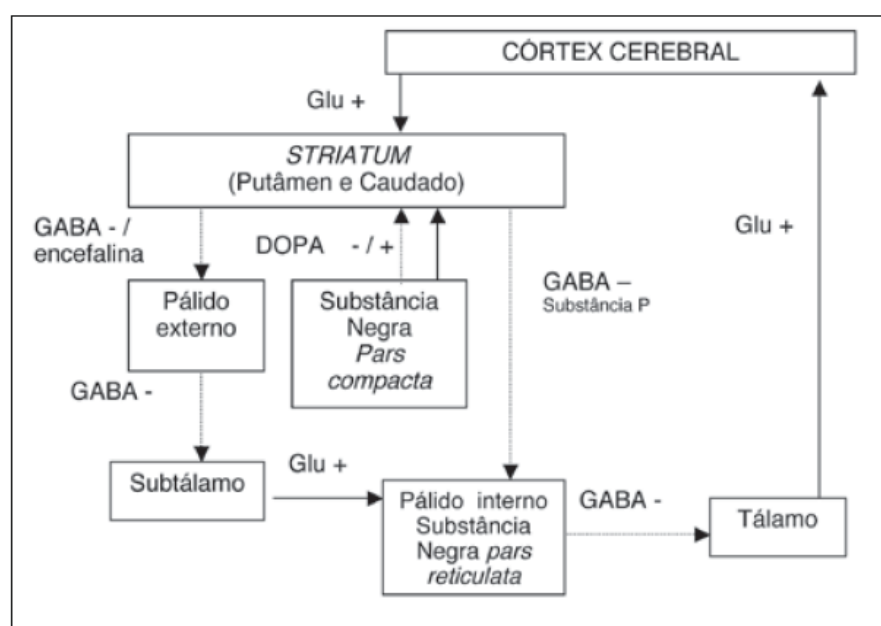
Uma escala de avaliação dos diferentes estágios patológicos da DH foi desenvolvida por Vonsattel e colaboradores em 1985 e permite determinar a severidade da degeneração na doença. Esta escala baseia-se nos padrões de degeneração estriatal observados em tecidos *post mortem* e é classificada em 5 graus (0 a 4). O grau 0 é praticamente indistinguível de um cérebro normal, apesar de uma perda neuronal de 30 a 40% poder estar presente no núcleo caudado. No grau 1 são observadas algumas alterações como atrofia, diminuição neuronal e astrogliose no núcleo caudado. Já os graus 2 e 3 são caracterizados por progressiva e severa atrofia do estriado, e o grau 4 por sua vez, inclui o quadro mais grave de atrofia estriatal, com perda neuronal de até 95%.

Além disso, foi estabelecida uma correlação positiva entre o número de repetições CAG e a escala de Vonsattel, onde um maior número de repetições está associado a lesões mais pronunciadas no estriado e a um grau mais elevado nesta escala (VONSATTEL E DIFIGLIA, 1998).

Os neurônios mais afetados no estriado são os neurônios espinhosos médios, que correspondem a cerca de 95% do número total de neurônios estriatais e utilizam o GABA (ácido gama-aminobutírico) como seu principal neurotransmissor (GIL E REGO, 2008).

O estriado representa a via de entrada do circuito dos gânglios da base, tendo como principal aferência o córtex motor e áreas associativas (OBESO et al., 2002).

O núcleo caudado recebe um maior número de aferências de áreas associativas e parece estar relacionado a atividades cognitivas como a aprendizagem motora (BHATIA E MARSDEN, 1994). Já as aferências do putâmen são provenientes do córtex motor, parecendo estar envolvido apenas no controle da motricidade (OBESO et al., 2000). O estriado recebe ainda aferências da substância negra *pars compacta*, tendo como neurotransmissor a dopamina. Esta, ao atuar sobre receptores do tipo D2, inibe neurônios estriatais que se projetam para o globo pálido externo. Por outro lado, ao atuar sobre receptores do tipo D1, excita os neurônios estriatais que se dirigem ao globo pálido interno e substância negra *pars reticulata* (OBESO et al., 2002) (Figura 3).



Setas cheias correspondem a estímulos excitatórios; setas pontilhadas, inibitórios. Glu=glutamato; GABA= Ácido gamaminobutírico; DOPA=dopamina. Via direta: Striatum e pálido interno. Via Indireta: Striatum, pálido externo, subtálamo e pálido interno.

Figura 3 - Circuito normal dos gânglios da base

Fonte: GODEIRO JÚNIOR et al, 2006

O globo pálido interno e a substância negra *pars reticulata* constituem um complexo, o qual representa a via de saída do circuito dos gânglios da base, com projeções para o tálamo, de onde partem fibras para o córtex motor, córtex pré-motor e área motora suplementar.

A integração do estriado com o complexo globo pálido interno/substância negra *pars reticulata* pode ocorrer de duas formas (ALEXANDER, 1994; OBESO et al., 2002):

- Via direta (estriado - globo pálido interno/substância negra *pars reticulata* – tálamo): tem como neurotransmissor o GABA e a substância P. A ativação dessa via causa a desinibição talâmica, pois os núcleos talâmicos encontram-se sob controle inibitório do globo pálido interno/substância negra *pars reticulata*
- Via indireta: (estriado - globo pálido externo - núcleo subtalâmico - globo pálido interno/substância negra *pars reticulata* – tálamo) As projeções do estriado para o globo pálido externo têm como neurotransmissor o GABA e encefalinas. As projeções do globo pálido externo para o núcleo subtalâmico tem como neurotransmissor também o GABA. Já as projeções do núcleo subtalâmico para o complexo globo pálido interno/substância negra *pars reticulata* o neurotransmissor é o glutamato. Ativação dessa via intensifica o efeito excitatório sobre o globo pálido interno aumentando a inibição efetuada por este sobre o tálamo.

Então, de acordo com esse esquema funcional, a ativação das vias direta e indireta leva a respostas opostas dos núcleos da base sobre tálamo e consequentemente efeitos contrários sobre os movimentos.

Na DH, estudos demonstraram que neurônios espinhosos médios GABAérgicos/encefalina que se projetam para o globo pálido externo (via indireta) são mais susceptíveis do que os neurônios que contêm substância P e se projetam para o globo pálido interno (via direta). Esse comprometimento na via indireta induz uma perda da inibição talâmica e subsequentemente aumento da excitação no córtex motor levando ao desenvolvimento dos movimentos involuntários (coreia) (MARGOLIS E ROSS, 2001). Com a progressão da doença, os neurônios espinhosos médios que se projetam para o globo pálido interno (via direta) também são afetados. A degeneração tardia dos neurônios da via direta é responsável pelo desenvolvimento de bradicinesia e rigidez em estágios terminais da doença (BERARDELLI et al., 1999).

Muitos interneurônios, tanto no estriado como no córtex, são “poupados” do dano no início da doença (VONSATTEL, 2008). Porém, em fases mais avançadas,

todas as projeções estriatais são afetadas, com atrofia estriatal extrema e perda considerável da população neuronal no grau 4 (escala de Vonsatel), indicando que todos os tipos neuronais são vulneráveis nos estágios finais da doença (ZUCCATO et al., 2010). Dessa forma, nos graus 3 e 4 (escala de Vonsatel), a neurodegeneração parece não ser restrita ao estriado, ocorrendo também em outras regiões como o córtex cerebral, globo pálido, tálamo, núcleo subtalâmico, substância nigra, cerebelo e hipotálamo (VONSATTEL E DIFIGLIA, 1998; KASSUBEK et al., 2004) são afetadas. Nessas condições, uma significativa atrofia com perda de massa encefálica pode ser observada, podendo ocorrer redução de até 40% da massa cerebral (GIL-MOHAPEL E REGO, 2011).

2.1.7 Modelos animais da Doença de Huntington

Os modelos animais que mimetizam de perto os sintomas neurobiológicos e clínicos da doença podem oferecer uma abordagem alternativa para a compreensão da patogênese e melhora dos tratamentos existentes e/ou o desenvolvimento de novas terapias para a DH (BORLONGAN et al., 1997).

Os modelos iniciais foram desenvolvidos em 1970, com base na vulnerabilidade seletiva dos neurônios do estriado para aminoácidos excitatórios. O primeiro foi um modelo de morte neuronal baseado na administração de ácido caínico, um composto excitotóxico que causava morte neuronal (COYLE E SCHWARCZ, 1976). Outros modelos também foram estabelecidos, como os modelos induzidos por toxinas: malonato, ácido quinolínico (AQ) e ácido 3-nitropropionico (3-NP). A identificação da mutação genética para DH levou à criação de modelos transgênicos em roedores (MANGIARINI et al., 1996), primatas não humanos e outras espécies (PARKER et al., 2001; MARSH et al., 2003), os quais expressam o gene mutante da proteína huntingtina.

No entanto, os modelos experimentais não genéticos ainda são bastante utilizados no estudo dos processos neurodegenerativos da DH devido à fácil aquisição, controle e uso (TUNEZ et al., 2010). Nesses modelos, a morte celular é induzida por mecanismos excitotóxicos (ácido caínico e AQ) ou por alterações no

metabolismo mitocondrial (malonato e 3-NP). Dessa forma, esses modelos, mesmo com algumas limitações, são importantes para o melhor entendimento dos fenômenos relacionados com a doença, bem como na busca de novos alvos terapêuticos para o tratamento de tal patologia.

O 3-NP é uma toxina natural, sintetizada por fungos (*Aspergillus flavus*; *Arthrinium*) e plantas (*Indigofera endecapylla*), que atravessa a barreira hematoencefálica e, portanto, pode ser administrado por via sistêmica. A sua administração subcutânea ou intraperitoneal são métodos eficazes para a infusão sistêmica do 3-NP (TUNEZ et al., 2010).

Entre os anos de 1950 a 1960, o 3-NP foi relacionado a episódios de envenenamento em mamíferos no oeste dos Estados Unidos. Estes animais, depois de serem envenenados com leguminosas infectadas, exibiam diferentes alterações motoras que evoluíam para descoordenação e paralisia. Posteriormente, aproximadamente 100 casos de envenenamento com 3-NP foram reportados na China, associados ao consumo de cana-de-açúcar contaminada com o fungo *Arthrinium* (LUDOLPH et al., 1991). Tal intoxicação foi responsável por causar encefalopatia aguda em adultos e crianças, seguida por casos de distonia e discinesia associados à degeneração bilateral dos gânglios da base, especialmente do putâmen (HE et al., 1995).

Estudos em animais de laboratório levaram à caracterização anatomopatológica da toxicidade do 3-NP. No início dos anos 80, Gould e colaboradores demonstraram que o tratamento com 3-NP produzia preferencial degeneração do estriado de ratos e camundongos (GOULD E GUSTINE, 1982; GOULD et al., 1985). Posteriormente, foi sugerido que danos neuronais também podiam ocorrer em outras áreas do cérebro, como cerebelo, hipocampo, tálamo e córtex cerebral (BEAL et al., 1993; BORLONGAN et al., 1997; BROUILLET et al., 1999).

As projeções neuronais principalmente afetadas pelo 3-NP são neurônios espinhais médios GABAérgicos no estriado (HASSEL E SONNEWALD, 1995). Dados da literatura demonstraram que a administração de 3-NP em animais de laboratório é capaz de diminuir os níveis de dopamina no estriado, sugerindo que as vias dopaminérgicas nigroestriatais são significativamente comprometidas neste modelo (BEAL et al., 1993; TARIQ et al., 2005; AL MUTAIRY et al., 2010).

O modelo animal utilizando 3-NP pode mimetizar e reproduzir os sintomas hipercinéticos e hipocinéticos da DH dependendo do tempo e da dose administrada e da frequência. Inicialmente, os animais desenvolvem hiperatividade, nas duas primeiras administrações, seguida por hipoatividade a partir da quarta injeção (BORLONGAN et al., 1997) permitindo assim que as fases iniciais (ou precoce) e tardias da DH possam ser avaliadas.

Além dos aspectos motores, os modelos experimentais também devem ser capazes de reconstruir aspectos cognitivos da desordem, tais como: memória e alterações de atenção. A este respeito, demonstrou-se que, no final de um dado tratamento de 3-NP, os primatas não humanos exibiam déficit cognitivo semelhante ao observado em indivíduos com DH (PALFI et al., 1996).

O 3-NP é um inibidor irreversível da enzima succinato desidrogenase (SDH). Portanto inibe tanto o ciclo de Krebs, como a atividade do complexo II da cadeia transportadora de elétrons (FERRANTE, 2009). A sua estrutura química é similar a do succinato (substrato da SDH) o que pode explicar o fato do 3-NP ocupar o sítio catalítico da enzima e inativá-la irreversivelmente (Figura 4) (COLES et al., 1979; ROSENSTOCK et al., 2004 e 2009).

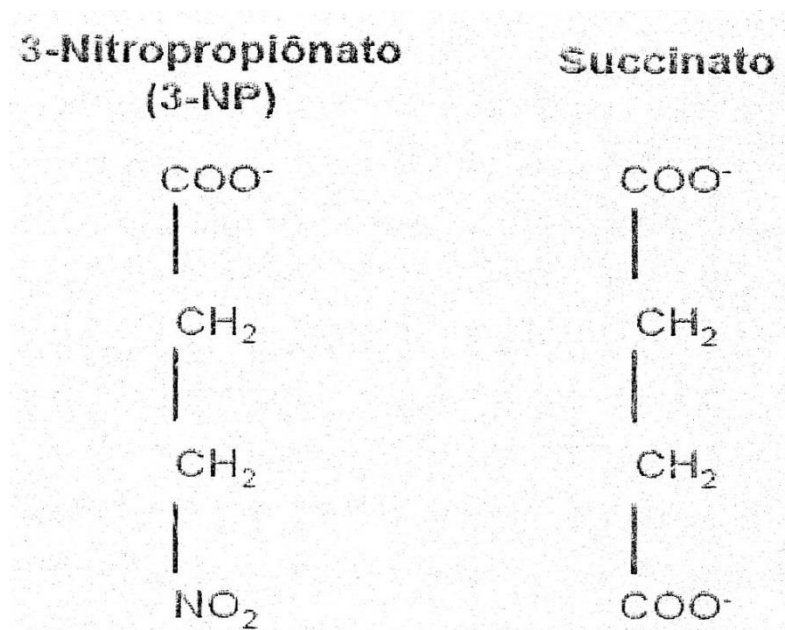


Figura 4 - Estrutura química do 3-NP e do succinato
Fonte: ALSTON et al., 1977

Diversos estudos sugerem diferentes mecanismos de toxicidade e morte neuronal induzidos pelo 3-NP, como consequência do déficit energético e disfunção mitocondrial devido à inibição do complexo II. Dentre estes, estão prejuízo na fosforilação oxidativa, depleção nos níveis de ATP, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, alteração na homeostase do cálcio, geração de EROs, excitotoxicidade e ativação de vias de morte celular (BIZAT et al., 2003; MONTILLA et al., 2004; ROSENSTOCK et al., 2004; MIRANDOLA et al., 2010). Estudos *in vitro* utilizando cultura de neurônios demonstraram que a disfunção mitocondrial induzida pelo 3-NP está relacionada com uma rápida diminuição nos níveis de ATP (LIOT et al., 2009), perda do potencial de membrana (LEE et al., 2002; MACIEL et al., 2004) e aumento na produção de EROs (LIOT et al., 2009). Estudos relataram que o 3-NP também é capaz de agir sobre os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), induzindo, assim, a excitotoxicidade e conduzindo à geração de radicais livres (LAFON-CAZAL et al., 1993; FONTAINE et al., 2000).

O estresse oxidativo ocasionado pelo aumento na produção de espécies reativas está bem definido no mecanismo de toxicidade induzido pelo 3-NP. De particular importância, um estudo mostrou que o tratamento com 3-NP foi capaz de induzir um aumento na produção de EROs. Esses autores demonstraram que o 3-NP induz um rápido aumento na produção de EROs em células neuronais trinta minutos após a exposição, seguido por um segundo pico de ERO algumas horas após (LIOT et al., 2009).

Aumentos na geração de EROs, como o $O_2^{\bullet-}$, o H_2O_2 e o $OH^{\bullet}$ foram reportados em estudos *in vitro* e *in vivo* (MANDAVILLI et al., 2005; BACSI et al., 2006; LIOT et al., 2009; SANDHIR et al., 2010). Além disso, marcadores de estresse oxidativo como produtos de peroxidação lipídica (malondialdeído e 4-hidroxinonenal), dano oxidativo ao DNA (8-hidroxi-2-deoxiguanosina) e proteínas carboniladas, foram encontrados em níveis elevados em regiões do cérebro de ratos tratados com 3-NP (SANTAMARIA et al., 2001; HALLIWELL, 2006; MONCADA E BOLANOS, 2006), indicando a relação do estresse oxidativo com as manifestações de neurotoxicidade induzidas pela toxina. A administração sistêmica de 3-NP em roedores também pode causar diminuição nos níveis de glutathiona (AL MUTAIRY et al., 2010; SANDHIR et al., 2010), depleção das enzimas antioxidantes superóxido

dismutase (SOD) (SANDHIR et al., 2010; BHATEJA et al., 2012) e catalase (BHATEJA et al., 2012; KUMAR et al., 2012).

Então, o modelo induzido pelo 3-NP pode promover características clínicas e fisiopatológicas da DH, incluindo alterações nos movimentos, déficit cognitivo, e degeneração neuronal progressiva no estriado (BEAL et al, 1993; TUNEZ et al, 2010).

2.1.8 Diagnóstico

O diagnóstico da DH é baseado no histórico familiar do paciente, manifestações clínicas apresentadas e testes genéticos. Critérios clínicos utilizados internacionalmente foram propostos por Folstein e colaboradores (1986) são eles:

1. DH definida: presença de coreia ou alteração característica do movimento voluntário não presente ao nascimento e história familiar positiva, com pelo menos outro membro acometido com sintomas típicos da DH. Demência e sintomas de ordem psiquiátrica, embora usualmente presentes, não são suficientes isoladamente para o diagnóstico.
2. DH provável: mesmas características clínicas descritas anteriormente, mas sem possibilidades de obtenção da história familiar, por adoção ou paternidade desconhecida.
3. DH possível: quadro clínico típico, mas sem história familiar, a despeito de investigação genealógica adequada.

Os testes genéticos são fundamentais e capazes de confirmar a presença da doença, pois a diferenciação clínica é limitada devido ao amplo quadro de manifestações sintomatológicas compatíveis com outras desordens neurológicas, dificultando o diagnóstico baseado apenas na história clínica e no exame físico. O teste consiste em uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que mostra a expansão do trinucleotídeo (CAG) (FALK et al., 2006).

Menos de 5% dos indivíduos em situação de risco para a doença de Huntington escolhem realmente fazer os testes genéticos preditivos. Aqueles que passam por esses testes geralmente o fazem para ajudar nas escolhas de carreira e

na família, outros optam por não fazer por causa da ausência de tratamento eficaz (LACCONE et al., 1999; WALKER, 2007).

2.1.9 Tratamento

Atualmente, não existe um tratamento que possa parar, adiar ou inverter a progressão da DH. Os medicamentos são utilizados, principalmente, com o objetivo de controlar os sintomas motores e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Sintomas motores, como os movimentos involuntários relacionados a hiperfunção dopaminérgica, decorrente da neurodegeneração dos neurônios GABAérgicos, são tratados com antagonistas dopaminérgicos (clopromazina, tetrabenazina) e agonistas do receptor GABA (baclofeno) (HADDAD, 1995; POON et al., 2010).

A tetrabenazina é atualmente considerada um dos mais efetivos agentes na redução da coreia, apresentando uma boa tolerabilidade entre os pacientes (KENNEY et al., 2007; FASANO et al., 2008; FRANK, 2009). É o único medicamento aprovado pela *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos para o tratamento da coreia associada à DH. Por outro lado, alguns efeitos adversos foram reportados em tratamentos com a tetrabenazina incluindo insônia, sonolência, depressão, agitação e hipercinesia (FRANK, 2010).

Neurolépticos típicos, incluindo haloperidol, pimozida, flufenazina, tioridazina entre outros, são utilizados para o tratamento da coreia e também dos sintomas psicóticos (BONELLI E HOFMANN, 2007). Esses medicamentos possuem alta afinidade pelos receptores de dopamina D₂, podendo induzir alguns efeitos colaterais como, por exemplo, sintomas parkinsonianos e discinesia tardia, e devem apenas ser utilizados em casos de extrema necessidade. Muitos neurolépticos atípicos, como a clozapina e olanzapina, também são utilizados no tratamento da coreia e dos sintomas psiquiátricos (ADAM E JANKOVIC, 2008; PHILLIPS et al, 2008; JANKOVIC, 2009).

A depressão na DH é tratada com medicamentos antidepressivos tricíclicos convencionais (imipramina, nortriptilina ou amitriptilina) ou com inibidores seletivos

da recaptação de serotonina (sertralina, fluoxetina). Já alterações de humor, ansiedade e irritabilidade excessiva podem ser tratados com benzodiazepínicos (HADDAD, 1995)

Os tratamentos de apoio como, fisioterapia e terapia ocupacional nos estágios iniciais da doença podem ajudar a melhorar a coordenação motora. Os exercícios podem fortalecer os músculos e melhorar o equilíbrio e postura. Terapia psiquiátrica pode ajudar a reduzir a ansiedade, depressão e estresse, bem como ajudar a lidar com as mudanças associadas à doença. Além disso, diminuir o estresse e a ansiedade pode ajudar a controlar a coreia. Fonoaudiólogos podem trabalhar com pacientes portadores de DH para ajudá-los com a comunicação e problemas de deglutição (BILNEY et al., 2003).

Considerando que os medicamentos utilizados para o tratamento da DH representam uma alternativa meramente paliativa, que proporciona benefícios sintomáticos e discretos sobre os sintomas clínicos da doença, diversas moléculas estão sendo testadas em busca de um tratamento efetivo capaz de retardar a progressão da doença. Neste contexto, a terapia com antioxidantes que é evidentemente efetiva em modelos animais da doença (JOHRI E BEAL, 2012), é hoje considerada uma estratégia terapêutica para a busca de novos fármacos para o tratamento da patologia de Huntington.

Apesar de muitos compostos antioxidantes demonstrarem potencial neuroprotetor em modelos animais, até o presente momento a maioria deles ainda não foi aplicada em testes clínicos. Dentre estes, o α -tocoferol, o ácido ascórbico, e a creatina já foram testados tanto em animais como em humanos, demonstrando seus benefícios terapêuticos para a DH (PEYSER et al., 1995; TABRIZI et al., 2003; HERSCH et al., 2006). Um estudo realizado por Peyser e colaboradores (1995), em pacientes com DH com sintomatologia leve a moderada, demonstrou que o tratamento com α -tocoferol, apesar de não ter efeito sobre os sintomas neurológicos e neuropsiquiátricos, diminuiu a taxa de declínio motor no estágio inicial da doença.

Considerando o importante papel do estresse oxidativo na patogênese da doença de Huntington, a terapia com moléculas antioxidantes é uma estratégia terapêutica que pode ser efetiva na tentativa de retardar a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

2.2 Eugenol

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas representa a forma mais antiga e difundida de medicação (HALBERSTEIN, 2005). Até o século passado, a maioria dos medicamentos era obtida diretamente de fontes vegetais ou animais. Mas, com a revolução industrial e o desenvolvimento da química orgânica, houve preferência pelos medicamentos sintéticos, devido à fácil obtenção e porque simples modificações estruturais possibilitam a produção de drogas mais ativas e seguras (RATES, 2001). No entanto, parcela significativa da população ainda prefere o tratamento à base de plantas.

O eugenol (4-alil-2-metoxi-fenol) (Figura 5) é um composto fenólico que ocorre no cravo, manjerição, canela e noz-moscada (YOGALAKSHMI et al., 2010). No cravo-da-índia, esse composto representa cerca de 89,5% e 98% da composição do óleo essencial e do extrato aquoso, respectivamente (RODRIGUES et al., 2009). Apresenta-se, à temperatura ambiente, como um líquido oleoso, incolor ou amarelo claro, mas quando em contato prolongado com o ar, torna-se mais espesso e de cor vermelho escuro. Possui odor característico, semelhante ao cheiro do cravo-da-índia, além de possuir sabor ardente e picante (ALMEIDA, 2004). O eugenol apresenta ampla utilização na indústria de alimentos, como aromatizantes de alimentos, bebidas e doces, e em cosméticos (YOGALAKSHMI et al., 2010). Sua alta lipossolubilidade possibilita uma fácil absorção através das membranas lipídicas e rápido acesso ao local de ação, podendo atingir alvos intracelulares como as mitocôndrias (USTA et al., 2002), ou penetrar com rapidez a bainha de mielina de uma fibra ou de um feixe nervoso (GURNEY, 1965).

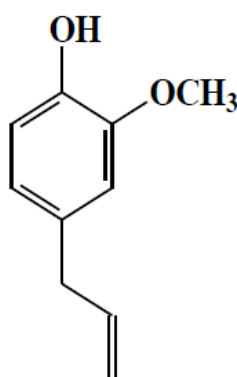


Figura 5 - Estrutura molecular do eugenol

Fonte: MORAIS et al, 2006

Apesar de existirem estudos com o eugenol que datam do século XIX, foi na segunda metade do século XX que se verificou um interesse maior na pesquisa com este componente, sendo muitos dos trabalhos publicados ligados à odontologia (BONASTRE, 1967; MOLNAR, 1967). Atualmente, o eugenol vem sendo extensivamente estudado, já tendo sido caracterizados diversos efeitos biológicos. Segundo Hume (1988), seus efeitos farmacológicos dependerão da concentração e do tempo de exposição e/ou de contato entre ele e as células. Dentre as propriedades biológicas podemos verificar atividades: anti-inflamatória (REDDY E LOKESH, 1994), analgésica (SNEDDON E GLEW, 1973), anestésica (GUENETTE et al., 2006), antimicrobiana (MARKOWITZ et al., 1992; VÁZQUEZ et al., 2001; ESCOBAR, 2002; DEVI et al., 2010), antifúngica (PINTO et al., 2009), anti-helmíntica em ruminantes (PESSOA et al, 2002), antipirética (quando administrado periférica ou centralmente reduzindo a febre por ação central, igualmente ao acetaminofeno) (FENG E LIPTON, 1987), antioxidante (OGATA et al., 2000; JIROVETZ et al., 2006; GÜLÇİN, 2011), neuroprotetora (KABUTO et al., 2007; WIE et al., 1997).

O eugenol é utilizado em práticas odontológicas como antisséptico tópico, analgésico e anestésico local, além de conferir propriedades farmacológicas aos cimentos obturadores de canais, visto ser bactericida (em concentrações relativamente altas de 10^{-3} a 10^{-2} mol/L), portanto, eficaz no tratamento de algumas enfermidades infecciosas na cavidade oral (MARKOWITZ et al., 1992; ESCOBAR, 2002). Também é utilizado como cimento provisório em cavidades dentárias, quando associado ao óxido de zinco (NAGABABU E LAKSHMAIH, 1994).

O eugenol inibe a peroxidação lipídica pela varredura de radicais livres como as espécies reativas de oxigênio, essa atividade antioxidante é determinada por sua estrutura metoxifenólica (TAIRA et al., 1992; NAGABABU E LAKSMAIAH, 1994; ITO et al., 2005). Possui também efeito modulador nas concentrações intracelulares de substâncias antioxidantes como a glutatona e a enzima glutatona-N-transferase (ROMPELBERG et al, 1996; YOKOTA, 1988; KABUTO et al., 2007). O eugenol pode ainda promover neuroproteção contra dano isquêmico através de sua ação hipotérmica e por modulação de receptores NMDA e do radical superóxido (WON et al., 1998; WIE et al., 1997).

Estudos têm demonstrado que o eugenol pode apresentar diferentes tipos de toxicidade *in vitro*, *in vivo*, e quando administrado diretamente no tecido pode determinar reações alérgicas e dermatites (HUME, 1983; ESCOBAR, 2002). Foram verificadas ainda disfunção hepática, coagulação intravascular disseminada, hipoglicemia severa até morte por falência múltipla de órgãos (ESCOBAR, 2002). Porém, estes efeitos tóxicos estão relacionados a altas doses (ALMEIDA, 2004).

3. Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito neuroprotetor do eugenol (4-alil-2-metoxifenol) sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela administração sistêmica do ácido 3-nitropropiónico (modelo experimental da doença de Huntington) em ratos Wistar.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a toxicidade aguda do eugenol em camundongos (machos e fêmeas);
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do eugenol pelo método de captura de radicais 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH[•]);
- Avaliar o efeito do eugenol sobre o comportamento de animais que receberam ácido 3-nitropropiónico, através dos testes comportamentais de campo aberto (avaliação motora e comportamental), rotarod (coordenação motora) e labirinto em cruz elevado (avaliação da memória);
- Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* do eugenol pelo método da peroxidação lipídica (malonaldeído) em animais que receberam ácido 3-nitropropiónico e eugenol.

4. Artigo

Artigo a ser submetido ao Periódico Food Chemistry

Neuroprotective efficacy of eugenol against 3-nitropropionic acid-induced behavioral alterations and oxidative stress in rats

Rafaella F. da Nóbrega^a, Jamilka L. da Silva^a, Cybelle F.B.M. Linard^a, Adriano C. Ramos^a, Renata C.P. Ribas^a, Claudia J. Lagranha^c, Almir G. Wanderley^b and Simone S. L. Lafayette^{b*}

^aDepartment of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, 50740-521, Recife - PE, Brazil

^bDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife - PE, Brazil

^cCenter for Physical Education and Sports Science, Federal University of Pernambuco - Center Academic of Vitória, 55608-680, Vitoria de Santo Antão – PE, Brazil

*Corresponding author at: Department of Physiology and Pharmacology, CCB, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901 – Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil – Tel.: +55 81 21268530; fax.: +55 81 21268976. E-mail address: simonesette@terra.com.br

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by cognitive, behavioral, and motor abnormalities. 3-Nitropropionic acid (3-NP) inhibits succinate dehydrogenase and complex II enzyme in the mitochondrial respiratory chain that leads to cellular energy deficit and oxidative stress and is a well-known experimental model to study Huntington's disease (HD). Eugenol, a phenolic antioxidant, may have an effect opposite to DH due to this activity. Then, the present study evaluated the possible role of eugenol, on the 3-nitropropionic acid induced behavioral and biochemical alterations. Intraperitoneal administration of 3-nitropropionic acid (20 mg/kg., i.p.) for 7 days produced hypolocomotion, muscle incoordination and memory deficit. Daily treatment with eugenol (37.5 mg/kg., p.o.) 60 min prior to 3-nitropropionic acid administration for a total of 7 days, significantly improved the 3-nitropropionic acid-induced motor and cognitive impairment. Biochemical analysis of the brain (striatum, cortex and substantia nigra) revealed that systemic 3-nitropropionic acid administration significantly increased lipid peroxidation. Eugenol treatment significantly attenuated oxidative damage. The results of the present study indicate that eugenol (37.5 mg/kg., p.o.) significantly reversed 3-nitropropionic acid-induced alterations in various behavioral and biochemical parameter. Therefore eugenol could be a therapeutic adjuvant for the treatment of Huntington's disease.

Keywords: Huntington's disease; 3-nitropropionic acid; Oxidative stress; Eugenol; Behavioral parameters

1. Introduction

Huntington's disease (HD) also known as Huntington's chorea is a progressive neurodegenerative disorder. The disease was first described in the 19th century by George Huntington, who identified both its clinical features and its pattern of familial transmission (Rosenstock et al., 2010; Stack et al., 2010). Clinical features of HD

include progressive motor dysfunctions, cognitive decline and psychiatric disturbances, including both neuronal dysfunctions and neuronal cell death (Bates, 2005).

Neuropathologically, HD is characterized by atrophy of the basal ganglia, specifically in the subpopulations of striatum neurons (caudate-putamen) (Reiner et al., 1988; Storey e Beal, 1993). HD is characterized by early selective loss of GABAergic striatal medium spiny neurons accompanied by degeneration of neurons in the cortex and in other brain areas (Gil e Rego, 2008).

Despite the discovery of the genetic mutation of HD - unstable expansion of a cytosine–adenine–guanine (CAG) trinucleotide repeat within the coding region of the IT15 gene on the short arm of chromosome 4 (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993), the mechanisms of the pathogenesis of HD are still not fully understood. Excitotoxicity (Fernandes et al., 2007; Shehadeh et al., 2006; Tang et al., 2005; Zeron et al., 2004; Zeron et al., 2002; Zeron et al., 2001), metabolic impairment, oxidative stress, mitochondrial dysfunction (Oliveira, 2010; Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2006; Tabrizi e Schapira, 1999; Tabrizi et al., 2000) have been proposed as contributing factors for the appearance of motor alterations and cognitive decline and have been implicated in the progressive degeneration observed in HD.

Several rodent models have been designed to reproduce the pathogenesis of the disease with the ultimate goal of developing potential novel drugs for clinical therapies (Ferrante, 2009). 3-nitropropionic acid (3-NP) induced HD model replicates most of the clinical and pathophysiological hallmarks of HD, including spontaneous choreiform, cognitive deficits, and progressive striatal neuronal degeneration (Beal et al., 1993; Tunez et al., 2010).

3-NP, is a neurotoxin, irreversibly inhibits succinate dehydrogenase enzyme, causing inhibition of both the Krebs cycle and complex II of the mitochondrial electron transport chain (Ferrante, 2009). One of the mechanisms following 3-NP administration is the development of mitochondrial dysfunctions leading to generation of a bioenergetic defect which involves three interacting processes such as: energy impairment (inhibition of complex-II), oxidative stress and excitotoxicity (NMDA receptor activation) (Damiano, 2010).

At present, there are no effective treatments against HD. Current therapies for treating HD are symptomatic; focusing on neurological and psychiatric symptoms that aim at improving the quality of life. Eugenol (4-allyl-2-methoxy phenol), is one such phenolic compound occurring in clove, basil, cinnamon and nutmeg. Pharmacological properties of eugenol (EUG) were demonstrated including anti-inflammatory (Reddy e Lokesh, 1994), analgesic (Sneddon e Glew, 1973), anesthetic (Guenette et al., 2006), antipyretic (Feng e Lipton, 1987), anti-bacterial, antioxidant (Gülçin, 2011; Jirovetz et al., 2006; Ogata et al., 2000), and neuroprotective effects (Kabuto et al., 2007; Wie et al., 1997). Due to its antioxidant activity, eugenol may have an effect against DH. So the aim of this study was investigated the neuroprotective potential of eugenol against the behavioral and biochemical changes induced by 3-NP in models of HD.

2. Materials and methods

2.1 Reagents

3-Nitropropionic acid (3-NP), was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), and was diluted with saline (adjust pH 7.4) before the beginning of the treatment. On subsequent days, solutions were stored in refrigerator (4 °C). Eugenol was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) dissolved in Tween 80 2% and diluted in distilled water. Ascorbic acid, butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), thiobarbituric acid (TBA) and 1,1,3,3-tetrametoxipropene (TMP), used in biochemical analysis, were also acquired from Sigma.

2.2 Evaluation *in vitro* antioxidant activity of eugenol

The antioxidant activity of eugenol was determined by the capture of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilidrazil) radical assay according to the method described by

Brand-Williams and colleagues (1995). Aliquots of 0,5 mL of solution containing different concentrations of eugenol (2,5 - 250 µg/mL) were added to 1,5 mL of ethanol solution of DPPH[·] (1mM). The solutions were homogenized and incubated for 30 min at room temperature and the absorbance of the resulting solution was read in a spectrophotometer at 515 nm against a blank. The radical scavenging activity was measured as an absorbance decrease of DPPH and was calculated using the following equation:

$$\frac{(\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}) \times 100}{\text{Absorbance of control}}$$

Ascorbic acid was used in experiments as a positive control. It was calculated the value of IC₅₀ (concentration of sample required to inhibit 50% of radical) of ascorbic acid and eugenol.

2.3 Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus* var. *albinus*) weighing between 300-350g were used for neuroprotective experiments. The animals were obtained from the Department of Physiology and Pharmacology from the Federal University of Pernambuco (UFPE). Male and female mice (35-40 g) (*Mus Musculus*, var. Swiss) used for oral toxicity of eugenol were obtained from the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (Lika). The animals were kept under standard conditions of light and dark cycle (12 h dark/light cycle) and temperature (22 ± 2 °C) with water and commercial feed (Labina®, Purina, Brazil) *ad libitum*. All the experimental protocols were submitted to and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the UFPE, under license nº. 23076.018119/2012-01 in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.4 Oral acute toxicity

Acute toxicity studies were performed on Swiss mice of both sexes as described by OECD 420 (2001), with slight modifications. The animals were randomly divided into four groups (n=5/group/sex) and deprived of feed for 12 h with access to water *ad libitum*. The treated group received eugenol (dissolved in Tween 80 2% and diluted in distilled water) in a single oral dose of 2.0 g/kg and the control groups received vehicle (10 mL/kg). The observations were performed at 30, 60, 120, 180 and 240 minutes after the oral treatments and daily for 14 days. Behavioral changes, weight, consumption of food and water, clinical signs of toxicity and mortality were recorded daily (Malone,1977).

2.5 Experimental groups

The animals were randomly divided into six groups, eight animals in each. Group 1 (control group): received intraperitoneally (i.p.) for seven days vehicle (NaCl 0.9% i.p.) and water orally one hour before (10 mL/kg p.o.); Group 2 (HD group): received 3-NP (20 mg/kg, i.p.) for seven days and water (p.o.) one hour before 3-NP; Groups 3-6 (treated): received 3-NP as in group 2, plus the fact that one hour before 3-NP, animals received oral doses of eugenol at 12.5, 25, 37.5 and 50 mg/kg, respectively. Twenty four hours after the last day of treatment, the rats were evaluated with behavioral tests. After the behavioral test animals were sacrificed and used for biochemical assays.

2.6 Evaluation of body weight

The animal body weight was recorded on the first and last day of the experiment. The percentage change in weight was calculated in comparison to initial body weight on the first day of the experiment.

$$\% \text{ change in body weight} = \frac{(\text{Body weight 1st day} - \text{Body weight 8st day})}{\text{Body weight 1st day}} \times 100$$

2.7 Experimental procedures

All animals were submitted to behavioral tests 24 hours after the seven day of treatment with the administration of 3-NP or vehicle (i.p.) and water or eugenol (p.o.).

2.7.1 Locomotor Activity

To quantify general activity, rats were placed individually in the center of an open-field arena (a circular wooden box 100 cm in diameter and 40 cm high, with a floor divided into 19 regions). The time for movement (start to time for the animal to move) the frequency of locomotion (number of floor units entered by the animal with its four paws), the rearing frequency (the number of times the animal stood on its hind legs) and immobility time (time that the animal stood without making any movements) were assessed for 5 min. The device was cleaned with a 5% alcohol–water solution before placement of each animal to eliminate a possible bias effect due to odor clues left by previous rats.

2.7.2 Rotarod test

All animals were evaluated for motor skills (motor incoordination, grip strength and balance) by using the rotarod. To perform this test, the animal was placed with all four paws on a bar with a diameter of 7.0 cm and set 25 cm above the floor, rotating at a speed of 25 rpm. Animals were placed on the rotating bar and the length of stay was recorded. A cut off time of 180 seconds (Kumar and Kumar, 2009) was maintained throughout the experiment. Before dividing each experimental group, the rats were trained in two sessions of 180 seconds for acclimatization.

2.7.3 Elevated plus maze test for spatial memory

The test adapted to memory was performed according to the method by Kumar et al. (2006). The elevated plus-maze consists of two opposite open arms (50x10 cm) and two closed arms of the same dimension, with 40 cm walls and a central area (10x10 cm) connecting the arms. The rats were placed individually at one end of an open arm facing away from the central area. The time taken by the animal to move from the open arm until entering one of the closed arms (latency time) was registered 24 hours after the last day of treatment with water or eugenol, and called transfer latency of initial. Rats were allowed to explore the maze for 30 seconds after the initial registration of the acquisition latency, and were then returned to their cages. The retention latency was evaluated again the following day.

The percentage of memory retention was calculated by the formula:

$$\frac{\text{Latency of initial transfer} - \text{Repeating transfer latency}}{\text{Latency of initial transfer}} \times 100$$

2.8 Biochemical studies

2.8.1 Dissection and homogenization

After behavioral assessments, the animals were decapitated, the brains removed, placed on ice and the striatum, cortex and substantia nigra dissected. These regions were weighed and homogenized in Potter Elvehjem type homogenizer with PBS buffer (10% w/v), to which was added BHT (0.004% w/v) to prevent autoxidation of the samples. The homogenate was centrifuged at 10 000 x g for 15 minutes at 4°C, and an aliquot of supernatant was separated for biochemical analysis.

2.8.2 Measurement of lipid peroxidation

Quantitative measurement of lipid peroxidation in the dissected regions was assessed according to the method of Buege and Aust (1978). The amount of malonaldehyde (MDA) present in samples was quantified by the reaction with thiobarbituric acid. Aliquots of 500 μ L of the supernatant were added to 1 mL of thiobarbituric acid reagent (TBA): TBA 0.38% (w/w), 250 mL of HCl 1N, TCA 15% (w/w) and 20 mL of ethanolic BHT (2% w/w). The solution was heated at 100°C for 15 minutes, followed by cooling in an ice bath. 1.5 mL of n-butanol was added, the mixture was shaken and centrifuged to 3 000 $\times$ g. After centrifugation, the upper phase was collected and analyzed in a spectrophotometer (CARY 3E - UV - Visible Spectrophotometer Varian) at 532 nm. For calculations, we performed a standard curve with 1,1,3,3-tetramethoxypropane. Results were expressed as nmol MDA/mg protein.

2.9 Statistical Analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SEM. The difference between groups was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison/post-hoc test to determine the significance level. The Kolmogorov-Smirnov test was employed in order to determine normality. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism[®] 5.0. Values less than 0.05 were considered statistically significant

3. Results

3.1 Reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical

Significant DPPH radical scavenging activity was evident in all concentrations tested. The preparation was able to reduce the stable free radical DPPH to the

yellow-colored 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl with an IC_{50} 33,12 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 = 0,8893$). Under similar conditions the positive control, ascorbic acid, showed IC_{50} 3,676 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 = 0,6374$).

3.2 Acute toxicity

It was observed that the eugenol (2.0 g/kg, p.o.) induced depression of the central nervous system (sedation) in mice of both sexes during the first 30 min. However, it produced no signs of acute toxicity or death in the treated animals. No significant changes in food and water intake or body weight were observed during the 14 days of observation (data not shown). The LD_{50} could not therefore be estimated and it is possibly higher than 2.0 g/kg.

3.3 Effect of eugenol on body weight in 3-NP treated rats

The control animals gained weight as expected. However, the animals that received 3-NP caused a significant decrease in body weight on the last day as compared to the control group. Daily treatment with eugenol for seven days improved the body weight loss, significantly in at the dose of 37,5 mg/kg (Figure. 1).

3.4 Effect of eugenol on locomotor activity

Administration of 3-NP for seven days significantly reduced the locomotor activity of rats. Treatment eugenol for seven days significantly improved locomotor activity in rats that received 3-NP (Figure. 2). Daily treatment with eugenol (37.5 mg/kg) increased ambulatory and rearing movements, and decreased the time of resting. Eugenol (12.5, 25 and 50 mg/kg) treatment did not significantly modify, locomotor in rats that received 3-NP.

3.5 Effect of eugenol on motor skills

Administration of 3-NP (20 mg/kg., i.p. for seven days) significantly decreased muscle grip strength and significantly decreased the fall-off time as compared to control animals (Figure 3). Daily treatment with eugenol (p.o.) for seven days significantly increased the fall-off time when compared to the group received only with 3-nitropropionic acid.

3.6 Effect eugenol on memory performance in elevated plus maze

Administration of 3-NP (20 mg/kg., i.p. for seven days) caused a marked memory loss as shown by a significant decrease in the % retention of memory in treated rats as compared to the control group (Figure 4). Daily treatment of eugenol (p.o.) one hour before the administration of 3-nitropropionic acid for seven days increased the % retention memory in rats as compared to the group received only with 3-nitropropionic acid.

3.7 Effect of eugenol on brain lipid peroxidation

The administration of 3-NP for seven days induced oxidative stress as indicated by a significant increase in the striatum, cortex and substância nigra MDA levels as compared to the control group. Eugenol treatment (p.o.) one hour before the administration of 3-nitropropionic acid for seven days, attenuated the increase in lipid peroxidation in striatum, cortex and substantia nigra as shown by a significant decrease in MDA levels (Figure 5).

4. Discussion

This study investigated the neuroprotective effect of eugenol against 3-NP induced neurotoxicity. Eugenol is an essential oil constituent extracted from cloves

and used as a food flavouring agent, and was reported to have antioxidant activity (Ito, 2005).

The antioxidant activity of eugenol was demonstrated *in vitro*, by DPPH radical assay. In the DPPH assay, the antioxidants reduce the stable radical DPPH to the yellow diphenyl-picrylhydrazine. This method is based on the reduction of DPPH in alcoholic solution in the presence of a hydrogen-donating antioxidant because of the formation of the nonradical form DPPH-H in the reaction (Oyaizu, 1986). DPPH is usually used as a reagent to evaluate free radical–scavenging activity of antioxidants. DPPH is a stable free radical, showing a maximum absorbance at 517 nm. When DPPH radicals encounter a proton-donor substrate such as an antioxidant, the radicals would be scavenged and the absorbance is reduced (Gülçin, 2004; Elmastas, 2006). The decrease in absorbance is taken to evaluate the radical scavenging. The results indicate that the eugenol showed DPPH free radical activity with the IC₅₀ value (33.12 µg/mL, $r^2 = 0,8893$). Previous reports demonstrated of the eugenol showed high DPPH free radical activity with the lowest IC₅₀ value (16.06 µg/mL, $r^2 = 0.9823$) (Gülçin, 2011). This results confirms the antioxidant propriety of eugenol.

The results of the acute toxicity test indicated that the eugenol when administered orally at a dose of 2.0 g/kg caused a reversible sedative effect, but did not produce any sign of toxicity or death in the treated animals, suggesting an LD₅₀ of above 2.0 g/kg. Previous acute toxicity test with eugenol showed minimum lethal dose values of 1.930 a 3.000 mg/kg, in mice and rats (Sticht and Smith, 1971; Opdyke, 1975).

In the present study, administration of 3-NP (20 mg/kg, i.p.) for seven days produced significant motor and behavioral abnormalities including bradykinesia, muscle weakness, grip strength, abnormal gait and rigidity. These finding are in agreement with earlier reports which also observed a variety of neurobehavioral abnormalities and motor deficit in rats following 3-NP administration (Kumar et al., 2006, 2007; Túnez et al., 2007). The symptoms developed by chronic administration of 3-NP are late hypokinetic stages of HD (Pandey et al., 2008). Locomotor and motor activities in rats that received 3-NP were significantly impaired what could be due to the degeneration of the GABAergic neurons in the basal ganglia that control body movement (Borlongan et al., 1995, 1997). Normally, the course of HD also

begins with involuntary movements (chorea), followed by a decrease in motor coordination and a loss of control of voluntary movements that eventually develops into rigidity and dystonia, similar to those of the model induced by the administration of 3-NP. In addition, 3-NP administration for seven days significantly impaired body weight. This reduction in weight could be due to metabolic impairment caused by 3-NP, due to impairment in energy metabolism and mobilization of energy stores (Kumar and Kumar, 2009). Furthermore, the striatal lesions and bradykinesia could be partly responsible for reducing rat appetite, food intake and motor incoordination (Guyot et al., 1997). Treatment with the eugenol significantly improved weight loss and locomotor activity.

Administration of 3-NP is associated with both hyperactivity and hypoactivity, depending on the dose, frequency and duration (Borlongan et al., 1997; Al Mutairy et al. 2010). Animals that received only 3-NP for seven days exhibited significant hypoactivity and incoordination motor. Eugenol treatment improved the hypoactivity and motor incoordination, as evident by several behavioral investigations such as movement analysis and locomotor activity. Motor activity of the animals that received 3-NP also significantly decreased performance on rotarod apparatus as compared to the rats that received vehicle and impaired motor changes were significantly improved by eugenol treatment. Motor changes evidenced by decreasing the fall-off time on the rotarod are attributed mainly to the degeneration of striatum neurons, a region functionally connected by afferences in the motor cortex (Brown, 1992; Sgambato et al. 1997).

3-NP also induced cognitive deficit. The memory of patients with HD often decreases with the degeneration of neurons in the brain (Barquero-Jiménez and Gómez-Tortosa 2001). Cognitive dysfunction can be due to the disruption of striatum-frontal circuits in patients with HD (Lastres-Becker et al. 2003). Eugenol treatment improved the cognitive deficit.

Administration of 3-NP acts as an irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase thus inhibits both the Krebs cycle and Complex II activity of the electron transport chain (Ludolph et al., 1991). Inhibition of succinate dehydrogenase interferes with the electron cascade and interrupts oxidative phosphorylation. This phenomenon induces a reduction in ATP production and oxidative stress. Oxidative stress is considered to be one of the major key determinants in 3-NP induced

neurotoxicity and previous studies clearly demonstrate that increased oxidative stress can be one of the major deleterious events in clinical and experimentally induced HD. 3-NP also was found to act on NMDA receptors thereby inducing excitotoxicity and leading to generation of free radicals (Lafon-Cazal et al., 1993; Fontaine et al., 2000). The inflammation associated with 3-NP, also acts as a contributing factor for neuronal damage and free radical generation (Ahuja et al. 2008). Shinomol and Muralidhara (2008) observed that various brain regions exposed to 3-NP showed significantly elevated levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and hydroperoxide, and a marked reduction in the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase - SOD, catalase and glutathione), suggesting the induction of oxidative stress.

Studies report that striatal damage caused by 3-NP can be attenuated by antioxidants possibly by free radical scavenging activity and increased endogenous antioxidant defense (Ahuja et al., 2008; Kumar and Kumar, 2009). It is becoming increasingly evident that the natural antioxidants, which have phenolic structure, play an important role in protecting the tissues against free radical damage (Fujisawa et al., 2002).

In the present study, after administration of 3-NP there was an increased in the levels MDA in the striatum, cortex and substantia nigra. MDA is an end product of lipid peroxidation and it was suggested that plasma MDA maybe used as a potential biomarker to test treatment efficacy of drugs used in Huntington's disease (Chen et al., 2007). Furthermore, the lipid peroxidation in biological systems has long been thought to be a toxicologic phenomenon that can lead to various pathologic consequences. The resulting lipid hydroperoxides can affect membrane fluidity and the function of membrane proteins (Hochstein and Atallah, 1988). However, these effect was attenuated by eugenol treatment.

The antioxidant activity of eugenol, that have a phenolic structure, was evaluated by the extent of protection offered against free radical mediated lipid peroxidation using both previous *in vitro* and *in vivo* studies (Nagababu et al., 2010). Eugenol forms complexes with reduced metals and therefore inhibits the formation of perferryl ions or iron-oxygen chelate complexes which act as the initiating factors of lipid peroxidation (Ito et al., 2005).

Previous studies demonstrated the antioxidant activity of eugenol, which significantly prevents oxidative tissue damage in different experimental models (Ito et al., 2005; Kabuto et al., 2007; Morsy and Fouad, 2008). In addition, it was reported that eugenol can inhibit inducible nitric oxide synthase (Li et al., 2006), prevent intracellular Ca^{2+} accumulation (Ou et al., 2006) which may contribute to its protective effect against oxidative tissue injury. Nitric oxide (NO) has been implicated in a variety of pathophysiological conditions including neuroinflammation and neurodegenerative diseases. Eugenol also has a neuroprotective effect against ischemic injury in the CNS. It inhibits neuronal excitotoxic or oxidative injury and has protective effects against N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced neurotoxicity. Mechanisms such as NMDA receptors modulation through inhibition of Ca^{2+} uptake has been suggested for the protective effect of eugenol (Wie et al., 1997; Won et al., 1998). In our study, the treatment with eugenol reduced the oxidative stress in substantia nigra, striatum and cortex, as assessed by the diminished levels of MDA.

5. Conclusion

Taken together, these results confirm that the administration of 3-NP in rats induce neurobehavioral and biochemical alterations similar those found in HD and suggest that neurodegeneration occurred due to increased oxidative damage. The treatment with eugenol demonstrated a protective effect against 3-NP-induced neurotoxicity, probably due to its antioxidant activity. More experiments are needed to further clarify the mechanisms involved in this effect.

References

- Ahuja, M., Bishnoi, M., Chopra, K. (2008). Protective effect of minocycline, a semi-synthetic second-generation tetracycline against 3-nitropropionic acid (3-NP)-induced neurotoxicity. *Toxicology*, 244, 111-122.
- Al Mutairy, A., Al Kadasah, S., Elfaki, I., Arshaduddin, M., Malik, D., Al Moutaery, K., Tariq, M. (2010). Trolox ameliorates 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neurotoxicology Teratology*, 32(2), 226-233.

Barquero-Jiménez, M. S., Gómez-Tortosa, E. (2001). Cognitive disorders in patients with Huntington's disease. *Revista de Neurología*, 32, 1067–1071.

Bates, G. P. (2005). History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. *Nature Reviews Genetics*, 6(10), 766-773.

Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Miller, J. M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B. R., Hyman, B. T. (1993). Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Journal Neuroscience*, 13, 4181–4192.

Borlongan, C. V., Koutouzis, T. K., Randall, T. S., Freeman, T. B., Cahill, D. W., Sanberg, P. R. (1995). Systemic 3-nitropropionic acid: behavioral deficits and striatal damage in adult rats. *Brain research bulletin*, 36, 549–556.

Borlongan, C. V., Koutouzis, T. K., Freeman, T. B., Hauser, R. A., Cahill, D. W., Sanberg, P. R. (1997). Hyperactivity and hypoactivity in a rat model of Huntington's disease: the systemic 3-nitropropionic acid model. *Brain research. Brain research protocols*, 1(3), 253-257.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.

Brown, L. L. (1992). Somatotopic organization in rat striatum: evidence for a combinational map. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 7403-7407.

Buege, J. A., Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.

Chen, C. M., Wu, Y. R., Cheng, M. L., Liu, J. L., Lee, Y. M., Lee, P. W., Soong, B. W., Chiu, D. T. (2007). Increased oxidative damage and mitochondrial abnormalities in the peripheral blood of Huntington's disease patients. *Biochemical and biophysical research communications*, 359, 335–340.

Damiano, M., Galvan, L., Déglon, N., Brouillet, E. (2010). Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802, 52-61.

Elmastas, M., Turkecul, I., Oztürk, L., Gülçin, I., Isildak, O., Aboul-Enein, H. Y. (2006). The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Comb Chem High Throughput Screen*, 9, 443–448.

Feng, J., Lipton, J. M. (1987). Eugenol: antipyretic activity in rabbits. *Neuropharmacology*, 26 (12), 1775-1778.

Fernandes, H. B., Baimbridge, K. G., Church, J., Hayden, M. R., Raymond, L. A. (2007). *The Journal of Neuroscience*, 27(50), 13614–13623.

Ferrante, R. J. (2009). Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792, 506-520.

- Fontaine, M. A., Geddes, J. W., Banks, A., Butterfield, D. A. (2000). Effect of exogenous and endogenous antioxidants on 3-nitropropionic acid-induced in vivo oxidative stress and striatal lesions: insights into Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 75, 1709–1715.
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y., Sakagami, H. (2002). Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*, 177, 39–54.
- Gil, J. M., Rego, A. C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, 27, 2803–2820.
- Guenette, S. A., Beaudry, F., Marier, J. F., Vachon, P. (2006). Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 29, 265–270.
- Guyot, M. C., Palfi, S., Stutzmann, J. M., Mazievre, M., Hantraye, P., Brouillet, E. (1997). Riluzole protects from motor deficits and striatal degeneration produced by systemic 3-nitropropionic acid intoxication in rats. *Neuroscience*, 81, 141–149.
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, O. I., Oktay, M., Büyükkökuroğlu, M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 205–215.
- Gülçin, I. (2011). Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. *Journal of Medicinal Food*, 14 (9), 975–985.
- Hochstein, P., Atallah, A. S. (1988). The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutation research*, 202, 363–375.
- Ito, M., Murakami, K., Yoshino, M. (2005). Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food Chemical Toxicology*, 43, 461–466.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 6303–6307.
- Kabuto, H., Tada, M., Kohno, M. (2007). Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 423–427.
- Kulkarni, S. K. (1999). *Handbook of Experimental Pharmacology*, 3rd ed. Vallabh Parkashan, New Delhi – India.
- Kumar, P., Padi, S. S., Naidu, P. S., Kumar, A. (2006). Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms. *Behavioral Pharmacology*, 17, 485–492.

Kumar, P., Padi, S. S., Naidu, P. S., Kumar, A. (2007). Possible neuroprotective mechanisms of curcumin in attenuating 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 29, 19–25.

Kumar, P., Kumar, A. (2009). Possible role of sertraline against 3-nitropropionic acid induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rat brain. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 33, 100–108.

Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., Bockaert, J. (1993). NMDA dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, 364, 535–537.

Lastres-Becker, I., Miguel, R. D., Fernández-Ruiz, J. J. (2003) The endocannabinoid system and Huntington's disease. *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*, 2, 335–347.

Li, W., Tsubouchi, R., Qiao, S., Haneda, M., Murakami, K., Yoshino, M., (2006). Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages. *Biomedical research*, 27, 69-74.

Ludolph, C. A., He, F., Spencer, P. S., Hammerstad, J., Sabri, M. (1991). 3-Nitropropionic acid: exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Journal canadien des sciences neurologiques*, 18, 492–498.

Malone, R. A. (1977). Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: Warner, H., Wolf, P. (Eds.), *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Springer- Verlag, Berlin, 24–53.

Morsy, M. A., Fouad, A. A. (2008). Mechanisms of gastroprotective effect of eugenol in indomethacin-induced ulcer in rats. *Phytotherapy research*, 22, 1361-1366.

Nagababu, E., Rifkind, J. M., Boindala, S., Nakka, L., (2010). Assessment of antioxidante activity of eugenol in vitro and in vivo. *Methods in molecular biology*, 610, 165–180.

Organisation For Economic Cooperation and Development (OECD). (2001). Guideline for Testing of Chemicals. Guidance no. 420. Fixed dose procedure, Adopted December 17. Disponible in <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD GL420.pdf>.

Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S., Endo, T. (2000). Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48, 1467–1469.

Oliveira, J. M. (2010). Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: focusing on huntingtin and the striatum. *Journal of Neurochemistry*, 114, 1–12.

Oliveira, J. M., Jekabsons, M. B., Chen, S., Lin, A., Rego, A. C., Goncalves, J., Ellerby, L. M., Nicholls, D. G. (2007). Mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: the bioenergetics of isolated and in situ mitochondria from transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*, 101, 241–249.

Oliveira, J. M., Chen, S., Almeida, S., Riley, R., Goncalves, J., Oliveira, C. R., Hayden, M. R., Nicholls, D. G., Ellerby, L. M., Rego, A. C. (2006). Mitochondrial-dependent Ca^{2+} handling in Huntington's disease striatal cells: effect of histone deacetylase Inhibitors. *Journal of Neuroscience*, 26, 11174–11186.

Opdyke, D. L. J. (1975). Monographs on fragrance raw materials. *Food and cosmetic toxicology*, 13.

Ou, H. C., Chou, F. P., Lin, T. M., Yang, C. H., Sheu, W. H. H. (2006). Protective effects of eugenol against oxidized LDL induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Food Chemistry Toxicology*, 44, 1485-1495.

Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *The Japanese Journal Nutrition and Dietetics*, 44, 307–315.

Pandey, M., Varghese, M., Sindhu, K. M., Sreetama, S., Navneet, A. K., Mohanakumar, K. P. et al. (2008). Mitochondrial NAD⁺-linked State 3 respiration and complex-I activity are compromised in the cerebral cortex of 3-nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's disease. *Journal Neurochemistry*, 104(2), 420–34.

Reddy, A. C., Lokesh, B. R. (1994). Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan induced inflammation in rats. *Annals of nutrition & metabolismo*, 38, 349–358.

Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B., Young, A. B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(15), 5733-5737.

Rosenstock, T. R., Duarte, A. I., Rego, A. C. (2010). Mitochondrial-Associated Metabolic Changes and Neurodegeneration in Huntington's Disease - Clinical Features to the Bench. *Current drug targets*, 11, 1218-1236.

Sgambato V., Abo V., Rogard M., Besson M. J., Deniau J. M. (1997). Effect of electrical stimulation of the cerebral cortex on the expression of the Fos protein in the basal ganglia. *Neuroscience*, 81, 93-112.

Shehadeh, J., Fernandes, H. B., Zeron Mullins, M. M., Graham, R. K., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Raymond, L. A. (2006). Striatal neuronal apoptosis is preferentially enhanced by NMDA receptor activation in YAC transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiology of Disease*, 21, 392–403.

Shinomol, G. K., Muralidhara. (2008). Effect of *Centella asiatica* leaf powder on oxidative markers in brain regions of prepubertal mice in vivo and it's in vitro efficacy to ameliorate 3-NPA-induced oxidative stress in mitochondria. *Phytomedicine*, 15, 971-984.

Sneddon, I. B., Glew, R. C. (1973). Contact dermatitis due to propanidid in an anaesthetist. *Practitioner*, 263, 321-323.

Stack, C., Ho, D., Wille, E., Calingasan, N. Y., Williams, C., Liby, K. et al. (2010). Triterpenoids CDDO-ethyl amide and CDDO-trifluoroethyl amide improve the behavioral phenotype and brain pathology in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Free radical biology & medicine*, 49, 147–58.

Sticht, E. D, Smith, R. M. (1971). Eugenol: Some Pharmacologic Observations. *Journal of Dental Research*, 50, 1531-1535.

Storey, E., Beal, M. F. (1993). Neurochemical substrates of rigidity and chorea in Huntington's disease. *Brain*, 116 (Pt 5), 1201-1222,

Tabrizi, S. J., Schapira, A. H. (1999). Secondary abnormalities of mitochondrial DNA associated with neurodegeneration. *Biochemical Society Symposium*, 66, 99–110.

Tabrizi, S. J., Workman, J., Hart, P. E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G.; Cooper, J. M., Schapira, A. H. (2000). Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Annals of Neurology*, 47, 80–86.

Tang T. S., Slow, E., Lupu, V., Stavrovskaya, I. G., Sugimori, M., Llinas, R.; Kristal, B. S., Hayden, M. R., Bezprozvanny, I. (2005). Disturbed Ca^{2+} signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 2602–2607.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72, 971–983.

Tunez, I., Feijoo, M., Collado, J. A., Medina, F. J., Pena, J., Munoz, M. del C., Jimena, I., Franco, F., Rueda, I., Muntane, J., Montilla, P. (2007). Effect of testosterone on oxidative stress and cell damage induced by 3-nitropropionic acid in striatum of ovariectomized rats. *Life Sciences*, 80, 1221–1227.

Tunez, I., Tasset, I., Perez-De La Cruz, V., Santamaria, A. (2010) 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules*, 15, 878–916.

Wie, M., Won, M., Lee, K., Shin, J., Lee, J., Suh, H., Song, D., Kim, Y. (1997). Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neuroscience Letters*, 225, 93–96.

Won, M. H., Lee, J. C., Kim, Y. H., Song, D. K., Suh, H. W., Oh, Y. S., Kim, J. H., Shin, T. K., Lee, Y. J. Wie, M. B. (1998). Postischemic hypothermia induced by eugenol protects hippocampal neurons from global ischemia in gerbils. *Neuroscience Letters*, 254, 101–104.

Zeron, M. M., Fernandes, H. B., Krebs, C., Shehadeh, J., Wellington, C., Leavitt, B. R., Baimbridge, K. G., Hayden, M. R., Raymond, L. A. (2004). Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 25, 469–479.

Zeron, M. M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C. L., Leavitt, B. R., Brundin, P., Hayden, M. R., Raymond, L. A. (2002). Increased sensitivity to N-methyl-d-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*, 33, 849–860.

Zeron, M. M., Chen, N., Moshaver, A., Lee, A. T., Wellington, C. L., Hayden, M. R., Raymond, L. A. (2001). Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Molecular and cellular neurosciences*, 17, 41–53.

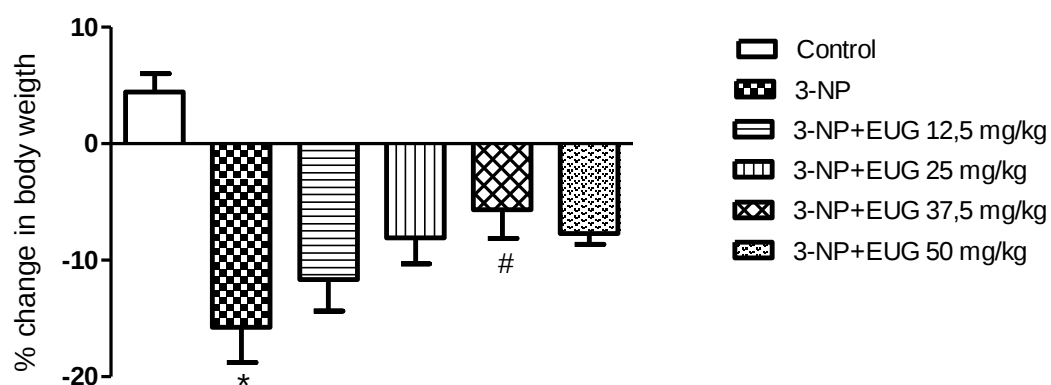


Fig.1. Effect of Eugenol (12.5; 25; 37.5; 50 mg/kg, p.o.) on body weight in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg, i.p.). Each value represents the mean±S.E.M. * $p<0.05$ as compared to vehicle treated control group; # $p<0.05$ as compared to 3-nitropropionic acid treated group (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

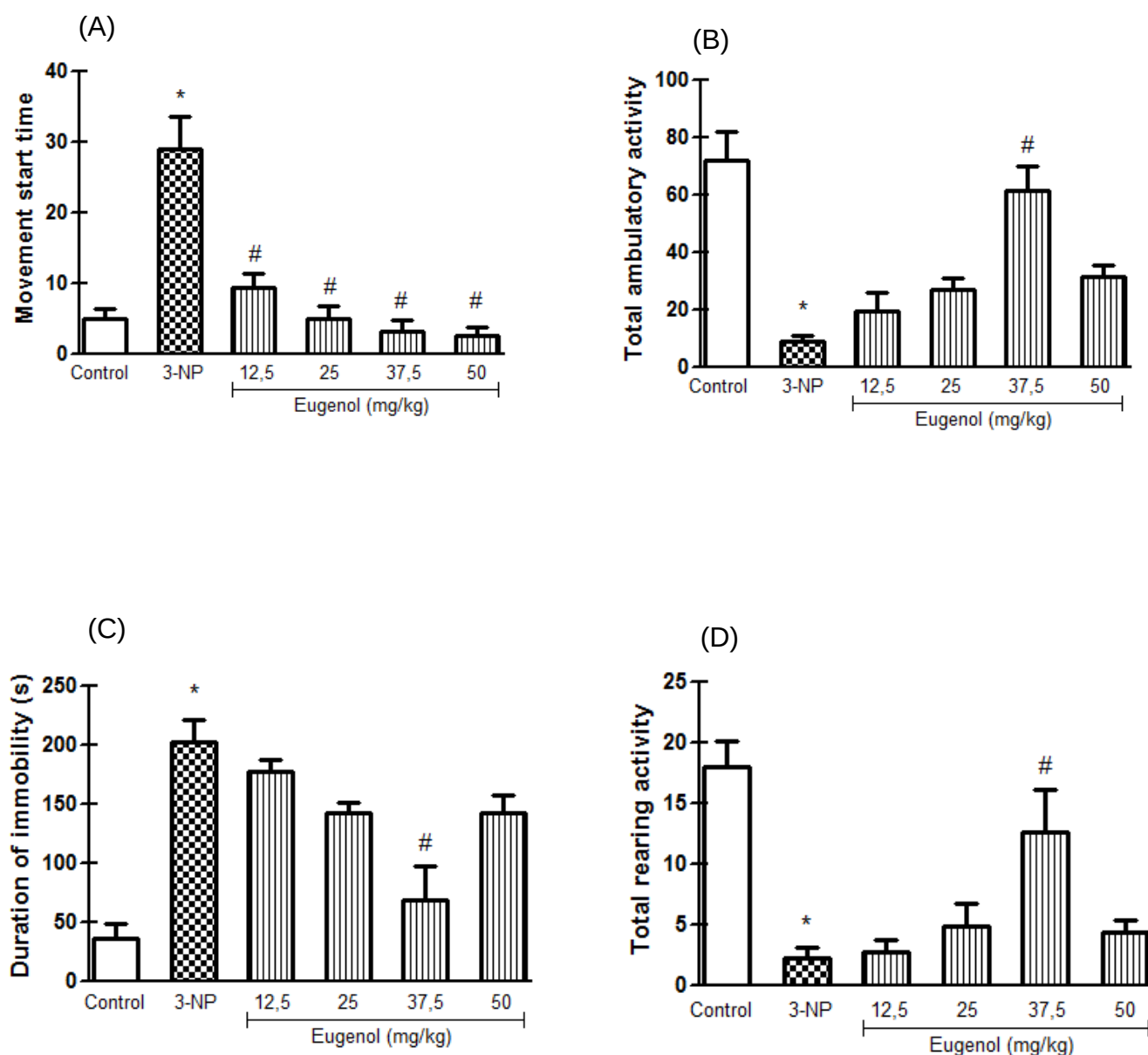


Fig. 2. Effect of Eugenol (12.5; 25; 37.5; 50 mg/kg, p.o.) on locomotor activity in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg, i.p.) as assessed by open field. Latency (A), Frequencies of locomotion (B), time of resting (C) and Rearing (D). Each value represents the mean ± S.E.M. *p < 0.05 as compared to vehicle treated control group; #p < 0.05 as compared to 3-nitropropionic acid treated group (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

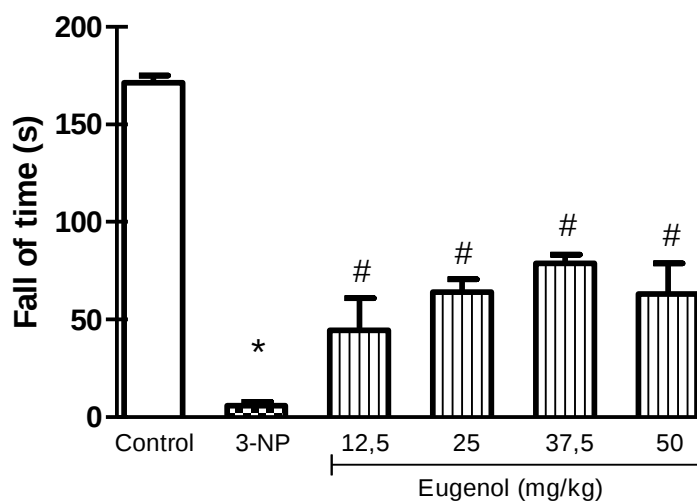


Fig. 3. Effect of Eugenol (12.5; 25; 37.5; 50 mg/kg, p.o.) on fall off time in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg, i.p.) on Rotarod performance. Each value represents the mean±S.E.M. * $p < 0.05$ as compared to vehicle treated control group; # $p < 0.05$ as compared to 3-nitropropionic acid treated group (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

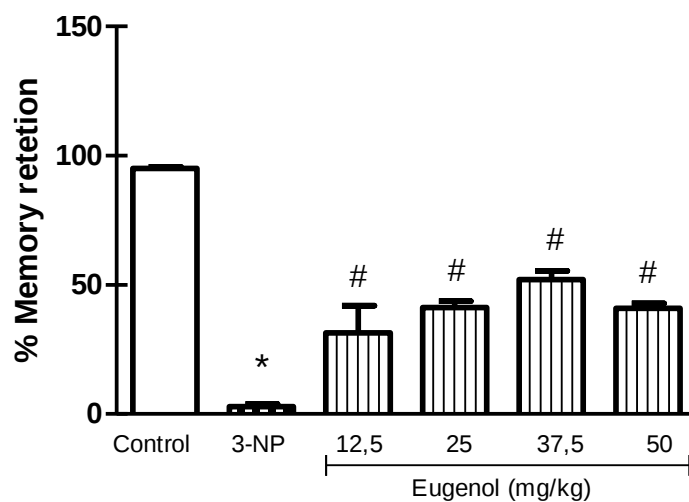


Fig. 4. Effect of Eugenol (12.5; 25; 37.5; 50 mg/kg, p.o.) on memory performance (% retention) in elevated plus maze task in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg, i.p.). Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. * p <0.05 as compared to vehicle treated control group; # p <0.05 as compared to 3-nitropropionic acid treated group (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

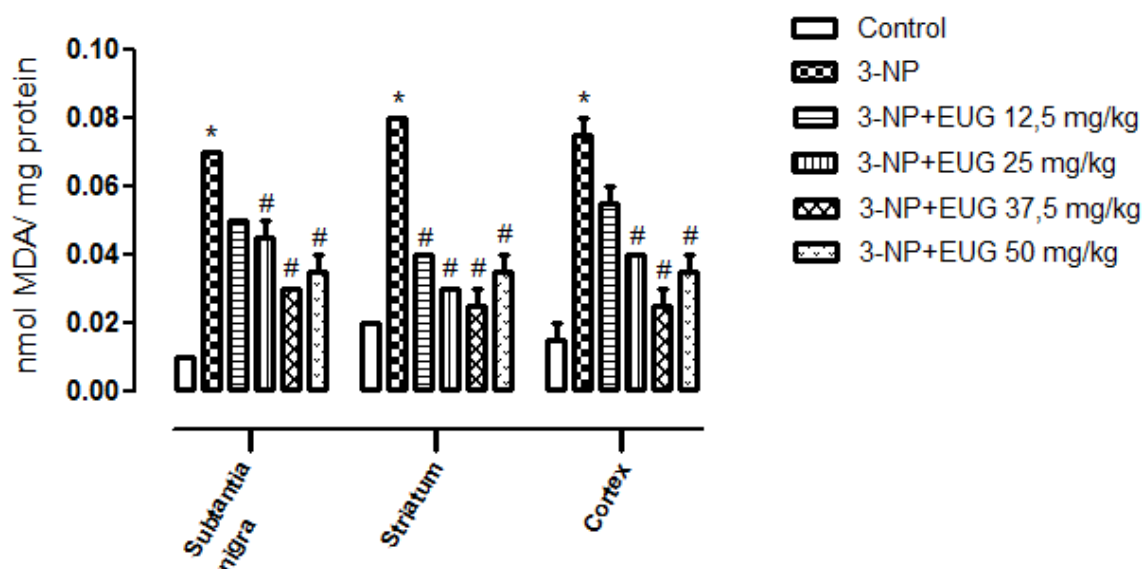


Fig. 5. Effect of Eugenol (12.5; 25; 37.5; 50 mg/kg, p.o.) on lipid peroxidation in the substantia nigra, striatum and cortex in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg, i.p.). Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ as compared to vehicle treated control group; # $p < 0.05$ as compared to 3-nitropropionic acid treated group (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

5. Conclusão

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- O eugenol apresentou atividade antioxidante *in vitro* no teste de captura do radical DPPH[•], demonstrando sua capacidade em combater os radicais livres provavelmente por ser um composto fenólico como descrito por vários autores.
- Os animais que receberam apenas o ácido 3-nitropropiónico (20 mg/kg, i.p.), durante sete dias, apresentaram significativa perda de peso, prejuízo motor e cognitivo, além de aumento da peroxidação lipídica.
- O tratamento diário com eugenol (v.o.), durante os sete dias em que foi administrado também o 3-NP, atenuou as alterações comportamentais induzidas por essa neurotoxina. Também foi observado uma melhora na peroxidação lipídica.
- A partir destes resultados, o eugenol surge como um agente neuroprotetor, existindo, assim, a perspectiva de uso no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Huntington.

Referências

REFERÊNCIAS

ADAM, O. R.; Jankovic, J. Symptomatic treatment of Huntington disease. *Neurotherapeutics*, v. 5, p. 181–197, 2008.

ALEXANDER, G. E. Basal ganglia-thalamocortical circuits: their role in control of movements. *Journal Clinical Neurophysiology*, v. 11, p. 420-431, 1994.

ALMEIDA, M. A. Efeitos do eugenol sobre o músculo liso traqueal de cobaio.. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 2004.

AL MUTAIRY, A.; AL KADASA, S.; ELFAKI, I.; ARSHADUDDIN, M.; MALIK, D.; AL MOUTAERY, K.; TARIQ, M. Trolox ameliorates 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neurotoxicology Teratology*, v. 32(2), p. 226-233, 2010.

ANDREW, S. E.; GOLDBERG, Y. P.; KREMER, B.; TELENUS, H.; THEILMANN, J.; ADAM, S.; STARR, E.; SQUITIERI, F.; LIN, B.; KALCHMAN, M. A. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genetics*, v. 4, p. 398–403, 1993.

ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. *Toxicology In Vitro*, v. 19, p. 1025-1033, 2005.

AYALA-PENÑA, S. Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 62, p. 102–110, 2013.

AZAMBUJA, M. J. Contribuição ao estudo da linguagem em indivíduos com Doença de Huntington. Dissertação – Fisiopatologia Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

BACSI, A.; WOODBERRY, M.; WIDGER, W.; PAPAConstantinou, J.; MITRA, S.; PETERSON, J. W.; BOLDOGH, I. Localization of superoxide anion production to mitochondrial electron transport chain in 3-NPA-treated cells. *Mitochondrion*, v. 6(5), p. 235-244, 2006.

BANO, D.; ZANETTI, F.; MENDE, Y; NICOTERA, P. Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell Death and Disease*, v. 2, p.1-7, 2011.

BATES, G. P. History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. *Nature Reviews Genetics*, v. 6(10), p. 766-773, 2005.

BEAL, M. F.; BROUILLET, E.; JENKINS, B. G.; FERRANTE, R. J.; KOWALL, N. W.; MILLER, J. M.; STOREY, E.; SRIVASTAVA, R.; ROSEN, B. R.; HYMAN, B. T. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Journal Neuroscience*, v. 13, p. 4181-4192, 1993.

BERARDELLI, A.; NOTH, J.; THOMPSON, P. D.; BOLLEN, E. L.; CURRA, A.; DEUSCHL, G.; VAN DIJK, J. G.; TOPPER, R.; SCHWARZ, M.; ROOS, R. A. Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 14(3), p. 398-403, 1999.

BHATEJA, D. K.; DHULL, D. K.; GILL, A.; SIDHU, A.; SHARMA, S.; REDDY, B. V.; PADI, S. S. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation attenuates 3-nitropropionic acid induced behavioral and biochemical alterations in rats: possible neuroprotective mechanisms. *European journal of pharmacology*, v. 674(1), p. 33-43, 2012.

BHATIA, K. P., MARSDEN, C. D. The behavioral and motor consequences of focal lesions of the basal ganglia in man. *Brain*, v. 117, p. 859-876, 1994.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 12, p. 123-130, 1999.

BILNEY, B.; MORRIS, M. E.; PERRY, A. Effectiveness of physiotherapy, occupational therapy, and speech pathology for people with Huntington's disease: a systematic review. *Neurorehabilitation & Neural Repair*, v. 17, p. 12-24, 2003.

BIZAT, N.; HERMEL, J. M.; HUMBERT, S.; JACQUARD, C.; CREMINON, C.; ESCARTIN, C.; SAUDOU, F.; KRAJEWSKI, S.; HANTRAYE, P.; BROUILLET, E. In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *The Journal of biological chemistry*, v. 278(44), p. 43245-43253, 2003.

BONASTRE, J. F. Dela combinaison des huiles volatiles de girofle...avec les alcalis et autres basis salifiables, *Jornal De Pharmacie*, v.13, p. 464-513, 1967.

BONELLI, R. M.; HOFMANN, P. A systematic review of the treatment studies in Huntington's disease since 1990. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, v. 8(2), p. 141-153, 2007.

BORLONGAN, C. V.; KOUTOUZIS, T. K.; FREEMAN, T. B.; HAUSER, R. A.; CAHILL, D. W.; SANBERG, P. R. Hyperactivity and hypoactivity in a rat model of Huntington's disease: the systemic 3-nitropropionic acid model. *Brain research. Brain research protocols*, v. 1(3), p. 253-257, 1997.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochemisry*, v. 132, p. 707–716, 1979.

BRENNAN, W. A.; BIRD, E. D.; APRILLE, J. R. Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *Journal of Neurochemistry*, v. 44, p. 1948–1950, 1985.

BRINKMAN, R. R.; MEZEI, M. M.; THEILMANN, J.; ALMQVIST, E.; HAYDEN, M. R. The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. *American Journal of Human Genetics*, v. 60, p. 1202–1210, 1997.

BROUILLET, E.; GUYOT, M. C.; MITTOUX, V.; ALTAIRAC, S.; CONDE, F.; PALFI, S.; HANTRAYE, P. Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *Journal of Neurochemistry*, v. 70, p. 794-805, 1998.

BROUILLET, E.; CONDE, F.; BEAL, M. F.; HANTRAYE, P. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in neurobiology*, v. 59(5), p. 427-468, 1999.

BROWNE, S. E.; FERRANTE, R. J.; BEAL, M. F. Oxidative stress in Huntington's disease, *Brain pathology*, v. 9, p. 147–163, 1999.

BROWNE, S. E.; BOWLING, A. C.; MACGARVEY, U.; BAIK, M. J.; BERGER, S.C.; MUQIT, M. M.; BIRD, E. D.; BEAL, M. F. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease:selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of neurology*, v. 41, p. 646–653, 1997.

BROWNE, S. E.; BEAL, M. F.; Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis, *Antioxidants & redox signaling*, v. 8, p. 2061–2073, 2006.

BRUYN, G. W. Huntington's chorea: historical, clinical and laboratory synopsis. In: Vinken, P. J.; Bruyn, G. W. Extrapyrarnidal disorders. *Handbook of Clinical Neurology*, v. 49, p. 298-378, 1968.

BUTTERWORTH, J.; YATES, C.; REYNOLDS, G. Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase, and a-glutamyl transpeptidase in postmortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *Journal of the neurological sciences*, v. 67, p. 1352–1360, 1985.

CAMARGOS, M. C. S.; ALVES, L. C. Implicações do envelhecimento populacional no sistema de saúde: uma análise da demanda e dos custos com internação hospitalar no SUS no estado de Minas Gerais em 1998. *XIV Encontro Nacional de Estudos Populacionais, ABEP*, 2004.

CARDOSO, F. Huntington Disease and Other Chorea. *Neurology Clinical*, v. 27 p. 719–736, 2009.

CIARMIELLO, A.; CANNELLA, M.; LASTORIA, S.; SIMONELLI, M.; FRATI, L.; RUBINSZTEIN, D.; SQUITIERI, F. Brain white-matter volume loss and glucose hypometabolism precede the clinical symptoms of Huntington's disease. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 47, p. 215–222, 2006.

COLES, C. J.; EDMONDSON, D. E.; SINGER, T. P. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3 nitropropionate. *The Journal of biological chemistry*, v. 254, p. 5161-5167, 1979.

COYLE, J. T.; SCHWARCZ, R. Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, v. 263(5574), p. 244-246, 1976.

DAJAS, F.; RIVERA-MEGRET, F.; BLASINA, F.; ARREDONDO, F.; ABINCARRIQUIRY, J. A. COSTA, G.; ECHEVERRY, C.; LAFON, L.; HEIZEN, H.; FERREIRA, M.; MORQUIO, A. Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 1613-1620, 2003.

DAMIANO, M.; GALVAN, L.; DÉGLON, N.; BROUILLET, E. Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1802, p. 52-61, 2010.

DEVI, K. P.; ARIF NISHA, S.; SAKTHIVEL, R.; PADIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 130, p. 107–115, 2010.

DIFIGLIA, M.; SAPP, E.; CHASE, K. O.; DAVIES, S. W.; BATES, G. P.; VONSATTEL, J.P.; ARONIN, N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, v. 277(5334), p. 1990-1993, 1997.

DIFLIGIA, M.; SAPP, E.; CHASE, K.; SCHWARZ, C.; MELONI, A.; YOUNG, C. et al. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron*, v. 14, p. 1075-1081, 1995.

DI STASI, C. L. D. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo, p. 109-126, 1996.

DJOUSSE, L.; KNOWLTON, B.; CUPPLES, L. A.; MARDER, K.; SHOULSON, I.; MYERS, R. H. Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology*, v. 59, p. 1325-1330, 2002.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: Propriedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubana de Estomatología*, v. 39, 2002.

FALK, M.; VOJTÍSKOVÁ, M.; LUKÁS, Z.; KROUPOVÁ, I.; FROSTER, U. Simple procedure for automatic detection of unstable alleles in the myotonic dystrophy and Huntington's disease loci. *Genetic testing*, v. 10(2), p. 85-97, 2006.

FASANO, A.; CADEDDU, F.; GUIDUBALDI, A.; PIANO, C.; SOLETI, F.; ZINZI, P.; BENTIVOGLIO, A. R. The long-term effect of tetrabenazine in the management of Huntington disease. *Clinical neuropharmacology*, v. 31(6), p. 313-318, 2008.

FEIGIN, A.; LEENDERS, K.; MOELLER, J.; MISSIMER, J.; KUENIG, G.; SPETSIERIS, P.; ANTONINI, A.; EIDELBERG, D. Metabolic network abnormalities in early Huntington's disease: an [^{18}F]FDG PET study. *The Journal of. Nuclear Medicine*, v. 42, p. 1591–1595, 2001.

FENG, J.; LIPTON, J. M. Eugenol: antipyretic activity in rabbits. *Neuropharmacology*, v. 26 (12), p.1775-1778, 1987.

FERNANDES, H. B.; BAIMBRIDGE, K. G.; CHURCH, J.; HAYDEN, M. R.; RAYMOND, L. A. Mitochondrial Sensitivity and Altered Calcium Handling Underlie Enhanced NMDA-Induced Apoptosis in YAC128 Model of Huntington's Disease. *The Journal of Neuroscience*, v. 27(50), p. 13614–13623, 2007.

FERRANTE, R. J. Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1792, p. 506-520, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, p. 61-68, 1997.

FOLSTEIN, S.; ABBOTT, M. H.; CHASE, G. A.; JENSEN, B. A.; FOLSTEIN, M. F. The association of affective disorder with Huntington's disease in a case series and in families. *Psychological Medicine*, v. 13(3), p. 537-542, 1983.

FONTAINE, M. A.; GEDDES, J. W.; BANKS, A.; BUTTERFIELD, D. A.; Effect of exogenous and endogenous antioxidants on 3-nitrotyrosine acid-induced in vivo oxidative stress and striatal lesions: insights into Huntington's disease. *Journal Neurochemistry*, v. 75, p. 1709–1715, 2000.

FOLSTEIN, S. E.; LEIGH, R. J.; PARHAD, I. M.; FOLSTEIN, M. F. The diagnosis of Huntington's disease. *Neurology*, v. 36, p. 1279-1283, 1986.

FRANK, S. Tetrabenazine as anti-chorea therapy in Huntington disease: an open-label continuation study. Huntington Study Group/TETRA-HD Investigators. *BMC Neurology*, v. 9(62), 2009.

FRANK, S. Tetrabenazine: the first approved drug for the treatment of chorea in US patients with Huntington disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*, v. 6, p. 57-65, 2010.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*, v. 177, p. 39-54, 2002.

GAFNI, J.; ELLERBY, L. M. Calpain activation in Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience*, v. 22(12), p. 4842-4849, 2002.

GARCIA RUIZ, P. J.; GOMEZ TORTOSA, E.; SANCHEZ BERNADOS, V.; ROJO, A.; FONTAN, A.; GARCIA DE YEBENES, J. Bradykinesia in Huntington's disease. *Clinical Neuropharmacology*, v. 23(1), p. 50-52, 2000.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, v. 40, p. 959-975, 2001.

GIL-MOHAPEL, J. M.; REGO, A. C. Huntington's Disease: A Review on the Physiopathological Aspects. *Rev Neurocienc*, p. 1-11, 2011.

GIL, J. M.; REGO, A. C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, v. 27, p. 2803–2820, 2008.

GOULD, D. H.; GUSTINE, D. L. Basal ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropanoic acid. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 8(5), p. 377-393, 1982.

GOULD, D. H.; WILSON, M. P.; HAMAR, D. W. Brain enzyme and clinical alterations induced in rats and mice by nitroaliphatic toxicants. *Toxicology letters*, v. 27(1-3), p. 83-89, 1985.

GRAYBIEL, A. M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in neurosciences*, v. 13(7), p. 244-254, 1990.

GU, M.; GASH, M. T.; MANN, V. M.; JAVOY-AGID, F.; COOPER, J. M.; SCHAPIRA, A. H. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Annals of neurology*, v. 39, p. 385-389, 1996.

GUENETTE, S. A.; BEAUDRY, F.; MARIER, J. F.; VACHON, P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, v. 29, p. 265–270, 2006.

GÜLÇİN, I. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. *Journal of Medicinal Food*, v. 14 (9), p. 975–985, 2011.

GURNEY, B. F. Eugenol: utility versus toxicity. *Oral Hygiene*, v. 55, n. 2, p. 74–82, 1965.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of epidemiology*, v. 15, p. 686-699, 2005.

HADDAD, M. S. Doença de Huntington: aspectos clínicos em 81pacientes. Dissertação. São Paulo: Faculdade de Medicina de São Paulo; 1995.

HADDAD, M. S.; CUMMINGS, J. L. Huntington's Disease. *The Psychiatric clinics of North America*, v. 20(4), p. 791-807, 1997.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, v. 18, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, v. 97, p. 1634-1658, 2006.

HARJES, P.; WANKER, E. E. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 28(8), p. 425-433, 2003.

HASSEL, B.; SONNEWALD, U. Selective inhibition of the tricarboxylic acid cycle of GABAergic neurons with 3-nitropropionic acid in vivo. *Journal of neurochemistry*, v. 65(3), p. 1184-1191, 1995.

HAYDEN, M. R. Huntington' chorea. Berlin: Springer-Verlag, 1981.

HAYDEN, M. R. Reflections on the history of Huntington's Chorea. *Amsterdam: Sctence Publishers B.V.*, 1983.

HE, F.; ZHANG, S.; QIAN, F.; ZHANG, C. Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid). *Neurology*, v. 45(12), p. 2178-2183, 1995.

HERSCH, S. M.; ROSAS, H. D. Neuroprotection for Huntington's disease: ready, set, slow. *Neurotherapeutics*, v. 5, p. 226-36, 2008.

HERSCH, S. M.; GEVORKIAN, S.; MARDER, K.; MOSKOWITZ, C.; FEIGIN, A.; COX, M.; COMO, P.; ZIMMERMAN, C.; LIN, M.; ZHANG, L.; ULUG, A. M.; BEAL, M. F.; MATSON, W.; BOGDANOV, M.; EBBEL, E.; ZAleta, A.; KANEKO, Y.; JENKINS, B.; HEVELONE, N.; ZHANG, H.; YU, H.; SCHOENFELD, D.; FERRANTE, R.; ROSAS, H. D. Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH2'dG. *Neurology*, v. 66(2), p. 250-252, 2006.

HO, L. W.; CARMICHAEL, J.; SWARTZ, J.; WYTTEBACH, A.; RANKIN, J.; RUBINSZTEIN, D. C. The molecular biology of Huntington's disease. *Psychological Medicine*, v. 31(1), p. 3-14, 2001.

HOFFNER, G.; KAHLEM, P.; DJIAN, P. Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. *Journal of Cell Science*, v. 115(Pt 5), p. 941-948, 2002.

HUME, W. R. Effect of eugenol on constrictor responses in blood vessels of the rabbit ear. *Journal of dental research*, v. 62(9), p. 1013-1015, 1983.

HUME, W. R. In vitro studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc-oxide eugenol. *International Endodontic Journal*, v. 21(1), p. 130-134, 1988.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of Flavonoids. *Phytochemistry*, v. 26, p. 2489-2491, 1987.

ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43, p. 461-466, 2005.

JANKOVIC, J. Treatment of hyperkinetic movement disorders. *The Lancet Neurology*, v. 8, p. 844-856, 2009.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; SCHMIDT, E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 54, p. 6303-6307, 2006.

JOHRI, A.; BEAL, M. F. Antioxidants in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1822, p. 664-674, 2012.

JUMMANI, R.; OKUN, M. Sydenham chorea. *Archives of Neurology*, v. 58(2), p. 311-313, 2001.

KABUTO, H.; TADA, M.; KOHNO, M. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, p. 423–427, 2007.

KAPLAN, A.; STOCKWELL, B. R. Therapeutic approaches to preventing cell death in Huntington disease. *Progress in Neurobiology*, v. 99, p. 262–280, 2012.

KASSUBEK, J.; GAUS, W.; LANDWEHRMEYER, G. B. Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology*, v. 62(3), p. 523-524; 2004.

KENNEY, C.; HUNTER, C.; JANKOVIC, J. Long-term tolerability of tetrabenazine in the treatment of hyperkinetic movement disorders. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 22(2), p 193-197, 2007.

KLEPAC, N.; RELJA, M.; KLEPAC, R.; HECIMOVIC, S.; BABIC, T.; TRKULJA, V. Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects: a cross-sectional study. *Journal of neurology*, v. 254, p. 1676–1683, 2007.

KIM, Y. J.; YI, Y.; SAPP, E.; WANG, Y.; CUIFFO, B.; KEGEL, K. B.; QIN, Z. H.; ARONIN, N.; DIFIGLIA, M. Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98(22), p. 12784-12789, 2001.

KOROSHETZ, W. J.; JENKINS, B. G.; ROSEN, B. R.; BEAL, M. F. Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. *Annals of neurology*, v. 41, p. 160–165, 1997.

KREMER, B.; GOLDBERG, P; ANDREW, S.E.; THEILMANN, J.; TELENIOUS, H.; ZEISLER, J. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *The New England Journal of Medicine*, v. 330, p. 1401–1406, 1994.

KROBITSCH, S.; KAZANTSEV, A. G. Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 43, p. 20–24, 2011.

KUMAR, P.; KALONIA, H.; KUMAR, A. Possible GABAergic mechanism in the neuroprotective effect of gabapentin and lamotrigine against 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. *European Journal Pharmacology*, v. 674, p. 265-274, 2012.

LACCONE, F.; ENGEL, U.; HOLINSKI-FEDER, E.; WEIGELL-WEBER, M.; MARCZINEK, K.; NOLTE, D.; MORRIS-ROSENDAHL, D. J.; ZÜHLKE, C.; FUCHS, K.; WEIRICH-SCHWAIGER, H.; SCHLÜTER, G.; VON BEUST, G.; VIEIRA-SAECKER, A. M.; WEBER, B. H.; RIESS, O. DNA analysis of Huntington's disease: five years experience in Germany, Australia, and Switzerland. *Neurology*, v. 53, p. 801–806, 1999.

LAFON-CAZAL, M.; PIETRI, S.; CULCASI, M.; BOCKAERT, J. NMDA dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, v. 364, p. 535–537, 1993.

LANDLES, C.; BATES, G. P. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Reports*, v. 5(10), p. 958-963, 2004.

LEE, W. T.; ITOH, T.; PLEASURE, D. Acute and chronic alterations in calcium homeostasis in 3-nitropropionic acid-treated human NT2-N neurons. *Neuroscience*, v. 113(3), p. 699-708, 2002.

LI, S. H.; LI, X. J. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends in genetics*, v. 20(3), p. 146-154, 2004.

LIMA-COSTA, M. F.; VERAS, R. Saúde pública e envelhecimento. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, p. 700-701, 2003.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, v. 443, p. 787–795, 2006.

LIOT, G.; BOSSY, B.; LUBITZ, S.; KUSHNAREVA, Y.; SEJBUK, N.; BOSSY-WETZEL, E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ*, v. 16(6), p. 899-909, 2009.

LUDOLPH, A. C.; HE, F.; SPENCER, P. S; HAMMERSTAD, J.; SABRI, M. *The Canadian journal of neurological sciences*, v. 18(4), p. 492-498, 1991.

LUND, J. C. *Chorea Sancti Vidi i Saeterdalen uddrag af distriktslaege for 1860 Nor. Off Sat. C*, 4, 137-138, Aaret 1862.

LYON, J. W. *Am. Med. Times* 7, p. 289-290, 1863.

MACIEL, E. N.; KOWALTOWSKI, A. J.; SCHWALM, F. D.; RODRIGUES, J. M.; SOUZA, D. O.; VERCESI, A. E; WAJNER, M.; CASTILHO, R. F. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca^{2+} and respiratory chain complex II inhibition. *Journal of neurochemistry*, v. 90(5), p. 1025-1035, 2004.

MANDAVILLI, B. S.; BOLDOGH, I.; VAN HOUTEN, B. 3-nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by Bcl-2 overexpression in PC12 cells. *Brain research. Molecular brain research*, v. 133(2), p. 215-223, 2005.

MANDEL, S.; YODIM, M. B. H. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 37, n. 3, p. 304-317, 2004.

MANGIARINI, L.; SATHASIVAM, K.; SELLER, M.; COZENS, B.; HARPER, A.; HETHERINGTON, C.; LAWTON, M.; TROTTIER, Y.; LEHRACH, H.; DAVIES, S. W.; BATES, G. P. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, v. 87(3), p. 493-506, 1996.

MARGOLIS, R. L.; ROSS, C. A. Expansion explosion: new clues to the pathogenesis of repeat expansion neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine*, v. 7, p. 479-482, 2001.

MARKOWITZ, K.; MOYNIHAN, M.; LIU, M.; KIM, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, v. 73(6), p. 729-37, 1992.

MARSH, J. L.; PALLOS, J.; THOMPSON, L. M. Fly models of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, v. 12 (2), p. 187-193, 2003.

MATTSON, M. P. Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. *Antioxidants & redox signaling*, v. 8, p. 1997–2006, 2006.

MIELCAREK, M.; BENN, C. L.; FRANKLIN, S. A.; SMITH, D. L.; WOODMAN, B.; MARKS, P. A.; BATES, G. P. SAHA decreases HDAC 2 and 4 levels in vivo and improves molecular phenotypes in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*, v. 6, e27746, 2011.

MIRANDOLA, S. R.; MELO, D. R.; SAITO, A.; CASTILHO, R. F. 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *Journal of Neuroscience Research*, v. 88(3), p. 630-639, 2010.

MITCHELL, I. J.; COOPER, A. J.; GRIFFITHS, M. R. The selective vulnerability of striatopallidal neurons. *Progress in Neurobiology*, v. 59(6), p. 691-719, 1999.

MOLNAR, E. J. Residual eugenol from zinc oxide-eugenol compounds. *Journal of Dental Research*, v. 46 (4), p. 645-649, 1967.

MONCADA, S.; BOLANOSM, J. P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *Journal of neurochemistry*, v. 97(6), p. 1676-1689, 2006.

MONTILLA, P.; ESPEJO, I.; MUNOZ, M. C.; BUJALANCE, I.; MUNOZ-CASTANEDA, J. R.; TUNEZ, I. Effect of red wine on oxidative stress and hypercholesterolemia induced by feeding a high-cholesterol diet in rat. *Journal of physiology and biochemistry*, v. 60(4), p. 259-64, 2004.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JUNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S. RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. *Química Nova*, v. 29 (5), p.907-910, 2006.

MOUMNE, L.; CAMPBELL, K; HOWLAND, D.; OUYANG, Y.; BATES, G. P. Genetic knockdown of Hdac3 does not modify disease-related phenotypes in a mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*, v. 7, e31080, 2012.

NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. *Free Radical Research*, v. 20, p. 235–266, 1994.

NOVAK, M. J. U.; TABRIZI, S. J. Huntington's disease. *BMJ*, v. 341, p. 34-40, 2010.

OBESO, J. A.; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M.; ARBIZU, J.; GIMÉNEZ-AMAYA, J. M. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News in physiological sciences*, v. 17, p. 51-55, 2002.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; RODRIGUEZ, M.; DELONG, M. R.; OLANOW, C. W. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: problems with the current model. *Annals of Neurology*, v. 47(suppl 1), p. S22-S34, 2000.

OGATA, M.; HOSHI, M.; URANO, S.; ENDO, T. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 48, p. 1467–1469. 2000.

OLIVEIRA, J. M. Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: focusing on huntingtin and the striatum. *Journal of Neurochemistry*, v.114 p. 1–12, 2010.

PALFI, S.; FERRANTE, R. J.; BROUILLET, E.; BEAL M. F.; DOLAN, R.; GUYOT, M. C.; PESCHANSKI, M.; HANTRAYE, P. Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *Journal Neuroscience*, v. 16, p. 3019–3025, 1996.

PARK, R. H. R; PARK, M. P. Saint Vitus' dance: vital misconceptions by Sydenham and Bruegel *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 83(8), p. 512-515, 1990.

PARKER, J. A.; CONNOLLY, J. B.; WELLINGTON, C.; HAYDEN, M.; DAUSSET, J.; NERI, C. Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98(23), p. 13318-13323, 2001.

PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 109, p. 59-63, 2002.

PEYSER, C. E.; FOLSTEIN, M.; CHASE, G. A.; STARKSTEIN, S.; BRANDT, J.; COCKRELL, J. R.; BYLSMA, F.; COYLE, J. T.; MCHUGH, P. R.; FOLSTEIN, S. E. Trial of d-alpha-tocopherol in Huntington's disease. *The American journal of psychiatry*, v. 152(12), p. 1771-1775, 1995.

PHILLIPS, W.; SHANNON, K. M.; BARKER, R. A. The current clinical management of Huntington's disease. *Movement Disorders*, v. 23, p. 1491–1504, 2008.

PINEDA, J. R.; CANALS, J. M.; BOSCH, M.; ADELL, A.; MENGOD, G.; ARTIGAS, F.; ERNFORS, P.; ALBERCH, J. Brain-derived neurotrophic factor modulates dopaminergic deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, v.93, p. 1057–1068, 2005.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzgium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, p. 1454–1462, 2009.

POON, L. H.; KANG, G. A.; LEE, A. J. Role of Tetrabenazine for Huntington's Disease–Associated Chorea. *The Annals of Pharmacotherapy*, v. 44, p. 1080-1089, 2010.

QUINTI, L.; CHOPRA, V.; ROTILI, D.; VALENTE, S.; AMORE, A.; FRANCI, G.; MEADE, S.; VALENZA, M.; ALTUCCI, L.; MAXWELL, M. M.; CATTANEO, E.; HERSCH, S.; MAI, A.; KAZANTSEV, A. Evaluation of histone deacetylases as drug targets in Huntington's disease models. Study of HDACs in brain tissues from R6/2 and CAG140 knock-in HD mouse models and human patients and in a neuronal HD cell model. *PLoS Currents*, v. 2, 2010.

RANEN, N. G.; STINE, O. C.; ABBOTT, M.H.; SHERR, M.; CODORI, A. M.; FRANZ, M. L.; CHAO, N. I.; CHUNG, A. S.; PLEASANT, N.; CALLAHAN, C. Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *American Journal of Human Genetics*, v. 57, p. 593–602, 1995.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603–613, 2001.

REDDY, A. C.; LOKESH, B. R. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan induced inflammation in rats. *Annals of nutrition & metabolism* v. 38, 349–358. 1994.

REINER, A.; ALBIN, R. L.; ANDERSON, K. D.; D'AMATO, C. J.; PENNEY, J. B.; YOUNG, A. B. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 85(15), p. 5733-5737, 1988.

RODRIGUES, T. G.; FERNANDES JUNIOR, A.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. In vitro and in vivo effects of clove on pro-inflammatory cytokines production by macrophages. *Natural product research*, v. 23, p. 319-326, 2009.

ROMPELBERG, C. J.; PLOEMEN, J. H.; JESPERSE, S.; VAN DER GREEF, J.; VERHAGEN, H.; VAN BLADEREN, P. J. Inhibition of rat, mouse and human glutathione S-transferase by eugenol and its oxidation products. *Chemico-biological interactions*, v. 5, 99(1-3), p. 85-97, 1996.

ROSENSTOCK, T. R.; CARVALHO, A. C. P.; JURKIEWICZ, A.; FRUSSA-FILHO, R.; SMAILI, S. S. Mitochondrial calcium, oxidative stress, and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *Journal of Neurochemistry*, v. 88, p. 1220-1228, 2004.

ROSENSTOCK, T. R.; ABÍLIO, V. C.; FRUSSA-FILHO, R.; KIYOMOTO, B. H.; SMAILI, S. S. Old mice present increased levels of succinate dehydrogenase activity and lower vulnerability to dyskinetic effects of 3-nitropropionic acid. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 91, p. 327-332, 2009.

ROSS, C. A.; MARGOLIS, R. L.; ROSENBLATT, A.; RANEN, N. G.; BECHER, M. W.; AYLWARD, E. Huntington disease and the related disorder, dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). *Medicine (Baltimore)*, v. 76, p. 305-338, 1997.

ROOS, R. A. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 5(1), p. 40, 2010.

ROSS, C. A.; TABRIZI, S. J. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurology*, v. 10(1), p. 83-98, 2011.

ROSSIGNOL, J.; BOYER, C.; LEVEQUE, X.; FINK, K. D.; THINARD, R.; BLANCHARD, F.; DUNBAR, G. L.; LESCAUDRON, L. Mesenchymal stem cell transplantation and DMEM administration in a 3NP rat model of Huntington's disease: morphological and behavioral outcomes. *Behavioral Brain Research*, v. 217, p. 369-378, 2011.

ROZE, E.; SAUDOU, F.; CABOCHE, J. Pathophysiology of Huntington's disease: from huntingtin functions to potential treatments. *Current Opinion in Neurology*, v. 21, p. 497-503, 2008.

RUBINSZTEIN, D. C.; BARTON, D. E.; DAVISON, B. C.; FERGUSON-SMITH, M. A. Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number. *Human Molecular Genetics*, v. 2, p. 1713–1715, 1993.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M. F.; GRACE, S. C.; YAMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, v. 177, p. 67-80, 2002.

SANDHIR, R.; MEHROTRA, A.; KAMBOJ, S. S. Lycopene prevents 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial oxidative stress and dysfunctions in nervous system. *Neurochemistry international*, v. 57(5), p. 579-587, 2010.

SANTAMARIA, A.; PEREZ-SEVERIANO, F.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, E.; MALDONADO, P. D.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; RIOS, C.; SEGOVIA, J. Comparative analysis of superoxide dismutase activity between acute pharmacological models and a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurochemical research*, v. 26(4), p. 419-424, 2001.

SHEHADEH, J.; FERNANDES, H. B.; ZERON MULLINS, M. M.; GRAHAM, R. K.; LEAVITT, B. R.; HAYDEN, M. R.; RAYMOND, L. A. Striatal neuronal apoptosis is preferentially enhanced by NMDA receptor activation in YAC transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiology of Disease*, v. 21, p. 392–403, 2006.

SIES, H. Strategies of antioxidant. Review. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA JÚNIOR, A. A. Plantas medicinais e aromáticas (CD-ROM). Itajaí: Epagri, 1997.

SNEDDON, I. B.; GLEW, R. C. Contact dermatitis due to propanidid in an anaesthetist. *The Practitioner*, v. 263, p. 321-323, 1973.

SNELL, R. G.; MACMILLAN, J. C.; CHEADLE, J. P.; FENTON, I.; LAZAROU, L. P.; DAVIES, P.; MACDONALD, M. E.; GUSELLA, J. F.; HARPER, P. S.; SHAW, D. J. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nature Genetics*, v. 4(4), p. 393-397, 1993.

SOROLLA, M. A.; REVERTER-BRANCHAT, G.; TAMARIT, J.; FERRER, I.; ROS, J.; CABISCOL, E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free radical biology & medicine*, v. 45, p. 667–678, 2008.

STACK, E. C.; MATSON, W. R.; FERRANTE, R. J. Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1147, p. 79–92, 2008.

STOREY, E.; BEAL, M. F. Neurochemical substrates of rigidity and chorea in Huntington's disease. *Brain*, v. 116 (Pt 5), p. 1201-1222, 1993.

SUN, B.; FAN, W.; BALCIUNAS, A.; COOPER, J. K.; BITAN, G.; STEAVENSON, S.; DENIS, P. E.; YOUNG, Y.; ADLER, B.; DAUGHERTY, L.; MANOUKIAN, R.; ELLIOTT, G.; SHEN, W.; TALVENHEIMO, J.; TELOW, D. B.; HANIU, M.; HALDANKAR, R.; WYPYCH, J.; ROSS, C. A.; CITRON, M.; RICHARDS, W. G. Polyglutamine repeat length-dependent proteolysis of huntingtin. *Neurobiology of Disease*, v. 11(1), p. 111-122, 2002.

TABRIZI, S. J.; CLEETER, M.; XUEREB, J.; TAANMAN, J. W.; COOPER, J. M.; SHAPIRA, A. H. V. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Annals of neurology*, v. 45, p. 25–32, 1999.

TABRIZI, S. J.; WORKMAN, J.; HART, P. E.; MANGIARINI, L.; MAHAL, A.; BATES, G.; COOPER, J. M.; SHAPIRA, A. H. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Annals of Neurology*, v. 47, p. 80–86, 2000.

TABRIZI, S. J.; BLAMIRE, A. M.; MANNERS, D. N.; RAJAGOPALAN, B.; STYLES, P.; SHAPIRA, A. H.; WARNER, T. T. Creatine therapy for Huntington's disease: clinical and MRS findings in a 1-year pilot study. *Neurology*, v. 61(1), p. 141-142, 2003.

TAIRA, J.; IKEMOTO, T.; YONEYA, T.; HAGI, A.; MURAKAMI, A.; MAKINO, K. Essential oil phenyl propanoids. Useful as OH scavengers? *Free Radical. Research. Commun.*, v. 16, p. 197-204, 1992.

TANG T. S.; SLOW, E.; LUPU, V.; STAVROVSKAYA, I. G.; SUGIMORI, M.; LLINAS, R.; KRISTAL, B. S.; HAYDEN, M. R.; BEZPROZVANNY, I. Disturbed Ca^{2+} signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, p. 2602–2607, 2005.

TARIQ, M.; KHAN, H. A.; ELFAKI, I.; AL DEEB, S.; AL MOUTAERY, K. Neuroprotective effect of nicotine against 3-nitropropionic acid (3-NP)-induced experimental Huntington's disease in rats. *Brain research bulletin*, v. 67(1-2), p. 161-168, 2005.

TASSET, I.; SANCHEZ, F.; TUNEZ, I. The molecular bases of Huntington's disease: the role played by oxidative stress. *Revista de neurologia*, v. 49, p. 424–429, 2009.

The American College of Medical Genetics/ American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. ACMG/ASHG statement; Laboratory guidelines for Huntington's disease genetic testing. *American Journal Human. Genetics*, v. 62, 1998.

THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, v. 72, p. 971–983, 1993.

THOMAS, E. A.; COPPOLA, G.; DESPLATS, P. A.; TANG, B.; SORAGNI, E.; BURNETT, R.; GAO, F.; FITZGERALD, K. M.; BOROK, J. F.; HERMAN, D.; GESCHWIND, D. H.; GOTTESFELD, J. M. The HDAC inhibitor 4b ameliorates the disease phenotype and transcriptional abnormalities in Huntington's disease transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, p. 15564–15569. 2008.

THOMPSON, P. D.; BERARDELLI, A.; ROTHWELL, J. C.; DAY, B. L.; DICK, J. P.; BENECKE, R.; MARSDEN, C. D. The coexistence of bradykinesia and chorea in Huntington's disease and its implications for theories of basal ganglia control of movement. *Brain*, v. 111 (Pt 2), p. 223-244, 1988.

TRABER, M. G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, Basel, v. 23, p. 135-139, 1997.

TUNEZ, I.; TASSET, I.; PEREZ-DE LA CRUZ, V.; SANTAMARIA, A. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules*, v. 15, p. 878–916, 2010.

USTA, J.; KREYDIYYEH, S.; BAJAKIAN, K.; NAKKASH-CHMAISSE, H. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. *Food and chemical toxicology*, v. 40, p.935-940, 2002.

VAN DIJK, J. G.; VAN DER VELDE, E. A.; ROOS, R. A.; BRUYN, G. W. Juvenile Huntington disease. *Human Genetics*, v. 73, p. 235-239, 1986.

VÁZQUEZ, B. I.; FENTE, C.; FRANCO, C. M.; VÁZQUEZ, M. J.; CEPEDA, A. Inibitory effects of eugenol and thymol on *penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 67, p. 175-163, 2001.

VONSATTEL, J. P.; MYERS, R. H.; STEVENS, T. J.; FERRANTE, R. J.; BIRD, E. D.; RICHARDSON, E. P. JR. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, v. 44(6), p. 559-577, 1985.

VONSATTEL, J.P.; DIFIGLIA, M. Huntington disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, v. 57(5), p. 369-84, 1998.

VONSATTEL, J. P. *Acta neuropathologica*, v. 115(1), p. 55-69, 2008.

WALKER, F. O. Huntington's disease. *Lancet*, v. 369, p. 218–228, 2007.

WATERS, C. O. Letter dated 5 May 1841. In *Practice of Medicine*, 1st edn (Dunglison, R,ed.), p. 245, Lee and Blanchard, Philadelphia, 1842.

WIE, M.; WON, M.; LEE, K.; SHIN, J.; LEE, J.; SUH, H.; SONG, D.; KIM, Y. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neuroscience Letters*, v. 225, p. 93–96, 1997.

WON, H. M.; LEE, C. J.; KIM, H. Y.; SONG, K. D.; SUH, W. H.; OH, S. Y.; KIM, H. J.; SHIN, K. T.; LEE, J. Y.; WIE, B. M. Postischemic hypothermia induced by eugenol protects hippocampol neurons from global ischemia in gerbils. *Neuroscience Letters*, v. 245, p.101-104, 1998.

YOGALAKSHMI, B.; VISWANATHAN, P.; ANURADHA, C. V. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*, v. 268, p. 204-212, 2010.

YOKOTA, H.; HASHIMOTO, H.; MOTOYA, M.; YUASA, A. Enhancement of UDP-glucuronyltransferase, UDP-glucose dehydrogenase, and glutathione S-transferase activities in rat liver by dietary administration of eugenol. *Biochemical pharmacology*, v. 37, p. 799–802, 1988.

ZERON, M. M.; FERNANDES, H. B.; KREBS, C.; SHEHADEH, J.; WELLINGTON, C.; LEAVITT, B. R.; BAIMBRIDGE, K. G.; HAYDEN, M. R.; RAYMOND, L. A. Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Molecular and Cellular Neurosciences*, v.25, p. 469–479, 2004.

ZERON, M. M.; HANSSON, O.; CHEN, N.; WELLINGTON, C. L.; LEAVITT, B. R.; BRUNDIN, P.; HAYDEN, M. R.; RAYMOND, L. A. Increased sensitivity to N-methyl-d-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*, v.33, p. 849–860, 2002.

ZHANG, S.; HENNESSEY, T.; YANG, L.; STARKOVA, N.; BEAL, M.; STARKOV, A. Impaired brain creatine kinase activity in Huntington's disease. *Neuro-degenerative diseases*, v. 8, p. 194–201, 2011.

ZUCCATO, C.; CIAMMOLA, A.; RIGAMONTI, D.; LEAVITT, B. R.; GOFFREDO, D.; CONTI, L.; MACDONALD, M. E.; FRIEDLANDER, R. M.; SILANI, V.; HAYDEN, M. R.; TIMMUSK, T.; SIPIONE, S.; CATTANEO, E. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*, v. 293, p. 493–498, 2001.

ZUCCATO, C.; LIBER, D.; RAMOS, C.; TARDITI, A.; RIGAMONTI, D.; TARTARI, M.; VALENZA, M.; CATTANEO, E. Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacological Research*, v. 52, p. 133–139, 2005.

ZUCCATO, C.; VALENZA, M.; CATTANEO, E. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiological reviews*, v. 90(3), p. 905–981, 2010.