



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA PRÉ-CLÍNICA DE PRODUTOS BIOATIVOS

Adriano Costa Ramos

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

RECIFE
2013

ADRIANO COSTA RAMOS

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

*Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal de Pernambuco
como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Ciências Farmacêuticas*

*Orientadora: Profª Dra. Simone Sette Lopes
Lafayette*

Co-orientador: Profª Dr. Almir Wanderley

**RECIFE
2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA PRÉ-CLÍNICA DE PRODUTOS BIOATIVOS

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

DATA DA DEFESA: 30/08/2013

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Adriano Costa Ramos** defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 30/08/2013 e cuja banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

Banca Examinadora

Profº Dr. Edvaldo Almeida

Profº Dr. Filipe S. Duarte

Profº Dra. Simone S. Lopes Lafayette

RECIFE
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
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-Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Profa. Dra. Vânia 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-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Prof. Dra. Ana Cristina Lima Leite

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço Deus, que de forma sublime, me deu toda força, coragem e determinação para concretizar mais esta fase em minha vida.

Agradeço aos meus familiares que sempre me apoiaram neste projeto e não mediram esforços para fazer deste trabalho uma realidade.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Simone Sette, que de forma muito humilde e carinhosa me ajudou a chegar ao fim deste trabalho.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório, em especial Cybelle Linard que foi não só uma parceira de laboratório, mas sim uma irmã que eu podia contar em todos os momentos, a Rafaella Nóbrega minha dupla de pesquisas, que sempre me ajudou no que foi preciso. Agradeço aos alunos de iniciação científica, Shirliane Silva, Renata Ribas, os Vítor Sales e Carvalho, a Taynne Melo e Hyago Teixeira, Adriana Sereniki e aos demais do Laboratório.

Enfim, agradeço aos meus amigos mais próximos (os que sabem que são sintam-se citados neste momento) que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado para que este projeto fosse concretizado. A vida é bela e o paraíso um infinito, fiz do mestrado uma jornada, um desafio, que em risos e lágrimas chega ao fim.

RESUMO

Nos últimos anos o aumento da população de idosos tem levado a uma crescente na incidência de doenças neurodegenerativas em todo o mundo. Este fato tem proporcionado um ávido interesse nos estudos que visam novas estratégias para a prevenção e cura destas patologias. Diversos produtos naturais são reconhecidos por possuírem características antioxidantes, razão pela qual têm sido empregados na formulação de fármacos, visando um potencial efeito neuroprotetor. A doença de Huntington (DH) é uma afecção neurodegenerativa autossômica dominante caracterizada por movimentos involuntários coreiformes, distúrbios emocionais e demência (RYU et al, 2004). A DH está associada a uma expansão anormal de repetições citosina-adenina-guanina (CAG's) no braço curto do cromossomo 4, responsável pela codificação da proteína huntingtina, expressa constitutivamente nos tecidos nervosos central e periférico, tanto em vesículas como em mitocôndrias (LI et al., 1996). Vários modelos experimentais têm sido utilizados para estudar as doenças neurodegenerativas, entre os quais alguns modelos transgênicos e outros farmacológicos. O ácido 3-nitropropiónico (3NP) é um inibidor irreversível da succinato desidrogenase, enzima do complexo II da cadeia respiratória e o tratamento com ele produz inibição deste complexo, com consequente liberação de cálcio mitocondrial, estresse oxidativo e morte de neurônios do estriado, resultando em modificações semelhantes à DH (BEAL et al., 1993; ROSENSTOCK et al., 2004). O Tirosol (2-(4-hidroxifenil)etanol) é um composto fenólico que está presente no azeite de oliva e no vinho. É conhecido como potente antioxidante e antiinflamatório (MUKHERJEE, 2009). Estudos prévios foram desenvolvidos para testar a possibilidade de um efeito neuroprotetor, mas não tiveram resultados conclusivos (BU, 2007). O presente estudo tem por objetivo investigar o efeito neuroprotetor do Tirosol em modelo experimental da doença de Huntington. Foram utilizados no experimento ratos Wistar, machos com 300g, sob regime de água e ração *ad libitum*. O ácido 3-nitropropiónico (3NP) foi administrado por via intraperitoneal em dose de 20mg/kg. O Tirosol foi administrado por via oral, em uma solução aquosa nas doses de 3, 5, 10 e 15mg. Tanto a indução da doença quanto o tratamento com o tirosol, as doses foram administradas por 7 dias consecutivos. Como resultado, temos que o Tirosol, nas doses de 10 e 15mg, foi capaz de melhorar os parâmetros comportamentais e bioquímicos da doença de Huntington induzida pelo 3NP. Assim, podemos concluir que o Tirosol apresenta-se efetivo na proteção dos neurônios ante a doença de Huntington, no que diz respeito a inibir a sua rápida progressão.

Palavras-Chave: Tirosol. Doença de Huntington. Estresse Oxidativo. Ácido 3-Nitropropiónico.

ABSTRACT

In recent years the increase in the elderly population has led to an increasing incidence of neurodegenerative diseases worldwide. This has provided a keen interest in studies aimed at new strategies for the prevention and cure of diseases. Several natural products are recognized to possess antioxidant properties, which is why they have been employed in the formulation of pharmaceuticals, targeting a potential neuroprotective effect. Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by involuntary choreiform movements, emotional disturbances and dementia (Ryu et al, 2004). The DH is associated with an abnormal number of repetitions citosine-adenine-guanine (CAG's) the short arm of chromosome 4 responsible for encoding the huntingtin protein, constitutively expressed in the central and peripheral nervous tissues, both in vesicles as in mitochondria (Li et al. 1996). Experimental models have been used to study neurodegenerative diseases, including some pharmacological and other transgenic models. The 3-nitropropionic acid (3NP) is an irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase enzyme complex II of the respiratory chain and the treatment he produces inhibition of this complex, with consequent release of mitochondrial calcium, oxidative stress and neuronal death in the striatum, resulting in Similar to changes DH (BEAL et al. 1993; ROSENSTOCK et al. 2004). The tyrosol (2 - (4-hydroxyphenyl) ethanol) is a phenolic compound that is present in olive oil and wine. It is known as a potent antioxidant and anti-inflammatory (MUKHERJEE, 2009). Previous studies were designed to test the possibility for a neuroprotective effect, but results were not conclusive (BU, 2007). The present study aims to investigate the neuroprotective effect of tyrosol in an experimental model of Huntington's disease. Was used in the experiment male Wistar rats with 300g, under a water and food ad libitum. The 3NP was administered intraperitoneally at a dose of 20mg/kg. The tyrosol was administered orally in an aqueous solution in doses of 3, 5, 10, 15mg. Both the induction of the disease and the treatment with the tyrosol doses were administered for 7 consecutive days. The result is that the tyrosol at doses of 10 and 15 mg, was able to improve the behavioral and biochemical parameters of Huntington's disease induced by 3NP. Thus, we conclude that presents tyrosol effective in the protection of neurons against Huntington's disease, with regard to inhibit its rapid progress.

Keywords : tirosol. Huntington's Disease. Oxidative Stress. Acid 3-nitropropionic.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NP: ácido 3-nitropropiónico

BHT: “butylated hydroxytoluene” (di-terc-butil metil fenol)

DH: doença de Huntington

DPPH[·]: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EROs: espécies reativas do oxigênio

GABA: ácido gama-aminobutírico

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HCl: ácido clorídrico

Htt: Huntingtina

I.P: intraperitoneal

MDA: Malonaldeído

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro-piridina

NaCl: cloreto de sódio

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NaOH: hidróxido de sódio

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

PBS: “fosfate buffered solution” (solução fisiológica tamponada)

RPM: rotações por minuto

S.C: subcutânea

SNC: Sistema Nervoso Central

TBA: ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

V.O: via oral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. FIGURAS DA INTRODUÇÃO

Figura 1: Mecanismos de disfunção mitocondrial da doença de Huntington	20
Figura 2: Neurotoxicidade induzida pelo ácido 3-nitroproiônico	21
Figura 3: Modelo estrutural do tirosol	24

2. FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1: Effect of pretreatment with tyrosol on body weight	49
Figura 2: Effect of pretreatment with tyrosol on open field test	50
Figura 3: Effect of pretreatment with tyrosol on memory retention (%)	51
Figura 4: Effect of pretreatment with tyrosol on time of permanency (s)	52
Figura 5: Effect of tyrosol on lipid peroxidation (mMol / mg protein)	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Doença de Huntington	12
1.2	Fisiopatogenia	14
1.3	Estresse Oxidativo	20
1.4	Ácido 3-nitropropilônico	21
1.5	Modelos animais da doença de Huntington	22
1.6	Tirosol	23
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivo Específico	28
4	STUDY NEUROPROTECTIVE EFFECT OF TYROSOL IN EXPERIMENTAL MODEL OF HUNTINGTON'S DISEASE	30
4.2	Materiais e Métodos	31
4.3	Resultados	36
4.4	Discussão	38
4.5	Conclusão	41
4.6	Referências Bibliográficas	42
5	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Huntington

A doença de Huntington (DH) ou coreia de Huntington é uma desordem neurodegenerativa hereditária, transmitida por gene autossômico dominante, caracterizada por disfunção motora, distúrbios emocionais, demência, e perda de peso. A DH ocorre em todo mundo e em todas as raças e grupos étnicos com prevalência de 5-10 casos por 100.000 pessoas (KROBITISCH, 2011). Existe uma predileção por idade de manifestação da doença, e esta se dá por volta dos 37 anos, porém a DH pode manifestar-se desde a infância à nona década de vida. Uma vez desenvolvido os sinais motores da doença, os indivíduos acometidos pelo DH passam por grandes dificuldades funcionais, que em decorridos 15-25 anos chega no grau mais severo da enfermidade e morte (HERSH et al., 2008).

Por causa do declínio funcional, da cronicidade da doença e dos cuidados multidisciplinares, a DH exige recursos médicos, sociais e familiares (AUBERLUCK & MOSKOWITS, 2008). A terapia recomendada para tratar a DH é a Tetrabenzanina, droga aprovada pela FDA (Food and Drug Administration), que é indicada para supressão dos movimentos involuntários (coreia), mas não impede a progressão da doença (POON et. al. 2010).

A DH é assim denominada em homenagem a George Huntington, autor da primeira publicação científica da síndrome clínica, que foi apresentada em abril de 1872, na revista norte americana “The medical and surgery reporter” com o nome de coreia hereditária. O termo coreia, derivado do grego, significa dança, e é uma designação muito apropriada para as alterações motoras presentes na síndrome

semelhante a alguns passos de dança (FERNANDO et. al, 2000). No artigo original, George Huntington descreve uma série de alterações, caracterizando um quadro sindrômico em que a característica mais marcante é um espasmo clônico afetando os músculos voluntários sem ocorrer perda de sensibilidade ou consciência (HUNTINGTON, 1872). A doença inicia-se por leves abalos dos músculos da face, que aumentam gradativamente em violência e variedade. As pálpebras são mantidas piscando, a testa franzida depois elevada, o nariz torcido para um lado depois para o outro e a boca se volta em direções variadas (HUNTINGTON, 1872).

Desde sua descoberta, a DH passou a ser muito estudada. Vários estudos, mesas redonda, simpósios e congressos, discutiam a respeito dos efeitos neurodegenerativos e como as terapias poderiam ser melhor utilizadas. Em 1877, Meynert demonstrou através de estudos neuropatológicos em cadáveres que os sintomas clínicos da DH estão associados com alterações específicas cerebrais, exatamente na região do núcleo caudado (FERNANDO et al., 2000). Os estudos de Anton em 1896, Lanois em 1897 e de Alzheimer em 1911 demonstraram que as alterações degenerativas que ocorrem na DH atingem uma parte maior nos gânglios da base, não se restringindo apenas ao núcleo caudado, mas acometendo todo núcleo estriado, que corresponde ao núcleo caudado e ao putâmem (FERNANDO et. al., 2000).

Em 1983, Gussela e colaboradores conseguiram identificar o gene responsável pela síndrome de Huntington através da análise de ligação utilizando fragmentos de restrição polimórficos e uma sonda conhecida como G8 (GUSSELA et al, 1983). A importância desta descoberta é devido ao fato de ser o primeiro gene responsável por alguma doença a ser localizado em humanos. Em 1993 o grupo de

pesquisa colaborativa sobre a DH conseguiu isolar o gene e descobriu que a mutação responsável pela síndrome é a expansão da repetição dos trinucleotídeos citosina-adenina-guanina CAG localizada na região 5' do gene Interesting Transcript 15 (IT15) do braço curto do cromossomo 4 (KROBITISCH, 2011).

A prevalência da DH em indivíduos afetados tem uma distribuição homogênea em todo o mundo variando de 5 a 10 casos por 100.000 indivíduos. Em algumas áreas, tais como a região da Tasmânia e as margens do lago Maracaibo na Venezuela a prevalência é relativamente maior do que em outras regiões, sugerindo a influencia do efeito do desencadeador, ou seja, um indivíduo dominante, que através dos laços tribais de parentesco, disseminou esta característica fenotípica. Em países como Japão, China, Finlândia e no continente africano a prevalência da DH é menor que a média descrita nos outros locais do mundo (HAYDEN, 2004).

1.2 Fisiopatogenia

O gene IT15 normal é o responsável pela codificação da Huntingtina, proteína presente em vários tecidos do corpo, embora esteja mais concentrada no cérebro. Quando no tecido cerebral, ela é quase exclusiva do citoplasma neuronal, sendo vista nos axônios, dendritos e no corpo celular (TAMMINGA, 1997). A huntingtina (HTT) é uma proteína com múltiplos domínios e como tal com vários desempenhos dentro da célula, alguns conhecidos, outros ainda hipotéticos, constituindo prolífica fonte de investigação na atualidade. Trata-se de uma proteína de localização preferencialmente intra citoplasmática, associada às organelas como a mitocôndria, o aparelho de Golgi, o retículo endoplasmático, as vesículas sinápticas e outros componentes do citoesqueleto. Em menor concentração existe também no núcleo, onde tem por função a regulação transcricional e o transporte núcleo citoplasma.

Tem ainda uma importante função sináptica, no transporte intracelular de vesículas e organelas e confirmada ação anti-apoptótica intracelular. Reddy e colaboradores demonstraram em seu estudo, a presença de HTT normal no citoplasma ao invés de HTT mutante que fica no núcleo, sugerindo uma alteração no mecanismo de ação da proteína (REDDY et al, 1999). Tamminga e colaboradores sugeriram que no citoplasma, ela estaria associada em parte com as membranas das vesículas (Complexo de Golgi) e por isso, poderia participar dos processos de migração vesicular e de exocitose de neurotransmissores e enzimas (TAMMINGA, 1997). À huntingtina também está vinculada uma propriedade apoptótica por um mecanismo incerto. Ela se ligaria com a uma proteína neuronal (como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), formando um complexo citotóxico. Na DH, a huntingtina possui uma cadeia anormal de poliglutaminas que confere à sua estrutura novas propriedades que desencadeiam interações anômalas com outras proteínas. Martín e colaboradores revelaram que, através da tomografia por emissão de pósitrons (PET scan) um significativo decréscimo cortical difuso no metabolismo da glicose, o que poderia sugerir uma provável interação da proteína huntingtina com o aproveitamento deste glicídio (MARTÍN, 1992).

O RNA mensageiro (RNAm) Huntington – responsável pela síntese da proteína huntingtina – é expresso em níveis elevados em neurônios de todo o sistema nervoso, estando também presente com menos frequência em outras regiões do organismo. Foi demonstrado por técnicas de hibridização *in situ* que não há nem aumento nem diminuição da expressão do RNAm Huntington em neurônios do núcleo caudado e putâmem (local de maior severidade da doença). Isto pode ser explicado pelo simples fato de que nestes locais estão presentes outros fatores que interagem fisiopatologicamente com a proteína huntingtina, ou seja, as células dos

núcleos da base são mais vulneráveis à degeneração do que outras áreas do cérebro (FERREIRA, 1997).

A DH é uma das 9 doenças de expansão de poliglutaminas identificadas até hoje, grupo de doenças neurodegenerativas hereditárias com características comuns, constituindo um dos modelos de doença mais bem estudados a nível molecular. O acúmulo da proteína mutada no interior celular é responsável pela disfunção e morte neuronal, no entanto, o mecanismo envolvido neste processo não foi completamente elucidado. As doenças mais comuns envolvendo as poliglutaminas são a DH e a ataxia espinho-cerebelosa tipo 3 (SCA3), que têm distribuição mundial se bem que com incidência muito variável nos diferentes países, sendo as mais frequentes também no nosso país (HAYDEN, 2004).

Chamam-se doenças de poliglutaminas porque a mutação genética, constituída por um aumento de repetições do nucleótido CAG, leva a uma expansão de resíduos de poliglutaminas na proteína mutada (poliQ). A expansão de repetições CAG é instável, tendendo sempre ao seu alongamento, o que acarreta um início de doença progressivamente mais precoce e um curso mais grave nas sucessivas gerações, fenómeno este conhecido como antecipação. Quanto maior o número de repetições CAG mais precoce será a idade de início da doença. O comprimento da expansão é assim responsável por 50 a 70% da variância na idade de início, sendo esta também condicionada por outros fatores genéticos ou ambientais (HAYDEN, 2004).

Os mecanismos pelos quais a proteína mutada, neste caso a huntingtina (HTT), causa neurodegeneração incluem agregação proteica, anomalia na interação proteína/proteína, alteração da expressão génica, desregulação dos sistemas

celulares lisosomais de autofagia e ubiquitina-proteossômico, e ainda disfunção mitocondrial com consequente acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) e apoptose (FERNANDO et al, 2000).

De momento foram identificadas 234 proteínas a que a huntingtina se associa. A huntingtina é essencial para o desenvolvimento embrionário (provado pela letalidade dos embriões dos ratinhos transgênicos com total ausência da proteína), porque a sua inexistência acelera os mecanismos de apoptose e interrupção no transporte de nutrientes maternos para o feto, mostrando que a huntingtina mutada até um determinado nível pode compensar a ausência da proteína endógena e executar a maioria das funções da huntingtina normal. Parece, pois que o processo de desregulação de vias intracelulares fundamentais, que termina na morte celular, ocorre com a contribuição tanto da proteína normal por um mecanismo de perda de função, como por um mecanismo de ganho tóxico de função da huntingtina (HTT). A mutação parece assim conferir uma adicional e deletéria função à proteína. No decurso da doença, a huntingtina normal vai perdendo a sua função, o que se relaciona com a progressão dos sinais clínicos, e foi já demonstrado experimentalmente nos modelos de animais transgênicos (HAYDEN, 2004)

A expansão de poliQ confere novas propriedades físicas à proteína que se traduzem em numerosas anomalias no seu comportamento. A proteína mutada apresenta alterações na degradação, na localização sub-celular, na maturação pós-tradução e na interação com outros elementos moleculares, bem como uma tendência para agregação dentro da célula. São estas alterações que induzem a

multiplicidade de disfunções celulares que levarão à morte neuronal (TAKAHASHI & KANATA, 2010).

A agregação das proteínas mutadas parece resultar de uma perturbação nos usuais mecanismos de degradação e eliminação das proteínas. Nos cérebros dos doentes os agregados observados são formados por fragmentos de proteínas contendo a expansão poliQ, e não pela proteína completa. Diversos estudos mostraram, *in vitro*, que quanto mais truncada é a proteína mais rapidamente se agrega, escapando provavelmente às vias de normal degradação pelo sistema proteossômico. Torna-se assim necessário identificar os fragmentos constituintes dos agregados, bem como as endopeptidases implicadas, para que seja possível o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que impeçam a proteólise. Em particular, algumas endopeptidases da família das caspases e das calpaínas estão envolvidas na proteólise da HTT mutada. A caspase-6 gera um fragmento de HTT mutada que se acumula no núcleo dos neurónios, sendo esse fragmento sujeito a proteólise por outras endopeptidases que originam fragmentos progressivamente tão pequenos e passíveis de agregação. Num modelo animal experimental (YAC 128) a abolição do local de clivagem das caspase-6 na HTT mutada torna-a menos patogénica. Poderá pois, ser esta uma via de investigação de novas terapêuticas para a doença (TAKAHASHI & KANATA, 2010).

Em todas as doenças de poliglutaminas o processo patológico inicia-se por uma disfunção neuronal causada pela proteína mutada, pelos fragmentos resultantes da proteólise, pela formação de agregados, pelo RNA, isto é, vários fatores contribuindo para a alteração da função celular. A investigação atual visa compreender o contributo de cada um destes elementos para o processo patológico

e distinguir as disfunções primárias das secundárias, com o fim de melhor desenvolver estratégias terapêuticas consequentes (TAKAHASHI & KANATA, 2010).

A desregulação da expressão gênica é uma característica comum à maioria das doenças de expansão de poliglutaminas. As proteínas mutadas têm interações aberrantes com uma série de proteínas nucleares essenciais à regulação dos genes. As numerosas alterações transcricionais que ocorrem nas doenças de expansão de poliQ incluem os genes implicados em funções celulares tais como a resposta ao *stress*, a sinalização neuronal, a regulação do cálcio e a regulação de processos de inflamação (TAKAHASHI & KANATA, 2010).

Defeitos metabólicos foram também evidenciados. Na DH a HTT mutada liga-se diretamente à membrana mitocondrial interferindo com as enzimas da cadeia respiratória e sua função. Também reprime o PGC-1 α , um co-ativador transcricional que regula a biogénese e a respiração mitocondrial. Como última consequência a alteração mitocondrial leva à produção de radicais livres de oxigénio sendo assim responsável pela exacerbação dos mecanismos de estresse oxidativo observados na doença (FIG 1) (KROBITISCH,2011).

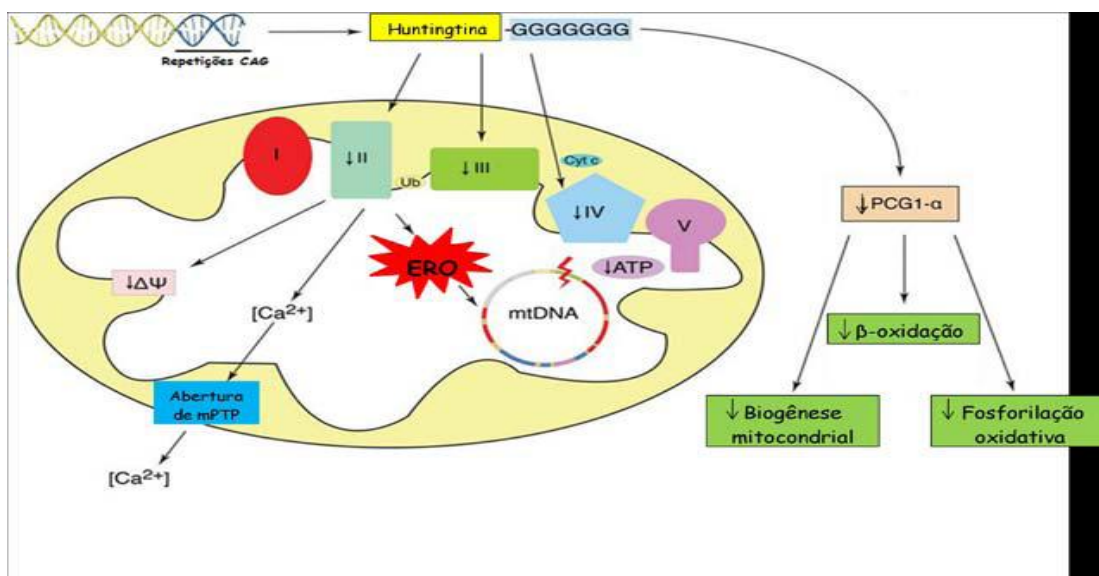


FIGURA1: Mecanismos de disfunção mitocondrial na DH. A presença da proteína mutante huntingtina pode exercer um efeito direto sobre a função mitocondrial através de uma diminuição da atividade dos complexos II, III e IV da cadeia transportadora de elétrons. Alterações na atividade do complexo II podem diminuir o potencial de membrana mitocondrial, causando a abertura de poros de transição com liberação de íons cálcio. Além disso, alterações no complexo II podem também induzir a produção de ERO, que por sua vez, podem promover dano oxidativo ao DNA mitocondrial. A diminuição da expressão do PGC-1 α pela proteína mutante contribui para a disfunção mitocondrial na DH .

1.3 Estresse Oxidativo

Esse aumento de compostos reativos no interior dos neurônios causa um efeito desregulador nas principais vias de neurotransmissores. Os neurotransmissores estimulados conduzem a uma excitotoxicidade reversa, e consequentemente, morte neuronal. A estimulação dos receptores de glutamato para o ácido N-metil-D-aspartato (NMDA) e seus subtipos, desempenham um papel fundamental neste processo. A administração de agonistas do receptor de NMDA em roedores e características patológicas da doença de Huntington, sugerindo que a

excitotoxicidade pode participar da morte neuronal da doença de Huntington. Estudos posteriores usando o modelo de NMDA mostraram que morte neuronal da DH pode ser causada pelo aumento do neurotransmissor glutamato, que altera a homeostase do cálcio, despolarizando seus canais e aumentando o fluxo de íons dentro da célula ao ponto que ela se rompe (FIG 2) (TUNEZ et al., 2010)

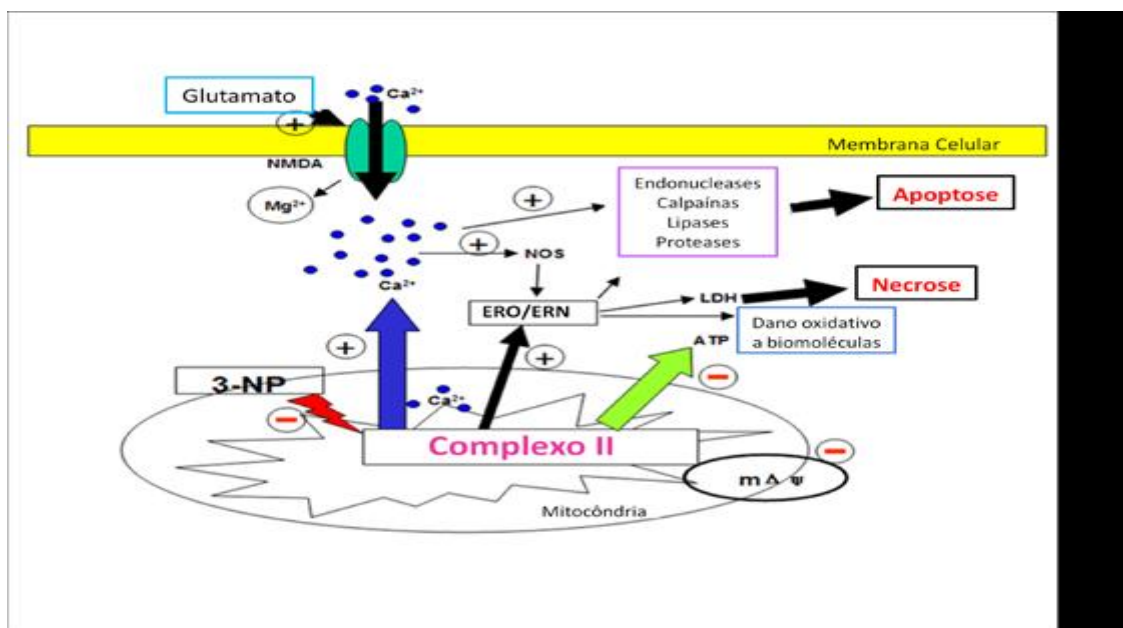


FIGURA 2: Neurotoxicidade induzida pelo 3-NP. O 3-NP inibe o complexo II da cadeia transportadora de elétrons causando diminuição na produção de ATP, alterações no potencial de membrana mitocondrial e aumento na produção de espécies reativas. A disfunção no metabolismo energético induzida pelo 3-NP pode desencadear excitotoxicidade secundária por tornar os neurônios mais sensíveis a níveis basais de glutamato. A despolarização da membrana plasmática libera o bloqueio exercido pelos íons Mg^{2+} nos receptores NMDA com conseqüente influxo de Ca^{2+} e ativação de vias morte celular (Adaptado de Tunez et al., 2010).

1.4 Ácido 3-Nitropropiónico (3-NP)

Ácido 3-nitropropiónico (3-NP) é um inibidor da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SDH), uma parte do complexo II, que liga o ciclo do ácido

tricarboxílico para a cadeia de transporte de elétrons respiratório. 3-NP foi descrito como responsável pela degeneração neuronal causada em cérebro humano por sua ingestão na cana-de-açúcar, milho e amendoim contaminados por fungos (LUDOLF et al, 1991, HE et al, 1995.; BROUILLET et al, 2005). Também tem sido usado em um modelo de doença de Huntington. A hipótese geralmente admitida para dar conta da degeneração induzida por 3-NP no estriado é que a depleção dos níveis de ATP produzido gera um déficit no metabolismo energético que pode levar a despolarização da membrana e produzir toxicidade, através do alívio de tensão dependente de magnésio e cálcio. Com o metabolismo energético diminuído, há produção de estresse oxidativo, bem como, na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BEAL et al, 1993, ZEEVA et al, 1995.; GREENE et al, 1998.; GABRIELSON et al., 2001).

1.5 Modelos Animais da Doença de Huntington

Desde 1970, diferentes modelos animais da DH foram desenvolvidos. O primeiro foi um modelo de morte neuronal baseado na administração de ácido cainico, um composto excitotóxico que causava morte neuronal (COYLE e SCHUWARCS, 1976). Outros modelos também foram estabelecidos como o modelo induzido pelo malonato,

Ácido quinolínico (AQ) e ácido 3-nitropropiónico (3-NP). Mais recentemente, foram desenvolvidos os modelos transgênicos da DH em camundongos (MANGIRIANI et al., 1996), primatas não humanos e outras espécies (MARSH et al., 2003; PARKER et al., 2001), 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 na 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 (TUNEZ,2010).

1.6 Tiroso

O Tiroso- 2 - (4-hidroxifenil)-etanol)- é um dos maiores representantes dos compostos fenólicos encontrados nas azeitonas e no azeite de oliva. Na forma de ésteres do ácido enólico também é encontrado no vinho e no suco de uva. Isoladamente o tiroso é um sólido incolor à temperatura ambiente, que se funde a 91-92° C, entra em ebulição a 158°C, é ligeiramente solúvel em água, com maior solubilidade em solventes orgânicos. Do ponto de vista estrutural, o tiroso partilha uma funcionalidade fenólica na posição *para* do anel aromático com uma cadeia de hidroxietil. O Hidroxitiroso possui um radical-OH adicional ao lado de outro - OH no benzeno. Estas características estruturais conferem ao tiroso um poder antioxidante, bem como potente composto quimiopreventivo em condições de estresse oxidativo (FIG. 3) (BU, 2007).

Também foi visto que o tiroso inibe a liberação de citocinas induzida por Lipopolissacarídeo-induzido (LPS) em monócitos humanos, diminuindo processos inflamatórios (BU, 2007). Estudos prévios foram desenvolvidos para testar a possibilidade de um efeito neuroprotetor, mas não tiveram sua continuidade. O

tirosol também se mostrou eficaz em terapias ligadas ao coração, tais como proteção contra estresse oxidativo e proteção das fibras cardíacas (MUKHERJEE, 2009). Muitos estudos têm levantado que a ação cardioprotetora do azeite de oliva está ligada a constituição dos ácidos graxos e compostos fenólicos, e em especial, a presença do tirosol (D'ARCHIVIO, et. al., 2007).

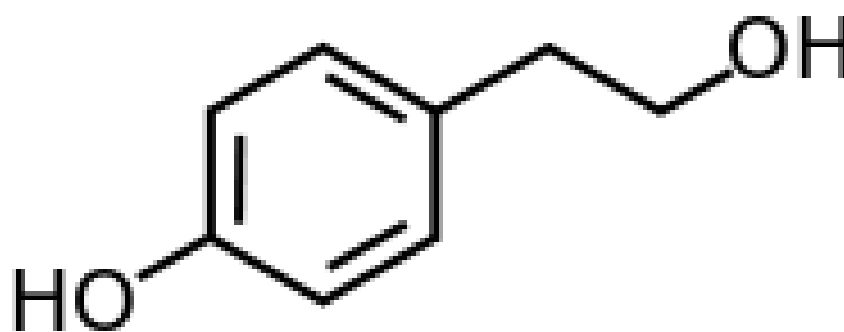


FIGURA 3: Imagem representativa do modelo estrutural do tirosol.

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, o aumento da população de idosos tem levado a um aumento crescente na incidência de doenças neurodegenerativas em todo o mundo. Este fato tem proporcionado um crescente interesse nos estudos que visam novas estratégias para a prevenção e cura destas patologias. Várias evidências têm demonstrado que a produção excessiva de radicais livres está fortemente associada ao desenvolvimento de muitas doenças típicas do envelhecimento como Alzheimer, Parkinson e Huntington. Entretanto, as bases moleculares que desencadeiam estas doenças, ainda não estão totalmente compreendidas. Assim, fica clara a necessidade de se investir no desenvolvimento de novos agentes que melhorem a qualidade de vida desta população.

Diversos produtos naturais são reconhecidos por possuírem características antioxidantes, razão pela qual têm sido empregados na formulação de fármacos, visando um potencial efeito neuroprotetor. Existe um crescente interesse em desenvolver novas estratégias terapêuticas, enfocando a ingestão combinada de compostos antioxidantes de diversas naturezas que atuem na proteção do SNC. Com base nestes dados, a proposta do presente trabalho é estudar novas estratégias terapêuticas, usando produto isolado da uva (*Vitis spp.*) o Tiroisol.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o possível efeito neuroprotetor do tirosol sobre as alterações comportamentais induzidas pela administração sistêmica do ácido 3-nitropropiónico, em modelo experimental da doença de Huntington.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar a toxicidade aguda do tirosol em camundongos machos e fêmeas;
- Avaliar a atividade *in vitro* do tirosol pelo método de captura de radicais 2,2-difenil-1-picrildrazil (DPPH)
 - Avaliar o efeito do tirosol sobre o comportamento de animais tratados com ácido 3-nitropropiónico, através dos testes comportamentais de campo aberto, rotarod e labirinto em cruz elevado
 - Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* do tirosol pelo método da peroxidação lipídica de animais tratados com o ácido 3-nitropropiónico.

4 STUDY NEUROPROTECTIVE EFFECT OF TYROSOL IN EXPERIMENTAL MODEL OF HUNTINGTON'S DISEASE

4 STUDY NEUROPROTECTIVE EFFECT OF TYROSOL IN EXPERIMENTAL MODEL OF HUNTINGTON'S DISEASE

ABSTRACT

In recent years the increase in the elderly population has led to an increasing incidence of neurodegenerative diseases worldwide. This has provided a keen interest in studies aimed at new strategies for the prevention and cure of diseases. Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by involuntary choreiform movements, emotional disturbances and dementia. The 3-nitropropionic acid (3NP) is an irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase enzyme complex II of the respiratory chain and the treatment, it produces inhibition of this complex, with consequent release of mitochondrial calcium, oxidative stress and neuronal death, resulting in similar to changes DH. The tyrosol (2 - (4-hydroxyphenyl) ethanol) is a phenolic compound that is present in olive oil and wine. Is and to posseses as a potent antioxidant and anti-inflammatory. In this work, we evaluated the protective effect of tyrosol neurotoxicity and oxidative stress in experimental models of HD in vitro and vivo. The 3NP was administered intraperitoneally at a dose of 20mg/kg. The tyrosol was administered orally in an aqueous solution in doses of 3, 5, 10, 15mg/kg. Both the induction of the disease and the treatment with the tyrosol doses were administered for 7 consecutive days. Our data shouwed that the tyrosol at doses of 10 and 15 mg/kg was able to improve the behavioral and biochemical parameters of Huntington's disease induced by 3NP. Thus, we conclude that the tyrosol has an effective protection of neurons against Huntington's disease.

Keywords: tirosol. Huntington's Disease. Oxidative Stress. Acid 3-nitropropionic.

1 INTRODUCTION

In recent years the increase in the elderly population has led to an increasing incidence of neurodegenerative diseases worldwide. This has provided a keen interest in studies aimed at new strategies for the prevention and cure of diseases. Several natural products are recognized to possess antioxidant properties, therefore, they have been employed in the formulation of pharmaceuticals, targeting a potential neuroprotective effect. Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by involuntary choreiform movements, emotional disturbances and dementia (Ryu et al, 2004). The HD is associated with an abnormal number of repetitions CAGs the short arm of chromosome 4 responsible for encoding the huntingtin protein, constitutively expressed in the central and peripheral nervous tissues, both in vesicles as in mitochondria (Li et al. 1996). Experimental models have been used to study neurodegenerative diseases, including some pharmacological and other transgenic models. The 3-nitropropionic acid (3NP) is an irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase enzyme complex II of the respiratory chain and the treatment produces inhibition of this complex, with consequent release of mitochondrial calcium, oxidative stress and neuronal death, resulting in similar to changes DH (BEAL et al. 1993; ROSENSTOCK et al. 2004). The tyrosol (2 - (4-hydroxyphenyl) ethanol) is a phenolic compound that is present in olive oil and wine. It is known as a potent antioxidant and anti-inflammatory (MUKHERJEE, 2009). Previous studies were designed to test the possibility for a neuroprotective effect, but results were not conclusive (BU, 2007). The present study aimed to investigate the neuroprotective effect of tyrosol in an experimental model of Huntington's disease.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 *Animal's*

We used male Wistar rats from the Department of Physiology and Pharmacology, from the Federal University of Pernambuco (UFPE) with 3-5 months of age and weighing between 280 and 350g. Were also used Swiss albino mice

approximately 2 months of age weighing between 25 and 30g from the Research Center Aggeu Magalhães (CPqAM). The animals received water and food "*ad libitum*" and standard environmental conditions (12h dark/light cycle) and were kept under controlled temperature ($22 \pm 2^\circ \text{C}$). Two days before the experiments, the animals were transferred to the experimental laboratory. The experiments were performed in a room with temperature control and in the light phase of the cycle. All experimental protocols were submitted for approval by the Ethics Committee on Animal Use at the Center for Biological Sciences UFPE under license number 23076.01977/2012-82, according to standard by Brazilian College for Animal Experimentation.

2.2 Drugs and Solvents

3-nitropropionic acid was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), and dissolved before the beginning of the treatment in saline (pH 7.4). In subsequent days, solutions were stored in refrigerator (4°C). The tyrosol was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), and dissolved in the distilled water. Butylatedhydroxytoluene (BHT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), thiobarbituric acid (TBA), and 1,1,3,3-tetrametoxipropene (TMP), used in biochemical analysis, were also purchased from Sigma.

2.3 Oral acute toxicity

In this test, male and female mice ($n = 5$) were housed in cages at $22 \pm 2^\circ \text{C}$ temperature and deprived of food overnight with free access to water. One dose limits of 2000 mg/kg body weight of tyrosol, was administered orally to animals of both groups. In each case, the volume administered was 10 mL/kg body weight. After administration, the animals were carefully observed during the first three hours, and from there, daily, during 14 days, were observed signs and toxic symptoms and death. Signs and symptoms of toxicity included the following: (1) autonomic effects such as reflections, salivation and piloerection; (2) central nervous system effects such as tremors and convulsions and (3) changes in the level of activity, posture,

strength and bizarre behavior (MALONE, 1977). The weight of the animals was measured daily.

2.4 Biochemical studies

Radical scavenging activities by antioxidants in the tyrosol was determined using DPPH* radical (2,2-diphenyl-1-picrilidrazil) according to the method of Brand-Williams and collaborators (1995). Briefly, aliquots of 0.5 mL of solution containing different concentrations of tyrosol (5-250 µg/mL) were added to 1.5 mL of methanolic solution of DPPH* (60 mM). The solutions were homogenized and incubated for 30 min at room temperature, and the absorbance of the resulting solution was read at 515 nm. The drop in reading the optical density of the samples and the positive control BHT was correlated to the control, establishing the percentage of DPPH* discoloration, according to the formula below:

$$\% \text{ protection} = \left(\frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of test}}{\text{Absorbance of control}} \right) \times 100$$

Was calculated the value of IC₅₀ (concentration of sample required to inhibit 50% of radical).

2.5 Experimental Groups

The animals were randomly divided into six experimental groups (n = 8). Rats in group 1 were pretreated intraperitoneally (i.p.) for seven days with vehicle (NaCl 0.9% i.p.) and water orally (10 mL/kg, p.o.); Group 2 - received 3-NP (20 mg/kg, i.p.) for seven days and water (p.o.); Groups 3-6 were treated with 3-NP as the same ingroup 2, plus the animals received, one hour before treatment with 3-NP, tyrosol oral doses in levels of 3, 5, 10 and 15 mg/kg, respectively. Twenty four hours after the last day of treatment, the rats were evaluated in behavioral tests. After the behavioral assessments animals were sacrificed and used for biochemical assays.

2.6 Evaluation of body weight

Animal body weight was recorded on the first day and last day of the experimentation. Percentage change in body weight was calculated in comparison to the initial body weight on the first day of experiment.

$$\% \text{ change in body weight} = \frac{(\text{Body weight 1 day} - \text{Body weight 9 day})}{\text{Body weight 1 day}} \times 100$$

2.7 Behavioral Tests

The animals were submitted to behavioral tests twenty four hours after the seven day of treatment with 3-NP or vehicle by i.p. and administration of water or tyrosol by p.o.

2.7.1 Open field Test

To quantify general activity, each rat was placed individually in the center of an open-field arena (a circular wooden box with 100 cm in diameter and 40 cm high, with floor divided into 19 regions). The frequency of locomotion (number of floor units entered by the animal with four paws), immobility time (time that the animal stood still without making any movement), grooming (number of times that animal self-cleaning) rearing frequency (number of times the animal stood on its hind legs, with the trunk perpendicular to floor of arena) and start the movement time (start time for the animal to move), were assessed for five min. The cleaning of arena was made with alcohol at 5%, before each test.

2.7.2 Elevated plus maze test for spatial memory

The test was performed according to the method of Kumar et al. (2006). The elevated plus maze consists of two opposite open arms (50×10 cm), crossed with two closed arms of same dimensions with 40 cm high walls. The arms are connected with central square (10×10 cm). The rats were placed individually at one end of an

open arm facing away from the central area. The time taken by animal to move from open arm until enter one of the closed arms was registered 24 hours after the last day of treatment with water or tyrosol and with vehicle or 3-NP, and called for transfer of initial latency. Rats were allowed to explore the maze for 30 seconds after initial registration of acquisition latency, and then they were put back in their cages. The retention latency was evaluated again the next day.

The percentage of memory retention was calculated by the formula:

$$\frac{\text{Transfer of initial latency} - \text{Transfer latency repetition}}{\text{Transfer of initial latency}} \times 100$$

2.7.3 Rotarod test

All animals were tested for motor skills and balance using the rotary axis or rotarod. For execution of this test, animal was placed with the four paws on a bar of diameter 7.0 cm and 25 cm above the floor, rotating at speed of 25 rpm. Before dividing each experimental group, the rats were trained in two sessions of 180 seconds for acclimatization. The animals were placed on rotating bars and length of stay was recorded. The cut off time used was of 180 seconds (Kumar & Kumar, 2009).

2.8 Biochemical studies

2.8.1 Dissection and homogenization

After behavioral assessments animals were anesthetized and 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 1X 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 g for 15 minutes at 4°C, and an aliquot of supernatant was separated for biochemical analyzes.

2.8.2 Measurement of lipid peroxidation

Quantitative measurement of lipid peroxidation in regions dissected was assessed according to method of Buege and Aust (1978). The amount of malonaldehyde (MDA) present in samples was quantified by reaction with thiobarbituric acid. Aliquots of 500 μ L of supernatant were added to 1 mL of reagent thiobarbituric acid (TBA): TBA 0.38% (p.v.), 250 mL of 1Nhydrochloride acid (HCl), trichloroacetic acid (TCA 15%) and 20 mL of ethanolic BHT (2%). The solution was heated at 100 °C for 15 minutes, followed by the cooling in an ice bath. 1.5 mL of n-butanol was added, shaken and centrifuged to 3000 xg. After centrifugation, was collected the upper layerthat was analyzed in spectrophotometer (CARY 3E - UV - Visible Spectrophotometer Varian) at 532 nm. All determinations were made in triplicate and contained only white n-butanol. For calculations, was made 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. Differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey's multiple comparison tests to determine the significance level. Statistical analyses were 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 at 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} 8.51 $\mu\text{g/mL}$. The synthetic antioxidant BHT at similar conditions showed an IC_{50} 62.71 $\mu\text{g/mL}$.

3.2 *Acute toxicity*

It was observed that, during the 14-day experiment, tirosol produced no death, no toxic signs or negative symptoms in any animal. There were no changes in the corporal weight and all animals exhibited a gain in body weight. In the daily consumption of water and food, there was no changes in both sexes. Therefore, the acute minimum fatal dose of the tyrosol for Swiss mice is higher than 2000 mg/kg b.w.

3.3 *Effect of pretreatment with tyrosol on body weight in 3-NP treated rats*

There was no change in initial and final body weight of vehicle treated animals. However, 3-NP treatment caused a significant decrease in body weight on last day as compared to vehicle treated group. Daily treatment with tyrosol (3, 5, 10 and 15 mg/kg, p.o.) for seven days significant decrease the body weight loss in 3-NP treated rats (Fig. 1).

3.4 *Effect of pretreatment with tirosol on locomotor activity in 3-NP*

Administration of 3-NP in open field test, significantly reduced the total ambulatory activity, rearing and grooming and increased the time to start the movement and duration of immobility. Treatment with tyrosol (10 and 15 mg/kg, p.o.) for seven days significantly improved all parameters (Fig. 2). Daily treatment with tyrosol increased the ambulatory, grooming and rearing movements, and decreased the time to start to movement and duration of immobility.

3.5 *Effect of pretreatment with tyrosol on memory performance in elevated plus maze*

Treatment with 3-NP (20 mg/kg., i.p.) for seven days caused marked memory loss as shown by a significant decrease in the % retention of memory in rats as compared to vehicle control group (Fig. 3). Daily administration of tyrosol (3, 5, 10 and 15 mg/kg, p.o.) one hour before the treatment with 3-NP for seven days increased the % retention memory in rats as compared to 3-nitropropionic acid alone.

3.6 *Effect of tyrosol on rotarod activity in 3-NP treated rats*

Treatment with 3-NP (20 mg/kg., i.p.) for seven days significantly decreased muscle grip strength and significantly decreased the time of permanency (s) as compared to control animals (Fig. 4). Daily treatment with tyrosol (10 and 15 mg/kg, p.o.) for seven days significantly increased the time of permanency (s) as compared to 3-nitropropionic acid alone treated group.

3.7 *Effect of tyrosol on brain lipid peroxidation in 3-NP-treated rats*

3-NP administration resulted in significant changes in biochemical parameters as compared to control animals. Administration of 3-NP for seven days induced oxidative stress as indicated by a significant increase in the striatum, cortex and substantia nigra MDA levels as compared with vehicle control group. Tyrosol treatment (3, 5, 10 and 15 mg/kg, p.o.) one hour before the treatment with 3-NP for seven days, attenuated the increase in lipid peroxidation in striatum, cortex and substantia nigra as shown by a significant decrease MDA levels (Fig. 5).

4 DISCUSSION

In this study, treatment with tyrosol in levels of 3, 5, 10 and 15 mg/kg, p.o. during seven days in which was administered 3-NP, sharply reduced the toxicity caused by systemic administration of neurotoxin. Treatment with 3-NP (20 mg/kg, i.p.) produced deficits in motor and cognitive functions, including bradykinesia, abnormal gait, hypoactivity, weakness and muscle stiffness, and significant reduction in body weight. Caused also neurochemical changes in specific brain regions. These findings are in agreement with previous investigations who also noted a variety of

neurobehavioural and motor abnormalities in rats after administration of 3-NP (Borlongan et al., 1997; Kumar and Kumar, 2009). 3-NP has as main mechanism of neurotoxicity the irreversible inhibition of mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase, resulting in reducing the levels of ATP and metabolic impairment that leads to cell death (Beal et al. 1993; Rosenstock et al, 2009). Normally, the course of HD also begins with involuntary movements (chorea), followed by decrease on motor coordination and loss of control of voluntary movements that eventually evolves to rigidity and dystonia similar those of model induced by administration of 3-NP. Effects on the gait abnormalities and movements of body are also supported in the evidence that interstitial injection of 3-NP causes the reduction in markers for both striatal intrinsic neurons such as GABA, substance P, and somatostatin as well as a decrease in markers for striatal afferents such as dopamine and its metabolites (Nam et al., 2005). Loss of body weight and hypoactivity can be simply because of energy metabolism depressed after treatment with 3-NP. The hypoactivity together with neuronal loss in striatum dorsolateral showed that disturbances of rigidity and movement are related to lesions of basal ganglia (Beal et al., 1993).

Treatment with tyrosol significantly improved weight loss when compared to group treated only with 3-NP. The weight reduction observed after injection of 3-NP may be due to impaired energy metabolism, mobilization of energy reserves and lipid peroxidation that are peripheral effects of administration of 3-NP (Kumar and Kumar, 2009). However, striatal lesions and bradykinesia can be partly responsible for reducing the food intake, appetite and motor incoordination in rats (Guyot et al., 1997; Fontaine et al, 2000).

In the evaluation of acute toxicity, our results show that the minimum lethal dose is more than 2000 mg/kg. Previous acute toxicity tests with tyrosol and showed minimum lethal dose values in Swiss mice and Wistar rats greater than 2000 mg/kg (Konan et al, 2007; Carvalho et al., 2011).

Administration of 3-NP is associated with both hyperactivity and hypoactivity, depending on frequency and duration of treatment (Borlongan et al., 1997). Animals that received only 3-NP for seven days exhibited hypoactivity significant, incoordination motor and cognitive deficits that resemble clinical symptoms related to HD. Daily administration of tyrosol for seven days significantly attenuated hipolocomotion, the motor activity impairment and cognitive disorder, compared to

animals treated with 3-NP. The musculoskeletal injury may be related to reduced energy levels and consequently to changes in neural processing (Seaman et al., 2000). Motor changes evidenced by decreasing the fall-off time in rotarod are attributed mainly to the degeneration of neurons of striatum, region functionally connected by afferences motor cortex (Brown, 1992; Sgambato et al., 1997). The memory of patients with HD often decreases with degeneration of neurons in brain (Barquero-Jiménez e Gómez-Tortosa, 2001). Cognitive dysfunction can be due to disruption of circuits striatum-frontal in patients with HD (Becker et al., 2003).

3-NP binds irreversibly the enzyme succinate dehydrogenase inhibiting routes of oxidation of fatty acids. Inhibition of these pathways contributes to energy deficiency of metabolism. Therefore, the 3-NP causes an energy deficit that leads to depolarization of membrane potential, followed by release of substrate for production of reactive oxygen species (ROS) and, consequently, oxidative stress (Tunez et al., 2003). Previous investigations clearly demonstrate that the increased oxidative stress may be major deleterious events in HD (Borlongan et al., 1997). Shinomol and Muralidhara (2008) observed that various brain regions exposed to 3-NP showed significantly elevated levels of ROS, MDA and hydroperoxide, and marked reduction in activity of antioxidant enzymes (SOD, catalase and glutathione), suggesting induction of oxidative stress. Normally oxidative stress is counteracted by endogenous antioxidants and free radical scavengers (Stack et al., 2010). Therefore, the administration of several antioxidants have demonstrated significant improvements in oxidative stress and lesions produced by 3-NP (Fontaine et al, 2000; Kim et al, 2005; Kumar, Kumar, 2009; Mutaury et al., 2010).

In this study, after administration of 3-NP, there was increase in level of MDA (indicator of lipid peroxidation) in the striatum, cortex and substantia nigra, suggesting increased central oxidative stress. These effects were attenuated by treatment with tyrosol for seven days, suggesting the antioxidant action of compound. The antioxidant activity of compound was also demonstrated *in vitro*, by DPPH radical assay, which evaluates the antioxidant capacity of study compound to capture hydrogen radical, since the DPPH is already clearly recognized by their ability to donate hydrogen (Shinomol and Muralidhara, 2008). It has a scavenging potential towards oxygen and nitrogen reactive species, including hydroxyl radical,

peroxynitrite, superoxide radical, hydrogen peroxide and hypochlorous acid (RIETJENS et al, 2007).

5 CONCLUSION

Taken together, these results shows that administration of 3-NP in rats induce neurobehavioral and biochemical changes similar those found in HD and suggests that neurodegeneration occurred due to increased oxidative damage. Furthermore, treatment with tyrosol showed protective effect against 3-NP-induced neurotoxicity, probably due to its antioxidant activity.

REFERENCES

ALEXI, T; BORLONGAN, CV; FAULL, RLF; WILLIAMS, CE; CLARK, RG; GLUCKMAN, PD; HUGHES, PE. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progresse in Neurobiology*, v.60, p.409-470, 2000.

ALLEN, RT; HUNTER III, WJ; AGRAWAL, DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *Journal Pharmacology Toxicology Method*, v. 37, p. 215-228, 1997..

BEAL, M. F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Analisis in Neurology*, v. 31, p. 119-130, 1992.

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 of Neurosciences*, v. 13, p. 4181– 4192, 1993.

BEHL, C. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Progresse in Neurobiology*, v.57, p.301-323, 1998.

BERNARDI, MM; PALERMO-NETO, J. Effect of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. *Psychopharmacology*, v. 65, p. 247-250, 1979.

BIANCHI, MLP; ANTUNES, LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 12, v. 123-130, 1999.

BLOIS, MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 181(4617, p. 1199-1200, 1958.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72(1-2), p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, ME; BREST, C. Use of free radical method evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss.Technol.*, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BROADHURST, PL. Determination of emotionality in the rat. I. Situational factors. *Br J Psychol*, v. 49, p. 12–20, 1957.

BU, Y. Neuroprotective effect of tyrosol on transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience Letters*, v.44, n. 3, p. 218-221, 2007

BUEGE, JA; AUST, SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v.52, p. 302-310, 1978.

CHANDRA, J; SAMALI, A; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 29, n. ¾, p. 323-333, 2000.

COYLE JT; SCHWARCZ R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 263(5574): 244-6, 1976.

D'ARCHIVIO et. al., Dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007

DUNHAM, N. W; MYIA, TS. A Note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rat and mice. *J. Amer. Pharm. Associ.*, v, 46, p. 208-210, 1957.

FERNANDO et al., Doença de Huntington, *Rev. Brasileira* v 54 p. 112-123, 2000

FERREIRA, ALA; MATSUBARA, LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil*. v. 43 p. 61-68, 1997.

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.

GROSS, A; YIN, XM; WANG, K; WEI, MC; JOCKEL, J; MILLIMAN, C; ERDJUMENT-BROMAGE, H; TEMPST, P; KORSMEYER, SJ. Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death. *J BiolChem*, v. 274, p. 1156-1163, 1999.

GU, M; GASH, MT; MANN, VM; JAVOY-AGID, F; COOPER, JM; SCHAPIRA, A H V. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol*, v. 39, p. 385-389, 1996.

GUSSELA JF, WEXLER NS, CONEALLY PM, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to huntington's disease. *Nature*. v. 7, p.306:234, 1983..

HALLIWELL, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radical Biology & Medicine*, v. 32, p. 968–974, 2002.

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

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HERSH et al. TeheNeurogenetics Genie: Testing for the Huntington's Disease mutation. *Neurology*, v 44 p.1369-1373, 1994..

HSU, Y-T; YOULE, RJ. Bax in Murine Thymus Is a Soluble Monomeric Protein That Displays Differential Detergent-induced Conformations *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 10, p. 777-783, 1998

HUNTINGTON G. On chorea. *Medical and Surgical Reporter*. V 21., p.;26:317, 1872.

KERR, JFR; HARMON, B. V. *Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. Apoptosis: The molecular basis of cell death*. Edited by L. David Tomei and Frederick O. Cope, 5 chapter, 1991.

KOWALTOWSKI, AJ; VERCESI, AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biological and Medical*, v. 26, p. 463-471, 1999.

KRAJEWSKI, S.; TANAKA, S.; SCHIBLER, M. J.; FENTON, W.; REED, J. C. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes *Cancer Res*, v. 53, p. 4701-4714, 1993.

KROBITISCH, S., Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. V 43, p. 20-24, 2011.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev*, v.87, p. 99–163, 2007.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGER, L. Free, sterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.*, v.30, n.2, p.330-334, 1982.

KUMAR & KUMAR, Protective effect of rivastigmine against 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease like symptoms: Possible behavioural, biochemical and cellular alterations, *European jornal*, v 615 p: 91-101, 2009.

LI, X. J.; SHARP, A. H.; LI, S. H.; DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H.; ROSS, C. A. Huntingtin-associated protein (HAP1): Discrete neuronal localizations in the brain resemble those of neuronal nitric oxide synthase. *ProcNatlAcadSci USA*, v. 93, p. 4839-4844, 1996.

LIMA-COSTA, MF; VERAS, R. Saúde pública e envelhecimento. *Cad. Saúde Pública*, v. 19, p. 700-701, 2003.

LOPES, GS; MORA, OA; CERRI, P; FARIA, FP; JURKIEWICZ, NH; JURKIEWICZ A; SMAILI, S;;;S. Mitochondrial alterations and apoptosis in smooth muscle from aged rats. *BiochimicaetBiophysicaActa*, v. 1658, p. 187– 194, 2004.

LUDOLPH AC; HE F; SPENCER PS; HAMMERSTAD J; SABRI M. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. **Can J NeurolSci**, 18(4): 492-8, 1991.

MACMILLAN, J.; QUARRELL, O.The neurobiology of Huntington's disease. In: *Harper PS (ed) Huntington's disease*. WB Saunders, London, pp 317–358, 1996.

MALONE, Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. iological or therapeutical activity . Berlin: Springer-Verlag, p. 23-53., 1977.

MANDEL, S; YODIM, MBH.Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, v.37 (3), p.304–317, 2004.

MANGIARINI L; SATHASIVAM K; SELLER M; COZENS B; HARPER A; HETHERINGTON C; LAWTON M; TROTTIER Y; LEHRACH H; DAVIES SW;

BATES GP. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. **Cell**, 87(3): 493-506, 1996.

MARSH JL; PALLOS J; THOMPSON LM. Fly models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 12 (2):187-93, 2003.

MARTIN WRW et al. Cortical glucose metabolism in HD. *Neurology*, 1992; 42: 223-229

MISRA, HP; FRIDOVICH, I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 257, pp. 3170–3175, 1972.

MUKHERJEE, S. Expression of the longevity proteins by both the red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol and hydroxytyrosol. *Free Radical Biology & Medicine*, v.46, p. 573-578, 2009.

NAPOLITANO, A. et al, The chemistry of tyrosol and hydroxytyrosol: implications for oxidative stress, *biochemistry journal*, n 12 v 7, p 78-85, 2010.

ORRENIUS, S; ZHIVOTOVSKI, B; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptotic link. *Nature*, v. 4, p.85-99, 1997.

PELLOW, S; FILE, SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.24 (3), p. 525-529, 1986.

REDDY PH et al. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's. *neuroscience journal*, v 11 (2) p. 235-239, 1999

ROSENSTOCK, TR; CARVALHO, ACP; JURKIEWICZ, A; FRUSSA-FILHO, R; SMAILI, SS. 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.

RUSSO, E. *Handbook of Psychotropic Herbs - A Scientific Analysis of Herbal Remedies for Psychiatric Conditions*. New York, The Haworth Press, Inc, 2001, 352 p.

RYU, J. K.; KIM, J.; CHO, S.; HATORI, K.; NAGAI, A.; CHOI, H. B.; LEE, M. C.; MCLARNON, J. G.; KIMA, S. U. Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease, *Neurobiology of Disease*, v. 16, p. 68– 77, 2004.

SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial disease. *Lancet*, v. 368, p. 70–82, 2006.

SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1410, n. 159-170, 1999.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SINGH, RP; SHARAD, S; KAPUR, S. Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, v. 5, n. 3, July-September, 2004.

SINHA, AK. Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, v.47(2), p. 389-394, 1972.

SMAILI, SS; CARVALHO, ACP; ROSENSTOCK, TR; SHARPE, JC; YOULE, RJ. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 183-190, 2003.

SMAILI, SS; HSU, Y-T; SANDERS, KM; RUSSEL, JT; YOULE, RJ. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death and Differ*, v. 8, p. 909-920, 2001.

TAKAHASHI T, KATADA S, Onodera O. Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J Mol Cell Biol*. V 2(4):180-191, 2010.

TAMMINGA, CA. Huntington's disease: From gene to Pathophysiology. *Journal of Psychiatry*. v.8p.154-158, 1997.

TRABER, MG. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, Basel, v. 23, n. 3/6, p. 135-139, 1997.

Trends Neuroci, June 1999, 22:6, 248-255

TUNEZ et al, Protective melatonin effect on oxidative stress induced by okadaic acid into rat brain, journal of pineal research, v 34, p 265-268, 2010

3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. Molecules, 15(2): 878-916, 2010.

VERAS, R. Em busca de uma assistência adequada à saúde do idoso: revisão da literatura e aplicação de um instrumento de detecção precoce e de previsibilidade de agravos. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 705-715, mai-jun, 2003.

WHITTON, PS. Inflammation as a causative factor in the etiology of Parkinson's disease. British Journal of Pharmacology, v.150, p.963-976, 2007.

WOLTER, KG; HSU, Y-T; SMITH, CL; NECHUSHTAN, A; XI, XG; YOULE, RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. J Cell Biol, v. 139, p. 1281-1292, 1997.

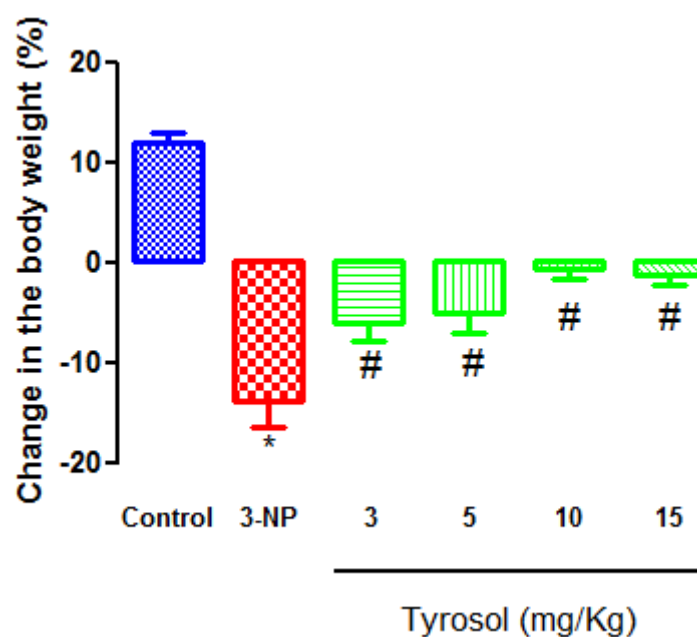


FIG. 1 Effect of tyrosol (3, 5, 10 and 15mg/kg p.o.) on body weight in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg i.p.) treated rats. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ as compared to vehicle treated control group; # $p < 0,05$ as compared to 3-nitropropionic acid treated group (One-Way ANOVA followed by Tukey's test)

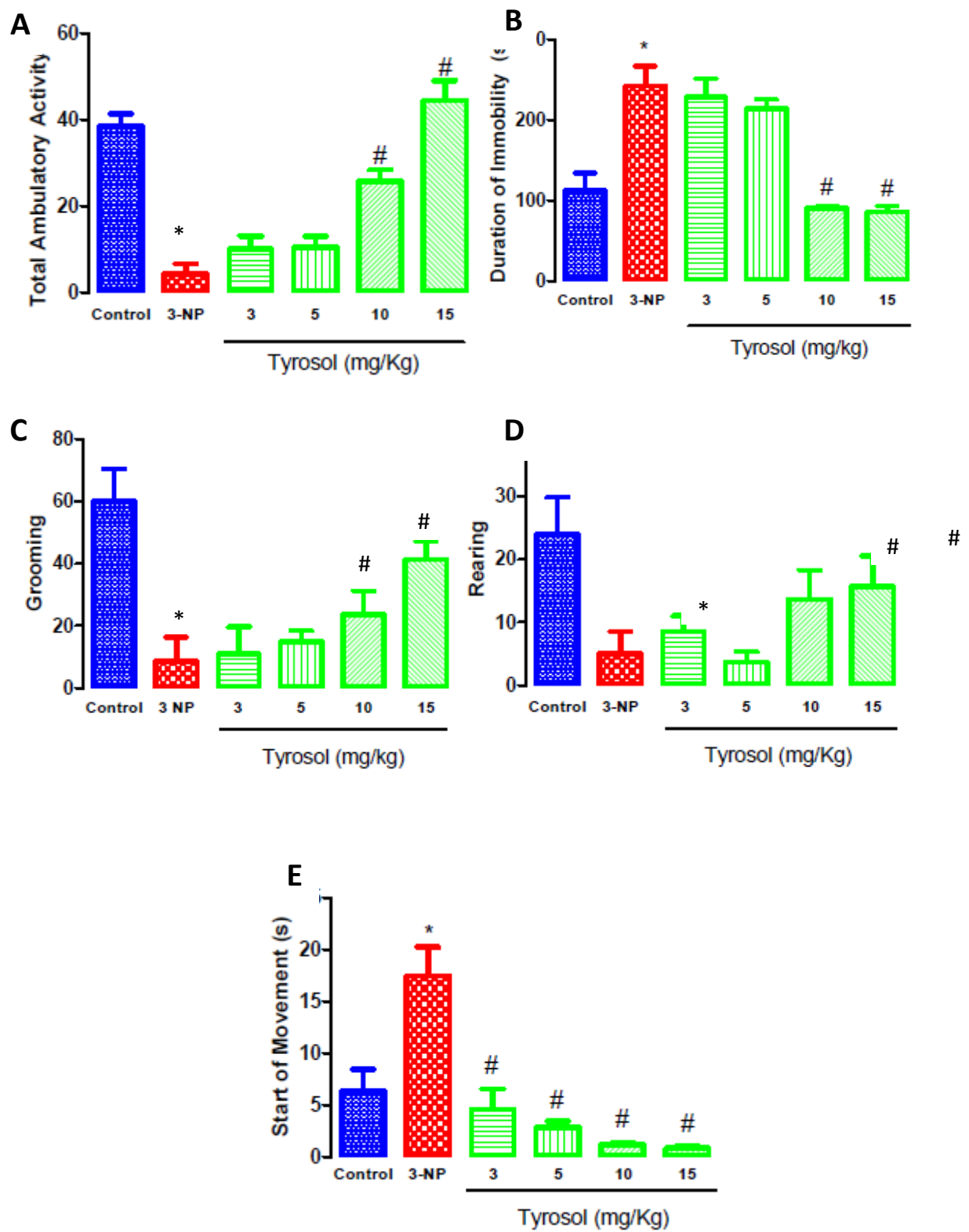


FIG. 2 Effect of tyrosol (3, 5, 10 and 15 mg/kg, p.o.) on open field test. Total ambulatory activity (A), duration of mobility (B), grooming (C), rearing (D) and start of

movement (E) in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg i.p.) treated rats. 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)

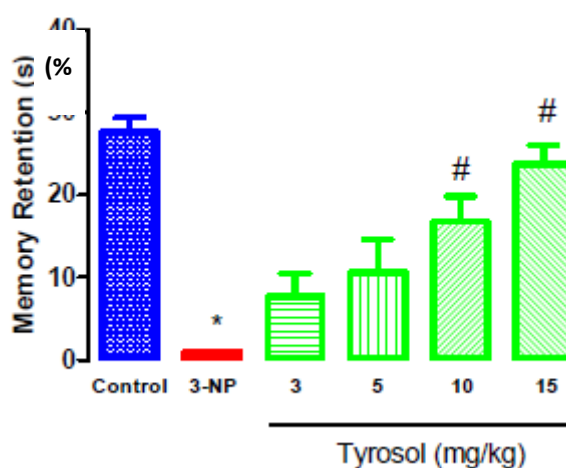


FIG. 3 Effect of tyrosol (3, 5, 10 and 15mg/kg p.o.) on memory retention (%) in elevated plus maze test in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg i.p.) treated rats. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. * $p<0,05$ as compared to vehicle treated control group; # $p<0,05$ as compared to 3-nitropropionic acid treated group (One-Way ANOVA followed by Tukey's test)

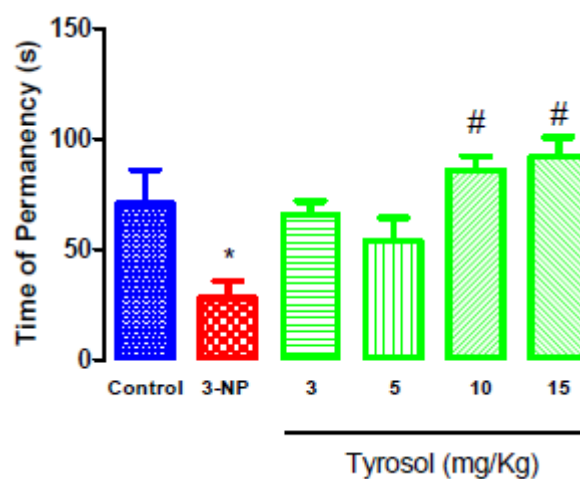


FIG. 4 Effect of tyrosol (3, 5, 10 and 15mg/kg p.o.) on time of permanency (s) in rotarod test in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg i.p.) treated rats. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ as compared to vehicle treated control group; # $p < 0,05$ as compared to 3-nitropropionic acid treated group (One-Way ANOVA followed by Tukey's test)

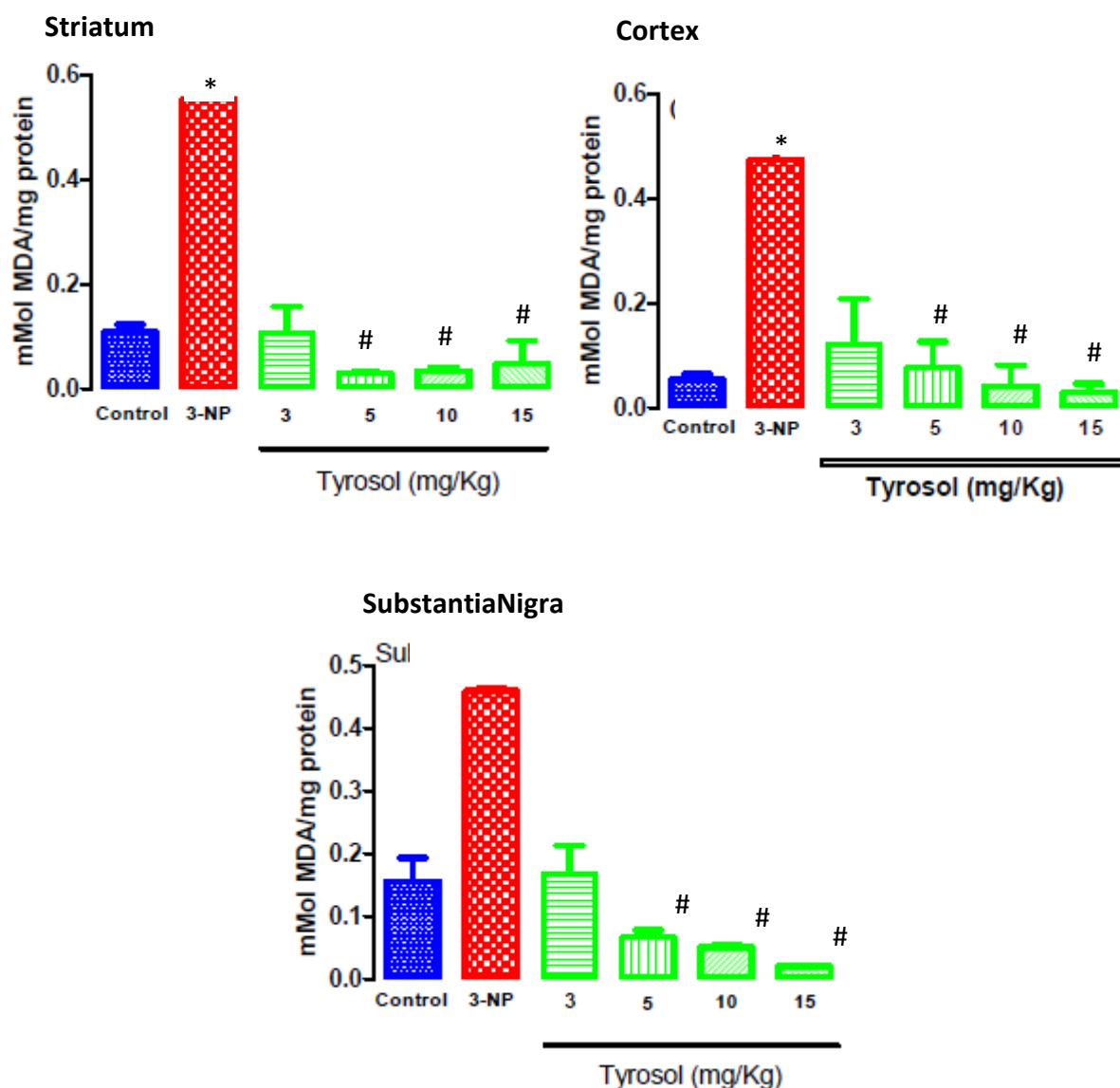


FIG. 5 Effect of pretreatment with tyrosol (3, 5, 10 and 15mg/kg p.o.) on lipid peroxidation (mMol MDA/mg protein) in the striatum, cortex and substantianigra in 3-nitropropionic acid (20 mg/kg i.p.) treated rats. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ as compared to vehicle treated 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 apresentados, é possível concluir que:

- ✓ O tirosol apresentou expressiva 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 tratados durante sete dias com o ácido 3-nitropropiónico (20 mg/kg, i.p.) apresentaram significativa perda de peso, déficit motor e cognitivo, além de aumento da peroxidação lipídica.
- ✓ O tratamento diário com tirosol (3, 5, 10 e 15mg/kg, v.o.) durante os sete dias em que foi administrado o 3-NP atenuou as alterações comportamentais induzidas por essa neurotoxina. Também foi observado que o composto melhorou a peroxidação lipídica.
- ✓ A partir destes dados, o tirosol surge como um potencial agente neuroprotetor existindo, assim, a perspectiva do seu uso no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Huntington.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS DO TRABALHO

ALEXI, T; BORLONGAN, CV; FAULL, RLF; WILLIAMS, CE; CLARK, RG; GLUCKMAN, PD; HUGHES, PE. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progresse in Neurobiology*, v.60, p.409-470, 2000.

ALLEN, RT; HUNTER III, WJ; AGRAWAL, DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *Journal Pharmacology Toxicology Method*, v. 37, p. 215-228, 1997..

BEAL, M. F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Analisis in Neurology*, v. 31, p. 119-130, 1992.

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 of Neurosciences*, v. 13, p. 4181– 4192, 1993.

BEHL, C. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Progresse in Neurobiology*, v.57, p.301-323, 1998.

BERNARDI, MM; PALERMO-NETO, J. Effect of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. *Psychopharmacology*, v. 65, p. 247-250, 1979.

BIANCHI, MLP; ANTUNES, LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 12, v. 123-130, 1999.

BLOIS, MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 181(4617, p. 1199-1200, 1958.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72(1-2), p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, ME; BREST, C. Use of free radical method evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss.Technol.*, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BROADHURST, PL. Determination of emotionality in the rat. I. Situational factors. *Br J Psychol*, v. 49, p. 12–20, 1957.

BU, Y. Neuroprotective effect of tyrosol on transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience Letters*, v.44, n. 3, p. 218-221, 2007

BUEGE, JA; AUST, SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v.52, p. 302-310, 1978.

CHANDRA, J; SAMALI, A; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 29, n. ¾, p. 323-333, 2000.

COYLE JT; SCHWARCZ R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. **Nature**, 263(5574): 244-6, 1976.

D'ARCHIVIO et. al., Dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007

DUNHAM, N. W; MYIA, TS. A Note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rat and mice. *J. Amer. Pharm. Associ.*, v, 46, p. 208-210, 1957.

FERNANDO et al., Doença de Huntington, *Rev. Brasileira* v 54 p. 112-123, 2000

FERREIRA, ALA; MATSUBARA, LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil*. v. 43 p. 61-68, 1997.

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.

GROSS, A; YIN, XM; WANG, K; WEI, MC; JOCKEL, J; MILLIMAN, C; ERDJUMENT-BROMAGE, H; TEMPST, P; KORSMEYER, SJ. Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death. *J BiolChem*, v. 274, p. 1156-1163, 1999.

GU, M; GASH, MT; MANN, VM; JAVOY-AGID, F; COOPER, JM; SCHAPIRA, A H V. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol*, v. 39, p. 385-389, 1996.

GUSSELA JF, WEXLER NS, CONEALLY PM, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to huntington's disease. *Nature*. v. 7, p.306:234, 1983..

HALLIWELL, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radical Biology & Medicine*, v. 32, p. 968–974, 2002.

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

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HERSH et al. TeheNeurogenetics Genie: Testing for the Huntington's Disease mutation. *Neurology*, v 44 p.1369-1373, 1994..

HSU, Y-T; YOULE, RJ. Bax in Murine Thymus Is a Soluble Monomeric Protein That Displays Differential Detergent-induced Conformations *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 10, p. 777-783, 1998

HUNTINGTON G. On chorea. *Medical and Surgical Reporter*. V 21., p.;26:317, 1872.

KERR, JFR; HARMON, B. V. *Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. Apoptosis: The molecular basis of cell death*. Edited by L. David Tomei and Frederick O. Cope, 5 chapter, 1991.

KOWALTOWSKI, AJ; VERCESI, AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biological and Medical*, v. 26, p. 463-471, 1999.

KRAJEWSKI, S.; TANAKA, S.; SCHIBLER, M. J.; FENTON, W.; REED, J. C. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes *Cancer Res*, v. 53, p. 4701-4714, 1993.

KROBITISCH, S., Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. V 43, p. 20-24, 2011.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev*, v.87, p. 99–163, 2007.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGER, L. Free, sterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.*, v.30, n.2, p.330-334, 1982.

KUMAR & KUMAR, Protective effect of rivastigmine against 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease like symptoms: Possible behavioural, biochemical and cellular alterations, *European jornal*, v 615 p: 91-101, 2009.

LI, X. J.; SHARP, A. H.; LI, S. H.; DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H.; ROSS, C. A. Huntingtin-associated protein (HAP1): Discrete neuronal localizations in the brain resemble those of neuronal nitric oxide synthase. *ProcNatlAcadSci USA*, v. 93, p. 4839-4844, 1996.

LIMA-COSTA, MF; VERAS, R. Saúde pública e envelhecimento. *Cad. Saúde Pública*, v. 19, p. 700-701, 2003.

LOPES, GS; MORA, OA; CERRI, P; FARIA, FP; JURKIEWICZ, NH; JURKIEWICZ A; SMAILI, S;;;S. Mitochondrial alterations and apoptosis in smooth muscle from aged rats. *BiochimicaetBiophysicaActa*, v. 1658, p. 187– 194, 2004.

LUDOLPH AC; HE F; SPENCER PS; HAMMERSTAD J; SABRI M. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. **Can J NeurolSci**, 18(4): 492-8, 1991.

MACMILLAN, J.; QUARRELL, O.The neurobiology of Huntington's disease. In: *Harper PS (ed) Huntington's disease*. WB Saunders, London, pp 317–358, 1996.

MALONE, Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. iological or therapeutical activity . Berlin: Springer-Verlag, p. 23-53., 1977.

MANDEL, S; YODIM, MBH.Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, v.37 (3), p.304–317, 2004.

MANGIARINI L; SATHASIVAM K; SELLER M; COZENS B; HARPER A; HETHERINGTON C; LAWTON M; TROTTIER Y; LEHRACH H; DAVIES SW;

BATES GP. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. **Cell**, 87(3): 493-506, 1996.

MARSH JL; PALLOS J; THOMPSON LM. Fly models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 12 (2):187-93, 2003.

MARTIN WRW et al. Cortical glucose metabolism in HD. *Neurology*, 1992; 42: 223-229

MISRA, HP; FRIDOVICH, I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 257, pp. 3170–3175, 1972.

MUKHERJEE, S. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol and hydroxytyrosol. *Free Radical Biology & Medicine*, v.46, p. 573-578, 2009.

NAPOLITANO, A. et al, The chemistry of tyrosol and hydroxytyrosol: implications for oxidative stress, *biochemistry journal*, n 12 v 7, p 78-85, 2010.

ORRENIUS, S; ZHIVOTOVSKI, B; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptotic link. *Nature*, v. 4, p.85-99, 1997.

PELLOW, S; FILE, SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.24 (3), p. 525-529, 1986.

REDDY PH et al. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's. *neuroscience journal*, v 11 (2) p. 235-239, 1999

ROSENSTOCK, TR; CARVALHO, ACP; JURKIEWICZ, A; FRUSSA-FILHO, R; SMAILI, SS. 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.

RUSSO, E. *Handbook of Psychotropic Herbs - A Scientific Analysis of Herbal Remedies for Psychiatric Conditions*. New York, The Haworth Press, Inc, 2001, 352 p.

RYU, J. K.; KIM, J.; CHO, S.; HATORI, K.; NAGAI, A.; CHOI, H. B.; LEE, M. C.; MCLARNON, J. G.; KIMA, S. U. Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease, *Neurobiology of Disease*, v. 16, p. 68– 77, 2004.

SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial disease. *Lancet*, v. 368, p. 70–82, 2006.

SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1410, n. 159-170, 1999.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SINGH, RP; SHARAD, S; KAPUR, S. Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, v. 5, n. 3, July-September, 2004.

SINHA, AK. Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, v.47(2), p. 389-394, 1972.

SMAILI, SS; CARVALHO, ACP; ROSENSTOCK, TR; SHARPE, JC; YOULE, RJ. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 183-190, 2003.

SMAILI, SS; HSU, Y-T; SANDERS, KM; RUSSEL, JT; YOULE, RJ. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death and Differ*, v. 8, p. 909-920, 2001.

TAKAHASHI T, KATADA S, Onodera O. Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J Mol Cell Biol*. V 2(4):180-191, 2010.

TAMMINGA, CA. Huntington's disease: From gene to Pathophysiology. *Journal of Psychiatry*. v.8p.154-158, 1997.

TRABER, MG. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, Basel, v. 23, n. 3/6, p. 135-139, 1997.

Trends Neuroci, June 1999, 22:6, 248-255

TUNEZ et al, Protective melatonin effect on oxidative stress induced by okadaic acid into rat brain, journal of pineal research, v 34, p 265-268, 2010

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, 15(2): 878-916, 2010.

VERAS, R. Em busca de uma assistência adequada à saúde do idoso: revisão da literatura e aplicação de um instrumento de detecção precoce e de previsibilidade de agravos. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 705-715, mai-jun, 2003.

WHITTON, PS. Inflammation as a causative factor in the etiology of Parkinson's disease. British Journal of Pharmacology, v.150, p.963-976, 2007.

WOLTER, KG; HSU, Y-T; SMITH, CL; NECHUSHTAN, A; XI, XG; YOULE, RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. J Cell Biol, v. 139, p. 1281-1292, 1997.

ZHANG, Y, DAWSON, VL, DAWSON, TM. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. Neurobiology Dis., v.7, p.240-250, 2000.