



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Centro Acadêmico de Vitória – CAV



Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica -
PPGNAFPF

Daílo Augusto Pereira Lopes

**Efeito do metileugenol sobre déficits comportamentais em modelo experimental da
doença de Huntington induzida por ácido 3-nitropropiónico em ratos Wistar**

Vitória de Santo Antão

2018



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Centro Acadêmico de Vitória – CAV



Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica -

PPGNAFPF

Daíllo Augusto Pereira Lopes

Efeito do metileugenol sobre déficits comportamentais em modelo experimental da doença de Huntington induzida por ácido 3-nitropropiónico em ratos Wistar

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, área de concentração Bases Experimentais e Clínicas da Plasticidade Fenotípica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Vitória de Santo Antão

2018

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia F. dos Santos, CRB4-2005

L864e Lopes, Daíllo Augusto Pereira
Efeito do metileugenol sobre déficits comportamentais em modelo experimental da doença de Huntington induzida por ácido 3-nitropropiónico em ratos Wistar. / Daíllo Augusto Pereira Lopes. - Vitória de Santo Antão, 2018.
53 folhas: fig.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, 2018.

1. Doença de Huntington. 2. Estresse oxidativo. 3. Neuroproteção I. Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

616.851 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-028/2018

Daíllo Augusto Pereira Lopes

**Efeito do metileugenol sobre déficits comportamentais em modelo experimental da
doença de Huntington induzida por ácido 3-nitropropiónico em ratos Wistar**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Bases Experimentais e Clínicas da Plasticidade Fenotípica.

Aprovada em: 28/02/2018.

Orientador: **Dr. Almir Gonçalves Wanderley**
Universidade Federal de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA:

Dr. José Gildo de Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Sandra Lopes de Souza
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Filipe Silveira Duarte
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Alice Valença de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho, com todo meu amor e carinho, aos meus familiares, meus queridos pais Cícero Lopes e Dagmar Pereira (*in memoriam*), meu irmão Diógenes Augusto e ao meu sobrinho Kaio Augusto por tudo que fizeram e fazem por mim ao longo de toda jornada, não resumindo nesses dois anos, mas em toda minha vida. Não tenho dúvida da importância de cada um e que sem vocês tudo seria diferente, nada disso estaria sendo realizado. Desejo ser merecedor de todo esforço, por vocês, dedicado a mim, principalmente quanto à minha formação como pessoa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por que sem ele nada seria possível e por sempre estar ao meu lado iluminando meus caminhos e minhas escolhas.

À minha família, meus pais Cícero Lopes e Dagmar Pereira (*in memoriam*), meu irmão Diógenes Augusto, meu sobrinho Kaio Augusto que cada um a sua maneira específica contribuiu imensamente nessa jornada. Desejo ser merecedor do vosso apoio.

Ao professor Dr. Filipe S. Duarte, por ter alguns minutos para colaborar sempre que precisei, por abrir sua estrutura para que alguns testes pudessem ser realizados, assim como a todos que fazem o laboratório de Neurofarmacologia Experimental, especialmente, Camila Pinho e Juliana Leal pelos momentos de conversa.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular, em especial à Bárbara Ramos (Jovem/Professora), mas não esquecendo: Cecília Melo (Ceci/Professorinha), Hotência Andrade (Horta), Rafael Artur (Chefe), entre outros que contribuíram não apenas na parte acadêmica, mas contribuíram mais ainda como amigos no dia a dia descontraído nos momentos mais turbulentos. Como esquecer as conversas durante os almoços na copa de vocês? Não tem como.

Ao professor Dr. Joaquim Evêncio que abriu as portas de seu laboratório para viabilização de algumas análises. À Edna que me recepcionou e com toda sua paciência conduziu o processamento, ao mesmo tempo que me passava um pouco do seu conhecimento. E também, ao professor Dr. Fábio Mendonça que em meio à sua extensa agenda aceitou o convite do professor Dr.º Joaquim Evêncio e disponibilizou uma parte do seu tempo para conduzir as análises histopatológicas.

À minha namorada, Mariana Cavalcanti, pelo apoio incondicional, paciência para aguentar meus estresses e pelos momentos importantíssimos de distração e descontração. E não poderia deixar de agradecer pela ajuda da @TeacherMariEnglish nessa fase final de trabalho.

Ao meu orientador, professor Dr. Almir Gonçalves Wanderley que me recebeu em seu laboratório, apesar de tê-lo avisado da falta de experiência na temática de trabalho, mesmo assim deu total condições para desenvolvimento do trabalho. Pelas orientações durante todo o curso, as quais não ficaram restritas à área acadêmica, mas também na formação.

A todos que fazem o Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Bioativos, em especial à Samara Alves, Gláucia Dal Santo, Jamilka Leopoldina, Anne Catharine, Hyago Teixeira, Victor Sales e os ICs pela excelente receptividade para comigo e toda ajuda para que o trabalho fosse desenvolvido da melhor forma possível.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NP	Ácido 3 nitropropiónico
AC	Ácido cainico
AM	Ácido malônico
AQ	Ácido quinolínico
ATP	Adenosina trifosfato
AAT	Atividade antioxidante total
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAG	Citosina-adenina-guanina
DH	Doença de Huntington
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DRP1	Proteína relacionada à dinamina 1
E.P.M.	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERE	Espécies reativas de enxofre
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HEAT	Huntingtina, fator de alongação 3, proteína de fosfatização 2a e TOR1
HO ⁻	Ânion hidroxila
Htt	Huntingtina
i.p.	Intraperitoneal
IL	Interleucina
It-15	Interesting Transcript 15
MAO	Monoamino oxidase
ME	Metileugenol
mHtt	Huntingtina mutante
Mn-SOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
NBT	Cloreto de tetrazólio-nitroazul
NMDA	N-metil D-aspartato
O ₂ ⁻	Ânion superóxido

PEST	Aminoácido prolina, ácido glutâmico ou aspártico, serina e treonina
PoliQ	Poliglutamina expandida
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomas
Quad	Quadrantes
RPM	Rotações por minuto
SSRI	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
TBZ	Tetrabenazina
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
v.o.	Via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Relação do comprimento CAG com a idade	13
Figura 2 — Esquema ilustrando as vias de integração neuronal.....	16
Figura 3 — Fórmula estrutural do ME.....	21
Figura 4 — Teste do campo aberto	29
Figura 5 — Teste do rotarod	30
Figura 6 — Desenho experimental.....	31

RESUMO

Doença de Huntington (DH) é um distúrbio neurológico, causado pela degeneração dos neurônios estriatais. O ácido 3-nitropropiónico (3-NP) é um modelo experimental da DH. Substâncias com atividade antioxidante podem reduzir as alterações comportamentais da DH. Dessa forma, o metileugenol (ME) foi investigado se poderia mitigar aspectos comportamentais em DH experimental induzido por 3-NP em ratos Wistar. Os grupos (n=7) foram tratados por 7 dias com água ou ME (5, 15 e 25 mg/kg, v.o.) e 15 min depois receberam 3-NP (20 mg/kg, i.p.) ou NaCl 0,9 %. 24 horas após o tratamento, os animais foram submetidos a testes comportamentais e análise histológica do SNC. Os resultados mostram que ME15 = -21 g atenuou a perda de massa corporal induzida pelo 3-NP (controle = -72 g), a atividade locomotora (controle = 2 quad vs ME15 = 32 quad), coordenação motora (controle = 5 s vs ME15 = 92 s), tempo de imobilidade (controle = 215 s) vs ME15 = 134,5 s), tempo de latência (controle = 14 s) vs ME5 = 3 s), retenção de memória (controle = 0% vs ME15 = 26,9% e ME25 = 80,4%). Na avaliação histológica, as alterações estriatais induzidas por 3-NP foram atenuadas pelo ME15. Em conclusão, o ME demonstrou possível efeito protetor contra as alterações comportamentais e histológicas induzidas por 3-NP, as quais foram correlacionadas inicialmente à sua atividade antioxidante.

Palavras-chave: Antioxidante. Doença de Huntington. Estresse oxidativo. Neuroproteção. Metileugenol.

ABSTRACT

Huntington disease (HD) is a neurological disturb caused by degeneration of striatal neurons. 3-nitropropionic acid (3-NP) is a experimental model of HD. Substances that have antioxidant activity can reduce the behavioral changes of HD. Therefore, the methyleugenol (ME) was investigated whether will be able to mitigate behavioral parameters in experimental HD induced by 3-NP in wistar rats. Groups (8 – 10) were treated over 7 days with water or ME (5, 15 and 25 mg/kg, p.o.) and 15 minutes after, they received 3-NP (20 mg/kg, i.p.) or 0.9 % NaCl 24 hours after treatment, the animals were submitted to behavioral tests and histological analyzes from central nervous system (CNS). The datas shown that ME15 = - 21 g reduced the body mass loss induced by 3-NP (control = - 72 g), the locomotor activity (control = 2 quad vs ME15 = 32 quad), motor coordination (control = 5 sec vs ME15 = 92 sec), immobility time (control = 215 sec vs ME15 = 134.5 sec), latency time (control = 14 sec vs ME15 = 3 sec), memory retention (control = 0 % vs ME15 = 26.9 % and ME25 = 80.4 %). In the histological analyzes, the striatal changes induced by 3-NP were mitigated by treatment with ME15. In summary, the ME shown possible protector effect against behavioral and histological changes induced by 3-NP which were initially correlated with its antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant. Huntington disease. Neuroprotection. Oxidative stress. Methyleugenol.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 HIPÓTESE	22
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 DROGAS E REAGENTES	24
4.2 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	24
4.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES <i>IN VITRO</i>	24
4.3.1 <i>Ensaio do DPPH</i> [□]	24
4.3.2 <i>Ensaio da atividade antioxidante total</i>	25
4.3.3 <i>Ensaio da peroxidação lipídica</i>	25
4.4 ANIMAIS	26
4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
4.6 EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL	27
4.7 TESTES COMPORTAMENTAIS	27
4.7.1 <i>Avaliação do efeito do ME sobre atividade locomotora no teste do campo aberto</i>	28
4.7.2 <i>Avaliação do efeito do ME sobre atividade locomotora no teste do teste rotarod</i>	29
4.8 DISSECAÇÃO DA ÁREA CEREBRAL NÚCLEO ESTRIADO (CAUDADO, PUTÂMEM E GLOBO PÁLIDO) E POSTERIOR ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	30
4.9 DESENHO EXPERIMENTAL DOS TESTES COMPORTAMENTAIS	30
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 RESULTADO - ARTIGO ORIGINAL	32
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE EXPERIMENTAÇÃO E USO ANIMAL	53

1 INTRODUÇÃO

Doença de Huntington, também chamada de Coreia de Huntington, é uma doença neurodegenerativa cronicamente debilitante com padrão autossômico dominante de hereditariedade (SANCHEZ-DIAZ et al., 2016). Embora esta doença é rara, progressiva e fatal (MARGOLIS; ROSS, 2003) e caracteriza-se por distúrbios motores, cognitivos, neuropsiquiátricos e também perda de peso (BATES et al., 2015; MESTRE; FERREIRA, 2012; WALKER, 2007). Tem início comumente entre 30 e 50 anos de idade levando a óbito 15 a 20 anos depois dos primeiros sintomas (MARGOLIS; ROSS, 2003; ROSS; TABRIZI, 2011).

O comprometimento motor pode ser dividido em dois componentes principais: primeiro ddistúrbio dos movimentos, coreia, que acontece normalmente em indivíduos adultos, comumente iniciando nos primeiros estágios da doença e segundo o comprometimento dos movimentos voluntários, dentre eles, descoordenação e bradicinesia, complicação mais expressiva na fase inicial da doença, sendo relatada quando há expansão longa do trinucleotídeo polimórfico citosina-adenina-guanina (CAG), especialmente na DH juvenil e em estágios avançados da doença em adulto (BATES et al., 2015; ROSENBLATT et al., 2012; ROSENBLATT et al., 2006).

Já o déficit cognitivo está associado à patologia cerebral estriado-cortical, similar a demência vascular e a doença de Parkinson, mas difere da doença de Alzheimer (ARETOULI; BRANDT, 2010; PEAVY et al., 2010). Causando problemas de atenção, planejamento, organização e reconhecimento emocional, problema de engajamento social e retardo mental (PAPOUTSI et al., 2014; STOUT et al., 2012; STOUT et al., 2011).

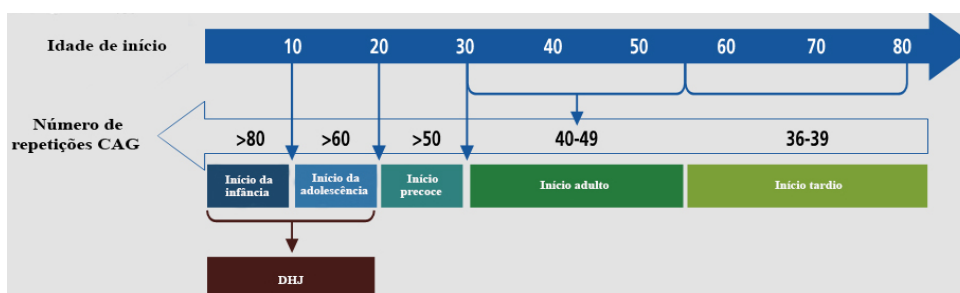
Outros sintomas como perda de massa corporal, distúrbio do sono e disfunção endócrina, também podem ser observados. Com a progressão dos déficits motores e cognitivos tornando-se graves, os pacientes vão a óbito, normalmente por complicações

respiratórias e/ou cardiovasculares, quedas, inanição ou disfagia (WALKER, 2007).

A evolução da DH está relacionada à expansão das repetições do trinucleotídeo polimórfico CAG, que codifica glutamina, no N-terminal da proteína Huntingtina (Htt), que ocorrem no exon 1 do gene huntingtina, originalmente denominado como “Interesting Transcript 15” (IT-15), localizado no cromossomo 4, no braço curto, que codifica a proteína Htt (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

Indivíduos saudáveis apresentam uma média de repetição do trinucleotídeo CAG que varia de 11 a 37, (ANDREW et al., 1993), indivíduos com 37 a 39 repetições, podem ou não desenvolver a doença e com mais de 39 repetições os indivíduos normalmente apresentam a doença. Vale salientar que há uma relação inversa entre o número de repetições CAG e o aparecimento dos sintomas (ANDREW et al., 1993), como mostra a Figura 1.

Figura 1 — Relação do comprimento CAG com a idade



Fonte: Adaptado de Nopoulos, 2016.

Em estudo *in vitro* com linhagem de célula neural, foi possível observar um aumento da atividade das caspases 3 e 7, da morte celular neuronal na presença da cadeia expandida de poliglutamina (poliQ), sugerindo que tanto a presença da poliQ quanto a ausência do alelo normal da Htt pode afetar a diferenciação e/ou sobrevivência neuronal (CONFORTI et al., 2013).

A Htt é uma grande proteína, com uma repetição normal de poliQ com 23 glutaminas (Q23), de aproximadamente 350 kDa, contendo 3144 aminoácidos, amplamente expressa por todo o corpo. Entretanto, os níveis são variáveis dependendo do tipo celular (BATES et al.,

2015). Apesar de sua função normal ser pouco entendida, foi verificado que a Htt pode exercer papel importante na regulação da apoptose, no transporte intracelular, no processo de endocitose (HARJES; WANKER, 2003), e em funções associadas à capacidade de interação com outras proteínas celulares. No desenvolvimento do sistema nervoso, a Htt atua influenciando a produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o transporte e a adesão celular (ZUCCATO; CATTANEO, 2014). Estudos mostraram que a Htt pode estar envolvida no transporte de uma variedade de vesículas, incluindo, vesículas contendo o BDNF, precursores sinápticos e receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA) (TWELVETREES et al., 2010; ZALA; HINCKELMANN; SAUDOU, 2013).

Portanto, a mutação na Htt é responsável pela alteração conformacional da mesma, que é clivada em fragmentos de N-terminal, formando agregados proteicos, inicialmente, dímeros, trímeros ou oligômeros (DIFIGLIA et al., 1997) levando à disfunção e degeneração neurológica em regiões específicas do cérebro, com ocorrência predominante no neostriado (núcleo caudado e ao putâmen). Embora os estudos tenham mostrado uma alta variabilidade na degeneração cerebral o cortex é severamente afetado, principalmente em casos mais avançados da doença (HADZI et al., 2012; PILLAI et al., 2012).

Alguns estudos têm sugerido que a disfunção cortical é um dos mais importantes indicadores da sintomatologia, o que pode acontecer devido à disfunção sináptica cortical, antes mesmo da morte celular (CEPEDA et al., 2007; CUMMINGS et al., 2009). Assim sendo, estudos mostraram que a disfunção cerebral é resultante da maior neurodegeneração tanto no córtex quanto nos gânglios da base (THU et al., 2010; TIPPETT et al., 2007). A grande variedade sintomatológica da DH está relacionada à heterogeneidade natural da neurodegeneração e as principais vias que ocorrem nas diferentes regiões do cérebro. Estando interligadas à perda de interneurônios GABAérgicos e células piramidais nas diferentes regiões corticais e do estriado (MEHRABI et al., 2016; NANA et al., 2014).

O estriado recebe aferência da substância nigra pars compacta, utilizando a dopamina e o glutamato como neurotransmissores. A dopamina exerce ação inibitória sobre os neurônios estriatais que se projetam para o globo pálido, quando atua nos receptores D₂. Por outro lado, a dopamina exerce ação excitatória por atuar nos receptores D₁ (OBESO et al., 2002). Esta região sofre o primeiro processo gradual de atrofia e perda neuronal, sendo os neurônios corticais e estriatais mais susceptíveis à mutação do que os interneurônios GABAérgicos e colinérgicos. Contudo, esse processo ocorre também em outras regiões cerebrais de acordo com a progressão da doença. A morte celular na DH tem forte contribuição do estresse oxidativo e do efeito citotóxico do glutamato (VONSATTEL; DIFIGLIA, 1998).

No circuito, estriado - complexo globo pálido interno - substância nigra pars reticulada, há duas principais maneiras de integração neuronal, via direta e via indireta. A via direta exerce uma conexão monossináptica (córtex - putâmen – globo pálido interno – substância nigra pars reticulada – núcleo talâmico - córtex). Estes neurônios têm por característica conter principalmente receptores dopaminérgicos do tipo D₁ e co-expressar os neuropeptídeos substância P e a dinorfina. E, na via indireta (putâmen – globo pálido externo – substância nigra pars reticulada – tálamo), estes neurônios têm por características expressar principalmente receptores dopaminérgicos do tipo D₂ e o peptídeo encefalina. As projeções do núcleo subtalâmico utilizam o glutamato como neurotransmissor, enquanto que, as do globo pálido para o núcleo subtalâmico utilizam o GABA, que também é utilizado nas projeções para o globo pálido externo (OBESO et al., 2002; WALDVOGEL et al., 2015), como mostrado na Figura 2.

O 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; ROSS, 2001). Com a progressão da doença,

na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como bioprodutos do metabolismo normal, bem como são responsáveis pela regulação da morte celular, incluindo autofagia e apoptose (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012). Portanto, as mitocôndrias desempenham papel essencial para o desenvolvimento neural, bem como na resposta às injúrias (HAGBERG et al., 2014). Entretanto, há pelo menos três principais mecanismos através dos quais a mitocôndria pode causar danos ou induzir a morte da célula hospedeira, nomeadamente através da produção de radicais livres, da sinalização pró-inflamatória ou pela permeabilização da membrana mitocondrial (GREEN et al., 2011).

A disfunção mitocondrial leva à produção excessiva de radicais livres, que são espécies químicas (átomos, moléculas ou íons) geradas tanto como resultado do metabolismo aeróbico celular normal quanto de reações anormais estimuladas por alguns processos patológicos. Os radicais livres são altamente instáveis e extremamente reativos com outras moléculas, que contém um ou mais elétrons desempareados em sua órbita externa. Nos sistemas biológicos, estes radicais são derivados de oxigênio, nitrogênio e moléculas de enxofre (KEHRER; KLOTZ, 2015; LU et al., 2010).

Embora, as EROs tenham papel fundamental para a sobrevivência dos organismos vivos por participarem de processos de defesa, o seu excesso pode produzir danos celulares, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana (lipoperoxidação), promovendo mudanças na estrutura e permeabilidade neuronal, induzindo à morte celular (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001).

Diante disso, a biogênese e o metabolismo mitocondrial podem ser alterados por alguns mecanismos, dentre eles, a interação da mHtt com a proteína relacionada dinamina 1 (DRP1) e a supressão da expressão do coativador-1 α (PGC-1 α) do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma γ (PPAR- γ), um coativador transcricional com implicações na regulação da biogênese mitocondrial, respiração mitocondrial e metabolismo de EROS

(DAMIANO et al., 2013; ST-PIERRE et al., 2006).

Como defesa aos danos causados pela produção excessiva de EROs, as células possuem mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante como a superóxido dismutase, responsável por catalisar a reação de O_2^- em H_2O_2 , a catalase e a glutatona peroxidase, que catalisam a degradação de H_2O_2 em H_2O . Estes mecanismos tem por objetivo neutralizar os agentes oxidantes e mantê-los em homeostase no organismo (LU et al., 2010).

A partir da observação dos sintomas da DH, o seu diagnóstico tem por base a avaliação clínica, histórico familiar (quando disponível) e na maioria dos casos testes genéticos para pesquisar a presença da expansão CAG na Htt. A tríade clínica que caracteriza a condição da DH são: disfunção motora (coreia), déficit cognitivo e alterações neuropsiquiátricas (apatia) (BATES et al., 2015). A DH pode ser classificada em: motora, humor e mix (motora e humor) (MEHRABI et al., 2016). Outras abordagens, as análises de DNA, fornecem observações da expansão CAG no gene Htt podem ser utilizadas para confirmar o diagnóstico em pacientes sintomáticos, como diagnóstico diferencial (FALK et al., 2006; FRANK, 2014).

O sistema nervoso central é susceptível às alterações na homeostase energética devido à alta demanda energética do metabolismo neural. Muitas doenças são associadas ao desequilíbrio do metabolismo energético, incluindo a DH (PATHAK; BERTHET; NAKAMURA, 2013). Para o estudo da DH tem sido utilizados modelos não-genéticos, uma vez que são de fácil manuseio, controle e aquisição. Basicamente, induzem morte celular por mecanismo de excitotoxicidade (ácido caínico e ácido quinolônico) ou alteração do metabolismo mitocondrial (ácido malônico ou ácido 3-nitropropiónico, 3-NP) (TUNEZ et al., 2010).

O 3-NP é uma toxina natural, sintetizada por fungos e plantas, *Aspergillus flavus*; *Arthrinium* e *Indigofera endecapylla*, respectivamente. O 3-NP apresenta alta capacidade de

atravessar a barreira hemato-encefálica, podendo ser utilizado por via sistêmica (TUNEZ et al., 2010). É inibidor seletivo da succinato desidrogenase, comprometendo a atividade do complexo II mitocondrial, causando depleção de ATP e déficit energético e, induzindo em roedores e primatas lesões estriatais e déficits motor e comportamental semelhante ao fenótipo apresentado por humanos com DH (BROUILLET et al., 2005).

3-NP induz toxicidade estriatal, através da degeneração dos neurônios GABAérgico médio-espinhal no estriado, processo semelhante ao observado na DH. As lesões causadas são relativamente específicas ao estriado, embora outras regiões, como hipocampo, tálamo e córtex cerebral também sejam afetadas (BORLONGAN et al., 1997).

Apesar do avanço científico neste tema, a DH continua sem cura. Ademais, não há terapia conhecida capaz de retardar a neurodegeneração e o declínio clínico. Contudo, alguns sintomas podem ser tratados com terapias farmacológicas e/ou não farmacológicas. (DAYALU; ALBIN, 2015). Muitos agentes têm sido estudados quanto à eficácia em retardar a coreia na DH, dentre eles, depletors de dopamina, neurolépticos, anti-glutamatérgicos, inibidores de acetilcolinesterases, agonistas GABA e antidepressivos (PIDGEON; RICKARDS, 2013). Na coreia, o principal sintoma motor está associada a um aumento na função dopaminérgica secundário à neurodegeneração de neurônios GABAérgicos (POON; KANG; LEE, 2010).

A tetrabenazina (TBZ), um agente atuante no sistema nervoso central e depletor de monoaminas, é a única droga aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) para gestão de coreia associada à DH (ARMSTRONG; MIYASAKI; AMERICAN ACADEMY OF, 2012; POON et al., 2010). Contudo, a TBZ depleta outras monoaminas, como serotonina e norepinefrina, não sendo indicada, portanto, em pacientes com elevado grau de ansiedade e depressão (DAYALU; ALBIN, 2015).

Frente ao fato que o tratamento da DH apresenta apenas ação sintomática e modesta

sobre a evolução clínica da doença, algumas moléculas têm sido testadas no intuito de encontrar uma capaz de curar ou retardar a progressão da DH. Diante disso, a utilização de substâncias com atividade antioxidante na terapia, já testada em modelos *in vitro* e *in vivo* com modelos da DH, tem sido considerada uma promissora estratégia terapêutica na pesquisa de novos fármacos para o tratamento da DH (JOHRI; BEAL, 2012).

Estudos realizados em animais e humanos têm indicado que compostos fenólicos e polifenólicos, assim como seus derivados possuem ação antioxidante e são capazes de diminuir o prejuízo neuronal por meio da diminuição do estresse oxidativo, restauração de algumas funções mitocondriais e prevenção de apoptose de neurônios dopaminérgicos (DUTTA; MOHANAKUMAR, 2015; ROSHAN; TAMBO; PACE, 2016).

O ME é um fenilpropanóide cuja fórmula estrutural é mostrada na fig. 3. É uma molécula pequena, altamente lipofílica e não iônica, características estas que conferem sua rápida absorção após a ingestão e um pico de concentração plasmática em aproximadamente 15 minutos, que é seguido de um pico secundário em até 300 minutos. Sua biodisponibilidade por via oral em ratos é considerada baixa ($\leq 9,2\%$), com um tempo de meia vida de aproximadamente 100 minutos, sendo metabolizado por meio de isoenzimas do citocromo P450 e rapidamente excretado na urina (GARDNER et al., 1997; HONG et al., 2013).

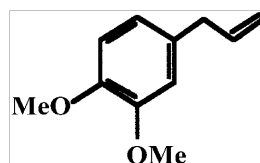
Por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* observou-se ações biológicas do ME, dentre elas, ação anestésica por meio da inativação dos canais de Na^+ periféricos (WANG et al., 2015), antianafilática devido à inibição da liberação de histamina por antígenos específicos, bem como não específicos (SHIN; LEE; KIM, 1997), antinociceptiva baseada na ativação de receptores GABA_A , mecanismo pelo qual pode inibir o desenvolvimento de hiperalgesia via receptores NMDA (YANO et al., 2006), antioxidante e anti-inflamatória por meio da ação direta na eliminação de radicais livres via up-regulation de enzimas antioxidantes como

catalase e a Mn-SOD e pela redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (CHOI et al., 2010).

Contudo, devido a semelhança química com carcinógenos (safrol, isosafrol e estragol), o ME tem sido descrito como tóxico. Entretanto, em estudo realizado em ratos e camundongos foi observada toxicidade moderada, sendo a dose letal mediana de 810-1560 mg/kg e 540 mg/kg, respectivamente (NATIONAL TOXICOLOGY, 2000). Enquanto que estudos de toxicidade prolongada mostraram que os efeitos tóxicos só apareceram quando os animais receberam uma dose muito acima dos níveis consumidos pelos seres humanos (0,49 a 61 μ g/g). As primeiras alterações observadas foram a lesão hepatocelular e o aumento do peso do fígado observado em doses \geq 100 mg/kg (NATIONAL TOXICOLOGY, 2000; STANFILL et al., 2003).

Levando em conta a importante ação do estresse oxidativo na patogênese da DH, a utilização de moléculas antioxidantes como o ME, cuja fórmula estrutural é mostrada na Figura 3, um fenilpropanóide, constituinte natural de plantas aromáticas e seus óleos essenciais, tais como, *Myristica fragans*, *Ocimum basilicum*, *Pimenta officinalis* e *Cinnamomum oliveri*, (DING et al., 2014; LAHLOU et al., 2004) tem despontado como objeto de estudo.

Figura 3 — Fórmula estrutural do ME



Fonte: Lahlou et al., 2004.

2 HIPÓTESE

Em função da ação biológica como antioxidante descrita para o ME, partimos da hipótese que o tratamento com esta substância possa reduzir os déficits comportamentais e histológicos em um modelo animal de DH induzido pelo 3-NP, em ratos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade neuroprotetora do ME frente às alterações comportamentais e histológicas no modelo experimental de DH induzido pela 3-NP, em ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a atividade antioxidante *in vitro* do ME pelos métodos do DPPH, da atividade antioxidante total (AAT) e peroxidação lipídica (pelo método malonaldeído);
- Determinar evolução da massa corporal absoluta e relativa;
- Analisar a possível ação neuroprotetora do ME contra as alterações comportamentais e motoras induzidas pela 3-NP em ratos avaliados nos testes do campo aberto (para avaliação da atividade locomotora), rotarod (para avaliação da coordenação motora).
- Examinar o grau de neurodegeneração por meio da análise histológica no estriado (caudado e putamêm).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Drogas e reagentes

Todos as drogas (ácido 3-nitropropiónico (3-NP), metileugenol (ME), xilazina e quetamina) e reagentes (álcool absoluto, formaldeído, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio bibásico, cloreto de sódio, DPPH, fosfomolibdênio, ácido sulfúrico, molibdato de amônio, metanol, ácido linoleico, tampão fosfato, cloreto ferroso, etanol, tiocianato de amônio e tween 80) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

O 3-NP foi dissolvido no veículo NaCl 0,9% e pH ajustado para 7,4. A manipulação da droga foi realizada em condições de baixa iluminação e imediatamente após, o material foi armazenado ao abrigo da luz. O ME foi diluído em uma solução aquosa de tween 80, a 2%.

4.2 Análise de sobrevivência

A dose da neurotoxina 3-NP foi escolhida baseada na literatura (TUNEZ et al., 2010) e também norteadada por meio de estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (NÓBREGA, 2013), onde um grupo experimental com 15 animais foi tratado com 3-NP 20 mg/kg/dia, por 7 dias e, obteve-se uma taxa de sobrevivência de 60 %.

4.3 Avaliação das atividades antioxidantes *in vitro*

4.3.1 Ensaio do DPPH*

A capacidade de remoção de radicais livres do ME foi realizada usando o ensaio do DPPH (Blios, 1958). Uma alíquota do composto teste, 0,04 mL de diferentes concentrações

(3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/mL) foi misturada com 0,25 mL da solução de DPPH^o em metanol. Após 25 minutos de incubação no escuro foi medida a absorvância colorimetricamente em 517 nm. Quercitina (1, 3 e 5 mg/mL) foi utilizada como padrão. O resultado foi expresso com o percentual de atividade e a IC₅₀ foi calculada.

$$\text{SRL [DPPH] (\%)} = \frac{(\text{Ac} - \text{Aa}) \times 100}{\text{Ac}}$$

Onde: Aa = Absorvância da amostra, Ac = Absorvância do controle e SRL = Sequestro de radicais livres.

4.3.2 Ensaio da atividade antioxidante total

Cem microlitros de cada concentração do ME (5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 mg/mL) foram misturados a 1 mL da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio), e incubados em água a 95 °C por 90 minutos. Após o retorno à temperatura ambiente de cada solução, a absorvância de cada concentração foi mensurada colorimetricamente a 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL do metanol) (Pietro, *et al.*, 1999). A atividade antioxidante total foi calculada pela fórmula:

$$\text{ATT (\%)} = \frac{(\text{Ac} - \text{Aa}) \times 100}{(\text{Aaa} - \text{Ac})}$$

Onde: Ac = Absorvância do controle, Aa = Absorvância da amostra, Aaa = Absorvância do ácido ascórbico e ATT = Atividade antioxidante total.

4.3.3 Ensaio da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada segundo Kikuzaki e Nakatani (1993). Duzentos microlitros de cada concentração do ME (300, 200, 100 e 50 mg/mL), do controle positivo (quercitina) (1, 3 e 5 mg/mL) e do branco (metanol) foram misturados com 0,2 mL

da solução de ácido linoleico (2,5 M), 0,4 mL de tampão fosfato (20 mM, pH 7) e 0,2 mL de água destilada (volume final 1 mL). Posteriormente, foram incubados no escuro por 24 horas, a 40 °C. Após a incubação, 0,05 mL da mistura foi adicionado a 0,05 mL de etanol (75%), 0,05 mL da solução de tiocianato de amônio (0,3 M) e 0,05 mL de solução de cloreto ferroso (20 mM) em um uma placa de microtitulação de fundo chato. Após 3 minutos, foi mensurada a densidade ótica em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 500 nm. A mistura original voltou para incubadora e o experimento foi realizado a cada 24h até 1 dia após o controle positivo atingir o seu valor máximo de absorbância. O resultado foi expresso em porcentagem de inibição e a IC₅₀ foi calculada.

$$I (\%) = \frac{(\text{Abs do controle positivo do último dia} - \text{Abs da amostra no último dia})}{\text{Abs do controle positivo do último dia}} \times 100$$

Onde abs = absorbância e I = inibição.

4.4 Animais

Nos experimentos, foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com 3 meses de idade, e com massa corporal variando entre 300-350 g. Os animais foram obtidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal Pernambuco (UFPE). Os mesmos foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2° C), umidade (55 - 65%) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à ração Presence (Purina, Paulínia, SP, Brasil) e água. O tratamento dos animais foi realizado em sala com controle de temperatura, na fase clara do ciclo e os experimentos na fase escura.

Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados, com parecer sob o número 23076.026092/2017-26 (Anexo 1), na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, que está de acordo com o Concelho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.5 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 5 grupos (com 8 - 10 animais/grupo) e tratados por via oral (v.o.) por sete dias consecutivos com veículo (solução aquosa de tween 80 a 2%) ou ME (5, 15 e 25 mg/kg). Após 15 minutos, 3-NP ou NaCl 0,9% foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) por 7 dias consecutivos, formando os seguintes grupos:

- Grupo controle: solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e NaCl 0,9% (i.p.);
- Grupo DH: solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e 3-NP (i.p.);
- Grupo 3, 4 e 5: metileugenol 5, 15 e 25 mg/kg (v.o.) e 3-NP (i.p.).

4.6 Evolução da massa corporal

A massa corporal foi observada diariamente, por meio de balança eletrônica (TORREY, modelo: L-PCR-20), para o cálculo de sua variação (absoluta e relativa) e para ajuste das doses. O cálculo foi realizado segundo a fórmula abaixo:

$$\Delta \text{ de ganho de massa} = \frac{(\text{massa do 9}^\circ \text{ dia} - \text{massa do 1}^\circ \text{ dia}) \times 100 (\%)}{\text{massa do 9}^\circ \text{ dia}}$$

e

$$\Delta \text{ de ganho de massa} = (\text{massa do 9}^\circ \text{ dia} - \text{massa do 1}^\circ \text{ dia}) (\text{g})$$

4.7 Testes Comportamentais

Após 24 h do último pré-tratamento, foram realizados os testes comportamentais.

4.7.1 Avaliação do efeito do ME sobre atividade locomotora no teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado com o objetivo de avaliar a motricidade e atividade exploratória dos animais segundo o procedimento descrito por Nowak (2003). O aparelho usado constitui-se de uma arena circular (um círculo de madeira com 90 cm de diâmetro e parede com 31,5 cm de altura). As paredes e o piso da arena são todos brancos, o piso é dividido com linhas pretas em 20 pequenos quadrantes (Figura 4). O aparato foi colocado em uma sala escurecida, tendo a intensidade de luz aferida com luxímetro digital (Minipa, MLM-1011), onde foi observado 1 lux. Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto e seu comportamento foi avaliado por 5 minutos, de acordo com os parâmetros: frequência de locomoção (penetrar em uma unidade de quadrante com as quatro patas), levantar (retirada das duas patas dianteiras, com apoio ou não das mesmas sobre a parede do campo, e se apoiando sobre as patas traseiras), tempo de imobilidade (ausência de atividade motora, permanecendo estático em relação à cabeça, ao tronco, às patas e a cauda), tempo de latência para início do movimento (tempo que o animal levou para sair do primeiro quadrante no centro da arena) e total de limpeza.

Os tempos de imobilidade e latência para o início do movimento foram mensurados com auxílio de cronômetro. Após a retirada de cada animal, a arena foi limpa com uma solução de álcool a 5% (NOWAK et al., 2003).

Figura 4 — Teste do campo aberto



Fonte: Lopes et al, 2017

4.7.2 Avaliação do efeito do ME sobre atividade locomotora no teste do teste rotarod

O teste do rotarod é uma metodologia utilizada para avaliar a coordenação motora do animal, por meio do tempo de permanência deste em uma barra giratória com 7,0 cm de diâmetro, elevada 25 cm acima do piso em 25 rotações por minuto (rpm) (Figura 5). Para a execução do teste, cada animal foi previamente submetido a duas sessões de 60 segundos para aclimatização ao equipamento antes da indução/tratamento. Foram utilizados apenas os animais que conseguiram ficar mais de 60 segundos andando sobre a barra giratória durante o treinamento. Após o período de pré-tratamento, os animais foram submetidos novamente ao equipamento por um período de 180 segundos, e o tempo de permanência foi registrado (KUMAR; KUMAR, 2009).

Figura 5 — Teste do rotarod



Fonte: Lopes et al, 2017

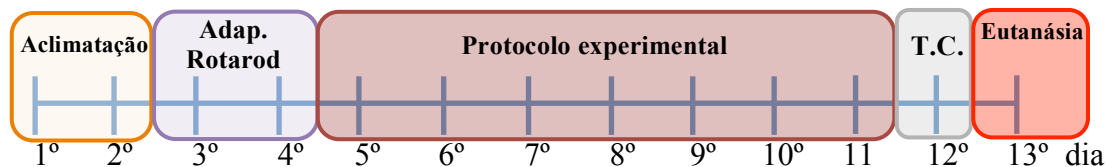
4.8 Dissecção da área cerebral núcleo estriado (caudado, putâmem e globo pálido) e posterior análise histológica

Ao final do período de experimentação, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com xilazina, 6 mg/kg + quetamina, 60 mg/kg e eutanasiados por decapitação cervical. Em seguida, os cérebros foram removidos e fixados em formaldeído 10% por 24 horas, em seguida colocados em álcool 70%. As amostras foram emblocadas em parafina e seccionadas em 5 μ m de espessura usando micrótomo. Foram feito cortes coronais na altura do núcleo estriado e posteriormente coradas com hematoxilina e eosina e examinada quanto a alterações histopatológicas usando microscópio óptico.

4.9 Desenho experimental dos testes comportamentais

O protocolo foi realizado no intervalo de 13 dias, constituído pelos períodos de aclimação, adaptação ao rotarod, protocolo experimental, testes comportamentais, repetição do teste do labirinto e eutanásia, como mostra a figura 6.

Figura 6 — Desenho experimental



T.C. = testes comportamentais (labirinto T elevado, campo aberto e rotarod)

Fonte: Autor

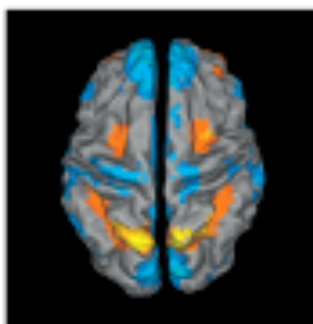
4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) ou mediana + intervalo interquartil, quando necessário. A análise estatística foi realizada utilizando Graph Pad Prism 5.0. (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinar a normalidade. A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo pós-teste de Dunnett's ou pelo teste de Kruskal-Wallis, para dados não-paramétricos, seguido pelo pós-teste de Dunn's. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADO - ARTIGO ORIGINAL

Artigo a ser enviado para revista Brain Research

Brain Research



ISSN: 0006-8993

Normas de submissão da revista: <https://www.elsevier.com/journals/brain-research/0006-8993/guide-for-authors>

Methyleugenol effect against the behavioral and histological changes in a Huntington disease model induced by 3-nitropropionic acid in Wistar rats

**DAÍLLO LOPES ^a, HYAGO TEIXEIRA ^b, VICTOR SALES ^c, BÁRBARA RAMOS ^d,
JAMILKA DA SILVA ^b, FÁBIO MENDONÇA ^e, JOAQUIM NETO ^e, ALMIR
WANDERLEY ^c**

^a Postgraduation in Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity, CAV – UFPE, Brazil

^b Department of Pharmaceutical Science, UFPE, Brazil

^c Department of Physiology and Pharmacology, UFPE, Brazil

^d Department of Biochemistry, UFPE, Brazil

^e Department of Animal Morphology and Physiology, UFRPE, Brazil

Abstract

Huntington disease (HD) is a neurological disturb caused by degeneration of striatal neurons. 3-nitropropionic acid (3-NP) is an experimental model of HD. Substances that have antioxidant activity can reduce the behavioral changes of HD. Therefore, the methyleugenol (ME) was investigated whether will be able to mitigate behavioral parameters in experimental HD induced by 3-NP in wistar rats. Groups (8 – 10) were treated over 7 days with water or ME (5, 15 and 25 mg/kg, p.o.) and 15 minutes after, they received 3-NP (20 mg/kg, i.p.) or 0.9% NaCl 24 hours after treatment, the animals were submitted to behavioral tests and histological analyzes from central nervous system (CNS). The data shown that ME15 = - 21 g reduced the body mass loss induced by 3-NP (control = - 72 g), the locomotor activity (control = 2 quad vs ME15 = 32 quad), motor coordination (control = 5 sec vs ME15 = 92 sec), immobility time (control = 215 sec vs ME15 = 134.5 sec), latency time (control = 14 sec vs ME15 = 3 sec), memory retention (control = 0 % vs ME15 = 26.9 % and ME25 = 80.4 %). In the histological analyzes, the striatal changes induced by 3-NP were mitigated by treatment with ME15. In summary, the ME shown possible protector effect against behavioral and histological changes induced by 3-NP which were initially correlated with its antioxidant activity.

Keywords: antioxidant; neurodegenerative disease; neuroprotection; oxidative stress

1. Introduction

Huntington's disease is a chronic neurodegenerative disturb, caused by an increase of trinucleotide cytosine-adenine-guanine (CAG) repeats into exon 1 of Huntington's gene leading to the mutant Huntingtin (mHtt) with an autosomal dominant pattern of inheritance (Sanchez-Diaz et al., 2016). The symptoms normally develop around 30 – 50 years old with progressive course leading to death 15 – 20 years after the onset (Ross and Tabrizi, 2011). The main characteristics are disorders that can be divided in motors, cognitive, neuropsychiatric and weight loss (Bates et al., 2015; Mestre and Ferreira, 2012).

Healthy people have less than 27 repetitions of CGA, when displaying 27 – 35 repeats there hardly will be expansion and will not develop HD, 36 – 39 repeats exhibit variable penetration power and over than 39 repeats have high penetration power (Margolis and Ross, 2003).

The symptoms arise, in part, due to cellular dysfunction and degeneration in brain-specific regions, such as neostriatum, which corresponds to the caudate and putamen nucleus. However, others regions from basal ganglia and cortex are affected, mainly in advanced disease course (Hadzi et al., 2012; Pillai et al., 2012). The symptomatology can emerge by of metabolism and mitochondrial biogenesis changes induced by the interaction between mHtt with dynamin-related protein 1 (DRP1) changing the transport and mitochondrial fusion, inhibiting the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) leading to alterations on mitochondrial respiratory regulations and reactive species metabolism (Damiano et al., 2013; St-Pierre et al., 2006).

Nowadays, HD continues without cure. However, with treatment, that consists in specific methods for specific symptoms and some without pharmacology strategy. Thus, the oxidative stress caused by mitochondrial dysfunction associated to the pathogenic expansion of CAG trinucleotide regulates cellular neuronal and non-neuronal death. Although, those effects can be attenuated by treatment with antioxidant substances (Valencia et al., 2012).

The methyleugenol (ME) is a phenylpropanoid, analogue of eugenol and natural constituent of a numerous essential oils from aromatic plants, among, *Myristica fragrans* H. (Myristicaceae), *Ocimum basilicum* L. (Laminaceae) and *Pimenta officinalis* Lindl. (Myrtaceae) (Lahlou et al., 2004). Some pharmacological properties have already been demonstrated from ME, such as, anesthetic (Wang et al., 2015), antianaphilactic (Shin et al., 1997), antinociceptive (Yano et al., 2006), antioxidant and anti-inflammatory activity (Choi et al., 2010).

Taking into consideration the activities listed above, among others, demonstrated anti-inflammatory and antioxidant capacity, it seemed important to us to analyze whether ME would be able to exert a neuroprotective action against some behavioral changes induced by 3-NP in experimental model HD.

2. Results

2.1 *in vitro* Antioxidant activities

Firstly, ME's antioxidant capacity was measured by different methods, such as DPPH, TAA, Lipid Peroxidation. In these assays, ME showed a concentration that inhibits 50 % of radical (IC₅₀) of 7.56; 1.01 and 55.48 mg/mL, respectively, as shown in table 1.

Table 1. Effect of methyleugenol on the *in vitro* antioxidant activities.

Samples	DPPH IC₅₀ (mg/mL)	TAA IC₅₀ (mg/mL)	Lipid Peroxidation IC₅₀ (mg/mL)
ME	7.26 (7.00 a 7.52)	1.01 (0.89 a 1.15)	55.48 (48.91 a 62.93)
quercitin	0.02 (0.02 a 0.02)	0.50 (0.44 a 0.56)	6.70 (4.33 a 10.36)

The values in parentheses indicate the variation coefficient. TAA: total antioxidant activity, DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydazyl and IC₅₀: concentration that inhibits 50% of radical.

2.2 Effect of ME on absolute and relative body mass in rats treated with 3-NP

The systemic treatment with 3-NP over seven days induced significant reduction on rat body mass when compared vehicle group. Further, the body mass reduction of rats treated with 3-NP was significantly attenuated with a ME pretreatment (15 mg/kg, p.o.) when compared to the control group (p<0.05), as shown in figure 1A. The same standard changes were observed on relative mass, as shown in figure 1B.

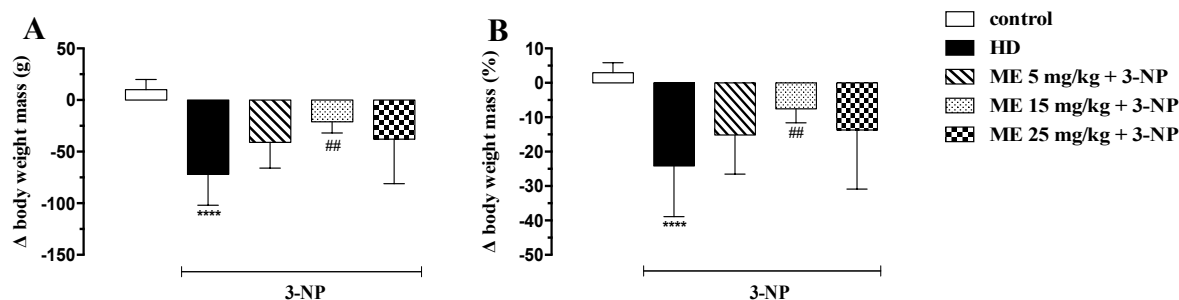


Fig 1. ME pretreatment effect (5, 15, 25 mg/kg, p.o.) on rat body mass in the HD experimental model induced by 3-NP (20 mg/kg, i.p). (A) Absolute body mass (g) and (B) relative body mass (%). Data was expressed as median \pm interquartile range (n = 8 – 10/group). The differences between the groups were determined by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. ## p < 0.01 vs control group, **** p < 0.0001 vs vehicle group. The vehicle group received 2% tween 80 water solution (p.o.) and 0.9 % NaCl solution (i.p).

2.3 Behavioral tests

2.3.1 Effect of ME on the 3-NP induced alterations in the locomotor activity evaluated in the open field test

After 3-NP induction, the animals demonstrated a significant reduction in the number of quadrants crossed (fig. 2A) and in rearing number (fig. 2B), increase on latency (fig. 2C) and immobility time (fig. 2D) when compared to vehicle group. However, the number of quadrants crossed was significantly increased and the immobility time was reduced by the pretreatment with ME (15 mg/kg) when compared to control group. Already, the latency time was attenuated by ME (5 mg/kg, p.o.) when compared to control group (fig 2C). Although, the exploratory activity was not attenuated by ME (fig. 2B).

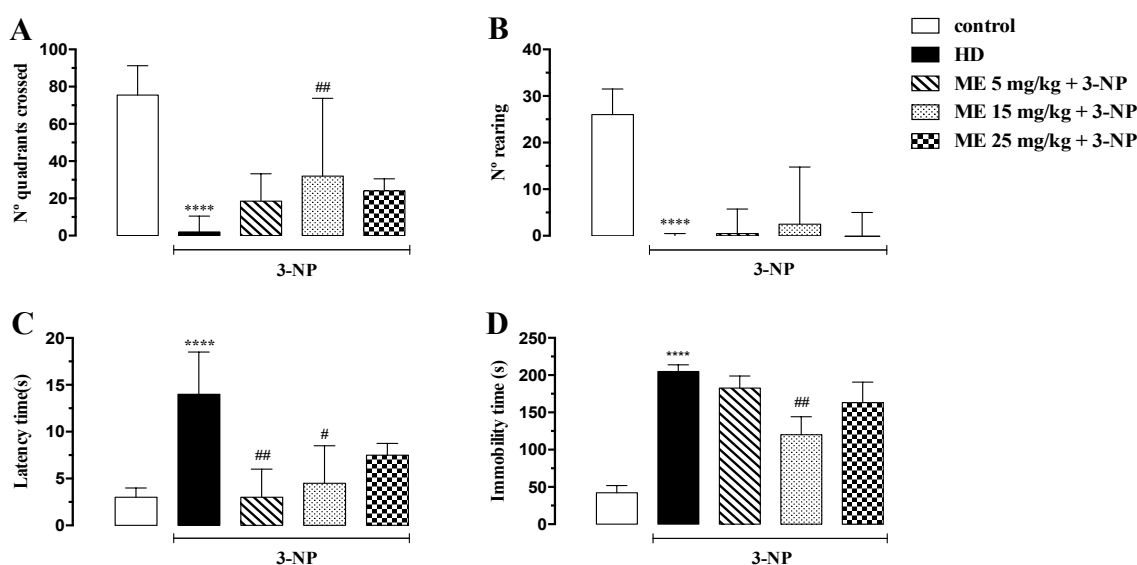


Fig 2. ME pretreatment effect (5, 15, 25 mg/kg, p.o.) on locomotor activities (A), rearing (B), latency (C) and immobility time (D) on open field test in experimental rats with HD induced by 3-NP (20 mg/kg, i.p). The data

was expressed as median \pm interquartile range (figures A, B and C) and as mean \pm SEM (figure D), (n = 8 – 10/group). The differences between groups were determined by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test for figures A, B and C, and by one-way Anova test, followed by Dunnett's test for figure D. ## p < 0.01 vs control group and **** p < 0.0001 vs vehicle group. The vehicle group received 2 % tween 80 water solution (p.o.) and 0.9 % NaCl solution (i.p).

2.3.2 Effect of ME on the 3-NP induced alterations in the motor coordination evaluated in the rotarod test

The systemic administration of 3-NP during seven days displayed a significant decrease on permanency time at the rolling bar when compared to vehicle group. However, the pretreatment with ME (15 mg/kg, p.o.) reduced this effect on motor coordination when compared to control group, as shown in fig. 3.

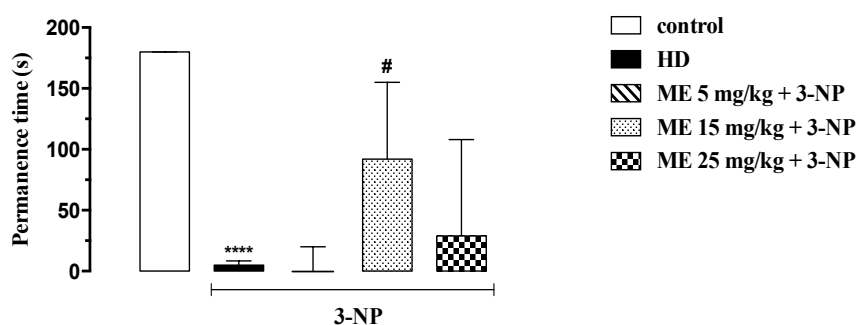


Fig 3. Effect of ME pretreatment on 3-NP induced changes in locomotor activities and motor coordination on rotarod test in experimental rats with HD induced by 3-NP (20 mg/kg i.p). The data was expressed as median \pm interquartile range (n = 8 – 10/group). The differences between the groups were determined by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test. # p < 0.05 vs control group and **** p < 0.0001 vs vehicle group. The vehicle group received 2% tween 80 water solution (p.o.) and 0.9 % NaCl solution (i.p).

2.4 Histological analysis

In the figure 5, A (caudate) and B (putamen and globus pallidus) correspond to vehicle group, where is possible to see intact neurons in normal quantity without neuropil vacuolization. When compared vehicle group with control group it can be seen that caudate has less neurons and more oligodendrocyte (fig. C), and putamen is characterized by neuropil vacuolization, in addition necrotic neurons with pycnotic nucleus, astrogiosis and microgliosis (fig. D). In the globus pallidus, the changes were similar to seen in putamen (fig. D). However, these change patterns were attenuated by pretreatment with ME (15 mg/kg). Although, not all animals had the expected protection, around 75% of animals showed caudate nucleus (fig. E), putamen and globus pallidus (fig F) with more neurons and without vacuolization when compared to control group (fig. C and D).

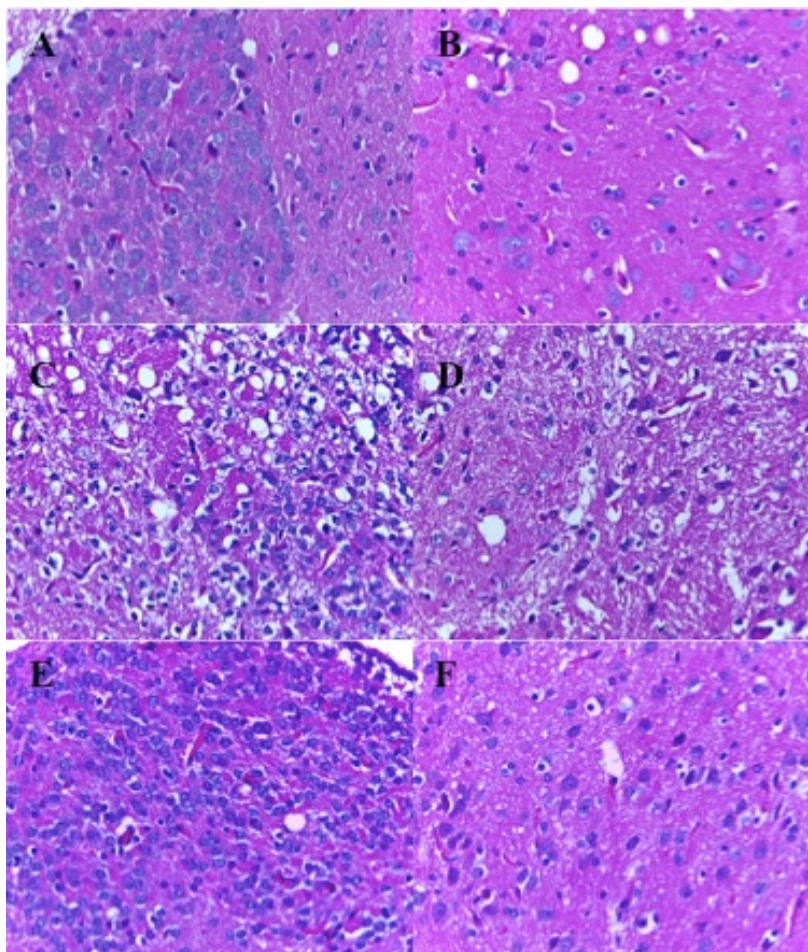


Fig 5. Effect of ME on 3-NP induced alterations in histological observations in the striatum of vehicle and experimental rats. Vehicle group exhibited normal histology (A and B, 400x). 3-NP induced depicted severe neuropyl vacuolization and neuronal degeneration (C and D, 400x). ME + 3-NP exhibited healthy neurons with few damaged cells and without vacuolization (E and F, 400x).

3. Discussion

In this study, the pharmacological capacity of ME at central level was evaluated against behavioural and histological changes induced by systemic treatment with 3-NP neurotoxin, that has as main effect inhibition of succinate dehydrogenase result of its structural similarity with succinate, an endogenous substrate, (REYNOLDS and LIN, 2000), mimicking some HD's symptoms, including memory deficit, hypokinesia, impairment of gait and loss of body mass (WANG et al., 2017). Thus, firstly, we evaluated the antioxidant potential *in vitro* of ME, using three different methodologies. It was performed a method which evaluates the free radical scavenging through electron donation. It was chosen the DPPH[•] test. Then, the total antioxidant activity, which evaluates the reduction of metallic ions, that quantitatively determines the antioxidant capacity through the formation of the phosphomolybdenum complex, was evaluated. This test consists in the reduction of Mo (VI) to Mo(V) and the

subsequent formation of a molybdenum phosphate complex, Mo (V), which has the green coloration at acid pH (SHABBIR et al., 2013).

Finally, it has been performed the lipid peroxidation inhibition test which consists of the induction of lipid peroxidation of a fatty acid, it was used the linoleic acid. If there is antioxidant product in the medium, there is inhibition in the production of peroxy radicals (LOOH^{*}). Thus, the ME showed antioxidant activity corroborating previous studies in vitro with neuronal cell culture (CHOI et al., 2010), in RAW264.7 cell culture, where was observed an inhibition of reactive oxygen species (ROS) generation, glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) depletion (ZHOU et al., 2017). Eugenol, an ME analogue, shown antioxidant and anti-inflammatory activity in LPS stimulated RAW264.7 cells (MURAKAMI et al., 2017).

After that, the pretreatment period was started. The ME's doses were chosen based on previous work, which used the precursor eugenol and on the pharmacokinetics characteristics already described for ME (HONG et al., 2013). In all analyzes the systemic administration of 3-NP induced behavioral impairment, as well as loss of body mass when compared to vehicle group. This impairment is justified due to neurotoxin action that inhibits the mitochondrial complex II, breakdown of energetic metabolism with increase production of free radicals, oxidative stress and striatal and cortical damage (BINAWADE and JAGTAP, 2013; CHO and KIM, 2015).

It may be noted that there was a significant loss of body mass in the group that was treated just with 3-NP when compared to vehicle group. Maybe, this loss result of mitochondrial dysfunction leading to metabolic dysfunction, mobilization of energy stocks and causing reduced appetite and food intake (KUMAR and KUMAR, 2009). However, when the animals were previously treated with ME 15 mg/mL this consequence was significantly attenuated, suggesting that the metabolic damage caused by the neurotoxin was mitigated by ME, possibly due to its antioxidant action.

In these behavioral evaluations, it may be noted that the animals treated just 3-NP shown impairment locomotors and exploratory activities and cognitive function when compared to vehicle group. The striatal damage and bradykinesia induced by 3-NP can be, partly, responsible for reducing behavioral activities (GUYOT et al., 1997). However, the locomotors activities (seen in the open field), motor coordination (seen in the rotarod) were improved by pretreatment with ME 5 and 15 mg/kg, suggesting that damage and the bradykinesia were mitigated by treatment. Furthermore, studies shown that phenolic compounds have anti-amyloidogenic effect on amyloid β -protein (AB) in addition to well-

known anti-oxidative and anti-inflammatory effects, hence suggesting their potential as therapeutic and/or preventive agents for cerebral A β amyloidosis, including Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy (CAA) (YAMADA et al., 2015) and reduce behavioral changes induced by 3-NP neurotoxin, as for example the chrysin (THANGARAJAN et al., 2016).

Some data corroborate the idea which behavioral symptoms of HD were associated with striatal damage and breakdown in homeostatic balance of dopamine (CHEN et al., 2013; JAMWAL and KUMAR, 2016). The HD has as main neuropathological factor the loss of striatal medium spiny neurons (Vonsattel and DiFiglia, 1998). Data shows that striatal medium spiny neurons corresponds at 90 – 95% of all striatal neurons and the others 5 – 10 % are the interneurons which can be divide in two main groups: GABAergic and cholinergic interneurons (CHEN et al., 2013) and they play a fundamental role in pathophysiological mechanism of HD (GARDONI and BELLONE, 2015).

The damage caused in striatum is the main feature of motor impairment associated to HD (JEON et al., 2016). In the histological evaluation was noted that animal treated just 3-NP shown histological changes when compared to vehicle group. However, this neuronal damage was attenuated by treatment with ME. In addition phenolic compounds, such as vanillin and 4-hydroxybenzyl alcohol enhanced cell proliferation, neuroblast differentiation and integration of granule cells in the dentate gyrus of adolescent mice (CHO et al., 2016) and chrysin that was be able to reduced the neuronal cell damage induced by 3-NP (THANGARAJAN et al., 2016).

In summary, on this study, the protective effect of ME against 3-NP induced neurotoxicity in Wistar rats had yielded more significant findings in some behavioral parameters and histological changes. Based on results showed in this study, it can be suggested that ME could have neuroprotective effect possibly through its antioxidant activity as shown in the free radical scavenging activity, total antioxidant activity and lipid peroxidation, improved behavioral parameters and reducing the neuronal cell damage as shown in the histological analyzes.

4. Material and methods

4.1 Reagents

All drugs (3-nitropropionic acid (3-NP), methyleugenol (ME), xylazine and ketamine) and reagents (absolute alcohol, formaldehyde, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate bibasic, sodium chloride, DPPH, phosphomolybdenum, sulfuric acid, ammonium molybdate, methanol, linoleic acid, phosphate buffer, ammonium thiocyanate, ferrous chloride, ethanol and tween 80) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

ME was dissolved in 2% tween 80 and diluted in water and 3-NP was diluted using 0.9% NaCl solution and the pH was adjusted to 7.4. The manipulation was performed under conditions of low light then it was stored without light.

4.2 Antioxidant activities *in vitro*

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay

The free radical removing capacity of ME was performed by using DPPH assay. An aliquot of compound test, 0.04 mL, at various concentration (3.125; 6.25; 12.5; 25; 50 e 100 mg/mL) was mixed with 0.25 mL of DPPH solution in methanol. After that the incubation without light of the mixture for 25 min, the absorbance was determined colorimetrically at 517 nm (BLOIS, 1958). Quercetin was used as a standard. The results were expressed with a percentage activity and the concentration that inhibits 50 % of radical (IC₅₀) was calculated.

Total Antioxidant Activity (TAA) assay

One hundred microliters of each concentration of ME (5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.3125 mg/mL) were mixed with 1 mL of phosphomolybdenum solution (600 mM of sulfuric acid, 28 mM of sodium phosphate and 4 mM of ammonium molybdate), and incubated in water 95° C for 90 min. After returned to room temperature, the absorbances of each concentration were measured colorimetrically at 695 nm (PRIETO et al., 1999). Quercetin was used as standard. Results were expressed as percentage activity and IC₅₀ was calculated.

Lipid Peroxidation

Two hundred microliters of each concentration of ME (300, 200, 100 and 50 mg/mL), positive control (quercetin) in different concentrations (1, 3 and 5 mg/mL) and white (methanol solution) were mixed with 0.2 mL of linoleic acid solution (2.5 M), 0.4 phosphate

buffer (20mM, pH 7.0) and 0.2 of distilled water (final volume 1 mL). After that, they were incubated without light for 24 hours in 40° C. Then, 0.05 mL of mixture were added to 0.05 mL of ethanol (75%), 0.05 mL of ammonium thiocyanate solution (0.3 M) and 0.05 mL of ferrous chloride solution (20 mM) in a flat background microtiter plate. After 3 minutes, the optic density was measured in spectrophotometer in 500 nm. Then, the original mixture returned from incubation and the experiment was performed each 24 hour until one day that positive control get its maximum value of absorbance (KIKUZAKI and NAKATANI, 1993). The results were expressed in percentage inhibition and the IC50 was calculated.

4.3 Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus var. albinus*) weighing up between 300 – 350 g and 90 days of life were used for neuroprotective experiments. The animals were obtained at the Department of Physiology and Pharmacology from the Federal University of Pernambuco (UFPE). They 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 Presence (Purina, Paulínia, SP, Brazil) *ad libitum*. All experimental methods were submitted and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the UFPE, under license 23076.026092/2017-26 in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

4.4 Experimental groups

The animals were randomly divided in 5 groups (n = 8 – 10/group) and they were pretreated for seven days. They received vehicle (water 10 mL/kg, p.o.) or ME as pretreatment. Fifteen minutes after, they received administration of the mitochondrial neurotoxin 3-NP (20 mg/kg, i.p.) for induce HD or vehicle 0.9% NaCl solution, i.p.

Group 1 (control): received vehicle p.o. and 0.9% NaCl solution i.p.

Group 2 (HD): received vehicle p.o. and 3-NP i.p.

Group 3 (ME 5 mg/kg): received ME p.o. and 3-NP i.p.

Group 4 (ME 15 mg/kg): received ME p.o. and 3-NP i.p.

Group 5 (ME 25 mg/kg): received ME p.o. and 3-NP i.p.

4.5 Body weight measurement

Each animal was weighed prior of the daily treatment of ME, vehicle and 3-NP.

4.6 Behavioral tests

4.6.1 Open field test

Open field apparatus is a circle made of wood, 90 cm in diameter and the floor divided in 20 quadrants. This test was performed in a darkened room, the light was measured by digital lux meter showing up 0-lux. Each animal was allowed to occupy the center of the open field, the start time for first movement (latency), number of squares crossed (locomotor behavior), rearing numbers, immobility time (exploratory behavior) and grooming numbers were measured through direct visual observation for 5 min (NOWAK et al., 2003).

4.6.2 Rotarod activity

All animals were evaluated for motor ability and balance by using the rotarod apparatus (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The rats were done two training session before initialization of therapy to acclimate them to rotarod apparatus. Rats were placed on the rotating rod with a diameter of 7 cm (speed 25 rpm). The cut off time was 3 minutes. Each rat was analyzed, and the animal permanency time was record (KUMAR and KUMAR, 2009).

4.7 Histological analysis

After experimental period, the animals were anesthetized intraperitoneally with xylazine, 6 mg/kg + ketamine, 60 mg/kg. Then, they were euthanized by cervical decapitation. After that, the brain was removed and fixed in 10% formaldehyde for 24 hours. Then, they were put in 70% alcohol. After, they were embedded in paraffin blocks and sectioned at 5 μ m thickness using microtome. The obtained sections were stained with hematoxylin and eosin and examined for histological changes in the striatum nucleus (caudate, putamen and globo pallidos) using optical microscope.

4.8 Statistical analysis

Data expressed as mean \pm S.E.M for parametric data and it was expressed as median with interquartile range for non-parametric data. The statistical analyzes was performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). The Kolmogorov-Smirnov test was used for measuring the normality. The differences between groups was assessed by one-way ANOVA followed by Dunnet's for parametric data or Kruskal-Wallis followed by Dunn's for non-parametric data. The significance level accepts was 5% ($p \leq 0.05$).

5. Acknowledgement

The study described in this article was supported by CAPES and Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

6. References

- Bates, G.P., Dorsey, R., Gusella, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scahill, R.I., Wetzel, R., Wild, E.J., Tabrizi, S.J., 2015. Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers*. 1, 15005.
- Binawade, Y., Jagtap, A., 2013. Neuroprotective effect of lutein against 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like symptoms: possible behavioral, biochemical, and cellular alterations. *J Med Food*. 16, 934-43.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181, 1199-1200.
- Chen, J.Y., Wang, E.A., Cepeda, C., Levine, M.S., 2013. Dopamine imbalance in Huntington's disease: a mechanism for the lack of behavioral flexibility. *Front Neurosci*. 7, 114.
- Cho, J.H., Park, J.H., Ahn, J.H., Lee, J.C., Hwang, I.K., Park, S.M., Ahn, J.Y., Kim, D.W., Cho, J.H., Kim, J.D., Kim, Y.M., Won, M.H., Kang, I.J., 2016. Vanillin and 4-hydroxybenzyl alcohol promotes cell proliferation and neuroblast differentiation in the dentate gyrus of mice via the increase of brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin-related kinase B. *Mol Med Rep*. 13, 2949-56.
- Cho, K.J., Kim, G.W., 2015. Differential caspase activity in the cortex and striatum with chronic infusion of 3-nitropropionic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 465, 631-7.
- Choi, Y.K., Cho, G.S., Hwang, S., Kim, B.W., Lim, J.H., Lee, J.C., Kim, H.C., Kim, W.K., Kim, Y.S., 2010. Methyleugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression of oxidative injury and inflammation. *Free Radic Res*. 44, 925-35.
- Damiano, M., Diguët, E., Malgorn, C., D'Aurelio, M., Galvan, L., Petit, F., Benhaim, L., Guillermier, M., Houitte, D., Dufour, N., Hantraye, P., Canals, J.M., Alberch, J., Delzescaux, T., Deglon, N., Beal, M.F., Brouillet, E., 2013. A role of mitochondrial

- complex II defects in genetic models of Huntington's disease expressing N-terminal fragments of mutant huntingtin. *Hum Mol Genet.* 22, 3869-82.
- Gardoni, F., Bellone, C., 2015. Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Front Cell Neurosci.* 9, 25.
- Guyot, M.C., Palfi, S., Stutzmann, J.M., Maziere, 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, 141-9.
- Hadzi, T.C., Hendricks, A.E., Latourelle, J.C., Lunetta, K.L., Cupples, L.A., Gillis, T., Mysore, J.S., Gusella, J.F., MacDonald, M.E., Myers, R.H., Vonsattel, J.P., 2012. Assessment of cortical and striatal involvement in 523 Huntington disease brains. *Neurology.* 79, 1708-15.
- Hong, S.P., Fuciarelli, A.F., Johnson, J.D., Graves, S.W., Bates, D.J., Waidyanatha, S., Smith, C.S., 2013. Toxicokinetics of methyleugenol in F344 rats and B6C3F(1) mice. *Xenobiotica.* 43, 293-302.
- Jamwal, S., Kumar, P., 2016. Spermidine ameliorates 3-nitropropionic acid (3-NP)-induced striatal toxicity: Possible role of oxidative stress, neuroinflammation, and neurotransmitters. *Physiol Behav.* 155, 180-7.
- Jeon, J., Kim, W., Jang, J., Isacson, O., Seo, H., 2016. Gene therapy by proteasome activator, PA28gamma, improves motor coordination and proteasome function in Huntington's disease YAC128 mice. *Neuroscience.* 324, 20-8.
- Kikuzaki, H., Nakatani, N., 1993. Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents. *Journal of Food Science.* 58, 1407-1410.
- 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. *Behav Pharmacol.* 17, 485-92.
- Kumar, P., Kumar, A., 2009. Possible role of sertraline against 3-nitropropionic acid induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33, 100-8.
- Lahlou, S., Figueiredo, A.F., Magalhaes, P.J., Leal-Cardoso, J.H., Gloria, P.D., 2004. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats. *Life Sci.* 74, 2401-12.
- Margolis, R.L., Ross, C.A., 2003. Diagnosis of Huntington disease. *Clin Chem.* 49, 1726-32.
- Mestre, T.A., Ferreira, J.J., 2012. An evidence-based approach in the treatment of Huntington's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 18, 316-20.
- Murakami, Y., Kawata, A., Fujisawa, S., 2017. Expression of Cyclooxygenase-2, Nitric Oxide Synthase 2 and Heme Oxygenase-1 mRNA Induced by Bis-Eugenol in RAW264.7 Cells and their Antioxidant Activity Determined Using the Induction Period Method. *In Vivo.* 31, 819-831.
- Nowak, G., Szewczyk, B., Wieronska, J.M., Branski, P., Palucha, A., Pilc, A., Sadlik, K., Piekoszewski, W., 2003. Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. *Brain Res Bull.* 61, 159-64.
- Pillai, J.A., Hansen, L.A., Masliah, E., Goldstein, J.L., Edland, S.D., Corey-Bloom, J., 2012. Clinical severity of Huntington's disease does not always correlate with neuropathologic stage. *Mov Disord.* 27, 1099-103.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 269, 337-41.

- Reynolds, N.C., Lin, W., 2000. The Neurochemistry of 3-Nitropropionic Acid. In *Mitochondrial Inhibitors and Neurodegenerative Disorders*. Vol., P.R. Sanberg, H. Nishino, C.V. Borlongan, ed.^eds. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 35-49.
- Ross, C.A., Tabrizi, S.J., 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* 10, 83-98.
- Sanchez-Diaz, G., Arias-Merino, G., Villaverde-Hueso, A., Morales-Piga, A., Abaitua-Borda, I., Hens, M., Bermejo-Sanchez, E., Posada de la Paz, M., Alonso-Ferreira, V., 2016. Monitoring Huntington's Disease Mortality across a 30-Year Period: Geographic and Temporal Patterns. *Neuroepidemiology.* 47, 155-163.
- Shabbir, M., Khan, M.R., Saeed, N., 2013. Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Maytenus royleanus* leaves. *BMC Complement Altern Med.* 13, 143.
- Shin, B.K., Lee, E.H., Kim, H.M., 1997. Suppression of L-histidine decarboxylase mRNA expression by methyleugenol. *Biochem Biophys Res Commun.* 232, 188-91.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R., Spiegelman, B.M., 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 127, 397-408.
- Thangarajan, S., Ramachandran, S., Krishnamurthy, P., 2016. Chrysin exerts neuroprotective effects against 3-Nitropropionic acid induced behavioral despair-Mitochondrial dysfunction and striatal apoptosis via upregulating Bcl-2 gene and downregulating Bax-Bad genes in male wistar rats. *Biomed Pharmacother.* 84, 514-525.
- Valencia, A., Sapp, E., Reeves, P.B., Alexander, J., Masso, N., Li, X., Kegel, K.B., DiFiglia, M., 2012. Reagents that block neuronal death from Huntington's disease also curb oxidative stress. *Neuroreport.* 23, 10-5.
- Vonsattel, J.P., DiFiglia, M., 1998. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 57, 369-84.
- Wang, L., Wang, J., Yang, L., Zhou, S.M., Guan, S.Y., Yang, L.K., Shi, Q.X., Zhao, M.G., Yang, Q., 2017. Effect of Praeruptorin C on 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease-like symptoms in mice. *Biomed Pharmacother.* 86, 81-87.
- Wang, Z.J., Tabakoff, B., Levinson, S.R., Heinbockel, T., 2015. Inhibition of Nav1.7 channels by methyl eugenol as a mechanism underlying its antinociceptive and anesthetic actions. *Acta Pharmacol Sin.* 36, 791-9.
- Yamada, M., Ono, K., Hamaguchi, T., Noguchi-Shinohara, M., 2015. Natural Phenolic Compounds as Therapeutic and Preventive Agents for Cerebral Amyloidosis. *Adv Exp Med Biol.* 863, 79-94.
- Yano, S., Suzuki, Y., Yuzurihara, M., Kase, Y., Takeda, S., Watanabe, S., Aburada, M., Miyamoto, K., 2006. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. *Eur J Pharmacol.* 553, 99-103.
- Zhou, J., Ma, X., Cui, Y., Song, Y., Yao, L., Liu, Y., Li, S., 2017. Methyleugenol protects against t-BHP-triggered oxidative injury by induction of Nrf2 dependent on AMPK/GSK3beta and ERK activation. *J Pharmacol Sci.* 135, 55-63.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O metileugenol (ME) amenizou as alterações comportamentais e histológicas induzidas pelo tratamento com 3-NP, sugerindo possível efeito neuroprotetor o qual foi inicialmente correlacionado a sua atividade antioxidante. Contudo, são necessários novos estudos visando avaliar os mecanismos envolvidos na neuroproteção induzida pelo tratamento com ME.

REFERÊNCIAS

- ANDREW, S. E. et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. **Nat Genet**, New York, v. 4, n. 4, p. 398-403, Aug 1993.
- ARETOULI, E.; BRANDT, J. Episodic memory in dementia: Characteristics of new learning that differentiate Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's diseases. **Arch Clin Neuropsychol**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 396-409, Aug 2010.
- ARMSTRONG, M. J.; MIYASAKI, J. M. Evidence-based guideline: pharmacologic treatment of chorea in Huntington disease: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, Hagerstown, v. 79, n. 6, p. 597-603, Aug 07 2012.
- AYALA-PENA, S. Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis. **Free Radic Biol Med**, Tarrytown, v. 62, p. 102-10, Sep 2013.
- BATES, G. P. et al. Huntington disease. **Nat Rev Dis Primers**, London, v. 1, p. 15005, Apr 23 2015.
- BERNARDI, M. M.; PALERMO NETO, J. Effects of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v. 65, n. 3, p. 247-50, Nov 1979.
- BORLONGAN, C. V. et al. Hyperactivity and hypoactivity in a rat model of Huntington's disease: the systemic 3-nitropropionic acid model. **Brain Res Brain Res Protoc**, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 253-7, Aug 1997.
- BROUILLET, E. et al. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. **J Neurochem**, Oxford, v. 95, n. 6, p. 1521-40, Dec 2005.
- CEPEDA, C. et al. The corticostriatal pathway in Huntington's disease. **Prog Neurobiol**, Oxford, v. 81, n. 5-6, p. 253-71, Apr 2007.
- CHOI, Y. K. et al. Methyleugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression of oxidative injury and inflammation. **Free Radic Res**, London, v. 44, n. 8, p. 925-35, Aug 2010.
- CONFORTI, P. et al. Lack of huntingtin promotes neural stem cells differentiation into glial cells while neurons expressing huntingtin with expanded polyglutamine tracts undergo cell death. **Neurobiol Dis**, San Diego, v. 50, p. 160-70, Feb 2013.
- CUMMINGS, D. M. et al. Alterations in cortical excitation and inhibition in genetic mouse models of Huntington's disease. **J Neurosci**, Washington, v. 29, n. 33, p. 10371-86, Aug 19 2009.

- DAMIANO, M. et al. A role of mitochondrial complex II defects in genetic models of Huntington's disease expressing N-terminal fragments of mutant huntingtin. **Hum Mol Genet**, Oxford, v. 22, n. 19, p. 3869-82, Oct 01 2013.
- DAYALU, P.; ALBIN, R. L. Huntington disease: pathogenesis and treatment. **Neurol Clin**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 101-14, Feb 2015.
- DIFIGLIA, M. et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. **Science**, Washington, v. 277, n. 5334, p. 1990-3, Sep 26 1997.
- DING, J. et al. Electrophysiological characterization of methyleugenol: a novel agonist of GABA(A) receptors. **ACS Chem Neurosci**, Washington, v. 5, n. 9, p. 803-11, Sep 17 2014.
- DUTTA, D.; MOHANAKUMAR, K. P. Tea and Parkinson's disease: Constituents of tea synergize with antiparkinsonian drugs to provide better therapeutic benefits. **Neurochem Int**, Oxford, v. 89, p. 181-90, Oct 2015.
- FALK, M. et al. Simple procedure for automatic detection of unstable alleles in the myotonic dystrophy and Huntington's disease loci. **Genet Test**, Larchmont, v. 10, n. 2, p. 85-97, Summer 2006.
- FRANK, S. Treatment of Huntington's disease. **Neurotherapeutics**, New York, v. 11, n. 1, p. 153-60, Jan 2014.
- GARDNER, I. et al. Cytochrome P450 mediated bioactivation of methyleugenol to 1'-hydroxymethyleugenol in Fischer 344 rat and human liver microsomes. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 1775-83, Sep 1997.
- GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 959-75, Jun 2001.
- GREEN, D. R.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. **Science**, Washington, v. 333, n. 6046, p. 1109-12, Aug 26 2011.
- HADZI, T. C. et al. Assessment of cortical and striatal involvement in 523 Huntington disease brains. **Neurology**, Hagerstown, v. 79, n. 16, p. 1708-15, Oct 16 2012.
- HAGBERG, H. et al. Mitochondria: hub of injury responses in the developing brain. **Lancet Neurol**, London, v. 13, n. 2, p. 217-32, Feb 2014.
- HARJES, P.; WANKER, E. E. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. **Trends Biochem Sci**, Cambridge, v. 28, n. 8, p. 425-33, Aug 2003.
- HONG, S. P. et al. Toxicokinetics of methyleugenol in F344 rats and B6C3F(1) mice. **Xenobiotica**, London, v. 43, n. 3, p. 293-302, Mar 2013.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. **Cell**, Cambridge, v. 72, n. 6, p. 971-83, Mar 26 1993.

JOHRI, A.; BEAL, M. F. Antioxidants in Huntington's disease. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1822, n. 5, p. 664-74, May 2012.

KAPLAN, A.; STOCKWELL, B. R. Therapeutic approaches to preventing cell death in Huntington disease. **Prog Neurobiol**, Oxford, v. 99, n. 3, p. 262-80, Dec 2012.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L. O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Crit Rev Toxicol**, London, v. 45, n. 9, p. 765-98, 2015.

KUMAR, P.; KUMAR, A. Possible role of sertraline against 3-nitropropionic acid induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rat brain. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 100-8, Feb 01 2009.

KUMAR, P. et al. Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms. **Behav Pharmacol**, London, v. 17, n. 5-6, p. 485-92, Sep 2006.

LAHLOU, S. et al. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats. **Life Sci**, Amsterdam, v. 74, n. 19, p. 2401-12, Mar 26 2004.

LU, J. M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J Cell Mol Med**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 840-60, Apr 2010.

MARGOLIS, R. L.; ROSS, C. A. Expansion explosion: new clues to the pathogenesis of repeat expansion neurodegenerative diseases. **Trends Mol Med**, Oxford, v. 7, n. 11, p. 479-82, Nov 2001.

_____. Diagnosis of Huntington disease. **Clin Chem**, Washington, v. 49, n. 10, p. 1726-32, Oct 2003.

MEHRABI, N. F. et al. Symptom heterogeneity in Huntington's disease correlates with neuronal degeneration in the cerebral cortex. **Neurobiol Dis**, San Diego, v. 96, p. 67-74, Dec 2016.

MESTRE, T. A.; FERREIRA, J. J. An evidence-based approach in the treatment of Huntington's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, Kidlington, v. 18, n. 4, p. 316-20, May 2012.

NANA, A. L. et al. Widespread heterogeneous neuronal loss across the cerebral cortex in Huntington's disease. **J Huntingtons Dis**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 45-64, 2014.

NATIONAL TOXICOLOGY, P. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methyleugenol (CAS NO. 93-15-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). **Natl Toxicol Program Tech Rep Ser**, Bethesda, v. 491, p. 1-412, Jul 2000.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**, Cambridge, v. 148, n. 6, p. 1145-59, Mar 16 2012.

OBESO, J. A. et al. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. **News Physiol Sci**, Bethesda, v. 17, p. 51-5, Apr 2002.

PAPOUTSI, M. et al. The cognitive burden in Huntington's disease: pathology, phenotype, and mechanisms of compensation. **Mov Disord**, New York, v. 29, n. 5, p. 673-83, Apr 15 2014.

PATHAK, D.; BERTHET, A.; NAKAMURA, K. Energy failure: does it contribute to neurodegeneration? **Ann Neurol**, New York, v. 74, n. 4, p. 506-16, Oct 2013.

PEAVY, G. M. et al. Cognitive and functional decline in Huntington's disease: dementia criteria revisited. **Mov Disord**, New York, v. 25, n. 9, p. 1163-9, Jul 15 2010.

PIDGEON, C.; RICKARDS, H. The pathophysiology and pharmacological treatment of Huntington disease. **Behav Neurol**, New York, v. 26, n. 4, p. 245-53, 2013.

PILLAI, J. A. et al. Clinical severity of Huntington's disease does not always correlate with neuropathologic stage. **Mov Disord**, New York, v. 27, n. 9, p. 1099-103, Aug 2012.

POON, L. H.; KANG, G. A.; LEE, A. J. Role of tetrabenazine for Huntington's disease-associated chorea. **Ann Pharmacother**, Thousand Oaks, v. 44, n. 6, p. 1080-9, Jun 2010.

ROSENBLATT, A. et al. Age, CAG repeat length, and clinical progression in Huntington's disease. **Mov Disord**, New York, v. 27, n. 2, p. 272-6, Feb 2012.

ROSENBLATT, A. et al. The association of CAG repeat length with clinical progression in Huntington disease. **Neurology**, Hagerstown, v. 66, n. 7, p. 1016-20, Apr 11 2006.

ROSHAN, M. H.; TAMBO, A.; PACE, N. P. Potential Role of Caffeine in the Treatment of Parkinson's Disease. **Open Neurol J**, Hilversum, v. 10, p. 42-58, 2016.

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

RUBINSZTEIN, D. C. et al. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. **Am J Hum Genet**, Chicago, v. 59, n. 1, p. 16-22, Jul 1996.

SANCHEZ-DIAZ, G. et al. Monitoring Huntington's Disease Mortality across a 30-Year Period: Geographic and Temporal Patterns. **Neuroepidemiology**, New York, v. 47, n. 3-4, p. 155-163, 2016.

SHIN, B. K.; LEE, E. H.; KIM, H. M. Suppression of L-histidine decarboxylase mRNA expression by methyleugenol. **Biochem Biophys Res Commun**, San Diego, v. 232, n. 1, p. 188-91, Mar 06 1997.

ST-PIERRE, J. et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell**, Cambridge, v. 127, n. 2, p. 397-408, Oct 20 2006.

- STANFILL, S. B. et al. Concentrations of nine alkenylbenzenes, coumarin, piperonal and pulegone in Indian bidi cigarette tobacco. **Food Chem Toxicol**, Exeter, v. 41, n. 2, p. 303-17, Feb 2003.
- STOUT, J. C. et al. Evaluation of longitudinal 12 and 24 month cognitive outcomes in premanifest and early Huntington's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, London, v. 83, n. 7, p. 687-94, Jul 2012.
- STOUT, J. C. et al. Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. **Neuropsychology**, Washington, v. 25, n. 1, p. 1-14, Jan 2011.
- THU, D. C. et al. Cell loss in the motor and cingulate cortex correlates with symptomatology in Huntington's disease. **Brain**, Oxford, v. 133, n. Pt 4, p. 1094-110, Apr 2010.
- TIPPETT, L. J. et al. Striosomes and mood dysfunction in Huntington's disease. **Brain**, Oxford, v. 130, n. Pt 1, p. 206-21, Jan 2007.
- TUNEZ, I. et al. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 2, p. 878-916, Feb 10 2010.
- TWELVETREES, A. E. et al. Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. **Neuron**, Cambridge, v. 65, n. 1, p. 53-65, Jan 14 2010.
- VONSATTEL, J. P.; DIFIGLIA, M. Huntington disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 369-84, May 1998.
- WALDVOGEL, H. J. et al. The Neuropathology of Huntington's Disease. **Curr Top Behav Neurosci**, Heidelberg, v. 22, p. 33-80, 2015.
- WALKER, F. O. Huntington's disease. **Lancet**, v. 369, n. 9557, p. 218-28, Jan 20 2007.
- WANG, Z. J. et al. Inhibition of Nav1.7 channels by methyl eugenol as a mechanism underlying its antinociceptive and anesthetic actions. **Acta Pharmacol Sin**, New York, v. 36, n. 7, p. 791-9, Jul 2015.
- YANO, S. et al. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 553, n. 1-3, p. 99-103, Dec 28 2006.
- ZALA, D.; HINCKELMANN, M. V.; SAUDOU, F. Huntingtin's function in axonal transport is conserved in *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e60162, 2013.
- ZHANG, S. F. et al. Impaired brain creatine kinase activity in Huntington's disease. **Neurodegener Dis**, Basel, v. 8, n. 4, p. 194-201, 2011.
- ZUCCATO, C.; CATTANEO, E. Huntington's disease. **Handb Exp Pharmacol**, Berlin, v. 220, p. 357-409, 2014.

ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE EXPERIMENTAÇÃO E USO ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 08 de dezembro de 2017.

Ofício nº 119/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Almir Goncalves Wanderley**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **23076.026092/2017-26**

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da capacidade neuroprotetora do metileugenol em modelo experimental da doença de Huntington induzida por 3-NP em ratos Wistar**”, registrada com o nº **23076.026092/2017-26**, sob a responsabilidade de **Prof. Almir Goncalves Wanderley** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 06/12/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/12/2017 a 31/05/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	330-350g/90 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CB/UFPE

Atenciosamente

