

## ESCOLA DE MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

## MELISSA TALITA WIPRICH

ESTABELECIMENTO DE UM MODELO DE DOENÇA DE HUNTINGTON INDUZIDO POR ÁCIDO-3-NITROPROPIÔNICO EM PEIXE-ZEBRA: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Porto Alegre 2019





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

# PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

## ESCOLA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

MELISSA TALITA WIPRICH

# ESTABELECIMENTO DE UM MODELO DE DOENÇA DE HUNTINGTON INDUZIDO POR ÁCIDO-3-NITROPROPIÔNICO EM PEIXE-ZEBRA: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Orientadora: Prof. Dra. Carla Denise Bonan

PORTO ALEGRE – RS

Fevereiro, 2019

## MELISSA TALITA WIPRICH

# ESTABELECIMENTO DE UM MODELO DE DOENÇA DE HUNTINGTON INDUZIDO POR ÁCIDO-3-NITROPROPIÔNICO EM PEIXE-ZEBRA: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Orientadora: Prof. Dra. Carla Denise Bonan

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

## PORTO ALEGRE – RS

### W797e Wiprich, Melissa Talita

Estabelecimento de um modelo de Doença de Huntington induzido por ácido-3-nitropropiônico em peixe-zebra : avaliação de parâmetros comportamentais / Melissa Talita Wiprich . – 2019.

98.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Denise Bonan.

1. locomoção. 2. ácido-3-nitropropiônico. 3. Doença de Huntington. 4. memória. 5. peixe-zebra. I. Bonan, Carla Denise. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a). Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

## MELISSA TALITA WIPRICH

# ESTABELECIMENTO DE UM MODELO DE DOENÇA DE HUNTINGTON INDUZIDO POR ÁCIDO-3-NITROPROPIÔNICO EM PEIXE-ZEBRA: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Douglas Kazutoshi Sato- PUCRS

Profa. Dra. Rosane Souza da Silva- PUCRS

Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira- UFRGS

Suplente: Profa. Dra. Patrícia Pereira- UFRGS

PORTO ALEGRE – RS

2019

Dedico este trabalho a minha mãe, meu pai (in memoriam) e minha irmã, pelo amor incondicional e eterno incentivo.

### AGRADECIMENTOS

É o momento de agradecer as pessoas especiais que me acompanharam durante a realização desta trajetória:

Primeiramente a Deus, por ter me dado o dom da vida, me dar força interna nos momentos difíceis e por me iluminar com momentos de alegrias.

Muito especialmente, a minha querida orientadora, Profa. Dra. Carla Denise Bonan, por acreditar no meu potencial, pelo acolhimento e abrir as portas para o mundo da pesquisa desde o meu 6º semestre de graduação. Obrigada pela sua orientação, paciência, dedicação, ensinamentos profissionais e pessoais, exemplo, confiança, apoio e carinho durante esta jornada... Iniciação Científica, Mestrado...

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Neuroquimica e Psicofarmacologia (ZebLab) por todas conversas e discussões trocadas, chimarrões, viagens realizadas, risadas proporcionadas e por tornarem o ambiente de trabalho aconchegante e alegre.

Aos amigos e colegas mais experientes do laboratório, Stefani, Fabiano e Luiza: muito obrigado por todo conhecimento e aprendizado repassado desde a minha iniciação científica, pela paciência de ensinarem, pelos puxões de orelhas, ajuda em todos os momentos e conselhos.

Ao meu amigo e colega Rodrigo pelo companheirismo, por ser minha dupla ao longo do mestrado e pelo auxílio fundamental para a realização de todos os experimentos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Rodrigo, Júlia Majolo, Amanda e Darlan, por estarem presentes ao longo dessa caminhada, pela ajuda nos momentos difíceis, pelos conselhos, pelas risadas e pela diversão e momentos extra-laboratório.

Aos demais professores do ZebLab pelo auxilio, cooperação e ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciência da Saúde da Escola de Medicina da PUCRS e ao CNPq pela bolsa de estudos concedida que possibilitasse a realização deste trabalho com dedicação exclusiva.

A minha avó Olinda (*in memoriam*) e ao meu avô Rudi que foram partes essenciais na construção do meu caráter e na minha vida.

Por fim, as pessoas mais importantes da minha vida- minha família: Á minha mãe, Nilsa, ao meu pai, Jorge (*in memoriam*) e a minha irmã, Agnes. Á minha mãe, Nilsa, obrigada pelos ensinamentos, por ser minha inspiração e ser meu exemplo de vida, pelo apoio incondicional de todas as formas durante todos os momentos, mesmo com quilômetros de distância. Ao meu pai, Jorge (*in memoriam*), obrigada por ter estado presente fisicamente ao longo de 24 anos, por me incentivar desde criança a estudar, pelo amor incondicional e pelas palavras que jamais serão esquecidas "aproveita as oportunidades". Mesmo estando distante fisicamente o amor é incondicional e sei que está feliz com essa minha conquista. Á minha irmã, Agnes, obrigada pelo eterno amor, pela força, compreensão, apoio e por estar sempre ao meu lado quando eu preciso e quando não preciso. Tu és essencial na minha vida. Agradeço a vocês pelo amor, por estarem comigo em todos os momentos difíceis e de alegrias e por me darem o suporte necessário para percorrer e conseguir finalizar essa etapa!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

"Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino."

Leonardo da Vinci

### RESUMO

A Doença de Huntington (DH) é uma condição neurodegenerativa, de herança genética, causada por uma expansão anormal do trinucleotídeo CAG, resultando em uma mutação da proteína huntingtina. É caracterizada por uma tríade de sintomas com alteração progressiva da função motora, cognitiva e psiquiátrica. Os primeiros sintomas normalmente surgem na fase adulta, embora também possam aparecer na idade juvenil, em torno dos 20 anos de idade, sendo assim denominada de DH juvenil. A doença torna-se fatal entre 15 a 20 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas. Além disso, a idade do aparecimento e a intensidade dos sintomas estão relacionadas com o número de repetições de CAG, ou seja, quanto mais repetições de CAG, mais cedo a patologia desenvolve-se e maior a intensidade dos sintomas. A principal característica neuropatológica da DH é a notável neurodegeneração dos neurônios médios do estriado, alterando diferentes sistemas de neurotransmissão, tais como GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico e adenosinérgico. Atualmente, os modelos animais da DH normalmente utilizam roedores e primatas não humanos e são classificados em genéticos e farmacológicos. Dentre os farmacológicos, o mais utilizado é o modelo de toxina mitocondrial com o uso do ácido-3-nitropropiônico (3-NPA), que inibe o complexo II-III mitocondrial e é capaz de reproduzir as alterações motoras e bioquímicas ocorridas na DH. Nesse contexto, o peixe-zebra vem se tornando um excelente modelo animal para o estudo e desenvolvimento de modelos de doenças neurodegenerativas. Neste estudo, realizamos uma triagem comportamental no peixe-zebra em estágio larval e adulto para estabelecer o modelo da DH induzido por 3-NPA. No estágio larval, o tratamento consistiu de exposição ao 3-NPA nas concentrações de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,5 mM durante 7 dias-pósfertilização (dpf). Do 7º dpf até o 14º dpf, os animais permaneceram somente na água. Para o tratamento dos animais adultos, as doses utilizadas foram 10, 20 e 60 mg/kg e salina para o grupo controle. O tratamento consistiu de 7 injeções via intraperitoneal realizadas a cada 96 horas. O comportamento locomotor e de ansiedade foi avaliado 24 horas após cada injeção e a interação social, agressividade e memória no final do tratamento de 29 dias. Nossos resultados demonstraram que no estágio larval a exposição ao 3-NPA nas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,5 mM aumentou a frequência cardíaca analisada aos 2 e 5 dpf, ocasionou alteração morfológica na concentração

de 0,05 mM e não alterou o comportamento locomotor avaliado nas idades de 7, 10 e 14 dpf. No estágio adulto, a exposição ao 3-NPA nas doses de 10, 20 e 60 mg/kg induziu a uma diminuição da atividade locomotora, enquanto não houve efeito na ansiedade e interação social dos animais. Entretanto, a dose de 60 mg/kg de 3-NPA causou uma diminuição no comportamento agressivo e um prejuízo de memória na tarefa da esquiva inibitória. Esses dados sugerem que, no estágio larval, o peixe-zebra é um modelo viável para estudar as características da fase de pré-manifestação da DH e, no estágio adulto, identificamos através do tratamento a longo prazo com o 3-NPA um novo modelo animal para estudar as características fenotípicas do estágio tardio da DH.

**Palavras chaves:** locomoção, ácido-3-nitropropiônico, Doença de Huntington, memória, peixe-zebra.

### ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative genetic inheritance condition caused by an abnormal expansion of the CAG trinucleotide resulting in a mutation of the huntingtin protein. It is characterized by a triad of symptoms with progressive alterations of motor, cognitive and psychiatric functions. The first symptoms usually appear in the adult phase, but they can also appear in the juvenile age, around the 20 years old, being denominated juvenile HD. The disease becomes fatal 15 to 20 years after the onset of the first symptoms. In addition, the age of onset and intensity of symptoms are related to the number of CAG repeats, i.e. the more CAG repeats, the earlier the pathology develops and the greater the intensity of symptoms. The main neuropathological characteristic of HD is the remarkable neurodegeneration of the midline striatal neurons, altering different neurotransmitter systems, such as GABAergic, glutamatergic, dopaminergic, and adenosinergic. Currently, animal models of HD usually use rodents and non-human primates and are classified into genetic and pharmacological models. Among the pharmacological agents, the most commonly tested is the mitochondrial toxin model with the use of 3-nitropropionic acid (3-NPA), that inhibits the mitochondrial complex II-III and is able to reproduce the motor and biochemical alterations occurred in HD. In this context, zebrafish has become an excellent animal model for the study and development of neurodegenerative disease models. In this study, we performed a behavior screening in larval and adult zebrafish to establish the 3-NPA induced HD model. In the larval stage, the treatment consisted of exposure to 3-NPA at concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 mM for 7 days post-fertilization (dpf). From the 7<sup>th</sup> dpf to 14<sup>th</sup> dpf the animals remained only in the water. For the treatment of adult animals, the doses used were 10, 20, and 60 mg/kg and saline for the control group. The treatment consisted of 7 intraperitoneal injections performed every 96 hours. The locomotor and anxiety behavior was assessed 24 hours after each injection and the social interaction, aggression and memory at the end of the 29 days of the treatment. In the larval stage, the exposure to 3-NPA at concentrations of 0.1, 0.2 and 0.5 mM increased the heart rate at 2 and 5 dpf, caused a morphological alteration at the concentration of 0.05 mM and did not alter the locomotor behavior at the ages of 7, 10 and 14 dpf. In the adult stage, the exposure to 3-NPA in the doses at 10, 20, and 60 mg/kg induced a decrease in locomotor activity whereas it had no effect on anxiety and social interaction of the animals. However, the

dose of 60 mg/kg caused a decrease in aggressive behavior and a memory impairment in the inhibitory avoidance task. These data suggest that zebrafish in the larval stage is a viable model for studying the characteristics of the pre-manifestation phase of HD and, in the adult stage, we identified through the long-term treatment with 3-NPA a new animal model to study the phenotypic characteristics of the late stage of HD.

Keywords: locomotion, 3-nitropropionic acid, Huntington disease, memory, zebrafish.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADO: adenosina
- ADP: adenosina difosfato
- AMP: adenosina monofosfato
- ATP: adenosina 5'-trifosfato
- CAG: citosina-adenina-guanina
- DA: dopamina
- DH: doença de Huntington
- Dpf: dias pós-fertilização
- ENK: encefalina
- EROs: espécies reativas de oxigênio
- GABA: ácido gama-aminobutírico
- GPe: globo pálido externo
- GPi: globo pálido interno
- Htt: huntingtina
- i.p: intraperitoneal
- Mhtt: huntingtina mutante
- NTPDases: ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolases
- SDH: succinato desidrogenase
- SNC: sistema nervoso central
- TH: tirosina hidroxilase
- 3-NPA: ácido-3-nitropropiônico

UHDRS: escala unificada para avaliação da doença de Huntington (do inglês unified

huntington's disease rating scale)

USA: Estados Unidos da América

## LISTA DE FIGURAS

Figura	1: Representação	o esquemática da huntingtina	14
--------	------------------	------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Modelos animais da Doença de Huntington	20
Tabela 2: Vantagens e limitações dos modelos animais de Doença de	77
Huntington em roedores e peixe-zebra	

# SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. DOENÇA DE HUNTINGTON	13
1.2. EPIDEMIOLOGIA	16
1.3. VIAS NEUROQUÍMICAS	17
1.4. METABOLISMO ENERGÉTICO	19
1.5. MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE HUNTINGTON	20
1.6. PEIXE-ZEBRA	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO	26
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
4. PERSPECTIVAS	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
6. ANEXOS	95
ANEXO A – Carta de Aprovação CEUA	96
ANEXO B – Comprovante de Submissão do Artigo	97

**CAPÍTULO 1** 

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

# 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DOENÇA DE HUNTINGTON

A Doença de Huntington (DH) é uma condição neurodegenerativa, de herança autossômica dominante, devastadora, caracterizada por uma tríade de sintomas com alteração progressiva da função motora, cognitiva e psiquiátrica (Mason et al., 2018; Wijeratne et al., 2018). Foi descrita inicialmente em 1872 por George Huntington, que identificou a manifestação clínica e o padrão de transmissão familiar, em uma família de pacientes da cidade de East Hampton, nos Estados Unidos da América (USA). Foi denominada primeiramente como coreia, pois o sintoma principal consiste de movimentos involuntários arrítmicos, rápidos e abruptos (Mendes et al., 1996; Wexler et al., 2016). Em 1993, a *Hereditary Disease Foundation* identificou que a causa da patologia é uma expansão da sequência de nucleotídeos citosina-adenina-guanina (CAG), na região da poliglutamina do gene da proteína huntingtina (htt) localizado no exon 1 do cromossomo 4, *locus* 4p16.3. Essa expansão anormal do trinucleotídeo CAG resulta em uma mutação da proteína htt (mhtt) (Dowie et al., 2010; Gil-Mohapel & Rego, 2011). Assim, a mhtt possui um resíduo maior de glutamina em razão da expansão trínucleotídea (CAG) anormal (MacDonald et al., 1993).

A proteína htt é composta de 3114 aminoácidos com tamanho de 350 kDa. Está presente em todos os tecidos somáticos com maior expressão no sistema nervoso central (SNC) e participa de funções celulares importantes, tais como regulação e transcrição gênica, síntese proteica, endocitose, tráfico, metabolismo e sinalização intracelular (Figura 1) (Li & Li, 2004; Blum et al., 2018). Além disso, a htt é essencial para o desenvolvimento embrionário, participando da neurogenêse do SNC. Em camundongos, a deficiência de htt causou letalidade embrionária e desenvolvimento anormal do SNC (Auerbach et al., 2001; Wiatr et al., 2018). A mhtt forma agregados, onde monômeros de htt se agrupam dando origem a uma conformação oligomérica e, além disso, ocasiona inclusões nucleares. Essa mutação da htt é tóxica para as células, principalmente no SNC (neurônios, micróglia e astrócito), prejudicando sua atividade e sobrevivência (Li & Li, 2004; Labbadia & Morimoto, 2013).



Figura 1: Representação esquemática da proteína huntingtina. A) Estrutura linear da molécula huntingtina. B) Provável estrutura tridimensional da huntingtina com um solenoide superhelical alongado. C) Funções celulares da huntingtina. Figura adaptada de Imarisio et al., 2008.

A htt normal apresenta de 6 a 26 repetições de CAG, enquanto que repetições CAG de 27 até 35 é considerado alelo intermédio com instabilidade, podendo as repetições se expandir em gerações futuras. Uma sequência de CAG de 36 a 40 repetições é considerada anormal, aumentando o risco de desenvolver a DH, enquanto sequências de CAG maiores que 40 repetições levam a uma completa penetrância da patologia. O número de repetições de CAG está diretamente associado com o início do desenvolvimento dos sintomas e progressão da DH (Vonsattel & DiFiglia, 1998). Além disso, observa-se o fenômeno de antecipação da DH, ou seja, o inicio mais precoce da doença, por aumento de repetições de CAG em decorrência da instabilidade durante a espermatogênese (Nance, 2017).

Os primeiros sintomas geralmente surgem na fase adulta entre os 40 anos de idade, embora também possam aparecer na idade juvenil, em torno dos 20 anos, ou tardiamente, a partir dos 70 anos. A doença progride ao longo do tempo, tornando-se fatal entre 15 a 20 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas (Ghosh & Tabrizi, 2018). A idade do aparecimento dos sintomas está inversamente, porém fortemente

relacionada com o número de repetições de CAG, ou seja, quanto mais repetições do trinucleotídeo CAG, mais cedo e com maior intensidade os primeiros sintomas surgem. Assim, a forma juvenil da DH é extremamente devastadora (Dowie et al., 2010; Bates et al., 2015).

O diagnóstico da DH acontece através de teste genético, história familiar e avaliação clínica. No teste genético, é analisada a expansão da CAG, podendo ser de diagnóstico, ou seja, para confirmar a doença em um paciente com sintomas sugestivos; ou preditivo, o qual é realizado no indivíduo que possui história familiar da patologia, mas que ainda não apresenta nenhum sintoma e/ou sinal clínico (Novak & Tabrizi, 2010). A avaliação clínica é realizada com base em uma escala internacional unificada denominada Escala Unificada para Avaliação da Doença de Huntington (UHDRS), que abrange a avaliação do comprometimento motor, cognitivo e psiquiátrico. A classificação do escore motor varia de 0 (sem anormalidades motoras sugestivas de DH) a 4 (anormalidade motoras > 99% devido a DH). Além disso, contém um questionário que avalia a capacidade funcional e independência do paciente, visando seu autocuidado. No exame físico, nota-se também a presença de sinal de Babinski positivo, indicando lesão das vias piramidais do SNC (Klempír et al., 2006; Margolis & Ross, 2003). Exames de imagem como ressonância magnética e tomografia computadorizada auxiliam no diagnóstico, sendo que normalmente mostram atrofia estriatal simétrica, a qual pode ser detectada antes do início dos sintomas motores (Bates et al., 2015).

A DH é dividida em três fases: fase pré-manifestação, prodrômica e de manifestação. Na fase pré-manifestação, as alterações neuropsiquiátricas, cognitivas e motoras são apenas subjetivas, não sendo observadas clinicamente. Essa fase inicia desde o nascimento até a próxima fase denominada prodrômica (Wild & Tabrizi, 2014). A segunda fase é chamada de prodrômica, onde os sintomas e sinais clínicos da doença começam a aparecer de forma sutil. Os pacientes manifestam alterações neuropsiquiátricas como depressão, ansiedade, apatia, irritabilidade, e disfunção cognitiva leve, tais como déficit de aprendizagem, alteração no processamento sensório-perceptivo e planejamento motor, dificuldade no reconhecimento de emoções faciais, memória de trabalho visual e identificação de odor, além de dificuldades na resolução de multitarefas, necessitando maior esforço para realização das mesmas (Harrington et al., 2012; Wild & Tabrizi, 2014). Além disso, observa-se alteração na função motora, sendo que primeiramente iniciam-se movimentos

excessivos das extremidades do corpo e face, progredindo para coreia (Novak & Tabrizi, 2010; Ghosh & Tabrizi, 2018). A última fase é a de manifestação, a qual é subdividida em estágio inicial e tardio. No estágio inicial, a coreia fica mais evidente e inicia-se a distonia, ocasionando torcicolo e opistótono. Na fase tardia, as alterações motoras incluem bradicinesia, acinesia e rigidez. A disartria e a disfagia também estão presentes com a progressão da patologia. Além disso, os pacientes apresentam demência severa, perda de peso, distúrbio do sono, insuficiência cardíaca e disfunção endócrina. Na última fase da doença, a rigidez pode fazer com que o indivíduo fique restrito ao leito, ocasionando uma postura flexora das extremidades. O óbito desses pacientes decorre geralmente de complicações cardiorrespiratórias (Roos, 2010; Gil-Mohapel & Rego, 2011; Ghosh & Tabrizi, 2018).

O tratamento requer uma equipe multidisciplinar composta por profissionais da saúde de diferentes áreas como médico geral, médico especialista, nutricionista, enfermagem, fonoaudiólogo, terapeuta ocupacional, fisioterapeuta e psicólogo para aumentar a qualidade de vida do paciente, seus familiares e cuidadores. O tratamento pode ser farmacológico ou não farmacológico (Van Walsem et al., 2017). O tratamento farmacológico não reverte a doença, apenas atenua os sintomas motores e psiquiátricos. Os fármacos mais utilizados atuam nos receptores ou na inibição do transporte de monoaminas, moduladores dos receptores GABAérgicos, antagonistas de receptores de glutamato, inibidores seletivos da recaptação da serotonina e toxina botulínica para os espasmos musculares (Müller, 2017; Ghosh & Tabrizi, 2018).

Não existe até o momento tratamento específico que reverta ou impeça que a DH se manifeste. No entanto, estudos em andamento tentam reduzir a mhtt através de silenciamento gênico por oligonucleotídeos antisense e RNA interferente (Wild & Tabrizi, 2017).

### 1.2. EPIDEMIOLOGIA

A DH é considerada rara, mas a sua prevalência vem aumentando ao longo dos anos e é diferente pelo mundo. Manifesta-se em todas as etnias, porém é de ascendência europeia, preferencialmente atingindo a população caucasiana (Kay et al., 2017). Em um estudo de metanálise realizado por Pringsheim et al. (2012), ao analisar oito estudos de incidência, o autor observou que a média de incidência da DH é de 0,38/100.000 habitantes/ano (Pringsheim et al., 2012). Na mesma metanálise, o autor, ao analisar dezessete estudos de prevalência, verificou que a média da

prevalência da DH é de 2,71/100.000 habitantes (Pringsheim et al., 2012). A prevalência específica por regiões do mundo é variada. Considerando uma população de 100.000 habitantes, no Reino Unido, a prevalência da DH mostrou um aumento entre os anos de 1990 e 2013, de 5.4 para 13.5 casos, respectivamente (Evans et al., 2013; Kay et al., 2017). Na região de Mosile, Itália, no ano de 2016 as taxas eram de 10.85 casos para cada 100.000 habitantes (Squitieri et al., 2016; Kay et al., 2017). Na Alemanha, não há dados sobre a prevalência da doença desde 1987, quando Przuntek & Steigerwald demonstraram 4.7 casos em Francônia, enquanto que na Europa oriental a incidência é de 4.5-5.2 (Kay et al., 2017). Em relação à prevalência na América do Norte, segundo Fisher & Hayden (2014), o Canadá apresentava 13.7 casos para cada 100.000 habitantes (Fisher & Hayden, 2014).

Na América Latina, mais precisamente na Venezuela, onde existe o foco maior de casos de DH no mundo, somente no estado de Zulia, a prevalência chega a ser 10 vezes maior comparada a europeia (Castilhos et al., 2016). Em Maracaibo, Peru, há 700 casos por 100.000 (Castilhos et al., 2016). Já no Brasil, os dados mais recentes em relação à prevalência são de 2015, demonstrando que a região nordeste lidera com o número de casos, apresentando 72 por 100.000 habitantes. O Rio Grande do Sul fica na segunda posição no Brasil. Um estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, cujo objetivo foi identificar a frequência da DH e outras desordens genéticas semelhantes a DH, teve a participação de 68 pacientes, sendo que desses, 62 pacientes apresentaram a doença (Castilhos et al., 2014; Castilhos et al., 2016).

A África apresenta poucos casos da patologia, pois na população negra as taxas são menores quando comparadas com a população mestiça ou branca, sendo 0.02 e 2.18 casos para cada 100.000 pessoas, respectivamente (Rawlins et al., 2016). Isso mostra que a doença tem ascendência caucasiana e diferenças moleculares em relação à etnia. Entretanto, também se pode pensar que nesse território ocorre uma maior dificuldade de constatar os casos devido à assistência médica precária em determinadas comunidades. Na Ásia, o Japão possui a população mais estudada em razão dos elevados níveis de cuidados de atenção à saúde, mas é o local de menor incidência, apresentando taxas de apenas 0.5 casos para cada 100.000 habitantes (Rawlins et al., 2016; Kay et al., 2017).

## 1.3. VIAS NEUROQUIMÍCAS ENVOLVIDAS NA DH

A principal característica neuropatológica da DH é uma notável neurodegeneração dos neurônios espinhosos médios do estriado, que compreendem o núcleo caudado e putamên. Com a progressão da doença, outras áreas cerebrais como o córtex, talámo, hipotálamo, substância *nigra* e núcleo subtalâmico também são afetados com a perda neuronal (Rubinsztein, 2002; Ramaswamy et al., 2007; Coppen & Roos, 2017). Estudos de neuroimagem mostram que a atrofia do estriado e substância branca é um biomarcador para a DH, pois aparece na fase présintomática, ou seja, antes da manifestação dos sintomas (Paulsen et al., 2008; Ross & Tabrizi, 2011; Scahill et al., 2013; Sepers & Raymond, 2014).

O núcleo caudado, putamên, globo pálido, núcleo subtalâmico e substância nigra em conjunto são denominados de gânglios da base e/ou núcleos da base. A função do estriado e dos outros núcleos da base está relacionada à seleção, preparação e execução do controle motor e cognitivo (Sepers & Raymond, 2014; Avanzino et al., 2016). A informação originada no córtex pré-motor, motor complementar e primário transmitida para o estriado é processada pelos gânglios basais por duas vias principais. A primeira via, é chamada de "direta" do estriado projetando-se até o globo pálido interno (GPi) e possui função de iniciar movimentos voluntários. Os neurônios dessa via contém como neurotransmissor principal o ácidogama-amino-butírico (GABA) coexistente com o neuropeptídeo P, além de expressar o receptor de dopamina do tipo  $D_1$  ( $D_1R$ ). Assim na via direta ocorre um *input* GABAérgico do estriado até a saída dos núcleos da base, projetados ao GPi. O caminho "indireto" do estriado é para o globo pálido externo (GPe) e atua na inibição dos movimentos voluntários pela inibição dos neurônios do córtex motor. Tem como neurotransmissor o GABA juntamente com o neuropeptídeo encefalina (ENK), alta expressão do receptor de dopamina do tipo D2 (D2R) e receptores de adenosina A2A (A<sub>2A</sub>R). Nessa via, acontece um *input* inibitório para o núcleo subtalâmico glutamatérgico, que projeta uma saída excitatória para o GPi (Sepers & Raymond, 2014; Guitart et al., 2016; Singh-Bains et al., 2016).

No estágio inicial da fase de manifestação da doença, os neurônios do circuito indireto são mais vulneráveis à degeneração e consequentemente há uma diminuição dos A<sub>2A</sub>R e D<sub>2</sub>R. Dessa forma, o GPe não consegue inibir o movimento voluntário, o que faz esse período ser marcado pela hipercinesia através da coreia (Ramaswamy et al., 2007). Nos estágios finais da DH, ocorre a perda neuronal da via direta,

produzindo sintomas motores hipocinéticos como a bradicinesia, acinesia e rigidez (Ramaswamy et al., 2007)

Alguns estudos demonstraram que na DH há diminuição dos níveis de adenosina (ADO), na expressão dos receptores de ADO A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>, receptores de dopamina D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> e receptores GABAérgicos. Pacientes com DH mostram alteração do sistema dopaminérgico na fase pré-sintomática e também de manifestação da doença, sendo que no estágio inicial, a dopamina (DA) está aumentada e no estágio final diminuída (Kish et al., 1987; Garrett & Soares-da-Silva, 1992; Agostino et al., 2016; Coppen & Roos, 2017; Kao et al., 2017). Ademais, tanto em pacientes quanto em modelo de rato transgênico da DH, observa-se uma diminuição da tirosina hidroxilase (TH) (Cha et al., 1998; Cepeda et al., 2014; Schwab et al., 2015).

Por fim, evidências também sugerem que na DH há não recaptação do neurotransmissor glutamato da sinapse, o que leva a uma ativação excessiva dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) gerando acúmulo de Ca<sup>2+</sup> intracelular levando a uma atividade inadequada do sistema glutamatérgico, desenvolvendo um papel essencial na excitotoxicidade neuronal presente na patologia (Beal et al., 1993; Kumar et al., 2010; Ribeiro et al., 2011; Weber & Backes, 2016; Ribeiro et al., 2017). Assim, a neurodegeneração dos neurônios espinhosos médios do estriado envolve a alteração de diferentes sistemas de neurotransmissão tais como GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico e adenosinérgico (Glass et al., 2000; Cepeda et al., 2014; Ferrante et al., 2014).

## 1.4. METABOLISMO ENERGÉTICO

A mhtt resultante da expansão anormal do trinucleotídeo CAG na DH perturba diversos processos celulares, dentre eles a hemostasia, fusão e fissão da mitocôndria (Carmo et al., 2018). As mitocôndrias participam no processo de sobrevivência da célula, controlando o metabolismo energético, a apoptose e homeostase do Ca<sup>2+</sup> (Damiano et al., 2010). A alteração na mitocôndria desencadeia uma cascata de eventos celulares, tais como: diminuição do ATP, níveis de Ca<sup>+2</sup> anormais, aumento das espécies reativas de oxigênio, ocasionando estresse oxidativo, e, além disso, a morte celular (Kaur et al., 2017; Liot et al., 2017). Evidências indicam que a disfunção mitocondrial tem um papel importante na fisiopatologia da DH. Em pacientes com DH, a estrutura e o número de mitocôndrias são diminuídos. A proteína mhtt interage com

as mitocôndrias, ocasionando uma diminuição de Ca<sup>+2</sup>, os níveis de ATP são menores ainda na fase de pré-manifestação da doença, há uma diminuição da atividade do complexo mitocondrial II, III e IV, além de níveis elevados de lactato (Gu et al., 1996; Johri et al., 2013; Carmo et al., 2018). Corroborando com esses achados, em ratos transgênicos com a doença também há diminuição dos níveis de Ca<sup>+2</sup>, degeneração mitocondrial no estriado, número de mitocôndrias reduzidas, alteração no complexo II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial e aumento de lactato (Choo et al., 2004; Benchoua et al., 2006; Tsang et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Pandey et al., 2008; Johri et al., 2013; Carmo et al., 2018).

### 1.5. MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE HUNTINGTON

Os primeiros modelos animais da DH começaram a surgir na década de 70 (Coyle et al., 1977; Sanberg et al., 1978; Mason & Fibiger, 1979). O primeiro modelo desenvolvido utilizava ácido caínico em camundongos como agente indutor da DH (Coyle & Schwarz, 1976). Posteriormente, outros modelos foram estabelecidos, utilizando malonato, ácido quinolínico e 3-NPA. Atualmente, os modelos animais estabelecidos para a DH são classificados em três categorias: modelos excitotóxicos, modelos de toxinas mitocondriais e modelos genéticos, sendo que os dois primeiros são farmacológicos (tabela 1). Os modelos genéticos são os mais estudados e estão bem estabelecidos em camundongos e primatas (Túnez et al., 2010; Kaur et al., 2017). No peixe-zebra, modelo animal vertebrado, que expressa o gene htt, já foi estabelecido modelo genético em animais no estágio larval (Das & Rajanikant, 2014). Entretanto, os modelos farmacológicos também têm sido muito estudados pela fácil utilização, controle e aquisição de fármacos. Dentre os mais utilizados, está o 3-NPA, por ser um modelo farmacológico que reproduz as características bioquímicas e sintomatologia observadas nos pacientes com DH (Túnez et al., 2010).

Modelo de indução da DH	Alteração bioquímica	Alteração patológica	Fenótipo (sinais/sintomas) de DH	Referências
Toxina mitocondrial (3-NPA e malonato)	Inibição da SDH; diminuição na produção de ATP e estresse oxidativo.	Atrofia, necrose e inflamação do estriado.	Movimentos em círculo, diminuição da atividade motora, distonia, déficit cognitivo e diminuição de peso.	Borlongan et al., 1997; Kumar et al., 2010; Suganya &

#### **Tabela 1.** Modelos animais da Doença de Huntington

Excitotóxicos (ácido caínico e ácido quinolínico)	Ativação excessiva dos receptores NMDA, aumento da concentração intracelular de Ca <sup>2+</sup> e estresse oxidativo.	Morte neuronal específica com o local da lesão.	Hiperatividade, discinesia e déficit de memória.	Sumathi, 2017. McGeer et al., 1982; Lelos & Dunnett, 2018.
Genéticos (transgênicos, <i>knouck-in/out</i> )	Expansão ou delação da CAG e agregação da proteína htt	Atrofia do estriado e dismorfia dos neurônios médios espinhosos.	Diminuição da atividade locomotora, distúrbio de marcha, tremores, redução da força muscular, déficit de memória e aprendizado e comportamento tipo depressivo.	Rangel- Barajas & Rebec, 2018

3-NPA: ácido-3-nitropropiônico; ATP: adenosina trifosfato; CAG: citosina-adeninaguanina; Ca<sup>2+</sup>: cálcio; htt: huntingtina; NMDA: n-metil-d-aspartato; SDH: succinato desidrogenase.

O 3-NPA é uma toxina natural que pode ser extraída a partir de fungos e plantas. É um inibidor irreversível da enzima succinato desidrogenase (SDH) do complexo II mitocondrial da cadeia respiratória, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. O complexo II faz parte do ciclo de Krebs responsável pela oxidação do succinato a fumarato e uma entrada para os elétrons ao nível do ubiquinol (Túnez et al., 2010; Kaur et al., 2017). O 3-NPA tem estrutura química semelhante ao succinato, sendo assim capaz de inibir o ciclo de Krebs. A inibição da SDH interfere no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa da mitocôndria, desencadeando uma cascata de eventos tais como deficiência energética da célula, formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e excitotoxicidade, as quais conduzem a morte celular (Colle et al., 2012). De acordo com Bak et al. (2016), a administração de inibidores do complexo mitocondrial II induz a perda neuronal seletiva do estriado combinada a déficits comportamentais (Bak et al., 2016). Além disso, tem sido relatado que a disfunção mitocondrial, redução de ATP, sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> e estresse oxidativo estão envolvidos na morte neuronal ocasionada pelo 3-NPA (Kim & Chan, 2001; Bak et al., 2016; Kaur et al., 2017).

Em humanos, a ingestão acidental do 3-NPA ocasionou sintomas motores e comportamentais semelhantes à DH, tais como: rigidez, distonia, perda de peso, além de lesão bilateral no putâmen e globo pálido (Ludolph et al., 1991; Ming, 1995). Em roedores, o modelo de 3-NPA mimetiza os sintomas da DH, tais como ataxia, movimentos coreiformes, demência, bradicinesia, fraqueza muscular, rigidez entre outros (Kim et al., 2000; Fernagut et al., 2002). A grande vantagem desse modelo em

relação aos outros é que ocorrem lesões bilaterais estriatais, tal como acontece na DH (Tariq et al., 2005). Em ratos, a administração de 3-NPA aumentou os níveis de lactato, ocasionou disfunção mitocondrial, produziu ERO's e consequente excitotoxicidade (Kumar et al., 2010; Kaur et al., 2017). Entretanto, a toxicidade do 3-NPA pode variar entre as espécies. A administração sistêmica aguda por injeção intraperitoneal (i.p) em roedores com uma única injeção leva a degeneração do estriado em horas. Os tratamentos subagudos consistem de mais de uma injeção e os crônicos de um período de 5 dias até 4 semanas. Os sintomas vistos nos animais depois da administração aguda são diminuição da atividade motora, que pode ser seguida de episódios de hiperatividade e movimentos anormais, tais como: tremores, movimentos de cabeça, rigidez, elevação de cauda e movimentos em círculo. Já na dose crônica, o padrão observado é hipercinesia, seguido de bradicinesia (Ludolph et al., 1991; Brouillet et al., 1998; Brouillet et al., 2005; Túnez et al., 2010). Logo, este modelo reproduz tanto os sintomas da fase precoce quanto da fase avançada da patologia.

### 1.6. PEIXE-ZEBRA

O Danio rerio mais popularmente conhecido como peixe-zebra ou zebrafish, é um pequeno teleósteo (3-4 cm) de água doce, que foi descrito em 1822 por Francis Hamilton. Entretanto, somente em 1970, década que entrava a fase geneticista, George Streisinger, observou que essa espécie poderia tornar-se um ótimo modelo animal para estudos de doenças (Das & Rajanikant, 2014). Atualmente, o peixe-zebra vem sendo muito utilizado como modelo animal para estudo da biologia do desenvolvimento, comportamento, mecanismos relacionados a doenças humanas e em pesquisas em neurociências (Flinn et al., 2008; Xi et al., 2011; Fontana et al., A utilização do peixe-zebra como modelo animal apresenta algumas 2018). vantagens em relação a outros modelos animais, tais como: baixo custo, necessita pouco espaço para manutenção, rápido desenvolvimento e progênie grande, possuem embriões transparentes, os animais são facilmente visualizados e manipulados (Sloman et al., 2003; Xi et al., 2011), além de apresentarem uma alta sensibilidade a fármacos e um rápido metabolismo (Goldsmith, 2004), assim aderindo aos princípios da pesquisa translacional: substituição, refinamento e redução (Fontana et al., 2018). Esta espécie possui o genoma totalmente sequenciado, apresentando elevada similaridade, com cerca de 80% dos genes relacionados a doenças em humanos (Howe et al., 2013). Por isso, permite uma compreensão de diferentes patologias humanas, dentre elas as doenças neurodegenerativas, as quais têm sido amplamente estudadas nestes animais (Bortolotto et al., 2014; Das & Rajanikant, 2014; Nery et al., 2014; Bortolotto et al., 2015). O SNC do peixe-zebra é bem caracterizado, apresentando sistemas de neurotransmissão tais como purinérgico, colinérgico e dopaminérgico (Rico et al., 2011).

A anatomia do peixe-zebra é conservada evolutivamente em relação aos humanos. A formação do SNC começa em torno de 6 horas pós-fertilização (hpf), sendo que com 10 hpf as estruturas cerebrais já podem ser identificadas (Vaz et al., 2019). Aos 3 dias pós-fertilização (dpf) começa o desenvolvimento da barreira hematoencefálica (Vaz et al., 2018). Estruturalmente o cérebro do peixe-zebra dividese em prosencéfalo, onde está localizado o diencéfalo e telencéfalo; mesencéfalo e rombencéfalo (Ullmann et al., 2010). O diencéfalo é composto pelo pálio, subpálio e bulbo olfatório, enquanto o telencéfalo pelo tálamo, pineal e habênula. Essas estruturas tem a função controlar o comportamento social, memória e emoção, ritmo circadiano e estado de atenção (Shinozuka & Watanabe, 2004; Mueller, 2012; Stednitz et al., 2018). Especificamente em relação ao pálio e subpálido, estudos mostram que a primeira região se correlaciona com os gânglios basais em humanos, e a segunda com o hipocampo e amigdala (Wullimann, 2009; Cheng et al., 2014; Vaz et al., 2019). As principais estruturas do mesencéfalo do peixe-zebra são o teto óptico e tegmento, responsáveis pela visão, audição e motivação/recompensa (Korzh, 2017; Vaz et al., 2019). No rombencéfalo localiza-se o cerebelo, que tem a função de controle motor, aprendizado e processamento de estímulos sensoriais (Lalonde & Botez, 1990; Vaz et al., 2019).

O peixe-zebra apresenta um repertório comportamental complexo tendo resposta fisiológica para o estresse, comportamento social e cognitivo (Das & Rajanikant, 2014). Diversos estudos já foram desenvolvidos, avaliando as características comportamentais do peixe-zebra como análise da atividade locomotora, agressividade, interação social e aprendizado (Zimmermann et al., 2016; Altenhofen et al., 2017; Rambo et al., 2017).

Considerando que a DH é fatal, comprometendo severamente as atividades de vida diárias e qualidade de vida dos pacientes, familiares e cuidadores e que os

mecanismos bioquímicos e moleculares pelos quais a doença ocorre precisam ainda ser elucidados, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de modelos animais complementares ao modelos já existentes e que mimetizem a DH para aumentar a compreensão da sua fisiopatologia. Assim, nesse contexto, o peixe-zebra é um um excelente animal para o estudo da DH em diferentes etapas de desenvolvimento e pode auxiliar no desenvolvimento de abordagens terapêuticas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da exposição ao 3-NPA sobre parâmetros comportamentais em peixe-zebra no estágio larval e adulto, a fim de estabelecer o modelo da Doença de Huntington nesta espécie.

# 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do 3-NPA na taxa de sobrevivência, morfologia e comportamento exploratório de larvas de peixe-zebra.

- Avaliar o efeito crônico do 3-NPA na atividade locomotora, cognição, agressividade e interação social em peixe-zebra adultos.

# **CAPÍTULO 2**

# **ARTIGO CIENTÍFICO**

## WIPRICH MT, ZANANDREA R, ALTENHOFEN S, BONAN CD. 3-Nitropropionic

acid induces Huntinton's-like symptoms in zebrafish.

Artigo submetido em 06 de fevereiro de 2019 ao periódico Neuropharmacology.

Fator de impacto: 4,249

3-Nitropropionic acid induces Huntington's-like symptoms in zebrafish

Melissa Talita Wiprich<sup>1,2</sup>, Rodrigo Zanandrea<sup>1,2</sup>, Stefani Altenhofen<sup>1,2</sup>, Carla Denise Bonan <sup>1,2,\*</sup>

1 Escola de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Corresponding author:

Carla Denise Bonan - Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681 – Predio 12, bloco D, sala 301, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: cbonan@pucrs.br

#### Abstract

Long-term treatment with 3-nitropropionic acid (3-NPA), a toxin derived from plants and fungi, can reproduce symptoms and biochemical characteristics of Huntington's disease (HD). Here we evaluated the effects of 3-NPA on the behavioral responses of zebrafish larvae and adults. Larvae exposed to 3-NPA for 7 days had an increase in heart rate at 0.1, 0.2 and 0.5 mM at 2- and 5-days post fertilization (dpf) and a decrease in ocular distance at 0.05 mM. However, 3-NPA did not alter the locomotor parameters. Adult zebrafish received an i.p. injection of 10, 20 or 60 mg/kg of 3-NPA every 96 hours for a total of seven injections. The treatment with 3-NPA at 60 mg/kg decreased the distance traveled at all time points, except at day 9 and caused a decrease in the velocity at day 25 only. In contrast, 10 and 20 mg/kg 3-NPA treated fish demonstrated a decrease in the distance traveled at day 1, 5, 9, 25 and 29 and day 1, 13 and 25, respectively. No changes were observed in anxiety-like behavior and social interaction between 3-NPA-exposed animals and the control group. However, the group exposed to 3-NPA at 60 mg/kg showed a decrease in aggression and had long-term memory impairment in the inhibitory avoidance task. These results demonstrated that exposure to 3-NPA induces morphological and cardiac physiological alterations in zebrafish larvae. In addition, our study establishes a new animal model to study HD-associated symptoms in zebrafish that have been submitted to long-term treatment with 3-NPA. Keywords: locomotion; 3-nitropropionic acid; Huntington's disease; memory; zebrafish
# 1. Introduction

Huntington's disease (HD) is an inherited neurodegenerative disorder, which is fatal and autosomal dominant, and it is caused by a CAG triplet repeat expansion in the huntingtin (htt) protein. It is characterized by progressive motor dysfunction (chorea, bradykinesia and dystonia), psychiatric disturbance and cognitive decline. Generally, this disease affects adults of around 40 years of age and HD also causes severe metabolic symptoms, such as weight loss, cardiac dysfunction, insulin resistance and others (Blum et al., 2018; Croce & Yamamoto, 2018; Dufour & McBride, 2018; Mason et al., 2018). It is estimated that the mean global prevalence is that 5 in 100,000 people will develop HD (Baig et al., 2016; Illarioshkin et al., 2018). Multiple brain regions, such as the cerebral cortex, thalamus, subthalamic nucleus, *globus pallidus, substantia nigra* and hypothalamus present with neurodegeneration, but the hallmark of the disease is the pronounced neuronal loss in the striatum (caudate nucleus and putamen) (Rubinsztein, 2002; Ramaswamy et al., 2007; Coppen & Roos, 2017).

The remarkable anatomical and physiological similarities between humans and animals allow researchers to investigate a large range of mechanisms and develop novel therapies using animal models before applying their discoveries to humans. The animal models of HD include approaches ranging from pharmacological-induced models to refined strategies to develop genetically-modified experimental animals (Kaur et al., 2017).

The great advantage of the pharmacological models of HD is their ease of use, control and acquisition of drugs able to induce HD-like symptoms. Among them, the most used is 3-nitropropionic acid (3-NPA), a natural toxin produced by fungi and plants. This toxin promotes the irreversible inhibition of the enzyme mitochondrial succinate dehydrogenase (SDH) of mitochondrial complex II and III of the respiratory chain being able to cross the blood-brain barrier (BBB) (Brouillet et al., 1999; Túnez & Santamaría, 2009; Túnez et al., 2010; Kaur et al., 2017).

Several studies have shown that there is a decrease in mitochondria, calcium, ATP and mitochondrial complex II, III and IV activity in the striatum of HD patients (Gu et al., 1996; Johri et al., 2013; Carmo et al., 2018). Accidental ingestion of 3-NPA in humans causes cell death in the bilateral putamen and caudate nucleus and motor impairment presenting as dystonia, involuntary spasms and facial grimaces (Ludolph et al., 1995; Ming et al., 1995). In rodents, acute and chronic treatment with 3-NPA mimics the motor symptoms and cellular alterations of the HD presenting as ataxia, choreiform movements, insanity, bradykinesia, muscle weakness, rigidity, weight loss, SDH inhibition, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, among others (Kim et al., 2000; Fernagut et al., 2002; Bortolatto et al., 2017; Kaur et al., 2017).

In this context, the zebrafish is becoming an excellent animal model for studying and developing neurodegenerative disease models due to their numerous advantages over other animal models such as: low cost; fast development and large progenies; genetics and physiology with a high similarity to humans, a central nervous system (CNS) well characterized and the BBB developed until 3 dpf (Goldsmith, 2004; Rico et al., 2011; Howe et al., 2013; Kalueff et al., 2014; Fontana et al., 2018; Vaz et al., 2018). In addition, the behavioral repertoire of this species associated with its high drug sensitivity has permitted the use of zebrafish as a platform for mechanistic and therapeutic research (Stewart et al., 2014; Da Silva et al., 2015; Baxendale et al., 2017).

In this sense, the present study evaluated the effects of 3-NPA on the behavioral responses of zerbrafish (*Danio rerio*) in larval and adult stages. Thus, the action of this

compound on morphology, exploratory behavior, aggression, social interaction and cognition was investigated, observing that 3-NPA induces toxic effects in this species.

#### 2. Materials and Methods

## 2.1. Animals

Embryos and larvae (0-14 days post-fertilization (dpf)) and adult stage animals (6-14 months, 0.2-0.4 g), wild-type *Danio rerio*, from the AB background were used. Animals were obtained from our breeding colony and maintained in recirculating systems (Zebtec, Tecniplast, Italy) with equilibrated filtered water to reach the species standard temperature (28 °C  $\pm$  2 °C), pH (7.0 and 7.5), conductivity (300-700  $\mu$ S) and ammonia (<0.02 mg/L), nitrite (<1 mg/L), nitrate (<50 mg/L) and chloride (0 mg/L) levels. Animals were subjected to a light/dark cycle of 14/10 hours, respectively. Animals received paramecium between 6 and 14 dpf and after 14 dpf, they received commercial flakes (TetraMin Tropical Flake Fish®) three times a day that were supplemented with brine shrimp (Westerfield, 2000).

For breeding, females and males (1:2) were placed in breeding tanks (Tecniplas, Italy) overnight that were separated by a transparent barrier, which was removed after lights went on the following morning. For the experiments with larvae, the embryos were collected, sanitized and subjected to the treatment. For the experiments with adult animals, the embryos were collected and maintained for up to 7 dpf at a density of one larva per 7 mL in Petri dishes in a biochemical oxygen demand (BOD) incubator. They were immediately transferred to a tank in the recirculation system with a density of one larva per 60 mL. When the animals reached 30 dpf, they were maintained at a density of one animal per 200 mL until adulthood. All protocols

were approved by the Animal Care Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (8024- CEUA- PUCRS). This study was registered in the Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado -SISGEN (Protocol No. A3B073D).

# 2.2. Treatments

# 2.2.1. Larvae Treatment

Embryos were placed in Petri dishes (60x16 mm) and subjected to 3-NPA (O<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H; 3-Nitropropionic-acid; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) treatment at a concentration of 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 mM (Colle et al., 2012; 2013) diluted in water for 7 dpf (2 hours post fertilization (hpf) to 7 dpf) (Fig. 1a) without changes of the medium. The control group was exposed to water and maintained the same conditions than the treatment group. The pH of the solution was adjusted between 7.2 and 7.6 with sodium hydroxide (NaOH) and was verified daily. From 7 dpf to 14 dpf the animals only remained in the water and the medium was changed daily. Animals were monitored daily for survival as determined by the presence of a heartbeat visualized using an inverted stereomicroscope (Nikon, Melville, EUA).

#### 2.2.2. Adult Animals Treatment

Adult animals, both sexes, aged between 6 and 14 months, received, via intraperitoneal (i.p), 7 injections of 3-NPA or saline (vehicle- control group) every 96 hours (Fig. 1b). Prior to injection, the animals were anesthetized by immersion in 250 mg/L tricaine solution until the animal showed a lack of motor coordination and a reduced respiration rate. The animals received an i.p injection of 3-NPA at doses of

10, 20 or 60 mg/kg (Túnez et al., 2010) or saline (vehicle- control group) in a volume of 10 µL. After the injection the animals were placed in a tank with a highly aerated recirculation system to facilitate their recovery from anesthesia. After recovery the animals returned to their house tank. Intraperitoneal injections were conducted using a 3/10-mL U-100 BD Ultra- Fine<sup>™</sup> Short Insulin Syringe 8 mm (5/16 in) × 31 G Short Needle (Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA).

## 2.3. Larvae analysis

## 2.3.1. Heartbeat

Animals were analyzed for their heartbeat rate. This measurement was carried out at 2 and 5 dpf using a stereomicroscope. Treated larvae and the controls were placed in 96 well plates (one larvae per plate) and their heart rates were monitored for 60 seconds (n=30). For all groups, water or treatment temperature was kept stable at 28 °C by a thermoplate coupled to the stereomicroscope.

## 2.3.2. Morphological evaluation

Morphological evaluation was performed by monitoring morphological defects using a stereomicroscope (3 <sup>x</sup>) at 5 dpf (n=30). Body length ( $\mu$ m), ocular distance ( $\mu$ m) and surface area of the eyes ( $\mu$ m<sup>2</sup>) were evaluated using NIS-Elements D software for Windows 3.2 (Nikon Instruments Inc, Melville, USA). The animals were placed in the dorsal position in 96 well plates (one larvae per plate). Body length was estimated using the method described by Capiotti et al. (2011) with modifications; the distance from the larvae mouth to the pigmented tip of the tail was measured. The ocular distance was evaluated by the distance between the inner edge of the two eyes (similar

to the inner intercanthal distance in humans) and the size of the eyes was determined by measuring the surface area of the eyes (Lutte et al., 2015).

#### 2.3.3. Exploratory behavior

The exploratory behavior of the larvae was based on the study by Altenhofen et al. (2017) and evaluated at 7, 10 and 14 dpf (n=20). The experiments were performed in a temperature-controlled room (27 °C  $\pm$  2 °C) between 1 p.m – 5 p.m. Each larva was placed individually in a 24 well cell culture plate containing 2 mL of water per well, for a 5 min session of exploratory behavior analysis following 1 min of acclimatization (Colwill & Creton, 2011). The performance was video recorded for automated analysis using the EthoVision XT software (version 11.5, Noldus). Total distance travelled (m) and velocity (m/s, ratio between distance travelled and movement) were considered as the parameters of exploration of the new environment. The time spent outside the area (s) and the turn angle (°) were determined for evaluation of behavior related to anxiety/fear and erratic movements, respectively. The parameter movement were defined as the period which the zebrafish exceeded the start velocity defined of 0.06 cm/s and remained moving until the stop velocity defined in 0.01 cm/s (Mahmood et al., 2013).

## 2.4. Adults analysis

## 2.4.1. Novel tank test

Twenty-four hours after each injection (1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup>, 9<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup>, 17<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, 25<sup>th</sup> days) and 120 hours (29<sup>th</sup> day) after the last injection the exploratory behavior of each animal was measured (n=20).The experiments were performed in a temperature-controlled

room (27 °C  $\pm$  2 °C) between 8:30 a.m. – 12 p.m. The animals were placed individually in experimental tanks (30 cm length x 15 cm height x 10 cm width). After 60 s of habituation, their locomotor behavior was recorded for 5 min (Gerlai et al., 2000) for subsequent analysis with the EthoVision XT software (version 11.5, Noldus). The behavioral parameters analyzed were: distance travelled (m), velocity (m/s, ratio between distance travelled and movement), time spent in upper zone (s) and turn angle (°). The time spent in the upper zone is an indicative of anxiolytic/depression-like behavior, since when introduced into a new environment zebrafish tend to spend more time at the bottom of the tank, until gradually moving to the upper zone after a few minutes (Levin et al., 2007). The parameter movement were defined as the period which the zebrafish exceeded the start velocity defined of 0.6 cm/s and remained moving until the stop velocity defined in 0.59 cm/s (Tran et al., 2016).

#### 2.4.2. Social interaction

The zebrafish is a schooling fish that may exhibit preference for its conspecifics under certain circumstances. Adult social interaction was evaluated at the end of the 29 days of treatment (n=20) between 8:30 a.m – 12.00 p.m. Each fish was individually placed in an experimental tank (30 cm x 15 cm x 10 cm, length x height x width). On one side of the experimental tank, an empty fish tank was placed; on the other side, a identically sized tank held 15 zebrafish, which were designated the "stimulus fish". The fish undergoing evaluation was allowed to acclimatize to the experimental tank for a 30 s period, after which its behavior was video recorded over a period of 5 min for subsequent analysis with EthoVision XT (version 11.5, Noldus) according to the study by Gerlai et al. (2000). To quantify fish preference between the "stimulus fish" side of their tank in detriment of the empty tank, the experimental tank was virtually divided

into four equal sections. The zones 1 and 2 of the tank correspond to the segments closer to the conspecific school and the zones 3 and 4 were considered as the segments closer to the empty tank. The amount of time the experimental fish spent in each zone was measured during the 5 min.

## 2.4.3. Aggression test

After the social interaction analysis, aggressive behavior was evaluated at the end of the 29 days of treatment in adult animals (n=20) between 8:30 a.m. - 12.00 p.m. The mirror test was used to measure aggression according to the procedure described by Gerlai et al. (2000) with modifications. Each fish was individually placed in an experimental tank (30 cm x 15 cm x 10 cm, length x height x width). A mirror (45 cm x 38 cm) was placed at the side of the tank at an angle of 22.5° to the back wall of the tank so that the left vertical edge of the mirror touched the side of the tanks and the right edge was further away. Thus, when the experimental fish swam to the left side of the tank, their mirror image appeared closer to them. After 1 min of acclimatization, a 5-min session was recorded for subsequent quantification of aggression with EthoVision XT (version 11.5, Noldus). Virtual vertical lines were used to divide the tank into four sections and allowed the researchers to record the number of entries the fish made into each section. Entry to the left-most segment indicated a preference for proximity to the "opponent", whereas entry to the right-most segments implied avoidance. The amount of time the experimental fish spent in each segment was measured. We also evaluated the number of bites against the mirror image as an aggression parameter. The video-tracking data were then used to determine the relevant measures through detecting animals by looking at the between them and the background of the apparatus.

## 2.4.4. Inhibitory avoidance task

To assess whether 3-NPA could impair memory in adult animals, we carried out an inhibitory avoidance test at the end (29 days) of long-term treatment (n=10) between 9:00 a.m. - 12 p.m. (Blank et al., 2009; Nabinger et al., 2018). There were two sessions, training and test, with a 24 h interval between them. In each session, animals were placed individually in an experimental tank (18 cm long x 9 cm wide x 7 cm high) with water, divided by a guillotine door into two compartments of equal size, one black (right side) and one white (left side). During the training session, the animal was placed in the white compartment with the door closed for one minute for habituation and environment recognition. After this period, the division was lifted. Once the animal crossed into the black side of the tank, the guillotine door was closed again and through of two electrodes attached to an 08,8 V stimulator was administered a final shock pulse of  $3 \pm 0.2$  V AC (intensity measured between electrodes and the center of the dark compartment) for five seconds. The animal was removed from the apparatus and returned to its housing tank with only water for 24 h until the test session, which consisted of the same protocol as the training session, but without the electric shock. The latency to enter the black compartment during each session was measured and the expected increase in the test session was used as an index of memory retention. A 180 s celling was imposed on test session latency measurements.

# 2.4.5. Statistical analysis

The data were presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M), except for larval survival that was presented as percentages. Larval survival during the 14 experimental days was analyzed by Kaplan-Meier analysis. Data from heart rate,

morphological evaluation and locomotor parameters in larvae were evaluated by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons using Tukey's test. Exploratory behavior data from adults were analyzed with a two-way ANOVA followed by post-hoc comparisons using Bonferroni corrections. Social interaction and aggression data from adults were evaluated by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons using Tukey's test. Inhibitory avoidance training and test latencies for each group were compared using the Mann-Whitney U matched pairs test. The latencies of multiple groups were compared using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* tests. For all comparisons, the significance level was set at p < 0.05.

#### 3. Results

## 3.1. 3-NPA exposure in zebrafish larvae

## 3.1.1. Survival

We investigated the effect of 3-NPA on survival until 14 dpf from the beginning of the exposure. Data for survival evaluation were analyzed using the Kaplan-Meier survival test. Exposure to 3-NPA was associated with a decrease in larval survival rate when all groups were compared (p < 0.0001, n = 50). Larvae survival for the control group at the end of the experiment, 14<sup>th</sup> day was 96%. However, decreased survival rate was observed at 14<sup>th</sup> day in animals exposed to 3-NPA at concentrations of 0.01 (68%, p < 0.0004), 0.05 (72%, p < 0.0014), 0.1 (74%, 0.0028), 0.2 (68%, p < 0.0004) and 0.5 (54%, p < 0.0001) mM. Moreover, animals exposed to concentrations of 1.0 (0%, p < 0.0001) and 2.0 (0%, p < 0.0001) mM died over the 7<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> day of observation, respectively with a survival percentage of 0%. Therefore, these concentrations were excluded from the study. So, all groups exposed to 3-NPA showed significant differences from the control (96%) at the end of the experiment (14 days). (Fig. 2).

# 3.1.2. Heartbeat rate

The measure of heartbeat rate was performed at 2 (Fig. 3a) and 5 dpf (Fig. 3b). At 2 dpf, embryos exposed to 0.2 and 0.5 mM 3-NPA had an increased heart rate compared to unexposed controls, whereas at 5 dpf, larvae exposed to 0.1, 0.2 and 0.5 mM 3-NPA had an increased heart rate(F  $_{(5,174)}$  = 4.051; p < 0.05 at 2 dpf; F  $_{(5,169)}$  = 4.255; p < 0.01 at 5 dpf).

### 3.1.3. Morphology

The teratogenicity effect of 3-NPA on the morphology of larvae were evaluated at 5 dpf. There were no differences in body length and eye surface area between the control and the 3-NPA exposed groups ( $F_{(5,173)} = 1.589$ ; p = 0.1656;  $F_{(5,172)} = 1.528$ ; p = 0.1833) (Fig. 4a and Fig. 4c). However, there were significant decreases in ocular distance at concentrations 0.01 and 0.05 mM when compared with the control group ( $F_{(5,173)} = 4.224$ ; p < 0.05) (Fig. 4b).

#### 3.1.4. Exploratory behavior

The exploratory behavior of the larvae was examined at 7, 10 and 14 dpf to determine whether 3-NPA exposure could alter larvae locomotion and orientation. There were no differences in distance traveled (Fig. 5a), velocity (Fig. 5b), time spent outside area (Fig. 5c) and absolute turn angle (Fig. 5d) at all these ages.

## 3.2.1. Novel tank test

The behavior pattern of adult animals was analyzed after 29 days of treatment (at eight different time's 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup>, 9<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup>, 17<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, 25<sup>th</sup> and 29<sup>th</sup> days) and was measured 24 h after each i.p. injection. All concentrations resulted in a marked alteration in the locomotion pattern of the exposed zebrafish compared to the controls (Fig. 6). The total distance traveled at a dose of 60 mg/kg of 3-NPA was decreased at all time points (except at day 9) when compared with the control group (F (3,608) = 56.24; p < 0.001). In contrast, fish treated with 3-NPA at 10 mg/kg and 20 mg/kg demonstrated a difference in the distance travelled at day 1, 5, 9, 25 and 29 (F  $_{(3,608)}$  =56.24; p < 0.05) and day 1, 13 and 25 (F  $_{(3,608)}$  =56.24; p < 0.05), respectively (Fig. 6a). Furthermore, treatment with 3-NPA at a dose of 60 mg/kg demonstrated a decrease in velocity only at day 25 when compared with the control group (F  $_{(3,608)}$  =8.073; p < 0.05) (Fig. 6b). In order to observe the index of anxiety, we evaluated the time the fish spent in the upper zone of the tank. As illustrated in Figure 6c, there were no significant differences in the time spent in the upper zone among the 3-NPA treated groups at any timepoint when compared with the control group. Another locomotor parameter analyzed was the absolute turn angle. Zebrafish exposed to 3-NPA showed significant changes in the absolute turn angle at doses of 20 mg/kg and 60 mg/kg at day 5 when compared with the control group (F  $_{(3,605)}$  =5.584; p < 0.05; Fig. 6d, Table 1).

#### 3.2.2. Social interaction

The treatment with 3-NPA at all doses analyzed did not induce any social interaction deficit in zebrafish and all treated animals presented the same preference for the stimulus area as their respective controls (Fig. 7).

## 3.2.3. Aggression

Treatment with 3-NPA significantly impacted on behavior as evaluated by the time spent in the segment nearest to the mirror image. Our results showed that treated animals at a dose of 60 mg/kg visited the segment nearest to the mirror fewer times (F  $_{(3,76)}$  =7.688; p<0.01; Fig. 8a). However, there were no differences at doses of 10 mg/kg and 20 mg/kg when compared with the control group. Moreover, the treated animals at a dose of 20 (p<0.05; Fig. 8b) and 60 mg/kg (p<0.01; Fig. 8b) showed significant decrease in the bites episodes when compared in the control group

# 3.2.4. Inhibitory avoidance task

The effects of treatment with 3-NPA on long-term memory were analyzed in zebrafish. It was found that 3-NPA treatment significantly impaired inhibitory avoidance long-term memory at a dose of 60 mg/kg compared to the control group (p < 0.05; Fig. 9).

#### 4. Discussion

This study observed that exposure to 3-NPA caused morphological and physiological alterations in the zebrafish larvae. When the adult animals were exposed to 3-NPA, a decrease in locomotor activity and aggressive behavior as well as impairment in the long-term memory in the inhibitory avoidance task was observed. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate the toxic effects of 3-NPA in morphological and behavioral parameters in zebrafish larvae and adults.

Our findings demonstrated that larvae exposed to the two higher concentrations of 3-NPA had a mortality rate of 100% at 7 dpf of the treatment. Studies have demonstrated that 3-NPA concentrations between 0.3 and 10 mM caused high cellular mortality and important biochemical changes (Ryu et al., 2003; Vish et al., 2004; Colle et al., 2018). Ryu et al. (2003) and Colle et al. (2012) observed in their in vitro studies that 3-NPA treatment in the concentrations at 1, 5 and 10 mM and 0.5 and 1 mM, respectively, reduced viability and increased cell death (Ryu et al., 2003; Colle et al., 2012). In a recent study, Colle et al. (2018) observed that concentrations at 0.3, 1, 3 and 10 mM 3-NPA caused a significant decrease on the viability in culture of cortical neurons obtained from mouse and an increase in the cell mortality (Colle et al., 2018). Vis et al. (2004) found that when cortical cells from mice were exposed to 3-NPA at concentrations of 50, 100, 250 and 500 µM for 24 h showed an increase in lactate dehydrogenase activity at 250 and 500 µM, and a dose-dependent increase of lactate and a decrease of pyruvate at all concentrations when compared to the control (Vish et al., 2004). These findings demonstrate the harmful potential of 3-NPA since concentrations lower than those used in our study are able to alter the biochemical machinery in cell culture.

In humans, although HD is primarily a neurological disease, it also affects several systems of the human body, including the cardiovascular system (Bellosta Diago et al., 2018). Cardiac alterations are observed in patients with HD both in the early and late stages of pathology (Kobal et al., 2017; Critchley et al., 2018). Previous studies on transgenic animal models of HD corroborate that there is cardiac dysfunction in HD (Mihm et al., 2007; Kiriazis et al., 2012; Mielcarek et al., 2014). In

the present study, we observed that larvae treated with 3-NPA at concentrations 0.1, 0.2 and 0.5 mM showed an increased heartbeat rate at 2 and 5 dpf. Moreira (2017), when checking the effects of 3-NPA on intrinsic innervation of the heart in mice, found an increase in heart rate when compared with the control group (Moreira, 2017). The mechanisms underlying the cardiotoxicity of 3-NPA can involve inhibition of oxygen consumption and reduction of ATP, oxidative damage caused by increased oxidized proteins, lipid peroxidation and the consequent generation of reactive oxygen species in cardiac cells (Castillo et al., 1993, Lopez et al., 1998; Milutinovic & Zorc-Plskovic, 2012; Silva-Palacios et al., 2017).

Importantly, we also observed that 3-NPA causes small morphological alterations in zebrafish larvae. The findings showed that 3-NPA at the concentration of 0.05 mM induced a decrease in the ocular distance, when analyzed at 5 dpf. However, this mycotoxin did not alter body length and the surface area of the eyes. A genetic model of HD has shown numerous morphological changes in the zebrafish larvae. Lumsden et al. (2007) and Diekmann et al. (2009) observed that the huntingtin-deficient zebrafish larvae had a remarkably smaller head and eyes in relation to the control group (Lumsden et al., 2007; Diekamnn et al., 2009). Studies have also shown that 3-NPA-like mycotoxins may cause morphological changes in zebrafish larvae. It has been observed that exposure to the mycotoxin ochratoxin A (OTA) decreased the growth of the animal, and it also caused craniofacial deformity and curvatures in the body (Haq et al., 2016, Kherzi et al., 2018).

Toxins, such as paraquat and mitoparaquat, that affect the mitochondrial complex, may alter exploratory parameters in zebrafish larvae (Wang et al., 2018; Pinho et al., 2019). In contrast to these studies, we demonstrated that 3-NPA exposure did not alter the behavioral parameters of the zebrafish larvae. Kotlar et al. (2017) also

observed that 3-NPA at concentrations at 1 and 10 mM was not able to alter locomotion in animals, when comparing the toxic effects of quinolinic acid and 3-NPA on the animal model of *C elegans* (Kotlar et al., 2017). Because 3-NPA is a toxin that has an effect on energy metabolism, it was expected to have an effect on the locomotor activity of zebrafish larvae. This unexpected effect of 3-NPA, in which there are no changes in locomotor parameters, may be due to the fact that adaptive responses to energy decrease occur at this stage of development.

In patients in the manifestation phase of HD, locomotor changes are observed in the initial stage with a pattern of hyperkinesia and in the late stage, bradykinesia (Ghosh & Tabrizi, 2018). He et al. (1995) and Ming (1995) reported, for the first time, human intoxication with 3-NPA through the ingestion of sugarcane caused an acute non-inflammatory syndrome with the development of motor symptoms similar to those of HD, such as choreatic movements in the hand and fingers, facial grimace, dysarthria and dystonia (He et al., 1995; Ming, 1995). 3-NPA toxicity in animals was first seen in Western regions of North America when animals poisoned with *Indigofera* and *Astragallus* plants had motor abnormalities such as muscle weakness, motor incoordination and rigidity (Ludolph et al., 1991). Different species of animals can be used to mimic HD with a 3-NPA model. However, sensitivity to toxin is different according to species. Doses should be chosen and administered according to the phenotypic profile and desired biochemical changes (Túnez & Santamaría, 2009).

In adult zebrafish, the data from our study demonstrated that 3-NPA treatment at 10 and 20 mg/kg reduced locomotion, however, not in every day of treatment. However, treatment with 60 mg/kg caused a reduction in locomotion from the first injection (1 day) and continued to act until the end of the treatment period (i.e the eighth i.p. injection on day 29). Studies in rodents (rats) have shown that acute treatment with 3-NPA at a maximum dose of 10 mg/kg after two injections induces hyperkinetic locomotion phenotypes (Hamilton & Gould, 1987; Borlongan et al., 1997). The chronic administration of 3-NPA of more than four injections over a course of days causes hypokinetic movements in non-human primates (Brouillet et al., 1995) and rats (Borlongan et al., 1997; Guyot et al., 1997). Our hypothesis is that this hypokinetic pattern is due to a decrease in dopamine and its metabolites since this neurotransmitter is responsible for motor, cognitive and memory functions (Arias-Carrión et al., 2010; Cepeda et al., 2014; Kacsprzak et al., 2017).

We also measured the absolute turn angle, which reveals changes in the swimming direction of zebrafish. The groups treated with 3-NPA at 20 and 60 mg/kg demonstrated an increased turning angle only at day 5. In accordance with our results, Bortolotto et al. (2014), when analyzing the behavioral parameters in adult zebrafish treated with i.p. injections of paraquat, an herbicide that reproduces the symptoms of Parkinson's disease, showed that the paraquat group treated with 10 mg/kg had an increase in the turning angle only at day 10 (Bortolotto et al., 2014). In addition to motor alterations resulting from the degeneration of dopaminergic neurons, HD caused non-motor symptoms. Multiple neuronal systems seem to be involved in HD pathophysiology, which leads to cognitive and psychiatric disturbances (Glass et al., 2000; Cepeda et al., 2014; Ferrante et al., 2014). Therefore, we also evaluated cognitive and social behaviors in adult zebrafish treated with 3-NPA such as anxiety, social interaction, aggression and memory.

When introduced into a new environment the zebrafish stayed at the bottom of the aquarium and gradually explored the upper portions. We did not observe any changes in the time spent in the upper zone of treated animals when compared to the control group, suggesting that treatment with 3-NPA does not cause anxiety-like

45

behavior in animals. These results conflict with a previous study conducted in Wistar rats, where injections of 3-NPA at 10 mg/kg for 14 days resulted in anxiety-like behavior (Jain & Gangshettiwar, 2014).

The symptom of apathy and aggression is one of the neuropsychiatric alterations of HD. The genetic model of HD in rodents has shown alteration in social interaction and aggressive behavior when compared with animals without this pathology (Shelbourne et al., 1999; Wood & Morton, 2015; Manfré et al., 2018). Zebrafish are a fish species that exhibits social behavior, such as aggression and social interaction, exhibiting a high preference for its conspecifics under certain circumstances (Das & Rajanikant, 2014). In the present study, we analyzed whether treatment with 3-NPA alters this conspecific preference, we observed that treated animals did not differ from their controls. However, treatment with 3-NPA at 60 mg/kg promoted a decrease in aggressive behavior during the mirror image test. Moreover, at doses 20 and 60 mg/kg of 3-NPA decrease a bites episode. This decrease in aggression may be related to the decreased locomotion of these animals after chronic exposure to 3-NPA.

In addition, we evaluated long-term memory using the inhibitory avoidance task. We found a significant impairment in long-term memory in animals treated with 3-NPA at 60 mg/kg, suggesting that long-term exposure of 3-NPA induces memory impairment. Studies have shown that patients with HD present cognitive decline at various stages of the disease. These deficits are observed in the subject's attention, psychomotor speed, executive functions, learning and short and long-term memory, but long-term memory is impaired only in the final stage of the pathology (Lawrence et al., 1998; Paulsen et al., 2001; Beglinger et al., 2005). Kamble et al. (2018), when analyzing changes in cortical excitability and cognitive dysfunction in HD through neuropsychological tests, demonstrated that HD patients had a significant impairment in these tests when compared to subjects without the disease. This suggests that attention, memory, learning, visuospatial abilities and cognitive functions are impaired in HD (Kamble et al., 2018). Previous studies have shown that 3-NPA treatment in nonhuman primates and rats impaired cognitive and memory tasks (Palfi et al., 1996; Kumar et al., 2010). Therefore, our results are in agreement with the literature, which suggests that 3-NPA induces memory impairment.

In summary, our findings indicate that 3-NPA exposure in the early stages of life induces morphological and cardiac physiological alterations. Furthermore, in adult zebrafish, repeated i.p. injections of 3-NPA produced a hypo-locomotion profile, impairment of long-term memory and decreased aggressive behavior. Therefore, we have identified a novel animal model for studying late stage characteristics of HD through long-term exposure with 3-NPA in zebrafish.

## Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (305035/2015-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (17/2551-0000977-0) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Doenças Cerebrais, Excitotoxicidade e Neuroproteção.

## References

- Altenhofen, S., Wiprich, M.T., Nery, L.R., Leite, C.E., Vianna, M.R.M.R., Bonan, C.D., 2017. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. Aquat Toxicol. 182, 172–183.
- Arias-carrión, O., Stamelou, M., Murillo-rodríguez, E., Menéndez-gonzález, M.,
  Pöppel, E., 2010. Dopaminergic reward system: a short integrative review. Int Arch
  Med. 6, 3–24.
- Baig, S.S., Strong, M., Quarrell, O.W., 2016. The global prevalence of Huntington's disease: a systematic review and discussion. Neurodegener. Dis Manag. 6, 331– 343.
- Baxendale S, van Eeden F, Wilkinson R., 2017. The Power of Zebrafish in Personalised Medicine. Adv Exp Med Biol. 1007, 179–197.
- Beglinger, L.J., Nopoulos, P.C., Jorge, R.E., Langbehn, D.R., Mikos, A.E., Moser, D.J., Duff, K., Robinson, R.G., Paulsen, J.S., 2005. White matter volume and cognitive dysfunction in early Huntington's disease. Cogn Behav Neurol. 18, 102–107.
- Bellosta Diago, E., Pérez-Pérez, J., Santos Lasaosa, S., Viloria Alebesque, A., Martínez-Horta, S., Kulisevsky, J., López del Val, J., 2018. Neurocardiovascular pathology in pre-manifest and early-stage Huntington's disease. Eur J Neurol. 25, 956–962.
- Blank, M., Guerim, L.D., Cordeiro, R.F., Vianna, M.R.M., 2009. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. Neurobiol Learn Mem. 92, 529–534.
- Blum, D., Chern, Y., Domenici, M.R., Buée, L., Lin, C.-Y., Rea, W., Ferré, S., Popoli,
  P., 2018. The Role of Adenosine Tone and Adenosine Receptors in Huntington's
  Disease. J. Caffeine Adenosine Res. 8, 43–58.

- Borlongan, C. V., Koutouzis, T.K., Freeman, T.B., Hauser, R.A., Cahill, D.W., Sanberg,
  P.R., 1997. Hyperactivity and hypoactivity in a rat model of Huntington's disease:
  The systemic 3-nitropropionic acid model. Brain Res. Protoc. 1, 253–257.
- Bortolatto, C.F., Reis, A.S., Pinz, M.P., Voss, G.T., Oliveira, R.L., Vogt, A.G., Roman, S., Jesse, C.R., Luchese, C., Wilhelm, E.A., 2017. Selective A2A receptor antagonist SCH 58261 modulates striatal oxidative stress and alleviates toxicity induced by 3-Nitropropionic acid in male Wistar rats. Metab Brain Dis. 32, 1919– 1927.
- Bortolotto, J.W., Cognato, G.P., Christoff, R.R., Roesler, L.N., Leite, C.E., Kist, L.W., Bogo, M.R., Vianna, M.R., Bonan, C.D., 2014. Long-Term Exposure to Paraquat Alters Behavioral Parameters and Dopamine Levels in Adult Zebrafish ( *Danio Rerio* ). Zebrafish. 11, 142–153.
- Brouillet, E., Condé, F., Beal, M.F., Hantraye, P., 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. Prog Neurobiol. 59, 427–468.
- Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R.J., Dolan, R., Leroy-Willig, A., Kowall, N.W., Beal, M.F., 1995. Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. Proc Natl Acad Sci. 92, 7105–7109.
- Capiotti, K.M., Menezes, F.P., Nazario, L.R., Pohlmann, J.B., de Oliveira, G.M.T., Fazenda, L., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Da Silva, R.S., 2011. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (Danio rerio). Neurotoxicol Teratol. 33, 680–685.
- Carmo, C., Naia, L., Lopes, C., Rego, A.C., 2018. Mitochondrial Dysfunction in Huntington's Disease. Adv Exp Med Biol. 1049, 59–83.

- Castillo, C., Valencia, I., Reyes, G., Hong, E., 1993. 3-Nitropropionic acid, obtained from astragalus species, has vasodilator and antihypertensive properties. Drug Dev Res. 28, 183–188.
- Cepeda, C., Murphy, K.P.S., Parent, M., Levine, M.S., 2014. The role of dopamine in huntington's disease. Progress in Brain Research. 211, 235–54.
- Colle, D., Santos, D.B., de Souza, V., Lopes, M.W., Leal, R.B., de Souza Brocardo, P.,Farina, M., 2018. Sodium selenite protects from 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in cultured primary cortical neurons. Mol Biol Rep. 0, 0.
- Colle, D., Santos, D.B., Moreira, E.L.G., Hartwig, J.M., dos Santos, A.A., Zimmermann,
   L.T., Hort, M.A., Farina, M., 2013. Probucol Increases Striatal Glutathione
   Peroxidase Activity and Protects against 3-Nitropropionic Acid-Induced Pro Oxidative Damage in Rats. PLoS One. 8, 1–15.
- Colle D, Hartwig J.M, Soares F.A, Farina M., 2012. Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. Brain Res Bull. 10, 397–405.
- Colwill, R.M., Creton, R., 2011. Locomotor behaviors in zebrafish (Danio rerio) larvae. Behav Processes. 86, 222–229.
- Coppen, E.M., Roos, R.A.C., 2017. Current Pharmacological Approaches to Reduce Chorea in Huntington's Disease. Drugs. 77, 29–46.
- Critchley, B.J., Isalan, M., Mielcarek, M., 2018. Neuro-cardio mechanisms in Huntington's disease and other neurodegenerative disorders. Front Physiol. 9, 1–8.
- Croce, K.R., Yamamoto, A., 2018. A role for autophagy in Huntington's disease. Neurobiol Dis. 0–1.
- Da Silva, R.B, Siebel, A.M, Bonan, C.D., 2015. The role of purinergic and dopamineric

systems on MK-801- induced antidepressant effects in zebrafish. Pharmacol Biochem Behav. 139, 149–57.

- Das, S., Rajanikant, G.K., 2014. Huntington disease: Can a zebrafish trail leave more than a ripple? Neurosci Biobehav Rev. 45, 258–261.
- Diekmann, H., Anichtchik, O., Fleming, A., Futter, M., Goldsmith, P., Roach, A., Rubinsztein, D.C., 2009. Decreased BDNF Levels Are a Major Contributor to the Embryonic Phenotype of Huntingtin Knockdown Zebrafish. J Neurosci. 29, 1343– 1349.
- Dufour, B.D., McBride, J.L., 2019. Normalizing glucocorticoid levels attenuates metabolic and neuropathological symptoms in the R6/2 mouse model of huntington's disease. Neurobiol Dis. 121, 214–229.
- Fernagut, P.O., Diguet, E., Stefanova, N., Biran, M., Wenning, G.K., Canioni, P., Bioulac, B., Tison, F., 2002. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: Behavioural and histopathological characterisation. Neuroscience. 114, 1005–1017.
- Ferrante, A., Martire, A., Pepponi, R., Varani, K., Vincenzi, F., Ferraro, L., Beggiato, S., Tebano, M.T., Popoli, P., 2014. Expression, pharmacology and functional activity of adenosine A1 receptors in genetic models of Huntington's disease. Neurobiol Dis. 71, 193–204.
- Fontana, B.D., Mezzomo, N.J., Kalueff, A. V., Rosemberg, D.B., 2018. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. Exp Neurol. 299, 157–171.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A., 2000. Drinks like a fish: Zebra fish (Danio rerio) as a behavior genetic model to study alcohol effects. Pharmacol Biochem Behav. 67, 773–782.

- Ghosh, R., Tabrizi, S.J., 2018. Clinical features of huntington's disease. Adv Exp Med Biol. 1049, 1–28.
- Glass, M., Dragunow, M., Faull, R.L.M., 2000. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: A comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. Neuroscience. 97, 505–519.
- Goldsmith, P., 2004. Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. Curr Opin Pharmacol. 4, 504–512.
- Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., Schapira, A.H.V., 1996.
  Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. Ann Neurol. 39, 385–389.
- Guyot, M.C., Hantraye, P., Dolan, R., Palfi, S., Maziére, M., Brouillet, E., 1997.
  Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease- like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. Neuroscience. 79, 45–56.
- Hamilton, B.F., Gould, D.H., 1987. Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. Acta Neuropathol. 72, 286–297.
- Haq, M., Gonzalez, N., Mintz, K., Jaja-Chimedza, A., De Jesus, C.L., Lydon, C., Welch,
  A., Berry, J.P., 2016. Teratogenicity of ochratoxin a and the degradation product,
  ochratoxin α, in the zebrafish (Danio rerio) embryo model of vertebrate
  development. Toxins (Basel). 8, 8–11.
- He, F., Zhang, S., Qian, F., Zhang, C., 1995. Delayed dystonia with striatal ct lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid). Neurology. 45, 2178–2183.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins,

J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Eliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Mortimer, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., De Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Crollius, H.R., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature. 496, 498–503.

- Illarioshkin, S.N., Klyushnikov, S.A., Vigont, V.A., Kaznacheyeva, E. V, 2018. Molecular Pathogenesis in Huntington's Disease. Bichemistry (Mosc). 83, 1030– 1039.
- Jain, D., Gangshettiwar, A., 2014. Combination of lycopene, quercetin and poloxamer188 alleviates anxiety and depression in 3-nitropropionic acid-induced Huntingtons disease in rats. J Intercult Ethnopharmacol. 3, 186.
- Johri, A., Chandra, A., Beal, M.F., 2013. PGC-1α, mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. Free Radic Biol Med. 62, 37–46.
- Kacsprzak, V., Patel, N., Riley, E., Yu, L., Yeh, J.-R.J., Zhdanova, I. V, 2017. Dopaminergic control of anxiety in young and aged zebrafish. Pharmacol Biochem Behav. 157, 1–8.
- Kamble, N., Netravathi, M., Nagaraju, B.C., Lenka, A., Kumar, K., Sowmya, V., Jain,
  S., Pal, P.K., 2018. Evaluation of Cognition and Cortical Excitability in Huntington's
  Disease. Can J Neurol Sci. 45, 176–181.
- Kaur N., Jamwal S., Kaur Gill H., Bansal P.K., 2017. Animal Models of Huntington's Disease. In: Bansal P., Deshmukh R. (eds) Animal Models of Neurological Disorders. Springer, Singapore.
- Khezri, A., Herranz-Jusdado, J.G., Ropstad, E., Fraser, T.W., 2018. Mycotoxins induce developmental toxicity and behavioural aberrations in zebrafish larvae. Environ Pollut. 242, 500–506.
- Kim, G.W., Copin, J.C., Kawase, M., Chen, S.F., Sato, S., Gobbel, G.T., Chan, P.H., 2000. Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in

mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. J Cereb Blood Flow Metab. 20, 119–29.

- Kiriazis, H., Jennings, N.L., Davern, P., Lambert, G., Su, Y., Pang, T., Du, X., La Greca, L., Head, G.A., Hannan, A.J., Du, X.J., 2012. Neurocardiac dysregulation and neurogenic arrhythmias in a transgenic mouse model of Huntington's disease. J Physiol. 590, 5845–5860.
- Kobal, J., Cankar, K., Pretnar, J., Zaletel, M., Kobal, L., Teran, N., Melik, Z., 2017.
  Functional impairment of precerebral arteries in Huntington disease. J Neurol Sci. 372, 363–368.
- Kotlar, I., Colonnello, A., Aguilera-González, M.F., Avila, D.S., de Lima, M.E., García-Contreras, R., Ortíz-Plata, A., Soares, F.A.A., Aschner, M., Santamaría, A., 2018.
  Comparison of the Toxic Effects of Quinolinic Acid and 3-Nitropropionic Acid in C. elegans: Involvement of the SKN-1 Pathway. Neurotox Res. 33, 259–267.
- Kumar, P., Kalonia, H., Kumar, A., 2010. Nitric oxide mechanism in the protective effect of antidepressants against 3-nitropropionic acid-induced cognitive deficit, glutathione and mitochondrial alterations in animal model of Huntington's disease.
   Behav Pharmacol. 21, 217–230.
- Lawrence, A.D., Sahakian, B.J., Robbins, T.W., 1998. Cognitive functions and corticostriatal circuits: insights from Huntington's disease. Trends Cogn Sci. 1, :379–88.
- Levin, E.D., Bencan, Z., Cerutti, D.T., 2007. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. Physiol Behav. 90, 54–58.
- Lopez, P.S., Castillo, C.H., Pastelín, G.H., Hernández, M.R., Suárez, M.J., Sánchez, M.L., Escalante, B.A., 1998. Characterization of 3-nitropropionic acid-induced bradycardia in isolated atria. Toxicol Appl Pharmacol. 148, 1–6.

- Ludolph, A.C., He, F., Spencer, P.S., Hammerstad, J., Sabri, M., 1991. 3-nitropropionic acid - Exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. Can J Neurol Sci. 18, 492–498.
- Lumsden, A.L., Henshall, T.L., Dayan, S., Lardelli, M.T., Richards, R.I., 2007. Huntingtin-deficient zebrafish exhibit defects in iron utilization and development. Hum Mol Genet. 16, 1905–1920.
- Lutte, A.H., Capiotti, K.M., Silva, N.L.G. da, Silva, C.S. de O. da, Kist, L.W., Bogo, M.R., Silva, R.S. Da, 2015. Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in zebrafish larvae. Reprod Toxicol 53, 82–91.
- Mahmood, F., Fu, S., Cooke, J., Wilson, S.W., Cooper, J.D., Russell, C., 2013. A zebrafish model of CLN2 disease is deficient in tripeptidyl peptidase 1 and displays progressive neurodegeneration accompanied by a reduction in proliferation. Brain. 136, 1488-507.
- Manfré, G., Novati, A., Faccini, I., Rossetti, A.C., Bosch, K., Molteni, R., Riva, M.A., Van der Harst, J.E., Nguyen, H.P., Homberg, J.R., 2018. BACHD rats expressing full-length mutant huntingtin exhibit differences in social behavior compared to wild-type littermates. PLoS One. 13, 1–18.
- Mason, S.L., Daws, R.E., Soreq, E., Johnson, E.B., Scahill, R.I., Tabrizi, S.J., Barker,R.A., Hampshire, A., 2018. Predicting clinical diagnosis in Huntington's disease:An imaging polymarker. Ann Neurol. 83, 532–543.
- Mielcarek, M., Bondulich, M.K., Inuabasi, L., Franklin, S.A., Muller, T., Bates, G.P., 2014. The Huntington's disease-related cardiomyopathy prevents a hypertrophic response in the R6/2 mouse model. PLoS One. 9, 1–10.
- Mihm, M.J., Amann, D.M., Schanbacher, B.L., Altschuld, R.A., Bauer, J.A., Hoyt, K.R., 2007. Cardiac dysfunction in the R6/2 mouse model of Huntington's disease.

Neurobiol Dis. 25, 297–308.

- Milutinović, A., Zorc-Plesković, R., 2012. Glycogen accumulation in cardiomyocytes and cardiotoxic effects after 3NPA treatment. Bosn. J. Basic Med Sci. 12, 15–19.
- Ming, L., 1995. Moldy sugarcane poisoning- A case report with a brief review. Clin Toxicol. 33, 363–367.
- Moreira, A.L., 2017. Effects of 3-nitropropionic acid (3-NP) on the extrinsic innervation of the mice heart- experimental model for Huntington's disease. Dissertation. University of Sao Paulo.
- Nabinger, D.D., Altenhofen, S., Bitencourt, P.E.R., Nery, L.R., Leite, C.E., Vianna,
  M.R.M.R., Bonan, C.D., 2018. Nickel exposure alters behavioral parameters in
  larval and adult zebrafish. Sci Total Environ. 624, 1623–1633.
- Palfi, S., Ferrante, R.J., Brouillet, E., Beal, M.F., Dolan, R., Guyot, M.C., Peschanski,
  M., Hantraye, P., 1996. Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. J Neurosci. 16, 3019–3025.
- Paulsen, J., Ready, R., Hamilton, J., Mega, M., Cummings, J., 2001. Neuropsychiatric aspects of Huntington 's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 5, 310–314.
- Pinho, B.R., Reis, S.D., Hartley, R.C., Murphy, M.P., Oliveira, J.M.A., 2019. Mitochondrial superoxide generation induces a parkinsonian phenotype in zebrafish and huntingtin aggregation in human cells. Free Radic Biol Med. 130, 318–327.
- Ramaswamy, S., Mcbride, J.L., Kordower, J.H., 2007. Animal Models of Huntington's Disease. ILAR J. 48, 356–73.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Langoni, A. da S., Souto, A.A., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Souza, D.O., 2011. Chronic ethanol treatment alters purine

nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. Neurotoxicology. 32, 871–878.

- Rubinsztein, D.C., 2002. Lessons from animal models of Huntington's disease. Trends Genet. 18, 202–209.
- Ryu, J.K., Nagai, A., Kim, J., Lee, M.C., McLarnon, J.G., Kim, S.U., 2003. Microglial activation and cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: In vitro and in vivo studies. Neurobiol Dis. 12, 121–132.
- Shelbourne, P.F., Killeen, N., Hevner, R.F., Johnston, H.M., Tecott, L., Lewandoski,
  M., Ennis, M., Ramirez, L., Li, Z., Iannicola, C., Littman, D.R., Myers, R.M., 1999.
  A Huntington's disease CAG expansion at the murine Hdh locus is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice. Hum Mol Genet. 8, 763–774.
- Silva-Palacios, A., Ostolga-Chavarría, M., Buelna-Chontal, M., Garibay, C., Hernández-Reséndiz, S., Roldán, F.J., Flores, P.L., Luna-López, A., Königsberg, M., Zazueta, C., 2017. 3-NP-induced Huntington's-like disease impairs Nrf2 activation without loss of cardiac function in aged rats. Exp Gerontol. 96, 89–98.
- Stewart, A.M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., Kalueff, A.V., 2014. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. Trends Neurosci. 37, 264–78.
- Túnez, I., Santamaría, A., 2009. Modelo de enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico. Rev Neurol. 48, 430–434.
- Túnez, I., Tasset, I., Pérez-De La Cruz, V., Santamaría, A., 2010. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. Molecules. 15, 878–916.
- Tran, S., Nowicki, M., Fulcher, N., Chatterjee, D., Gerlai, R., 2016. Interaction between handling induced stress and anxiolytic effects of ethanol in zebrafish: a behavioral

and neurochemical analysis. Behav Brain Res. 298, 278-85.

- Vaz, R.L., Outeiro, T.F., Ferreira, J.J., 2018. Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson's disease and other movement disorders: A systematic review. Front. Neurol. 1, 347.
- Vis, J.C., De Boer-Van Huizen, R.T., Verbeek, M.M., De Waal, R.M.W., Ten Donkelaar,
  H.J., Kremer, B., 2004. Creatine protects against 3-nitropropionic acid-induced cell
  death in murine corticostriatal slice cultures. Brain Res. 1024, 16–24.
- Wang, X.H., Souders, C.L., Zhao, Y.H., Martyniuk, C.J., 2018. Paraquat affects mitochondrial bioenergetics, dopamine system expression, and locomotor activity in zebrafish (Danio rerio). Chemosphere. 191, 106–117.
- Westerfield, M., 2000. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), 4<sup>th</sup> Edition. University of Oregon Press, Eugene.
- Wood, N.I., Morton, A.J., 2015. Social Behaviour is Impaired in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. J Huntingtons Dis. 4, 61–73.

# **Figure legends**

**Fig. 1.** Timeline of the experimental procedure. (a) Zebrafish larvae were exposed to water (control group) or 3-NPA at concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 mM. The exposure occurred from 2 hpf to 7 dpf and the analysis lasted 14 dpf. The analysis including survival rate, heart rate, morphological evaluation and exploratory behavior. (b) Zebrafish adults received 7 intraperitoneal injections of 3-NPA at doses of 10, 20 and 60 mg/kg or saline (vehicle-control group). The injections occurred for 28 days and the analysis included a novel tank test, social interaction, aggression and inhibitory avoidance task.

**Fig. 2.** Kaplan-Meir survival for zebrafish larvae treated with 3-NPA. 3-NPA significantly impaired survival at 1.0 and 2.0 mM when compared to the control group at the 7<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> day of the experiment (Log-rank (Mantel-Cox) test, p < 0.0001). In addition, there was a significant difference between the animals exposed to concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 mM 3-NPA and the control group (Log-rank (Mantel-Cox) test, p < 0.0001). Data are expressed as the mean from 50 animals analyzed individually for each group.

**Fig. 3.** Heartbeat rate of larvae measured at 2 dpf (a) and 5 dpf (b). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=30). A one-way ANOVA was used, followed by a post-hoc Tukey's test. \* to p < 0.05, \*\* to p < 0.01.

**Fig. 4.** Morphological parameters of control and 3-NPA treated zebrafish larvae at 5 dpf. Body length (a), ocular distance (b) and surface area (c). Data are showed as the

61

mean  $\pm$  S.E.M (n=30). A one-way ANOVA was used, followed by a post-hoc Tukey's test. \* to p < 0.05. (d) Pictures represent the morphological evaluation at 5 dpf.

**Fig. 5.** Exploratory behavior of control and 3-NPA treated at 7, 10 and 14 dpf of zebrafish larvae. Total distance travelled (a), velocity (b), time spent outside area (c) and absolute turn angle (d) and. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=20). A one-way ANOVA was used, followed by a post-hoc Tukey's test.

**Fig. 6.** The locomotion profile of control and 3-NPA treatment zebrafish. Twenty-four hours after each injection, total distance travelled (a), velocity (b), time spent in the upper zone (c) and absolute turn angle (d) were evaluated. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=20). A two-way ANOVA was used, followed by a Bonferroni posthoc test. to \* p < 0.05, \*\* to p < 0.01, \*\*\* to p < 0.001, to \*\*\*\* p < 0.0001.

**Fig. 7.** Social interaction of adult animals treated with 3-NPA. Data are showed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=20). A one-way ANOVA was used, followed by a post-hoc Tukey's test.

**Fig. 8.** Effects of 3-NPA aggression deficits in zebrafish. Time spent close to stimulus in mirror (a) and bites episodes (b). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=20). A one-way ANOVA was used, followed by a post-hoc Tukey's test. to \* p < 0.05; \*\* to p < 0.01.

**Fig. 9.** The inhibitory avoidance task performance on training and long-term memory test sessions of control and 3-NPA treated adult zebrafish after 28 days of treatment.

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=10) analyzed individually for each group; to \* p < 0.05, to \*\*\* p < 0.001, to \*\*\*\* p < 0.0001 indicates the differences between training and test sessions for each group compared using the Mann-Whitney U matched pair test. No differences were found between training performances among all groups as evaluated by the Kruskal-Wallis test. The main effects of behavior adult analysis and the interaction between day and group of treatment with 3-NPA.

Dependent variable	Effects	<i>F</i> -value	DF	P-value
Total distance	Interaction	1.482	21	0.0768
	Day	6.508	7	0.0001
	Treatment	56.24	3	0.0001
Velocity	(Group)			
	Interaction	0.9061	21	0.5834
	Day	6.995	7	0.0001
	Treatment	8.073	3	0.0001
	(Group)			
	Interaction	0.8515	21	0.6554
Time spent in upper zone	Day	9.473	7	0.0001
Absolute turn angle	Treatment	1.431	3	0.2326
	(Group)			
	Interaction	1.255	21	0.1987
	Day	9.132	7	0.0001
	Treatment	5.584	3	0.0009
	(Group)			

**Notes:** DF, degrees of freedom; significant effects (p < 0.05) are given in bold font.




Figure 2



Figure 3



## Figure 4





b)





Control 0.01 mM 3-NPA 0.05 mM 3-NPA 0.1 mM 3-NPA 0.2 mM 3-NPA 0.5 mM 3-NPA

Figure 5

a)





b)









Absolute turn angle (°)





## Figure 6





b)













Figure 8

a)



3-NPA

b)



## Figure 9



## **CAPÍTULO 3**

# **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As doenças genéticas decorrem pela mutação de um único gene, sendo geralmente consideradas raras (Venugopal et al., 2018). Segundo o Ministério da Saúde (2019) é considerada doença rara quando afeta até 65 pessoas a cada 100.000 indivíduos e é definida doença rara como crônica progressiva e incapacitante, podendo ser degenerativa (Brasil, Ministério da Saúde, 2019). Ainda, no ano de 2014, o Ministério da Saúde elaborou as Diretrizes para atenção integral às pessoas com doenças raras no Sistema Único de Saúde (Brasil, Ministério da Saúde, 2014). Dentre essas doenças raras, está a DH.

A DH é uma doença de herança genética neurodegenerativa que se caracteriza por perda da estrutura neuronal no SNC. Individuos com DH apresentam uma tríade de sintomas caracterizada por déficit motor, distúrbio psiquiátrico e declínio cognitivo. Os sintomas motores são movimentos das extremidades do corpo parecidos com dança denominados de coreia, posterior bradicinesia, distonia e rigidez motora. Os sintomas psiquiátricos geralmente antecedem o déficit motor e são caracterizados por ansiedade, depressão, irritabilidade e distúrbios do sono. O declínio cognitivo apresenta-se de inicio com dificuldade de concentração em múltiplas tarefas, declínio da linguagem, fala desorganizada e deficiência perceptiva, progredindo ao final da doença para demência (Pandey & Rajamma, 2018).

Os mecanismos que envolvem a fisiopatologia da DH não estão completamente esclarecidos. Entretanto, sabe-se que a disfunção mitocondrial, o aumento das espécies reativas de oxigênio e consequente excitotoxicidade contribuem para a patogênese da doença (Sorolla et al., 2011; Guedes-Dias et al., 2016; Zheng et al., 2018). Para melhor compreender as bases fisiopatológicas das doenças torna-se necessário a utilização de modelos animais. Os modelos animais existentes da DH são genéticos e farmacológicos. Dentre os modelos farmacológicos, a utilização do 3-NPA, inibidor do complexo II mitocondrial, já está bem estabelecida para induzir a DH. Estudos em roedores e primatas não humanos mostram que o tratamento com o 3-NPA reproduz os fenótipos e as alterações celulares da DH (Brouillet et al., 1993; Kaur et al., 2017). Apesar disso, esses modelos sofrem com limitações de custo-efetividade e restrição de tempo. Assim, o peixe-zebra surge como uma ferramenta promissora para o estudo e compreensão dos aspectos neurobiológicos das doenças neurodegenerativas (Koehler & Williams, 2018). A tabela 2 apresenta as vantagens e limitações dos modelos genéticos e farmacológicos e farmacológicos em roedores e peixe-zebra.

Modelos animais da Doença - Iroedores Genéticos Genéticos - Mimetiza a patogênese molecula - Permite compreender os aspecto genéticos da doença; - Permite comportamentais mais pronunciados que os modelos farmacológicos; - Cos modelos avaliam as características neuropsiquiátricas da Doença de Huntington. - Alto custo; - Fragmentos inseridos não são representativos da patologia humana; - Gene inseridos pode interferir em genes normais e causar outras doenças; - Altoras in pouca morte celular;	Modelos em r Farmacológicos - Mimetiza características da fase inicial e tardia da Doença de Huntington; - Reproduz alterações locomotoras e cognitivas da Doença de Huntington; - Mimetiza alterações celulares e cognitivas da doença; e cognitivas da doença; - Mimetiza alterações celulares e cognitivas da doença; - Mimetiza alterações celulares e cognitivas da doença; - Mimetiza alterações celulares e cognitivas da doença; - Mimetiza da doença; - Mimetiza da doença; - Modelo estabelecido com fármacos de toxina mitocondrial e excitotoxicidade. - Morte celular é de imediato; - Morte celular é de imediato; - Não há associação clara entre mecanismo de ação e causa genética; - Não avaliam as características neuropsiquiátricas da Doença de Huntington nos modelos estabelecidos; - Cérebro grande.
de Huntington (DH) Modelos Farmacológico Farmacológico Farmacológico - Modelo estabelecido em animai - Modelo avaliado em larvas; - Em adultos, reproduz alterações endofenotípicas e cognitivas da fa da Doença de Huntington; - Em larvas, consegue mimetizar características cardíacas pré-mar da doença; - Modelo animal que reproduz as da fase tardia em um curto espaço tempo; - Modelo animal que reproduz as da fase tardia em um curto espaço tempo; - Modelo animal que reproduz as da fase tardia em um curto espaço - Modelo estabelecido não reproc alterações da fase inicial da Doer Huntington; - Modelo não avalia alterações ce	Modelos animais da Doença de Huntington (DH)Modelos animais da Doença de Huntington (DH)oedoresModelosGenéticosModelo estabelecido em animaiPermite compreender os aspectosModelo avaliado em larvas;Permite compreender os aspectosModelo avaliado em larvas;Farmacológicos;Modelo avaliado em larvas;Conunciados que os modelosModelo avaliado em larvas;Fanacológicos;Modelo avaliado em larvas;Comunciados que os modelosModelo avaliado em larvas;formacológicos;Modelo avaliado em larvas;formacológicos;Modelo avaliado em larvas;a Doença de Huntington.Em larvas, consegue mimetizarda doença;Modelo animal que reproduz asda tarctristicas neuropsiquiátricasModelo animal que reproduz asda tarctristicas neuropsiquiátricasModelo animal que reproduza Doença de Huntington Modelo animal que reproduzAlto custo;- Fácil administração do fármaco;Fragmentos inseridos não são- Modelo estabelecido não reprocanacisticas posuem celular;- Modelo estabelecido não reprocAlto custo;- Modelo estabelecido não reprocAlto custo;- Modelo não avalia alterações cedenenca;- Modelo estabelecido não avalia da torocAlto custo;- Modelo não avalia alterações cedenenca;- Modelo não a
nça coula co	Modelos animais da Doel oedores Genéticos Genéticos Mimetiza a patogênese mole Permite compreender os as enéticos da doença; Fenótipos comportamentais ronunciados que os modelos tronunciados que os modelos tronunciados que os modelos tronunciados que os modelos arracterísticas; Os modelos avaliam as aracterísticas da patologia umana; Gene inserido pode interferi enes normais e causar outra oenças; Exibem patologia neurítica; Algumas linhagens não
Modelos em Farmacológicos Farmacológicos - Mimetiza características da fase inicial e tardia da Doença de Huntington; - Reproduz alterações locomotoras e cognitivas da Doença de Huntington; - Mimetiza alterações celulares específicas da doença; - Mimetiza alterações celulares específicas da doença; - Midelo estabelecido com fármacos de toxina mitocondrial e excitotoxicidade. - Morte celular é de imediato; - Cérebro grande.	

Tabela 2: Vantagens e limitações dos modelos animais da Doença de Huntington em roedores e peixe-zebra

No capítulo 2, apresentamos a caracterização do modelo de DH induzida por 3-NPA em peixe-zebra no estágio larval e adulto. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o 3-NPA em larvas de zebrafish, com o intuito de avaliar o efeito do 3-NPA de uma disfunção na fase embrionária mimetizando as alterações produzidas pela mhtt nessa fase, resultou em letalidade de 100% na metade do tratamento (7 dpf) nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM. Estes resultados sugerem que, em altas doses dessa toxina, o peixe-zebra não é capaz de achar mecanismos compensatórios frente à depleção de energia, ocasionando o não desenvolvimento e morte dos animais. Interessantemente, na dose de 0.05 mM o 3-NPA diminuiu a distância ocular das larvas de peixe-zebra, o que pode indicar uma diminuição do tamanho do SNC provocado pelo dano induzido pelo 3-NPA. Em concordância com nossos resultados, Lumsden et al. (2007) e Diekmann et al. (2009) observaram em um modelo genético da DH em peixe-zebra no estágio larval que os animais com deficiência de htt (genótipo de DH) possuíam o tamanho da cabeça e olhos menores (Lumsden et al., 2007; Diekmann et al., 2009).

Na determinação dos batimentos cardíacos, nas doses de 0,1, 0,2 e 0,5 mM, o 3-NPA alterou a frequência cardíaca das larvas de peixe-zebra aos 2 e 5 dpf, o que é relevante, uma vez que, do ponto de vista dos sintomas da doença, pacientes com DH apresentam alterações cardíacas precedendo os sintomas motores da doença (Sorensen & Fenger, 1992; Ciammola et al., 2006; Aziz et al., 2010). Isso indica que o 3-NPA pode estar causando disfunção mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e consequente estresse oxidativo nas células cardíacas. Em contrapartida, nossos achados mostraram que, aos 7, 10 e 14 dpf, o 3-NPA não alterou os parâmetros locomotores e de ansiedade no peixe-zebra, sugerindo que o peixe-zebra é capaz de ter mecanismos adaptativos frente à diminuição do metabolismo de energia nesses estágios de desenvolvimento.

No peixe-zebra adulto, três doses de 3-NPA foram avaliadas, 10, 20 e 60 mg/kg, e o grupo controle recebeu injeção via i.p de salina. O tratamento consistiu da administração intraperitoneal de 3-NPA, perfazendo um total de sete injeções realizadas com um intervalo de 96 horas, e com experimentos de locomoção avaliados 24 horas após cada injeção (Figura. 1b, Capítulo 2). Os parâmetros locomotores avaliados foram distância total percorrida, velocidade e ângulo de giro. Na dose de 60 mg/kg a distância total percorrida dos animais diminuiu todos os dias, exceto para o 9º dia e a velocidade diminiu apenas no 25º dia. Entretanto, nas doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg a distância percorrida teve alteração somente em alguns dias do tratamento, sendo que não houve alteração na velocidade. Ademais, no ângulo de giro ocorreu um aumento somente no dia 5 e nas doses de 20 e 60 mg/kg. Corroborando com nossos resultados, estudos em roedores e primatas não humanos tratados de forma crônica com 3-NPA também demonstraram uma atividade hipolocomotora (Brouillet & Hantraye, 1995; Borlongan et al., 1997; Guyot et al., 1997; Borlongan et al., 1998).

Além do comportamento locomotor, nosso estudo também avaliou parâmetros neuropsiquiátricos, como ansiedade e interação social, e cognitivos, como memória. O tratamento com 3-NPA não influenciou na ansiedade e interação social do peixezebra. No entanto, nossos resultados apresentaram que o 3-NPA na dose de 60 mg/kg causa uma diminuição da agressividade. Wood & Morton (2015), observaram em ratos transgênicos ao realizar o teste de intruso residente, que os animais *wildtype* (sem a DH) eram mais agressivos que os ratos R6/2 (com DH) em relação aos animais invasores (Wood & Morton, 2015). Além disso, o tratamento com 3-NPA na dose de 60 mg/kg causou um prejuízo da memória de longo-prazo avaliado através da tarefa da esquiva inibitória. Nossos achados estão de acordo com a literatura. Estudos com animais tratados com 3-NPA demonstram prejuízo cognitivo e da memória em ambos testes (Palfi et al., 1996; Kumar et al., 2010). Além disso, em pacientes é observado déficit nas funções executivas, aprendizado e memória de curto e longo-prazo (Lawrence et al., 1998; Paulsen et al., 2001; Beglinger et al., 2005; Kamble et al., 2018).

Portanto, nossos resultados apontam que o peixe-zebra no estágio larval é um modelo viável para estudar as características cardíacas da fase pré-manifestação da DH e que a exposição consecutiva do 3-NPA no peixe-zebra adulto torna-se um importante modelo para estudar as características fenotípicas da DH no estágio tardio da patologia.

#### **4. PERSPECTIVAS**

Na DH ocorre a degeneração dos neurônios médios espinhosos do estriado, interrompendo as projeções de neurônios para o globo pálido e substância *nigra*. Esses neurônios expressam dois subtipos de receptores de dopamina (DA): os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, e, além disso, alta abundância de receptores de adenosina do tipo A<sub>2A</sub> (Deb et al., 2017; Dickey & Spada, 2017; Blum et al., 2018; Goodliffe et al., 2018).

A DA é o neurotransmissor do sistema dopaminérgico, o qual modula várias funções fisiológicas do cérebro como controle motor, cognição, memória, emoções e mecanismo de recompensa (Kacprzak et al., 2017; Rangel-Barajas et al., 2015). A DA possui distribuição ampla no SNC e além de neurotransmissor, também serve como percursor de noradrenalina (Rangel-Barajas et al., 2015). Os neurônios noradrenérgicos contém uma enzima chamada dopamina beta-hidroxilase que converte a DA em noradrenalina (Levin et al., 1960; Kaufman & Friedman, 1965). A síntese da DA é modulada pela atividade da TH, a qual converte o aminoácido Ltirosina para L-DOPA que é descarboxilado para formar DA (Missale et al., 1998; Yamamoto et al., 2010). Após ser sintetizada, a DA é armazenada em vesículas présinápticas, as quais são transportadas para o terminal sináptico pelo transportador vesicular de monoamina (Lapish et al., 2007). A DA é liberada por exocitose na fenda sináptica e age através da sua difusão no fluido extracelular a partir do qual é eliminada lentamente como resultado da recaptação, metabolismo e ativação dos seus receptores (Ciliax et al., 1995, 1999; Venton et al., 2003). Existem cinco receptores de DA: D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub>, através dos quais ela pode controlar o início e execução de movimento (Han et al., 2007). Os receptores de DA são do tipo metabotrópicos, acoplados a proteína G e podem ser divididos em receptores D1-like (D1 e D5) e D2-like (D2, D3 e D4), agrupados por sua estrutura e resposta biológica (Rangel-Barajas et al., 2015). A expressão dos mesmos muda durante processos neurodegenerativos como na DH (Rangel-Barajas et al., 2015). Estudos mostram que na DH há uma diminuição na síntese de DA, e alteração na expressão de seus receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, levando a um circuito anormal do controle motor (Cepeda et al., 2014; Waters et al., 2018). Ademais, estudos em animais utilizando o 3-NPA como indutor da DH, demonstram que ocorre alteração na DA bem como nos receptores D1 e D<sub>2</sub> (Lukács et al., 2009; Herrera-Mundo & Sitges, 2010; Crawford et al., 2011).

O sistema purinérgico tem um papel importante na neurotransmissão e neuromodulação do SNC, e tem como principal molécula sinalizadora a adenosina 5'trifosfato (ATP) e seu metabólito adenosina (ADO) (Burnstock, 1972; Burnstock, 2016). O ATP está presente em todas as células intracelulares e tem ação nos receptores P2. Uma vez no meio extracelular, o ATP é degradado até ADP, AMP e ADO (Bonan et al., 2000; Robson et al., 2006; Burnstock, 2008). Já a ADO é um neuromodulador essencial e age nos purinoreceptores P1, subdivididos em A1, A2A, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (Burnstock, 2008; Burnstock et al., 2011). O nível desses nucleotídeos é controlado pela ação das ectonucleotidases, especialmente as ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolases (NTPDases) e a ecto-5'-nucleotidase (Bonan, 2012; Yegutkin, 2014). A ADO pode ser desaminada a inosina pela ação da adenosina desaminase (Robson et al., 2006). Alguns estudos tem reportado que ocorre uma diminuição dos receptores A<sub>2A</sub> em pacientes com DH (Martinez-Mir et al., 1991; Villar-Menéndez et al., 2013). Também em modelos animais da DH já foi observado diminuição dos receptores A<sub>2A</sub> e alteração da ADO e que bloqueio genético dos receptores A<sub>2A</sub> piora a progressão da patologia. Ademais, o tratamento com antagonistas desses receptores também ocasionou piora na progressão da doença. Por outro lado, o tratamento com agonistas de receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>1</sub> mostraram-se benéficos contra a progressão da degeneração na DH (Blum et al., 2002; Chou et al., 2005; Miévis et al., 2011; Guitart et al., 2016).

Portanto, como perspectivas deste estudo, pretendemos estudar as alterações sobre parâmetros neuroquímicos relacionados ao sistema purinérgico e dopaminérgico. Destacamos a seguir:

 Avaliar os níveis de dopamina, glutamato e serotonina em peixe-zebra adulto expostos de forma crônica ao 3-NPA.

 Avaliar o efeito da exposição crônica do 3-NPA sobre a atividade enzimática das NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e adenosina desaminase em encéfalo de peixezebra adulto.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostino P V., Gatto EM, Cesarini M, Etcheverry JL, Sanguinetti A, Golombek DA. Deficits in temporal processing correlate with clinical progression in Huntington's disease. Acta Neurol Scand. 2017;136(4):322–329.
- Altenhofen S, Wiprich MT, Nery LR, Leite CE, Vianna MRMR, Bonan CD. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. Aquat Toxicol. 2017;182:172–83.
- Auerbach W, Hurlbert MS, Hilditch-Maguire P, Wadghiri YZ, Wheeler VC, Cohen SI, Joyner AL, MacDonald ME, Turnbull DH. The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. Hum Mol Genet. 2001;10(22):2515-23.
- Avanzino L, Pelosin E, Vicario CM, Lagravinese G, Abbruzzese G, Martino D. Time Processing and Motor Control in Movement Disorders. Front Hum Neurosci. 2016;12(10):631. Review.
- Aziz NA, Anguelova G V., Marinus J, Van Dijk JG, Roos RAC. Autonomic symptoms in patients and pre-manifest mutation carriers of Huntington's disease. Eur J Neurol. 2010;17(8):1068–74.
- Bak J, Kim HJ, Kim SY, Choi YS. Neuroprotective effect of caffeic acid phenethyl ester in 3-nitropropionic acid-induced striatal neurotoxicity. Korean J Physiol Pharmacol. 2016;20(3):279–86.
- Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, Nance M, Ross CA, Scahill RI, Wetzel R, Wild EJ, Tabrizi SJ. Huntington disease. Nat Rev Dis Primers. 2015;23(1):15005.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. J Neurosci. 1993;13:4181–92.
- Beglinger LJ, Nopoulos PC, Jorge RE, Langbehn DR, Mikos AE, Moser DJ, Duff K, Robinson RG, Paulsen JS. White matter volume and cognitive dysfunction in early Huntington's disease. Cogn Behav Neurol. 2005;18(2):102–7.
- Benchoua A, Trioulier Y, Zala D, Gaillard MC, Lefort N, Dufour N, Saudou F, Elalouf JM, Hirsch E, Hantraye P, Déglon N Brouillet E. Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. Mol Biol Cell. 2006;17(4):1652–63.
- Blum D, Gall D, Galas M-C, d'Alcantara P, Bantubungi K, Schiffmann SN. The adenosine A1 receptor agonist adenosine amine congener exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions and motor

impairments in the 3-nitropropionic acid model of neurotoxicity. J Neurosci. 2002;22(20):9122-33.

- Blum D, Chern Y, Domenici MR, Buée L, Lin C-Y, Rea W, Ferré S, Popoli S. The Role of Adenosine Tone and Adenosine Receptors in Huntington's Disease. J Caffeine Adenosine Res. 2018;8(2):43–58.
- Bonan CD, Amaral OB, Rockenback IC, Walz R, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ. Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes. Neurochem Res. 2000;25(6):775–9.
- Bonan CD. Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2012;11(6):739–50. Review.
- Borlongan C V., Koutouzis TK, Sanberg PR. 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. Neurosci Biobehav Rev. 1997;21(3):289–93.
- Borlongan C V., Koutouzis TK, Poulos SG, Saporta S, Sanberg PR. Bilateral fetal striatal grafts in the 3-nitropropionic acid-induced hypoactive model of Huntington's disease. Cell Transplant. 1998;7(2):131–5.
- Bortolotto JW, Cognato GP, Christoff RR, Roesler LN, Leite CE, Kist LW, Bogo MR, Vianna MR, Bonan CD. Long-Term Exposure to Paraquat Alters Behavioral Parameters and Dopamine Levels in Adult Zebrafish (*Danio Rerio*). Zebrafish. 2014;11(2):142–53.
- Bortolotto JW, Melo GM, Cognato Gde P, Vianna MR, Bonan CD. Modulation of adenosine signaling prevents scopolamine-induced cognitive impairment in zebrafish. Neurobiol Learn Mem. 2015;118:113–9.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 199 de 30 de Janeiro de 2014. Institui a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, aprova as Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Diário Oficial da União. 2014. Disponível em <u>http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199\_30\_01\_2014.html</u>.
- Brasil. Ministério da Saúde. Doneças raras: o que são, causas, diagnósticos, tratamentos e prevenção. 2019. Disponível em <u>http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-raras</u>.
- Brouillet E, Hantraye P. Effects of chronic MPTP and 3-nitropropionic acid in nonhuman primates. Curr Opin Neurol. 1995;8(6):469–73.
- Brouillet E, Guyot MC, Mittoux V, Altairac S, Condé F, Palfi S, Hantraye P. Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. J Neurochem. 1998;70(2):794–805.
- Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. Prog Neurobiol. 1999;59(5):427–68.

Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 3-Nitropropionic acid: A mitochondrial toxin

to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. J Neurochem. 2005;95(6):1521–40.

Burnstock G. Purinergic nerves. Pharmacol Ver. 1972;24(3):509-81. Review.

- Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. Nat Rev Drug Discov. 2008;7(7):575–90.
- Burnstock G, Fredholm BB, Verkhratsky A. Adenosine and ATP receptors in the brain. Curr Top Med Chem. 2011;11(8):973–1011. Review.
- Burnstock G. An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. Neuropharmacology. 2016;104:4–17.
- Carmo C, Naia L, Lopes C, Rego AC. Mitochondrial Dysfunction in Huntington's Disease. Adv Med Biol. 2018;1049:59–83.
- Castilhos RM, Souza AFD, Furtado G V., Gheno TC, Silva AL, Vargas FR, Lima MA, Barsottini O, Pedroso JL, Godeiro C Jr, Salarini D, Pereira ET, Lin K, Toralles MB, Saute JA, Rieder CR, Quintas M, Sequeiros J, Alonso I, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil. Clin Genet. 2014;86(4):373–7.
- Castilhos RM, Augustin MC, Santos JA, Perandones C, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Genetic aspects of Huntington's disease in Latin America. A systematic review. Clin Genet. 2016;89(3):295–303.
- Cepeda C, Murphy KPS, Parent M, Levine MS. The role of dopamine in huntington's disease. Prog Brain Res. 2014;211:235–254.
- Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, Penney JB, Bates GP, Young AB. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(11):6480–5.
- Chao TK, Hu J, Pringsheim T. Risk Factors for the Onset and Progression of Huntington Disease. Neurotoxicology. 2017;61:79–99.
- Cheng RK, Jesuthasan SJ, Penney TB. Zebrafish forebrain and temporal conditioning. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014;369(1637):1-9.
- Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. Hum Mol Genet. 2004;13(14):1407–20.
- Chou SY, Lee YC, Chen HM, Chiang MC, Lai HL, Chang HH, Wu YC, Sun CN, Chien CL, Lin YS, Wang SC, Tung YY, Chang C, Chern Y. CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model. J Neurochem. 2005;93(2):310–20.

Ciammola A, Sassone J, Alberti L, Meola G, Mancinelli E, Russo MA, Squitieri F, Silani

V. Increased apoptosis, Huntingtin inclusions and altered differentiation in muscle cell cultures from Huntington's disease subjects. Cell Death Differ. 2006;13(12):2068–78.

- Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn L, Pristupa Z, Ince E, Hersch S, Niznik HB, Levey AI. The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. J Neurosci. 1995;15(3):1714–23.
- Ciliax BJ, Drash GW, Staley JK, Haber S, Mobley CJ, Miller GW, Mufson EJ, Mash DC, Levey AI. Immunocytochemical localization of the dopamine transporter in human brain. J Comp Neurol. 1999;409(1):38–56.
- Colle D, Hartwig JM, Soares FA, Farina M. Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. Brain Res Bull. 2012;87(4-5):397–405.
- Coppen EM, Roos RAC. Current Pharmacological Approaches to Reduce Chorea in Huntington's Disease. Drugs. 2017;77(1):29–46.
- Coyle JT, Schwarcz R, Bennett JP, Campochiaro P. Clinical neuropathologic and pharmacological aspects of Huntington's disease: correlates with a animal model. Prog Neuropsychopharmacol. 1977;1(1-2):13–30.
- Coyle JT, Schwarcz R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. Nature. 1976;263(5574):244–6.
- Crawford CA, Akopian G, Ring J, Jakowec MW, Petzinger GM, Andersen JK, Vittozzi-Wong P, Wang K, Farley CM, Charntikov S, Mitroi D, Beal MF, Chow R, Walsh JP. Acute and long-term response of dopamine nigrostriatal synapses to a single, low-dose episode of 3-nitropropionic acid-mediated chemical hypoxia. Synapse. 2011;65(4):339–50.
- Damiano M, Galvan L, Déglon N, Brouillet E. Mitochondria in Huntington's disease. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2010;1802(1):52–61.
- Das S, Rajanikant GK. Huntington disease: Can a zebrafish trail leave more than a ripple? Neurosci Biobehav Rev. 2014;45:258–61.
- Deb A, Frank S, Testa CM. New symptomatic therapies for Huntington disease. Handb Clin Neurol. 2017;144:199–207.
- Dickey AS, La Spada AR. Therapy development in Huntington disease: From current strategies to emerging opportunities. Am J Med Genet Part A. 2018;176(4):842–61.
- Diekmann H, Anichtchik O, Fleming A, Futter M, Goldsmith P, Roach A, Rubinsztein DC. Decreased BDNF Levels Are a Major Contributor to the Embryonic Phenotype of Huntingtin Knockdown Zebrafish. J Neurosci. 2009;29(5):1343–9.
- Dowie MJ, Scotter EL, Molinari E, Glass M. The therapeutic potential of G-protein coupled receptors in Huntington's disease. Pharmacol Ther. 2010;128(2):305–23.

- Evans SJ, Douglas I, Rawlins MD, Wexler NS, Tabrizi SJ, Smeeth L. Prevalence of adult Huntington's disease in the UK based on diagnoses recorded in general practice records. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013;84(10):1156–60.
- Fernagut PO, Diguet E, Stefanova N, Biran M, Wenning GK, Canioni P, Bioulac B, Tison F. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: Behavioural and histopathological characterisation. Neuroscience. 2002;114(4):1005–17.
- Ferrante A, Martire A, Pepponi R, Varani K, Vincenzi F, Ferraro L, Beggiato S, Tebano MT, Popoli P. Expression, pharmacology and functional activity of adenosine A1 receptors in genetic models of Huntington's disease. Neurobiol Dis. 2014;71:193–204.
- Fisher ER, Hayden MR. Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: prevalence and population at risk. Mov Disord. 2014;29(1):105–14.
- Flinn L, Bretaud S, Lo C, Ingham PW, Bandmann O. Zebrafish as a new animal model for movement disorders. J Neurochem. 2008;106(5):1991–7.
- Fontana BD, Mezzomo NJ, Kalueff A V., Rosemberg DB. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. Exp Neurol. 2018;299:157–71.
- Garrett MC, Soares-da-Silva P. Increased cerebrospinal fluid dopamine and 3,4dihydroxyphenylacetic acid levels in Huntington's disease: evidence for an overactive dopaminergic brain transmission. J Neurochem. 1992;58(1):101–6.
- Gil-Mohapel JM, Rego AC. Huntington's Disease: A review on the physiopathological aspects. Rev Neurociencias. 2011;19(4):724–34.
- Ghosh R, Tabrizi SJ. Clinical features of huntington's disease. Adv Exp Med Biol. 2018;1049:1–28.
- Glass M, Dragunow M, Faull RLM. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: A comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. Neuroscience. 2000;97(3):505–19.
- Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. Curr Opin Pharmacol. 2004;4(5):504–12.
- Goodliffe JW, Song H, Rubakovic A, Chang W, Medalla M, Weaver CM, Luebke JI. Differential changes to D1 and D2 medium spiny neurons in the 12-month-old Q175+/- mouse model of Huntington's Disease. PLoS One. 2018;13(8):1–28.
- Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AHV. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. Ann Neurol. 1996;39(3):385–9.
- Guedes-Dias P, Pinho BR, Soares TR, de Proença J, Duchen MR, Oliveira JMA. Mitochondrial dynamics and quality control in Huntington's disease. Neurobiol Dis. 2016;90:51–7.

- Guitart X, Bonaventura J, Rea W, Orrú M, Cellai L, Dettori I, Pedata F, Brugarolas M, Cortés A, Casadó V, Chang CP, Narayanan M, Chern Y, Ferré S. Equilibrative nucleoside transporter ENT1 as a biomarker of Huntington disease. Neurobiol Dis. 2016;96:47–53.
- Guyot MC, Hantraye P, Dolan R, Palfi S, Maziére M, Brouillet E. Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease- like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. Neuroscience. 1997;79(1):45–56.
- Han P, Nakanishi ST, Tran MA, Whelan PJ. Dopaminergic Modulation of Spinal Neuronal Excitability. J Neurosci. 2007;27(48):13192–204.
- Harrington DL, Smith MM, Zhang Y, Carlozzi NE, Paulsen JS. Predict-HD Investigators of the Huntington Study Group. Cognitive domains that predict time to diagnosis in prodromal Huntington disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012;83(6):612–9.
- Herrera-Mundo N, Sitges M. Mechanisms underlying striatal vulnerability to 3nitropropionic acid. J Neurochem. 2010;114(2):597–605.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature. 2013;496(7446):498–503.
- Imarisio S, Carmichael J, Korolchuk V, Chen C-W, Saiki S, Rose C, Krishna G, Davies JE, Ttofi E, Underwood BR, Rubinsztein DC. Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. Biochem J. 2008;412(2):191–209.
- Johri A, Chandra A, Beal MF. PGC-1α, mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. Free Radic Biol Med. 2013;62:37–46.
- Kacprzak V, Patel NA, Riley E, Yu L, Yeh JRJ, Zhdanova I V. Dopaminergic control of anxiety in young and aged zebrafish. Pharmacol Biochem Behav. 2017;157:1– 8.
- Kamble N, Netravathi M, Nagaraju BC, Lenka A, Kumar K, Sowmya V, Jain S, Pal PK. Evaluation of Cognition and Cortical Excitability in Huntington's Disease. Can J Neurol Sci. 2018;45(2):176–81.
- Kao YH, Lin MS, Chen CM, Wu YR, Chen HM, Lai HL, Chern Y, Lin CJ. Targeting ENT1 and adenosine tone for the treatment of Huntington's disease. Hum Mol Genet. 2017;26(3):467–78.
- Kaufman S, Friedman S. Dopamine-Beta-Hydroxylase. Pharmacol Rev. 1965;17:71– 100.
- Kaur N., Jamwal S., Kaur Gill H., Bansal P.K., 2017. Animal Models of Huntington's Disease. In: Bansal P., Deshmukh R. (eds) Animal Models of Neurological Disorders. Springer, Singapore.
- Kay C, Hayden MR, Leavitt BR. Epidemiology of Huntington disease. Handb Clin Neurol. 2017;144:31–46.

- Kim GW, Copin JC, Kawase M, Chen SF, Sato S, Gobbel GT, Chan PH. Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20(1):119–29.
- Kim GW, Chan PH. Oxidative stress and neuronal DNA fragmentation mediate agedependent vulnerability to the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid, in the mouse striatum. Neurobiol Dis. 2001;8(1):114–26.
- Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Elevated serotonin and reduced dopamine in subregionally divided Huntington's disease striatum. Ann Neurol. 1987;22(3):386–9.
- Klempír J, Klempírová O, Spacková N, Židovská J, Roth J. Unified Huntington's Disease Rating Scale: Clinical practice and a critical approach. Funct Neurol. 2006;21(4):217–21.
- Koehler D, Williams FE. Utilizing zebrafish and okadaic acid to study Alzheimer's disease. Neural Regen Res. 2018;13(9):1538–1541.
- Korzh V. Development of brain ventricular system. Cell Mol Life Sci. 2018;75(3):375– 383.
- Kumar P, Kalonia H, Kumar A. Huntington's disease: Pathogenesis to animal models. Pharmacol Reports. 2010;62(1):1–14.
- Kumar P, Kalonia H, Kumar A. Nitric oxide mechanism in the protective effect of antidepressants against 3-nitropropionic acid-induced cognitive deficit, glutathione and mitochondrial alterations in animal model of Huntington's disease. Behav Pharmacol. 2010;21(3):217–30.
- Labbadia J, Morimoto RI. Huntington's disease: Underlying molecular mechanisms and emerging concepts. Trends Biochem Sci. 2013;38(8):378–85.
- Lalonde R, Botez MI. The cerebellum and learning processes in animals. Brai Res Rev. 1990;15(3):325–32. Review.
- Lapish CC, Kroener S, Durstewitz D, Lavin A, Seamans JK. The ability of the mesocortical dopamine system to operate in distinct temporal modes. Psychopharmacology. 2007;191(3):609–25.
- Lawrence AD, Sahakian BJ, Robbins TW., 1998. Cognitive functions and corticostriatal circuits: insights from Huntington's disease. Trends Cogn Sci. 1, :379–88.
- Lelos MJ, Dunnett SB. Generating excitotoxic lesion models of Huntington's disease. Methods Mol Biol. 2018;1780:209–220.
- Levin EY, Levenberg B, Kaufman S. The enzymatic conversion of 3,4dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. J Biol Chem. 1960;235:2080–6.

- Li SH, Li XJ. Huntingtin and its role in neuronal degeneration. Neuroscientist. 2004;10(5):467–75. Review.
- Liot G, Valette J, Pépin J, Flament J, Brouillet E. Energy defects in Huntington's disease: Why "in vivo" evidence matters. Biochem Biophys Res Commun. 2017;483(4):1084–95.
- Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M. 3-nitropropionic acid -Exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. Can J Neurol Sci. 1991;18(4):492–8.
- Lukács A, Szabó A, Papp A, Vezér T. Altered open field behavior in rats induced by acute administration of 3-nitropropionic acid: Possible glutamatergic and dopaminergic involvement. Acta Biol Hung. 2009;60(4):359–67.
- Lumsden AL, Henshall TL, Dayan S, Lardelli MT, Richards RI. Huntingtin-deficient zebrafish exhibit defects in iron utilization and development. Hum Mol Genet. 2007;16(16):1905–20.
- MacDonald ME, Barnes G, Srinidhi J, Duyao MP, Ambrose CM, Myers RH et al. Gametic but not somatic instability of CAG repeat length in Huntington's disease. J Med Genet. 1993;30(12):982–6.
- Margolis RL, Ross CA. Diagnosis of Huntington disease. Clin Chem. 2003;49(10):1726–32. Review.
- Martinez-Mir MI, Probst A, Palacios JM. Adenosine A2 receptors: Selective localization in the human basal ganglia and alterations with disease. Neuroscience. 1991;42(3):697–706.
- Mason ST, Fibiger HC. Kainic acid lesions og the striatum in rats mimic the spontaneous motor abnormalities of Huntington's disease. Neuropharmacol. 1979;18(4):403–7.
- Mason SL, Daws RE, Soreq E, Johnson EB, Scahill RI, Tabrizi SJ, Barker RA, Hampshire A. Predicting clinical diagnosis in Huntington's disease: An imaging polymarker. Ann Neurol. 2018;83(3):532–43.
- McGeer PL, McGeer EG. Kainic acid: The neurotoxic breakthrough. Crit Rev Toxicol. 1982;10(1):1–26. Review.
- Mendes MF, Augusto L, Andrade FDE, Ballal H. Chorea: clinical analysis of 119 cases. Arq Neuropsiquiatr. 1996;54(3):419–27.
- Mievis S, Blum D, Ledent C. A2A receptor knockout worsens survival and motor behaviour in a transgenic mouse model of Huntington's disease. Neurobiol Dis. 2011;41(2):570–6.
- Ming L. Moldy sugarcane poisoning- A case report with a brief review. Clin Toxicol. 1995;33(4):363–7.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine Receptors: From

Structure to Function. Physiol Rev. 1998;78(1):189–225.

Mueller T. What is the thalamus in zebrafish ? Front Neuosci. 2012;6:64.

- Müller T. Investigational agents for the management of Huntington's disease. Expert Opin Investig Drugs. 2017;26(2):175–85.
- Nery LR, Eltz NS, Hackman C, Fonseca R, Altenhofen S, Guerra HN, Freitas VM, Bonan CD, Vianna MR. Brain intraventricular injection of amyloid-β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. PLoS One. 2014;9(9):105862.
- Nance MA. Genectics of Huntington disease. Handb Clin Neurol. 2017;144:3-14. Review.
- Novak MJ, Tabrizi SJ. Huntington's disease. BMJ. 2010;340:c3109. Review.
- Oliveira JM, Jekabsons MB, Chen S, Lin A, Rego AC, Gonçalves J, Ellerby LM, Nicholls DG. Mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: the bioenergetics of isolated and in situ mitochondria from transgenic mice. J Neurochem. 2007;101(1):241–9.
- Palfi S, Ferrante RJ, Brouillet E, Beal MF, Dolan R, Guyot MC, Peschanski M, Hantraye P. Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. J Neurosci. 1996;16(9):3019–25.
- Pandey M, Varghese M, Sindhu KM, Sreetama S, Navneet AK, Mohanakumar KP, Usha R. Mitochondrial NAD+-linked State 3 respiration and complex-I activity are compromised in the cerebral cortex of 3-nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's disease. J Neurochem. 2008;104(2):420–34.
- Pandey M, Rajamma U. Huntington's disease: the coming of age. J Genet. 2018;97(3):649–64.
- Paulsen J, Ready R, Hamilton J, Mega M., Cummings J. Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2001;5:310–4.
- Paulsen JS, Langbehn DR, Stout JC, Aylward E, Ross CA, Nance M, Guttman M, Johnson S, MacDonald M, Beglinger LJ, Duff K, Kayson E, Biglan K, Shoulson I, Oakes D, Hayden M; Predict-HD Investigators and Coordinators of the Huntington Study Group. Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2008;79(8):874–80.
- Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N. The incidence and prevalence of Huntington's disease. a systematic review and meta-analysis. Mov Disord. 2012;27(9):1083–91. Review.
- Ramaswamy S, Shannon KM, Kordower JH. Huntington's disease: pathological mechanisms and therapeutic strategies. Cell Transplant. 2007;16(3):301–12. Review.

- Rambo CL, Mocelin R, Marcon M, Villanova D, Koakoski G, de Abreu MS, Oliveira TA, Barcellos LJ, Piato AL, Bonan CD. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. Physiol Behav. 2017;171:50–54.
- Rangel-Barajas C, Coronel I, Florán B. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. Aging Dis. 2015;6(5):349–68.
- Rangel-Barajas C, Rebec GV. Overview of Huntington's disease models: neuropathological, molecular and behavioral differences. Curr Protoc Neurosci. 2018;83(1):47. Review.
- Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, Tabrizi SJ, Douglas I, Evans SJW, Smeeth L. The prevalence of huntington's disease. Neuroepidemiology. 2016;46(2):144–53.
- Ribeiro FM, Pires RG, Ferguson SS. Huntington's disease and Group I metabotropic glutamate receptors. Mol Neurobiol. 2011;43(1):1–11.
- Ribeiro FM, Vieira LB, Pires RG, Olmo RP, Ferguson SS. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. Pharmacol Res. 2017;115:179–191.
- Rico EP, Rosemberg DB, Langoni A da S, Souto AA, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD, Souza DO. Chronic ethanol treatment alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. Neurotoxicology. 2011;32(6):871–8.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signal. 2006;2(2):409–30.
- Roos RA. Huntington's disease: a clinical review. Orphanet J Rare Dis. 2010; 20(5):40. Review.
- Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. Lancet Neurol. 2011;10(1):83–98.
- Rubinsztein DC. Lessons from animal models of Huntington's disease. Trends Genet. 2002;18(4):202–9.
- Sanberg PR, Lehmann J, Fibiger HC. Impaired learning and memory after kainic acid lesions of the striatum: a behavioral model of Huntington's disease. Brain Res. 1978;149(2):546–51.
- Scahill RI, Hobbs NZ, Say MJ, Bechtel N, Henley SM, Hyare H, Langbehn DR, Jones R, Leavitt BR, Roos RA, Durr A, Johnson H, Lehéricy S, Craufurd D, Kennard C, Hicks SL, Stout JC, Reilmann R, Tabrizi SJ; TRACK-HD investigators. Clinical impairment in premanifest and early Huntington's disease is associated with regionally specific atrophy. Hum Brain Mapp. 2013;34(3):519–29.
- Schwab LC, Garas SN, Drouin-Ouellet J, Mason SL, Stott SR, Barker RA. Dopamine and Huntington's disease. Expert Rev Neurother. 2015;15(4):445–58.

- Sepers MD, Raymond LA. Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in Huntington's disease. Drug Discov Today. 2014;19(7):990–6.
- Shinozuka K, Watanabe S. Effects of telencephalic ablation on shoaling behavior in goldfish. Physiol Behav. 2004;81(1):141–8
- Singh-Bains MK, Waldvogel HJ, Faull RL. The role of the human globus pallidus in Huntington's disease. Brain Pathol. 2016;26(6):741–751.
- Sloman KA, Scott GR, Diao Z, Rouleau C, Wood CM, McDonald DG. Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Aquat Toxicol. 2003;65(2):171–85.
- Squitieri F, Griguoli A, Capelli G, Porcellini A, D'Alessio B. Epidemiology of Huntington disease: first post-HTT gene analysis of prevalence in Italy. Clin Genet. 2016;89(3):367–70.
- Sorensen SA, Fenger K. Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives. J Med Genet. 1992;29(12):911–4.
- Sorolla MA, Nierga C, Rodríguez-Colman MJ, Reverter-Branchat G, Arenas A, Tamarit J, Ros J, Cabiscol E. Sir2 is induced by oxidative stress in a yeast model of Huntington disease and its activation reduces protein aggregation. Arch Biochem Biophys. 2011;510(1):27–34.
- Stednitz SJ, McDermott EM, Ncube D, Tallafuss A, Eisen JS, Washbourne P. Forebrain control of behaviorally driven social orienting in zebrafish. Curr Biol. 2018;28(15):2445–2451.
- Suganya SN, Sumathi T. Effect of rutin against a mitochondrial toxin, 3nitropropionicacid induced biochemical, behavioral and histological alterations- a pilot study on Huntington's disease model in rats. Metab Brain Dis. 2017;32(2):471–481.
- Tariq M, Khan HA, Elfaki I, Al Deeb S, Al Moutaery K. Neuroprotective effect of nicotine against 3-nitropropionic acid (3-NP)-induced experimental Huntington's disease in rats. Brain Res Bull. 2005;67(1-2):161–8.
- Tsang TM, Woodman B, McLoughlin GA, Griffin JL, Tabrizi SJ, Bates GP, Holmes E. Metabolic characterization of the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease by high-resolution MAS 1H NMR spectroscopy. J Proteome Res. 2006;5(3):483–92.
- Túnez I, Tasset I, Pérez-De La Cruz V, Santamaría A. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. Molecules. 2010;15(2):878–916.
- Ullmann JF, Cowin G, Kurniawan ND, Collin SP. A three-dimensional digital atlas of the zebrafish brain. Neuroimage. 2010;51(1):76–82.
- van Walsem MR, Howe EI, Ruud GA, Frich JC, Andelic N. Health-related quality of life and unmet healthcare needs in Huntington's disease. Heal Qual Life Outcomes.

2017;15:1–10.

- Vaz T, Hofmeister W, Lindstrand A. Zebrafish models of neurodevelopmental disorders: limitations and benefits of current tools and techniques. Int J Mol Sci. 2019;20(6):2–26.
- Vaz RL, Outeiro TF, Ferreira JJ. Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson's disease and other movement disorders: A systematic review. Front Neurol. 2018;9:347.
- Venton BJ, Zhang H, Garris PA, Phillips PEM, Sulzer D, Wightman RM. Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing. J Neurochem. 2003;87(5):1284–95.
- Venugopal A, Chandran M, Eruppakotte N, Kizhakkillach S, Breezevilla SC, Vellingiri B. Monogenic diseases in India. Mutat Res. 2018;776:23–31.
- Villar-Menéndez I, Blanch M, Tyebji S, Pereira-Veiga T, Albasanz JL, Martín M, Ferrer I, Pérez-Navarro E, Barrachina M. Increased 5-methylcytosine and decreased 5hydroxymethylcytosine levels are associated with reduced striatal A2AR levels in Huntington's disease. NeuroMolecular Med. 2013;15(2):295–309.
- Vonsattel JP, DiFiglia M. Huntington disease. J Neuropathol Exp Neurol. 1998;57(5):369–84. Review.
- Waters S, Tedroff J, Ponten H, Klamer D, Sonesson C, Watersc N. Pridopidine: Overview of Pharmacology and Rationale for its Use in Huntington's Disease. J Huntingtons Dis. 2018;7(1):1–16
- Weber AV, Backes LTH. Excitotoxicity glutamatergic in Huntington's disease. Rev Contexto & Saúde. 2016;16(31):97–103.
- Wexler A, Wild EJ, Tabrizi SJ. George Huntington: A legacy of inquiry, empathy and hope. Brain. 2016;139(8):2326–33.
- Wiatr K, Szlachcic WJ, Trzeciak M, Figlerowicz M, Figiel M. Huntington disease as a neurodevelopmental disorder and early signs of the disease in stem cells. Mol Neurobiol. 2018;55(4):3351–3371. Review.
- Wijeratne PA, Young AL, Oxtoby NP, Marinescu RV, Firth NC, Johnson EB, Mohan A, Sampaio C, Scahill RI, Tabrizi SJ, Alexander DC. An image-based model of brain volume biomarker changes in Huntington's disease. Ann Clin Transl Neurol. 2018;5(5):570–582.
- Wild E, Tabrizi S. (2014-03). Premanifest and Early Huntington's Disease. In (Ed.), Huntington's Disease. Oxford, UK: Oxford University Press,. Retrieved 5 Feb. 2019.http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199929146.001.0001/me d-9780199929146-chapter-5.
- Wild EJ, Tabrizi SJ. Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease. Lancet Neurol. 2017;16(10):837–847.

- Wullimann MF. Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice: a brief review. Integr Zool. 2009;4(1):123–133.
- Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. Curr Neurol Neurosci Rep. 2011;11(3):274–82.
- Yamamoto K, Ruuskanen JO, Wullimann MF, Vernier P. Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates. New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. Mol Cell Neurosci. 2010;43(4):394–402.
- Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2014;49(6):473–97.
- Zheng J, Winderickx J, Franssens V, Liu B. A Mitochondria-Associated Oxidative Stress Perspective on Huntington's Disease. Front Mol Neurosci. 2018;11:1–10.
- Zimmermann FF, Gaspary KV, Siebel AM, Bonan CD. Oxytocin reversed MK-801induced social interaction and aggression deficits in zebrafish. Behav Brain Res. 2016;311:368–74.

ANEXOS

## ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE

#### ANIMAIS (CEUA)



SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 8024

Porto Alegre,14 de julho de 2017

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Estabelecimento de um modelo de Doença de Huntington induzido por ácido 3-nitropropiônico em peixe-zebra: avaliação de parâmetros comportamentais e moleculares" coordenado por CARLA DENISE BONAN.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 14/07/2017 - 14/09/2018

Nº de Animais	Espécie	
468	Danio rerio	
4407	Danio rerio	
Total de Animais: 4875		

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

## ANEXO B: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

← → C				🖈 🛛 Erro 🔕 🗄
NEURO PHARMACOLOGY	7			
home   main menu   submit paper   guide for authors   register   change details   log out	Username: melissa.wiprich@acad.pucrs.br Switch To: Co-author T Go to: My EES Hub			Version: EES 2019.2
Submissions Being Processed for Co-author melissa wiprich				
Page: 1 of 1 (1 total submissions)		Display 10 🔻 resul	its per page.	
□ Action ▲ ▲▼ Title		Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links 3-Nitropropionic acid induces Huntin	ngton's-like symptoms in zebrafish	Feb 06, 2019	Feb 06, 2019	Submitted to Journal
Page: 1 of 1 (1 total submissions)		Display 10 🔻 resul	lts per page.	
	<< Co-author Main Menu			

Help | Privacy Policy | Terms and Conditions | About Us

Copyright © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved. Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our <u>Cookies</u> page.

C II	
Mail	Melicca Talita Wiprioh <melicca.wiprioh@aoad.puorc.br< th=""></melicca.wiprioh@aoad.puorc.br<>
Fwd: Submission Con	firmation
Carla Denise Bonan <cbonan@ Para: Melissa Talita Wiprich <me< th=""><th>pucrs.br&gt; 14 de fevereiro de 2019 10:3 Issa.wiprich@acad.pucrs.br&gt;</th></me<></cbonan@ 	pucrs.br> 14 de fevereiro de 2019 10:3 Issa.wiprich@acad.pucrs.br>
Carla Denise Bonan PUCRS	
From: eesserver@eesmail.e	elsevier.com <eesserver@eesmail.elsevier.com> on behalf of</eesserver@eesmail.elsevier.com>
Neuropharmacology <885887 Sent: Wednesday, February 6, To: Carla Depice Bonan	ver@eesmail.elsevier.com> 2019 6:15:01 PM
Subject: Submission Confirma	tion
*** Automated email sent by	y the system ***
Neuropharmacology Title: 3-Nitropropionic acid I Authors: Melissa T Wiprich; Article Type: Research Pap	nduces Huntington's-like symptoms in zebrafish Rodrigo Zanandrea; Stefani Altenhofen; Carla Denise Bonan er
Dear Carla Bonan,	
Your submission entitled "3- been received by Neuropha	-Nitropropionic acid induces Huntington's-like symptoms in zebrafish" has armacology.
You may check on the prog author. The URL is https://e	ress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an es.elsevier.com/neuropharm/.
Your manuscript will be give	en a reference number once an Editor has been assigned.
Thank you for submitting yo queries.	our work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any
Kind regards,	
Neuropharmacology	
For any technical queries al authorsupport@elsevier.com	bout using EES, please contact Elsevier Author Support at m



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Pró-Reitoria de Graduação Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar Porto Alegre - RS - Brasil Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564 E-mail: prograd@pucrs.br Site: www.pucrs.br