



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

DAYANE PESSOA DE ARAÚJO

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E NEUROPROTETORA DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO:
UMA NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE
PARKINSON**

FORTALEZA – CE

2012

DAYANE PESSOA DE ARAÚJO

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E NEUROPROTETORA DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO:
UMA NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE
PARKINSON

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Silvânia Maria Mendes Vasconcelos.

Co-orientador (a): Prof^a Dr^a Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

FORTALEZA – CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

A688a Araújo, Dayane Pessoa de.
Atividade antioxidante e neuroprotetora do ácido alfa lipóico: uma nova perspectiva para o tratamento da doença de Parkinson/ Dayane Pessoa de Araújo. – 2012.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Neurofarmacologia.

Orientação: Profª Drª Silvânia Maria Mendes Vasconcelos.

Coorientação: Profª Drª Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

1. Doença de Parkinson 2. Ácido Tióctico 3. Levodopa 4. Estresse Oxidativo I.Título.

CDD 616.833

DAYANE PESSOA DE ARAÚJO

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E NEUROPROTETORA DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO:
UMA NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE
PARKINSON

Dissertação apresentada ao Mestrado em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a Dr^a Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Jairo Diniz Filho
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dedico este trabalho a Deus a quem tudo devo.

E a minha tia Maria Albaniza Pessoa, que sempre acreditou no meu potencial e me apoiou em todas as minhas escolhas me dando o bem mais precioso que um indivíduo pode adquirir, o saber.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por me amparar em todos os momentos da minha vida, enchendo-a de bênçãos e graças. A eles meus eternos agradecimentos!

A minha querida Tia Albaniza Pessoa, que tanto contribuiu com a minha formação, se fazendo presente em todos os momentos e vibrando pelo meu sucesso. Por seu amor, carinho, dedicação e fortaleza. Obrigada por tudo minha tia, amor eterno!

A minha mãe Danúbia, por ter me dado à vida, por seu amor, os quais jamais serão esquecidos. Amo Você!

Ao meu esposo José Rodolfo, pelo carinho, apoio e flexibilidade nos momentos de maiores necessidades e pela grande contribuição para a concretização dessa trajetória. Amo-te!

A minha tia Lourdes e a minha irmã Dayara, a minha avó Socorro que tantas vezes me apoiaram para seguir em frente.

A minha orientadora, professora Dr^a. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, pela paciência, atenção e dedicação oferecidas durante a construção deste trabalho. Muito obrigada!

A Dr^a Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, minha co-orientadora pela contribuição inestimável, pela paciência e serenidade. Por ajudar na execução deste trabalho, o qual não teria sido possível sem a senhora. Muito Obrigada!

Ao Dr Otoni Cardoso do Vale e ao Dr. Jairo Diniz Filho, por fazerem parte da minha banca, contribuindo com o seus conhecimentos para o aperfeiçoamento deste trabalho. Muito obrigada!

A Dr^a Danielle Macêdo Silveira, por sua presença alegre e contagiante.

A minha querida amiga Marcia Calheiros, pela sua amizade sincera e presteza a qual me orgulho muito. Você é muito especial!

Ao meu colega Carlos Eduardo, por ter me ajudado na realização dos meus experimentos. Muito obrigada, sua contribuição foi de grande valor.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório de neurofarmacologia - UFC em especial a Caren Soares e Paulo Victor por terem me ajudado nos meus experimentos para a construção deste trabalho. Muito Obrigada!

Aos colegas do laboratório de neurofarmacologia - UFC em especial. Francisca Taciana, Eliane Lima, Edna Chaves, Patricia Xavier, Lena Costa, Vila e Rafael Sampaio. Vocês são muito especiais!

A CAPES (PROEX) e CNPq pelo apoio financeiro importantíssimo no desenvolvimento deste trabalho

“Os sonhos são como uma bússola, indicando os caminhos que seguiremos e as metas que queremos alcançar. São eles que nos impulsionam, nos fortalecem e nos permitem crescer.”

(Augusto Cury)

RESUMO

Atividade antioxidante e neuroprotetora do ácido alfa lipóico: uma nova perspectiva para o tratamento da doença de Parkinson. DAYANE PESSOA DE ARAÚJO. Orientadora: Prof^a Dr^a Silvânia Maria Mendes Vasconcelos. Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2012.

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos comportamentais e neuroquímicos do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA no modelo animal de doença de Parkinson induzido pela injeção estereotáxica da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) em corpo estriado de rato. Os animais (ratos Wistar machos, 250-300g) foram tratados com ácido lipóico nas doses de 100mg/Kg ou 200mg/Kg sozinho ou associado com LDOPA na dose de 50mg/Kg 1h antes da injeção estereotáxica com 6-OHDA e diariamente por 14 dias após a lesão. O comportamento motor foi testado através da avaliação rotacional induzida pela apomorfina, da atividade exploratória horizontal no teste de campo aberto e da assimetria no uso das patas dianteiras no teste do cilindro. Os testes neuroquímicos visaram avaliar o efeito antioxidante e neuroprotetor do ácido α -lipóico através da determinação da peroxidação lipídica no TBARS, determinação da concentração de nitrito/nitrato e avaliação da atividade da catalase. O ácido α -lipóico promoveu uma diminuição significativa no número de rotações contralaterais induzidas pela apomorfina, bem como promoveu uma melhora do desempenho motor, aumentando a atividade exploratória horizontal no teste de campo aberto e a utilização da pata contralateral à lesão produzida pela 6-OHDA no teste do cilindro. Quanto ao efeito antioxidante, o ácido α -lipóico promoveu uma redução da peroxidação lipídica ao reduzir o TBARS, reduziu a produção de nitrito/nitrato, bem como interagiu com o sistema antioxidante endógeno promovendo uma redução na atividade da enzima catalase. Portanto, o ácido α -lipóico preveniu a lesão produzida nos neurônios dopaminérgicos pela 6-OHDA e pelo uso prolongado da LDOPA, demonstrando que este antioxidante teve efeito neuroprotetor, sendo um importante alvo terapêutico para a doença de Parkinson.

Palavras-chaves: Doença de Parkinson. Ácido α -lipóico. LDOPA. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Antioxidative and neuroprotective activity of alpha-lipoic acid: a new perspective for the treatment of Parkinson's disease. DAYANE PESSOA DE ARAÚJO. Leader: Prof^a Dr^a Silvânia Maria Mendes Vasconcelos. Prof^a Dr^a Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar. Master's thesis. Graduate Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2012.

This study aimed to investigate the behavioral and neurochemical effects of α -lipoic acid alone or in combination with LDOPA in an animal model of Parkinson Disease induced by stereotactic injection of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6 - OHDA) in rat striatum. The animals (male Wistar rats, 250-300g) were treated with doses of lipoic acid or 100mg/kg 200mg/Kg alone or in combination with a dose of 50mg/Kg LDOPA 1h before stereotactic injection of 6-OHDA and daily for 14 days after injury. Motor behavior was tested by evaluating apomorphine-induced rotational, horizontal exploratory activity in open field test and asymmetry in the use of the forelegs in the cylinder test. The neurochemical tests were intended to evaluate the antioxidant and neuroprotective effect of α -lipoic acid by determining the lipid peroxidation in the TBARS and determining the concentration of nitrite/nitrate and evaluation of catalase activity. α -Lipoic acid promoted a significant decrease in the number of rotations induced by apomorphine, as well as promoted an improvement in motor performance by increasing the horizontal exploratory activity in open field test and use the paw of the opposite side of the lesion produced by 6-OHDA in the test cylinder. The antioxidant effect of the α -lipoic acid promoted reduction of lipid peroxidation by reducing the TBARS reduced the production of nitrite / nitrate and interacted with the antioxidant system promoting a reduction in endogenous catalase activity. Therefore, α -lipoic acid prevented the damage produced in the dopaminergic neurons by 6-OHDA and the chronic use of LDOPA, indicating that this antioxidant had a neuroprotective effect, being an important therapeutic target for Parkinson disease.

Keywords: Parkinson's disease. α -Lipoic acid. LDOPA. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Secção através do cérebro mostrando o tálamo e as diferentes partes dos NB	21
Figura 2	Modelo mostrando as conexões entre os gânglios basais, tálamo e áreas de córtex motor	22
Figura 3	O balanço entre as ações estimulatórias (via glutamato-Glu e acetilcolina-ACh) e inibitórias (GABA e DA-DA) mantendo o funcionamento normal do circuito neuronal e as possíveis alterações que ocorrem na doença de Parkinson	23
Figura 4	As formas oxidadas e reduzidas do ácido α -lipóico	29
Figura 5	Determinação do comportamento rotacional induzido pela apomorfina (1mg/Kg, i.p) por 60 min, em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA e tratados com ácido α -lipóico nas doses de 100mg/Kg e 200mg/Kg sozinho ou em associação com a LDOPA (50mg/Kg)	43
Figura 6	Determinação do efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA no número de cruzamento de quadrantes no teste de campo aberto em animais pré-tratados com a 6-OHDA	46
Figura 7	Determinação do efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA no número de rearing no teste de campo aberto em animais pré-tratados com a 6-OHDA	47
Figura 8	Determinação do efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA no número de grooming no teste de campo aberto em animais pré-tratados com a 6-OHDA	48
Figura 9	Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA sobre a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	53
Figura 10	Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA sobre a peroxidação lipídica no hipocampo de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	54
Figura 11	Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA sobre a peroxidação lipídica no corpo estriado de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	55

Figura 12	Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA sobre a concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	58
Figura 13	Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA sobre a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	59
Figura 14	Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA sobre a concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	60
Figura 15	Efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA sobre a atividade da catalase no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	62
Figura 16	Efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA sobre a atividade da catalase no hipocampo de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	63
Figura 17	Efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA sobre a atividade da catalase no corpo estriado de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Protocolo experimental 1	37
Quadro 2	Protocolo experimental 2	38
Quadro 3	Protocolo experimental 3	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Drogas e Reagentes	35
Tabela 2	Avaliação dos efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA no teste do cilindro em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5HT	Serotonina
Acetil CoA	Acetilcoenzima A
Ach	Acetilcolina
AL	Ácido α -lipóico
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
COMT	Catecolaminotransferase
CPF	Córtex pré-frontal
CE	Corpo estriado
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
HC	Hipocampo
HVA	Ácido homovanílico
LDOPA	Diidroxifenilalanina
MAO	Monoaminaoxidase
MDA	Malondialdeído
NA	Noradrenalina
NB	Núcleos da base
NST	Núcleo Subtalâmico
PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
SNc	Substância Negra <i>pars Compacta</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNr	Substância Negra <i>pars Reticulata</i>
TH	Tirosina hidroxilase
VD	Via direta
VI	Via indireta
VMAT	Transportador vesicular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Doença de Parkinson	18
1.2	Bases neurais da doença de Parkinson	20
1.3	Patogênese da doença de Parkinson	24
1.4	Mecanismo apoptótico e sua influência no Parkinson	25
1.5	Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo	26
1.6	Modelo de doença de Parkinson induzido pela 6-hidroxidopamina	26
1.7	Ácido α -lipóico e doença de Parkinson	28
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo geral	35
2.2	Objetivos específicos	35
3	METODOLOGIA	36
3.1	Animais	36
3.2	Drogas e reagentes	36
3.3	injeção estereotáxica com 6-OHDA	37
3.4	Procedimento experimental	38
3.5	Testes comportamentais	39
3.6	Dissecação da área cerebral	40
3.7	Determinação da peroxidação lipídica (tbars)	40
3.8	Determinação do conteúdo de nitrito	41
3.9	Determinação da concentração de catalase	41
4	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	44
5.1	Determinação do comportamento rotacional induzido pela administração intraperitoneal de apomorfina em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA e tratados com ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA	44
5.2	Análise dos efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA sobre o comportamento locomotor no teste de campo aberto em ratos submetidos ao modelo de doença de Parkinson	45
5.3	Determinação do efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA no teste de assimetria no uso do membro anterior (teste do cilindro)	50

5.4	Determinação dos efeitos do ácido α -lipóico sobre a peroxidação lipídica em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	52
5.5	Dosagem de nitrito/nitrato em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA na ausência ou presença do ácido α -lipóico e/ou LDOPA	57
5.6	Avaliação da atividade da catalase no efeito neuroprotetor do ácido α -lipóico no modelo da doença de Parkinson induzido por 6-OHDA	62
6	DISCUSSÃO	66
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
	REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A transformação em um novo perfil epidemiológico em que a sociedade está inserida, relacionado ao envelhecimento populacional, traz aos profissionais de saúde um volume crescente de doenças crônicas e degenerativas, que são afecções típicas de idades mais avançadas (PETERNELLA e MARCON, 2009).

O envelhecimento, antes considerado um fenômeno, hoje, faz parte da realidade da maioria das sociedades. O mundo está envelhecendo. Tanto isso é verdade que se estima para o ano de 2050 existam cerca de dois bilhões de pessoas com mais de sessenta anos no mundo, a maioria delas vivendo em países em desenvolvimento (BRASIL, 2006).

O aumento da expectativa de vida resulta em conseqüências como aumento da preocupação da manutenção da saúde do idoso, principalmente diante de uma doença crônica e degenerativa como a doença de Parkinson (DP) (PETERNELLA e MARCON, 2009).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em idosos com uma prevalência estimada de 3.300 por 100.000 pessoas no Brasil (WIRDEFELDT, 2011). Esta é uma doença de distribuição universal atingindo todas as classes sociais. Acomete, preferencialmente, pessoas com idade superior a 60 anos. A incidência tem aumentado em cerca de 1,5% em pessoas acima de 65 anos, e de 2,5%, nos acima de 85 anos de idade (BRASIL, 2006).

Segundo Wirdefeldt *et al.* (2011) e Baumann (2012) a prevalência da DP tem sido estimada entre 167 a 5.703 casos por 100.000 pessoas com idade superior a 60 anos. Acredita-se que até o ano 2030 o número de indivíduos acometidos pela DP seja de 8,7 a 9,7 milhões no mundo. O quadro clínico, em geral, tem início entre 50 e 70 anos de idade. A doença não apresenta maior incidência de acordo com a raça, classe social ou sexo, apesar de alguns estudos epidemiológicos demonstrarem maior freqüência no sexo masculino (TEIVE, 2005; WIRDEFELDT, 2008). No Brasil estima-se que existam cerca de 200 mil casos de DP, sendo a

maior parte concentrada nas regiões Sudeste e Sul, responsável por um total estimado de 64 mil casos (BRASIL, 2006).

O gasto econômico global com a DP é substancial e relacionando os custos diretos e indiretos, é estimado em vinte bilhões de dólares anuais e tende a dobrar devido ao aumento do número de indivíduos afetados (WEINTRAUB, COMELLA e HORN, 2008).

A DP é definida como distúrbio neurológico progressivo, caracterizado principalmente pela degeneração das células (neurônios) da parte compacta da substância negra e do *Locus coeruleus*. Tal degeneração resulta na diminuição da produção de dopamina (DA), produzindo um conjunto de sintomas caracterizados principalmente por distúrbios motores. Seu início costuma ser insidioso, e dificilmente o portador identifica o momento exato em que notou alguma mudança em si, geralmente, são parentes ou pessoas próximas que percebem alterações sutis (TEIVE, 2005; FEKETE e JANKOVIC, 2011).

As manifestações clínicas da DP produzem incapacidades que levam a redução da qualidade de vida do sujeito portador desta doença. Tais sintomas são: presença de tremor de repouso, rigidez muscular do tipo plástica ou cética, bradicinesias que se traduzem por alentecimento dos movimentos e dificuldade em iniciar movimentos voluntários, além de instabilidade postural por perda de reflexos posturais, face inexpressiva, melancolia, perda de apetite, fadiga, distúrbios do sono, demência, perda da autoestima e ansiedade (GONÇALVES, ALVAREZ e ARRUDA, 2007).

O tratamento atual restringe-se apenas no alívio dos sintomas e no retardo da velocidade da neurodegeneração. Deste modo, várias intervenções terapêuticas vem sendo utilizadas, dentre elas podemos citar o tratamento farmacológico: o uso de drogas que atuam no sistema dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico, glutamatérgico e gabaérgico, antagonistas do receptor de adenosina A_{2a}, e o tratamento não farmacológico que envolve estimulação cerebral profunda no núcleo subtalâmico do portador de DP e a terapia com células tronco (AGUIAR, 2009).

As drogas que atuam sobre o sistema dopaminérgico podem agir diretamente aumentando as concentrações endógenas de DA podemos citar a

levodopa (LDOPA), em geral utilizada juntamente com inibidores da dopa descarboxilase de ação periférica como a carbidopa; drogas que agem inibindo a metabolização endógena da DA, como por exemplo, a selegilina que bloqueia a MAO-B e drogas que agem como agonistas dos receptores dopaminérgicos D1 e D2, tais como, bromocriptina e pergolida (AGUIAR *et al.*, 2006).

A LDOPA, atualmente, é a droga mais eficaz contra os sintomas motores da DP. Ela é o metabólito precursor da DA. A LDOPA é metabolizada a 3-O-metilLDOPA (3-OMD) e no cérebro é rapidamente descarboxilada à DA.

No início do tratamento com a LDOPA o portador da DP apresenta uma melhora significativa dos sintomas, porém, com o tempo a doença tende a progredir levando a perda da eficiência e eficácia do medicamento, sendo necessário o aumento das doses, a substituição ou a combinação terapêutica para minimizar os efeitos causados pela doença. (XU *et al.*, 2005).

Com o uso prolongado da LDOPA, o indivíduo passa a apresentar o fenômeno ON/OFF que são flutuações do estado clínico, caracterizado por movimentos coreoatetóticos nas extremidades e segmento cranial, manifestando-se no auge do efeito da LDOPA, a discinesia – ON. Por outro lado, a redução na dose de LDOPA pode levar a movimentos distônicos, na região axial e também nas extremidades, sendo acompanhados de dor no segmento acometido, a discinesia - OFF (RODRIGUES e CAMPOS, 2006; HOLLOWAY *et al.*, 2004; JENNER, 2005).

Esses efeitos colaterais limitam o uso da LDOPA e impossibilitam a continuação do tratamento. Portanto, estratégias neuroprotetoras estão sendo propostas à medida que o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DP estão sendo elucidados, dentre elas podemos citar o ácido α -lipóico como nova proposta terapêutica complementar ao tratamento atual da DP (ARAÚJO *et al.* 2011).

1.2 Bases neurais da doença de Parkinson

A partir da descoberta da presença de DA no cérebro humano especialmente nos núcleos da base (NB), vários estudiosos buscaram compreender

esta relação com DP. Meynert em 1871 foi o primeiro a propor que uma disfunção dos NB estava intimamente ligada ao desenvolvimento da DP (AGUIAR, 2009).

Os NB são constituídos por uma complexa rede de núcleos e vias nervosas. Eles participam no planejamento dos movimentos voluntários, mas também estão envolvidos no controle das funções cognitivas e afetivas. O mau funcionamento destas estruturas leva a distúrbios hipocinéticos e transtornos hiperkinéticos, tais como, DP e doença de Huntington, respectivamente (DIETRICH, 2008).

Os NB consistem de quatro centros subcorticais, imersos no centro branco medular do cérebro, cujas aferências majoritárias provêm do córtex cerebral e emitem suas projeções para o próprio córtex, via tálamo, principalmente, para a realização do controle da motricidade (KANDEL, SCHWARTZ e JESSEL, 2003; MONTGOMERY, 2012).

As quatro estruturas que correspondem aos NB são: o *Striatum* (Formado pelos Núcleos Caudado e Putâmen); o Globo Pálido (subdividido morfofisiologicamente em Globo Pálido Medial/Interno (GPi) e Globo Pálido Lateral/Externo (GPe)); a Substância Negra (subdividida morfofisiologicamente em Substância Negra *pars compacta* (SNc) e Substância Negra *pars reticulata*) e o Núcleo Subtalâmico (NST) (Figura 1) (KANDEL, SCHWARTZ e JESSEL, 2003).

O *striatum* recebe projeções glutamatérgicas oriundas de todas as áreas corticais, daí partem projeções estriatais que seguem dois caminhos distintos: a via direta (VD) e a via indireta (VI). Com relação à VD, as projeções gabaérgicas (inibitórias) partem do *striatum* e seguem diretamente para o GPi que, por sua vez, emitiria projeções gabaérgicas (também inibitórias) se não houvesse sido antes inibido pelo *striatum*. Uma vez inibido, o GPi não é capaz de inibir o Tálamo que, por sua vez emite eferências glutamatérgicas (excitatórias) para a porção motora do córtex cerebral (MARTIN, 1999; MACHADO, 2006).

No que tange a VI, O *striatum* projeta-se para o GPe por meio de projeções gabaérgicas e/ou encefalinérgicas. O GPe, por sua vez, se projeta para o NST, por uma via gabaérgica, e o NST se projeta então para o GPi por meio de uma via glutamatérgica (excitatória). Assim o GPi, estando excitado, emite projeções

gabaérgicas (inibitórias) para os núcleos talâmicos, causando a inibição destes (MARTIN, 1999; MACHADO, 2006).

Com isso, é possível perceber que a VD facilita o movimento, sendo considerada excitatória. Já a VI dificulta o movimento, sendo considerada então inibitória (KANDEL, SCHWARTZ e JESSEL, 2003).

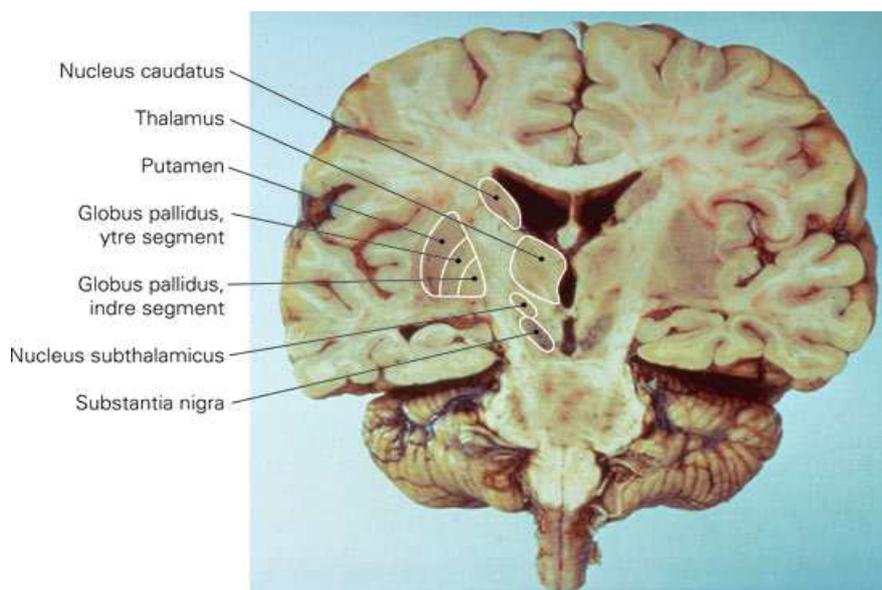


Figura 1 - Secção através do cérebro mostrando o tálamo e as diferentes partes dos NB. Fonte: DIETRICH, 2008.

A atividade cortico-estriado-talámo-cortical é afetada pela ação da DA a partir das fibras dopaminérgicas nigroestriatais da substância negra *pars compacta*. Os terminais nervosos nigroestriatais localizados no corpo estriado afetam a transmissão do sinal do córtex para o estriado (DIETRICH, 2008).

A DA apresenta efeitos opostos nas células das VD e VI, sendo excitatórios nas células da VD e inibitórios nas células da VI (OBESO *et al.*, 2008). Nesse circuito, além da DA outros neurotransmissores também possuem papel fundamental, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), a acetilcolina (ACh), o glutamato, a substância P, a encefalina, entre outros (AGUIAR, 2009).

A DA age nos receptores D1 ativando a via excitatória/VD facilitando a transmissão da informação ou inibindo a via inibitória/VI por ação nos receptores D2. Esse mecanismo tem como finalidade a produção dos movimentos e a inibição da

atividade muscular indesejada através do córtex motor. A perda da atividade dopaminérgica decorrente da degeneração neuronal presente na DP afeta a atividade de todo o sistema, reduzindo a ativação das áreas motoras acarretando no surgimento da bradicinesia (Figura 2) (DIETRICH, 2008).

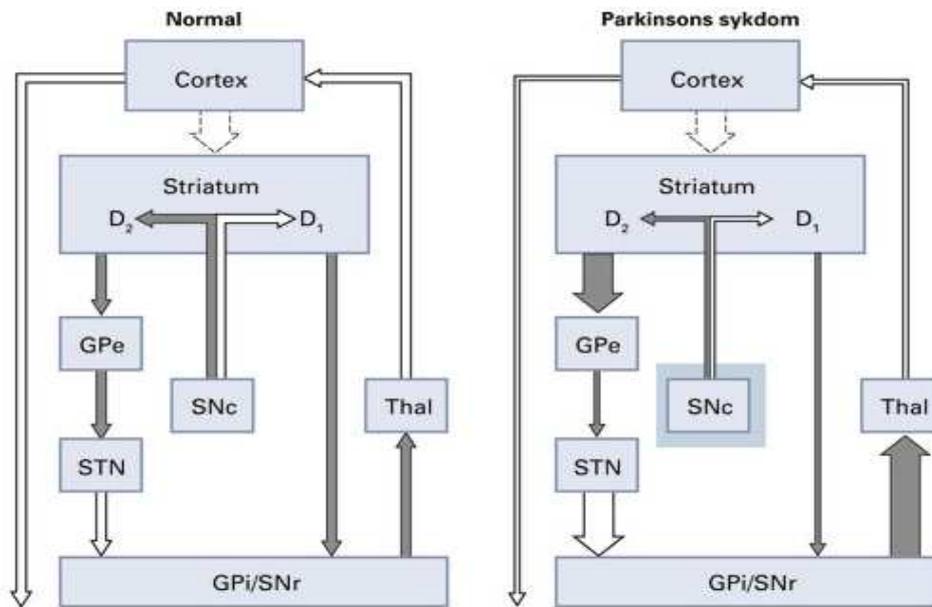


Figura 2 - Modelo mostrando as conexões entre os gânglios basais, tálamo e áreas de córtex motor. **Fonte:** DIETRICH, 2008. Neurotransmissão inibitória (GABAérgica) estão marcadas por seta cinza, excitatórias (glutamatérgica) seta branca. Espessura da seta é a intenção de representar a atividade impulso no nervo e respectivos caminhos. GPe: globo pálido externo, GPI: globo pálido interno, SNC: substância negra *pars compacta*, SNR: substância negra *pars reticulata*, STN: núcleo subtalâmico e Thal: tálamo.

A degeneração neuronal presente na DP não se restringe apenas a via dopaminérgica, outros sistemas encontram-se alterados na evolução dessa patologia, tais como: a via colinérgica, a via adrenérgica, a via serotoninérgica, a via gabaérgica e a via glutamatérgica. (JÖBGES *et al.*, 2007). Os níveis de acetilcolina (Ach) não se alteram na DP, mas com a depleção da DA ocorre redução do efeito inibitório nos neurônios do estriado ricos em Ach, levando a uma hiperatividade relativa desses neurônios colinérgicos (Figura 3) (XU, BASTIA e SCHWARZSCHILD, 2005).

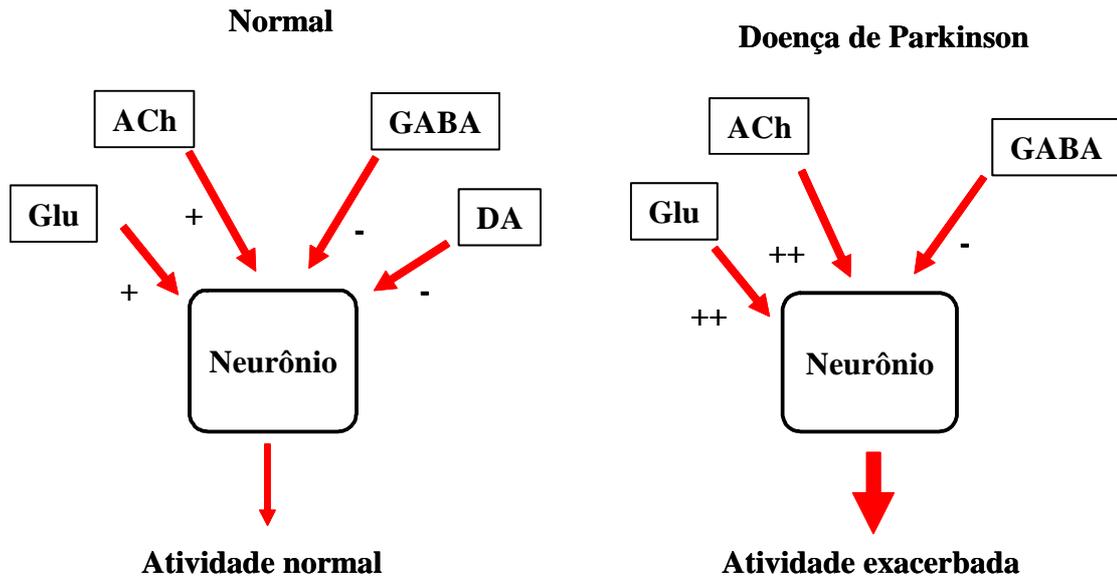


Figura 3 - O balanço entre as ações estimuladoras (via glutamato-Glu e acetilcolina-ACh) e inibitórias (GABA e DA-DA) mantendo o funcionamento normal do circuito neuronal e as possíveis alterações que ocorrem na doença de Parkinson. **Fonte:** AGUIAR, 2009.

1.3 Patogênese da doença de Parkinson

O processo neurodegenerativo da substância negra envolvida na DP é marcado pela deficiência de tirosina hidroxilase e presença de inclusões intracitoplasmáticas ricas em corpos de Lewy. Esses corpúsculos de Lewy são constituídos por diversas proteínas, dentre elas podemos citar a α -sinucleína, parkina, ubiquitina e neurofilamentos que podem ser encontrados em várias regiões cerebrais (AGUIAR *et al.*, 2008).

A perda neuronal dopaminérgica inicia na camada ventrolateral da substância negra, progredindo para as camadas medial, ventral e dorsal. Esse padrão de perda está relacionado à diminuição de transportadores de DA (PEREIRA *et al.*, 2007).

A origem dessa degeneração neuronal ainda é desconhecida e envolve diversos fatores tais como, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, deficiência de fatores neurotróficos, ação do sistema imune, acúmulo de proteínas alteradas (α -sinucleína), excitotoxicidade e mecanismo pró-apoptótico (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

1.4 Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo na doença de Parkinson

O funcionamento normal das células promove a produção constante de radicais livres, principalmente sob a forma de espécies reativas de oxigênio (ROS). Após sua produção, esses radicais são removidos por substâncias chamadas antioxidantes que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas (FERREIRA e ABREU, 2007).

O estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre fatores que promovem a formação de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante. As reações de oxidação e redução são catalisadas por metais de transição como o ferro, o cobre, e o manganês. Destes, o mais importante do ponto de vista biológico é o ferro. Tem sido discutido que o estresse oxidativo pode contribuir para o processo patogênico da morte das células nigrais na DP. Vários fatores poderiam estar implicados em conjunto como a excessiva formação de peróxidos, com deficiência de glutathione (que seria a principal arma antioxidante e protetora), a um aumento da reatividade ao ferro, levando a formação de radicais tóxicos. Todos estes fatores podem atuar de forma isolada ou em conjunto, provocando o aparecimento do estado de estresse oxidativo e a subsequente neurodegeneração na parte compacta da substância negra do mesencéfalo (TEIVE, 2005).

Os radicais livres produzidos no organismo que se encontram em abundância são derivados do oxigênio, sendo o superóxido, o radical presente em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação dos neutrófilos, macrófagos e eosinófilos; o radical hidroperoxila encontra-se na sua forma protonada e é mais reativo do que o radical superóxido; o radical hidroxila é o mais reativo nos sistemas biológicos; e o peróxido de hidrogênio não é necessariamente um radical, pois não apresenta elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, porém, é um metabólito do oxigênio altamente reativo e participa da produção dos radicais hidroxila (FERREIRA e ABREU, 2007).

O estresse oxidativo contribui para a degeneração dopaminérgica na DP. As regiões cerebrais ricas em catecolaminas são mais vulneráveis a ação dos radicais livres. A metabolização da DA se dá pela ação da monoaminoxidase (MAO)

ou pela auto-oxidação com a produção de peróxido de hidrogênio, esse metabolismo pode desencadear a exacerbação do processo inflamatório e o dano tecidual devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (AGUIAR *et al.*, 2008).

Um dos processos oxidativos mais amplo é aquele onde ocorre a quebra de lipídios das membranas celulares e a formação de radical de peroxil. Este processo, chamado de peroxidação lipídica é extremamente complexo e lesivo, porque uma vez iniciado, pode ser propagado, já que o radical peroxil formado pode reiniciar o processo, que pode ocorrer indefinidamente (BARBOSA, 2006).

Os agentes antioxidantes são responsáveis por evitar esses danos causados pelos radicais livres e EROs. Entre esses agentes pode citar a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione peroxidase (GPH-Px), a glutathione reductase (GPH-R), estas sendo antioxidantes enzimáticos. Dentre as formas não enzimáticas estão o tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), os carotenóides, os flavonóides e o ácido α -lipóico (BARBOSA, 2006).

1.5 Mecanismo apoptótico e sua influência na doença de Parkinson

O mecanismo apoptótico está diretamente relacionado à DP contribuindo com a morte neuronal. Esse processo envolve a alteração na membrana mitocondrial levando a formação de canais de alta condutância promovendo a perda de potencial por fosforilação oxidativa, há também o extravasamento de citocromo c para o meio intracitoplasmático, ativação de caspases, transglutaminases, endonucleases e fosfatidilserina. Essa série de eventos leva a fragmentação e clivagem de organelas e cromatina, após esta etapa há formação de corpúsculos apoptóticos que posteriormente são fagocitados pelos macrófagos (AGUIAR, 2009).

A apoptose é composta por duas vias de ativação, a via extrínseca onde há a ação da pró-caspase 8 que é recrutada pelo domínio efetor de morte que envia o sinal de morte por meio do complexo de morte via estímulo extracelular, sendo o ligante o fator de necrose tumoral (TFN); a via intrínseca é a outra via de ativação da apoptose, essa envolve a sinalização da pró-caspase 9 que ativada atua na

permeabilidade da membrana mitocondrial promovendo a liberação de citocromo c no meio intracitoplasmático e promovendo a morte celular (AGUIAR *et al.*, 2008).

As caspases são proteases que estão envolvidas no mecanismo de apoptose. No tecido nervoso dos mamíferos existem mais de 14 tipos de caspases, elas podem atuar na iniciação da apoptose, na execução ou como mediadores da inflamação. Na DP a caspase 3 é a que se encontra em maior concentração (WEINTRAUB, COMELLA e HORN, 2008).

1.6 Modelo animal de doença de Parkinson induzido pela 6-hidroxi-dopamina

A 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) também conhecida como 2,4,5-tri-hidroxi-feniletilamina é uma neurotoxina seletiva catecolaminérgica. Essa neurotoxina é utilizada como modelo para induzir a neurodegeneração progressiva que ocorre na DP (SOTO-OTERO *et al.*, 2000).

O modelo animal de DP é produzido pela injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA no corpo estriado ou na substância negra no mesencéfalo de ratos, o que provoca a destruição completa ou parcial dos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos ou dos seus terminais no *striatum* (BLANDINI *et al.*, 2008).

A 6-OHDA usa o mesmo sistema de transporte das catecolaminas para ser levada até o neurônio. Ela é relativamente seletiva para o neurônio dopaminérgico sendo transportada através do transportador de DA (DAT) e acumulando-se no citosol do neurônio induzindo a neurotoxicidade que culmina com a destruição neuronal (LEHMENSIEK *et al.*, 2006).

O mecanismo exato pelo qual a 6-OHDA produz a lesão de forma seletiva aos neurônios dopaminérgicos ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que essa ação neurotóxica da 6-OHDA se dá por dois mecanismos principais: através da formação de radicais livres, culminando com o estresse oxidativo ou pela inibição direta do complexo I e IV da cadeia respiratória mitocondrial (LEHMENSIEK *et al.*, 2006; BRANCHI *et al.*, 2010).

A 6-OHDA pode ser produzida a partir da DA por hidroxilação não enzimática na presença de Fe^{2+} e H_2O_2 . Em condições fisiológicas a 6-OHDA sofre

auto-oxidação na presença de oxigênio molecular formando o H_2O_2 e os correspondentes p-quinona. Esse último, por sua vez, sofre uma ciclização intramolecular seguida por uma cascata de reações oxidativas levando a formação de um polímero insolúvel relacionado com a neuromelanina (SOTO-OTERO *et al*, 2000; DOOLEY *et al*, 2012).

H_2O_2 resultante da auto-oxidação da 6-OHDA na presença de ferro pode ser convertido ao radical hidroxila pela reação de Fenton, que é um dos radicais livres mais prejudiciais às células. O neurônio dopaminérgico mesencefálico por ser rico em ferro decorrente da sua acumulação por neuromelanina favorece a seletividade pela 6-OHDA, sendo alvo potencial desta toxina (SOTO-OTERO *et al*, 2000).

A inibição direta do complexo I e IV da cadeia respiratória mitocondrial induzida pela 6-OHDA promove uma redução na produção de ATP, isso acarreta na disfunção na atividade da mitocôndria, produzindo alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial com conseqüente perda de elétrons a partir da cadeia transportadora de elétrons, favorecendo a formação de mais radicais livres que por sua vez leva a destruição do neurônio dopaminérgico de forma progressiva e irreversível.

1.7 Ácido α -lipóico e doença de Parkinson

1.7.1 Estrutura Química

O ácido α -lipóico (AL), também conhecido como ácido tióctico 1,2-ditiolano-3-pentanóico é um dissulfeto de oito carbonos contendo um centro quiral e, juntamente com a sua forma reduzida o di-hidrolipóico (DHLLA), são componentes naturais das membranas biológicas, sendo encontrados nas plantas e nos animais. O AL possui na sua estrutura dois grupos tiol que podem ser reduzidos ou oxidados, assim como o grupo tiol da glutathiona (GSH). O AL também contém um carbono assimétrico resultando em dois isômeros ópticos o RAL e o SAL, sendo a forma RAL sintetizada endogenamente. O AL exógeno é rapidamente absorvido pelas células,

no espaço intracelular é finalmente reduzido a DHLA com a participação do sistema NADH e NADPH (SCHOTTI *et al.*, 2007; PACKER e CADENAS, 2010).

O AL e o DHLA agem como antioxidantes naturais, atuando como co-fator para as desidrogenases do sistema mitocondrial, sendo, portanto, a mitocôndria seu principal local de ação. Diferentemente da GSH que apenas a forma reduzida atua como antioxidante, a forma oxidada e reduzida do AL tem ação antioxidante (VALE *et al.*, 2003; FERREIRA, MILITÃO e FREITAS, 2009; SMITH *et al.*, 2004) (Figura 4).

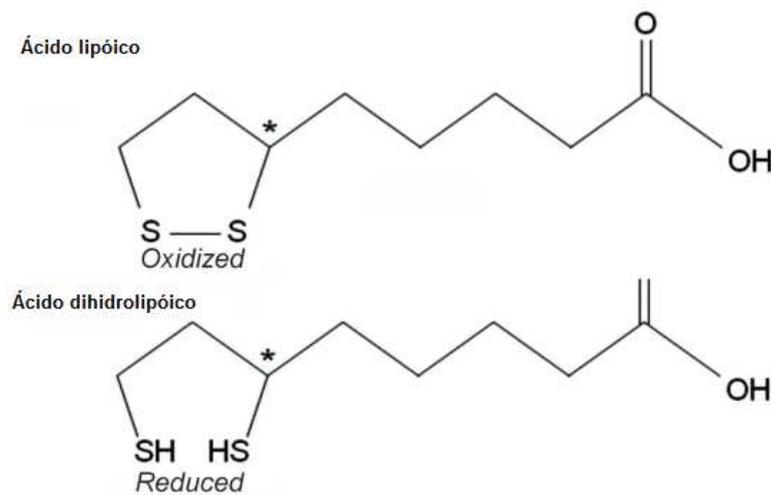


Figura 4. As formas oxidadas e reduzidas do ácido α -lipóico. Fonte: GORACA *et al.*, 2011

1.7.2 Absorção, biodisponibilidade e metabolismo do ácido α -lipóico por via oral

O AL como relatado anteriormente é uma substância presente endogenamente, nas membranas biológicas, mas também pode ser adquirida de maneira exógena através dos alimentos, tais como: produtos hortícolas, frutos, carnes, coração, rins e fígado (WOLLIN e JONES, 2003).

A absorção do AL exógeno ocorre de maneira rápida, esta substância atravessa a bicamada celular de forma dependente do pH. O transporte do AL pode

ser inativado pelo ácido benzóico e ácidos graxos de cadeia média, sugerindo que o transportador monocarboxilatos seja o provável transportador responsável pela absorção intestinal do AL. Em um estudo *in vitro* foi sugerido que o transportador multivitamínico dependente de sódio seja responsável pela absorção gástrica do AL, bem como seu transporte para os tecidos através do plasma sanguíneo (BALAMURUGAN *et al*, 2005).

A biodisponibilidade do AL pode variar se ele for ingerido na forma de ácido livre ou sal. A administração na forma de sal é mais rapidamente absorvido do que na forma de ácido livre (SHAY *et al*, 2009).

De acordo com a forma enantiomérica R e S, as concentrações plasmáticas do AL na forma R são maiores do que na forma S, sendo, portanto, a forma RAL a mais indicada para fornecer suplementos orais, no entanto, SAL na mistura racêmica podem impedir a polimerização do RAL e, assim, aumentar a biodisponibilidade total (TEICHERT *et al*, 2000).

O AL é metabolizado rapidamente após captação nos tecidos, sendo os produtos deste metabolismo o bisnorlipoato, o tetranorlipoato, e os derivados do beta-hidroxi-bisnorlipoato. Esses metabolitos são rapidamente excretados na urina (SHAY *et al*, 2009).

1.7.3 Ação antioxidante e neuroprotetora do ácido α -lipóico

A ação antioxidante do AL foi descrita a primeira vez como um co-fator essencial para a conversão de piruvato em acetil-coenzima A, um passo crítico na respiração celular. Além da função antioxidante, o AL também age como um agente mimético da insulina, estimulando a captação da glicose em muitos tipos de células e também pode modular a sinalização da insulina. Além dessa função, o AL ativa a prostaglandina EP2 e EP4 de receptores para estimular a produção de moléculas de adenosina cíclico 5' monofosfato (cAMP). Essas diversas ações, sugerem que o AL possa ser terapeuticamente eficaz no tratamento de várias doenças que tem o estresse oxidativo como mecanismo molecular envolvido, dentre elas a DP (SALINTHONE *et al*, 2008).

O AL e a sua forma reduzida, o DHLA, afeta as células e funções orgânicas por seis vias (PACKER, 1999; SCOTTI *et al*, 2007):

- a) Como antioxidantes, removendo os radicais de hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio em sua forma livre (HOCL), superóxido (O₂⁻) e o (LOO). Ambos quelam metais de transição. O DHLA regenera o ascorbato do seu radical ascorbil, que pode regenerar o tocoferol de seu radical tocoferil;
- b) Células suplementadas com AL aumentam o seu conteúdo de GSH, talvez pela redução do AL à DHLA, diminuindo o poder de redução celular (mimetizando o ataque oxidativo), e sinalizando a necessidade maior de thiol que reduz agentes como a GSH. A redução do AL em DHLA promove a redução da cistina em cisteína. Essa última é rapidamente transportada para o meio intracelular através do sistema de transporte alanina/serina/cisteína (ASC). No meio intracelular a cisteína estimula a síntese de GSH, promovendo o aumento desta enzima. O AL também age aumentando os níveis de outros antioxidantes como, a vitamina C e E, bem como previne a destruição da GSH no citoplasma e na mitocôndria;
- c) Aumenta a atividade antioxidante de outras substâncias endógenas e reduz a destruição mitocondrial por reduzir o estresse oxidativo através da remoção das EROS;
- d) O DHLA e o AL protegem proteínas. O DHLA protege proteínas pela thiolação em estudos com fumantes, bloqueando reações lesivas como aldeídos na fumaça. O AL bloqueia a glicação da albumina incubada em altas doses de glicose, provavelmente por ligação aos sítios hidrofóbicos;
- e) Reduz o risco de complicações cardiovasculares, retinopatia e neuropatias frequentes nos portadores de diabetes;
- f) O AL/DHLA regula o estado redox nas células afetando a expressão gênica e a transcrição oxidativa de fatores de pro-inflamatórios como o NFκB e o AP1.

O AL tem sido utilizado no tratamento de várias doenças por ser um antioxidante muito eficaz, pois além de combater os radicais livres, ele promove a

redução na peroxidação lipídica, atua como co-fator de múltiplos complexos enzimáticos e regenera os tecidos lesados (CHNG *et al*, 2009).

A atividade antioxidante do AL e DHLA está diretamente relacionada à ação destes agentes sobre o metabolismo energético mitocondrial. Sabe-se que a disfunção mitocondrial está envolvida na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, tais como: doença de Alzheimer, DP e doença de Huntington (PACKER e CADENAS, 2011).

A perda da função mitocondrial leva a redução do sistema da transdução energética. Essa disfunção está relacionada aos danos oxidativos produzidos pelo desequilíbrio nas concentrações das EROs presente nas doenças neurodegenerativas. A perda da função mitocondrial é agravada pela baixa regulação citosólica de glutarredoxina-1 (substância que ajuda a manter a integridade mitocondrial) (PACKER e CADENAS, 2011).

O AL age estimulando o sistema de sinalização MAPK/IP3K/AKT promovendo o aumento na expressão de co-fatores de enzimas como a piruvato desidrogenase e a α -cetoglutarato desidrogenase, bem como, protege essas enzimas contra o estresse oxidativo melhorando o sistema de defesa antioxidante e recuperando a regulação citosólica de glutarredoxina-1 promovendo o aumento da biogênese mitocondrial (LIU, 2008).

Estudos sugerem que o AL produz seus efeitos através da remoção de radicais hidroxilas e da inibição da oxidação de lipídios e proteínas (BIST e BHATT, 2009). Devido ao seu potente efeito antioxidante, seria também capaz de evitar o dano neuronal ocasionado pelas espécies reativas derivadas do oxigênio produzidas durante as doenças neurodegenerativas (MACZUREK *et al*, 2008). Também foi descrito uma importante ação para esse composto antioxidante contra o processo inflamatório cerebral induzido por radicais livres (BIEWENGA, HAENEN e BAST, 2000).

Como já descrito anteriormente o AL atua no processo inflamatório, inibindo a migração de células T. Esse mecanismo de reduzir a resposta inflamatória não está totalmente esclarecido, porém, acredita-se que isso esteja relacionado à molécula de cAMP que age como um potente inibidor da resposta imune e ativação das células T. O AL age aumentando as concentrações de cAMP, isso acarreta

numa inibição da ativação dos linfócitos T bem como a migração celular, isso acontece pela inibição da molécula de adesão vascular 1 (VCAM1) e adesão endotelial de monócitos humanos induzida pelo AL, portanto, reduzindo a resposta inflamatória (SCHILLACE *et al*, 2007; KUNT *et al*, 1999).

Outro papel importante do AL relatado por alguns estudos é a sua capacidade em alterar as concentrações das monoaminas em todo o cérebro. Essas alterações não são totalmente elucidadas, sabe-se apenas que o AL aumenta as concentrações de noradrenalina e DA através da estimulação da liberação e/ou síntese ou redução na taxa de metabolização destas monoaminas, bem como altera as concentrações de acetilcolina por aumentar a atividade da acetilcolinesterase (CHNG *et al*, 2009). Foi observada também uma redução dos níveis de serotonina no hipocampo de ratos tratados com o AL (FERREIRA, MILITÃO e FREITAS, 2009; BIST e BHATT, 2009).

Em um estudo realizado com o AL para avaliar sua ação sobre a disfunção cognitiva relacionada ao envelhecimento, foi observado que este favorecia a liberação do glutamato, este mecanismo se dava pela estimulação do influxo de cálcio levando a contração da vesícula sináptica e exocitose do glutamato. O estudo demonstrou que o AL exercia um papel fundamental na melhora da função cognitiva (WANG e CHEN, 2007).

O uso do AL como coadjuvante para o tratamento da DP vem sendo relatado na literatura, onde foi demonstrado que a ação antioxidante e a capacidade de melhorar o sistema de defesa contra o estresse oxidativo por aumentar os níveis de GSH, bem como aumentar a atividade da glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione-s-transferase (GST) duas importantes enzimas desintoxicantes, favoreciam o retardo na progressão da degeneração neuronal e regeneração do tecido lesado, sendo, portanto, uma nova perspectiva para o tratamento desta patologia (BILSKA *et al*, 2007).

Proteger o sistema nervoso central contra o dano oxidativo pode ser uma abordagem terapêutica útil. Assim, o AL pode possuir um papel modulador no tratamento de doenças neurodegenerativas como a DP uma vez que este composto interrompe o estresse oxidativo em ambas as suas formas oxidadas e reduzidas (FERREIRA, MILITÃO e FREITAS, 2009).

Apesar de extensas pesquisas, ainda não há nenhum tratamento definitivo para a DP levando cada vez mais pesquisadores em todo o mundo a buscar novas terapias capazes de retardar ou idealmente parar a neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos. A associação de fármacos para o tratamento da DP será importante para reduzir as doses e os efeitos adversos provocados pela ingestão destes medicamentos, proporcionando uma melhora na qualidade de vida e funcionalidade dos pacientes.

Considerando que a prevalência e os gastos econômicos relacionados aos custos diretos e indiretos da DP vem crescendo vertiginosamente. Assim como, que o ácido alfa-lipóico é capaz de atuar em diversos mecanismos patogênicos da doença como no combate do estresse oxidativo e redução da resposta neuroinflamatória. Bem como a falta de estudos mais aprofundados acerca do mecanismo de ação desta droga, justifica-se a relevância deste estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos comportamentais e neuroquímicos do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA no modelo animal de doença de Parkinson induzido pela injeção estereotáxica da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em corpo estriado de rato.

2.2 Específicos

- Verificar os efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA sobre o comportamento rotacional induzido pela administração intraperitoneal de apomorfina no modelo de doença de Parkinson;
- Verificar os efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA sobre o desempenho motor no teste de campo aberto e no teste de assimetria no uso do membro anterior (teste do cilindro);
- Determinar os efeitos bioquímicos do ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA sobre a concentração de TBARS, nitrito, e catalase em corpos estriado, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à injeção estereotáxica de 6-OHDA;
- Estudar os possíveis mecanismos envolvidos nas suas ações farmacológicas;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 8 ratos machos por grupo, totalizando 49 animais (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), com peso variando entre 250-300g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais foram mantidos em caixas de prolipropileno com no máximo seis animais, à temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água a vontade. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC sob o protocolo nº 72/10

3.2 Drogas e reagentes

TABELA 1 - Drogas e reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais.

Drogas/Reagentes	Procedência
Ácido α-lipóico	Sigma, [®] U.S.A.
6-OHDA	Sigma, [®] U.S.A.
LDOPA + cabidopa (250mg/25mg)	Teuto [®] , Brasil.
Ácido Clorídrico.	Vetec [®] , Brasil.
Ácido ditio bis-2-nitrobenzóico	Sigma, [®] U.S.A.
Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico	Reagen [®] , Brasil.
Acido fosfórico	Vetec [®] , Brasil.
Ácido tricloroacético (TCA)	Vetec [®] , Brasil.
Albumina sérica bovina	Sigma [®] , U.S.A
Apomorfina	Tocris [®] , U.S.A
Xilazina (10mg/kg)	Virbac [®] , Brasil
Coomassie Blue G250	Sigma [®] , U.S.A
Ketamina (50mg/Kg)	Virbac [®] , Brasil
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma [®] , U.S.A.

Drogas/Reagentes	Procedência
Fosfato de potássio monobásico	Reagen [®] , Brasil.
Fosfato de sódio dibásico	Reagen [®] , Brasil
Hidróxido de sódio	Vetec [®] , Brasil.
Peróxido de hidrogênio (30%)	Vetec [®] , Brasil.
N-acetil cisteína	União química [®] , Brasil.
N-(1-naphthyl) ethil –enedimine (NEED)	Sigma, [®] U.S.A.
Sulfanilamide	Sigma, [®] U.S.A.
Ácido Tiobarbiturico	Sigma, [®] U.S.A.
Trisma base	USB [®] , U.S.A.
Carboximetilcelulose	Vetec [®] , Brasil.

3.3 Injeção estereotóxica unilateral com 6-OHDA

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de xilazina (10mg/kg) e ketamina (80 mg/kg) sendo então submetidos à tricotomia da região superior da cabeça e posteriormente fixados ao aparelho estereotático onde receberam injeção estereotóxica unilateral de 6 OHDA (duas injeções de 1µl de uma solução de 6-OHDA dissolvida em salina 0,9% contendo 0,2% de ácido ascórbico) na dose de 12 µg/µl dentro do corpo estriado direito (AP 0,9/1,4; ML 3,8; DV 3,3 à partir do bregma) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1986), usando uma seringa de Hamilton de 5µl. A seringa foi deixada no local de aplicação por 5 minutos para assegurar que o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente (KIM et al, 1998). Logo após a cirurgia estereotática, a incisão cirúrgica foi suturada com fio de sutura náilon 3.0, o animal foi colocado na caixa de polipropileno sob luz vermelha para manutenção da temperatura corpórea até que o animal retornasse da anestesia.

3.4 Procedimento Experimental

3.4.1 Protocolo 1 - Tratamento com Ácido α -Lipóico Sozinho

O ácido α -lipóico foi utilizado por gavagem nas doses 100 ou 200 mg/kg e administrado uma hora antes da injeção estereotáxica de 6-OHDA e por 14 dias após a mesma. O veículo utilizado foi água destilada e celulose a 5% (Quadro 1).

3.4.2 Protocolo 2 – Tratamento com Ácido α -Lipóico + LDOPA

Os animais foram tratados com ácido α -lipóico em associação com LDOPA (LA 100 ou 200mg/kg e LDOPA 50 mg/kg gavagem) uma hora antes da injeção estereotáxica de 6- OHDA e por 14 dias após a mesma. O veículo foi água destilada para diluir a LDOPA e água destilada e celulose 5% para a diluição do ácido α -lipóico (Quadro 2).

3.4.3 Protocolo 3 – Tratamento com LDOPA

Os animais foram tratados por gavagem com LDOPA na dose 50 mg/kg uma hora antes da injeção estereotáxica de 6- OHDA e por 14 dias após a mesma. O veículo foi água destilada (Quadro 3).

Dois semanas após a lesão os animais foram submetidos aos testes comportamentais (rotacional com apomorfina, campo aberto e cilindro), e no dia seguinte (24 horas depois) foram sacrificados, decapitados com guilhotina, os

cérebros foram retirados para isolar o corpo estriado, que foram armazenados a – 70°C para uso posterior.

Quadro 1- Protocolo de tratamento com ácido α -lipóico

GRUPOS	Droga	Doses (mg/kg)	Via de adm.	Tempo de tto. (dias)
1 – Controle	Água destilada+celulose 5%	-	Gavagem	14
2 - 6-OHDA	Água destilada+celulose 5%	-	Gavagem	14
3 – LA 100 14d	Ácido α -lipóico	100	Gavagem	14
4 – LA 200 14d	Ácido α -lipóico	200	Gavagem	14

Quadro 2 - Protocolo de tratamento com ácido α -lipóico + LDOPA

GRUPOS	Droga	Doses (mg/kg)	Via de adm.	Tempo de tto. (dias)
1 - Controle	Água destilada+celulose 5%	-	Gavagem	14
2 - 6-OHDA	Água destilada+celulose 5%	-	Gavagem	14
5- LA 100 + LDOPA	Ácido α -lipóico + LDOPA	100 /50	Gavagem	14
7- LA 200 + LDOPA	Ácido α -lipóico + LDOPA	200/50	Gavagem	14

Quadro 3 - Protocolo de tratamento com LDOPA

GRUPOS	Droga	Doses (mg/kg)	Via de adm.	Tempo de tto. (dias)
1 - Controle	Água destilada+celulose 5%	-	Gavagem	14
2 - 6-OHDA	Água destilada+celulose 5%	-	Gavagem	14
3- LDOPA	LDOPA	50	Gavagem	14

3.5 Testes comportamentais

3.5.1 Teste rotacional com apomorfina

Os animais foram submetidos ao teste rotacional duas semanas após a lesão estriatal com 6-OHDA. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (3mg/kg, i.p., que induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão) sendo o número de rotações completas em volta do próprio eixo observado durante 60 minutos (KIM et al, 1998).

3.5.2 Teste do campo aberto

Os ratos foram colocados em um campo aberto, com área de 50 x 50 cm e em ambiente iluminado por uma luz vermelha. Este campo é confeccionado em acrílico com fundo preto, dividida em seis quadrantes iguais. Os animais foram previamente habituados durante 1 minuto ao campo aberto e, posteriormente, submetidos ao teste que foi realizado em uma sala livre de sons. Este teste avalia a movimentação espontânea dos animais (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), número de autolimpeza (“grooming”) e o número de levantamento com duas patas (“rearing”). O observador coloca os animais na arena e registra o número de travessias de um quadrante para outro durante 6 minutos (1 minuto de habituação) (JORGENSEN et. al., 1994).

3.5.3 Teste do cilindro

O teste do cilindro visa avaliar a assimetria no uso dos membros anteriores na atividade exploratória vertical (rearing). Para tanto os animais foram

colocados no interior de um cilindro de 20 cm de diâmetro e 40 cm de altura. Cada animal foi avaliado individualmente durante 5 minutos. Foi contado o número de contatos na parede do cilindro com a pata direita, esquerda e ambas as patas simultaneamente. Os resultados foram dados em percentual, sendo o cálculo feito da seguinte forma: a soma total de contatos na parede do cilindro com a pata direita, esquerda e ambas as patas totalizava 100%, com base nisso, calcula-se o valor percentual para cada achado (SCHALLERT *et al.*, 2000).

3.6 Dissecação da área cerebral

Os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA), os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo, 24 horas após o teste rotacional.

Em seguida, o corpo estriado (caudado, putamen e globo pálido), o córex pré-frontal e o hipocampo foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação após o rebatimento lateral do córtex.

Terminada a dissecação, cada área foi colocada em papel de alumínio, sob gelo, pesada e armazenada a -20 °C para uso posterior (BURKE, 1987).

3.7 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais foi medido através da determinação dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990), seguindo o protocolo a seguir.

Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. 0,25 mL do homogeneizado foi misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 min., adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína.

3.8 Determinação do conteúdo de nitrito

3.8.1 Preparação da curva padrão:

Foram pesados 7mg de NaNO_2 e dissolvidos em 10 mL de água destilada (estoque-10mM) foi feita as diluições em série (10 e 20x), ficando 1mM, 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,312 μM . Foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.* 1982).

Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (w/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Após a centrifugação (800xg, 10 min) os sobrenadantes são coletados e a produção de NO determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 μl do sobrenadante foi incubada com 100 μl do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em H_3PO_4 1 %/*N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1 %/ H_3PO_4 1 % / diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância é medida em espectrofotômetro a 550nm. A concentração de nitrito (μM) é determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 .

3.9 Determinação da concentração de catalase

A atividade da catalase foi medida pelo método que usa peróxido de hidrogênio para produzir H₂O e O₂ (Maehly & Chance, 1954). Imediatamente após o esvaziamento das áreas do cérebro, um meio de reação, que é composta de 9 ml de água oxigenada diluída em água destilada (1 / 1000) em 0,5 mL de Tris-HCl 1M 5 mM EDTA e 0,5 mL de água destilada, foi preparado. A amostra (20 ml), após centrifugação a 10.000 xg por 5 min, foi adicionado 980 ml do meio de reação. Após 1 min, a absorbância inicial foi gravada e ao final foi lido após 6 min. O comprimento de onda utilizado foi 230 nm. A curva padrão foi feita utilizando catalase purificada (Sigma, MO, E.U.A.) em condições idênticas à prova. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry et al. (1951).

4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Para comparação múltipla dos parâmetros foi utilizada a análise de variância (ANOVA). O nível de significância entre os grupos será determinado pelo teste de Tukey. Em todas as análises, considerar-se-á estatisticamente significante valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação do comportamento rotacional induzido pela administração intraperitoneal de apomorfina em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA e tratados com ácido α -lipóico sozinho ou associado à LDOPA.

O teste de rotação induzido por drogas já está bem estabelecido para avaliar o déficit de DA após a lesão produzida por neurotoxinas como a 6-OHDA. A apomorfina induziu um aumento significativo no número de rotações contralaterais a lesão no grupo pré-tratado com 6-OHDA (controle positivo) sem tratamento posterior quando comparado ao grupo controle (Falso operado/controle: $0,00 \pm 0,00$; 6-OHDA: $429,5 \pm 26,27$ rotações/h) (Figura 05).

Os grupos lesionados com 6-OHDA e tratados uma hora após com AL 100 ($95,67 \pm 17,51$ rotações/h) ou AL 200 ($89,33 \pm 14,15$ rotações/h) reduziram o número de rotações contralaterais a lesão quando comparado ao grupo da 6-OHDA e ao grupo da LDOPA (6-OHDA: $429,5 \pm 26,27$; 6-OHDA+LDOPA: $545,2 \pm 44,32$ rotações/h) (Figura 05).

Nos grupos lesionados com a 6-OHDA e tratados uma hora após com as associações de ácido α -lipóico e LDOPA, o ácido α -lipóico, em ambas as doses (6-OHDA+AL100+LDOPA: $61,17 \pm 3,54$ rotações/h) ou (6-OHDA+AL200+LDOPA: $53,33 \pm 8,45$ rotações/h) foi capaz de reverter o aumento das rotações contralaterais induzidas pela apomorfina quando comparados ao grupo da 6-OHDA e ao grupo da LDOPA sozinho (6-OHDA: $429,5 \pm 26,27$; 6-OHDA+LDOPA: $545,2 \pm 44,32$ rotações/h; $F(6,40)=109,8$; $p<0,0001$).

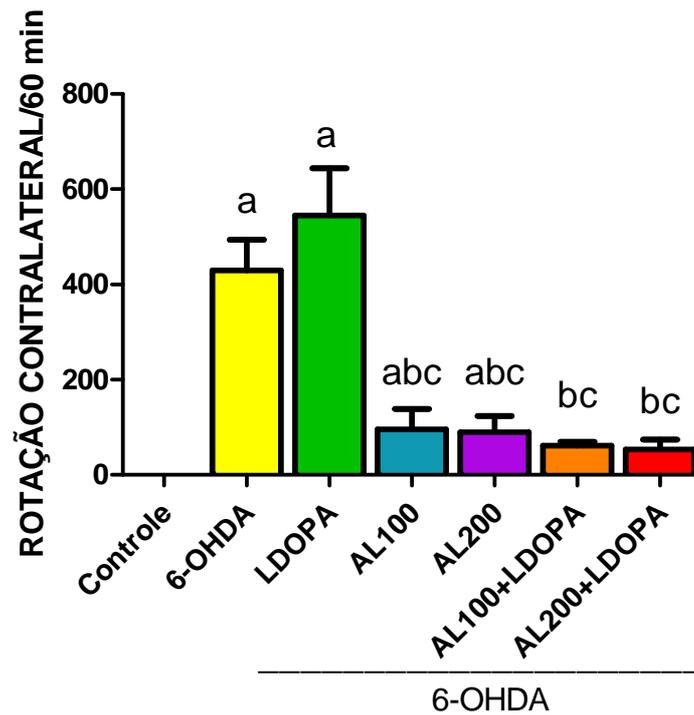


Figura 05 - Determinação do comportamento rotacional induzido pela apomorfina (1mg/Kg, i.p) por 60 min, em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA e tratados com ácido α -lipóico nas doses de 100 ou 200mg/Kg sozinho ou em associação com a LDOPA (50mg/Kg). Os valores são expressos como média \pm E.P.M do número de observações. Foram utilizados 8 animais por grupo. Foram usados os testes ANOVA e Tukey como teste *post hoc*. a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHDA+LDOPA com $p < 0,0001$.

5.2 Análise dos efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado com a LDOPA no comportamento locomotor do teste de campo aberto em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA.

Os resultados indicaram diferenças significativas no parâmetro locomotor no teste de campo aberto. O grupo pré-tratado com a 6-OHDA apresentou uma diminuição da atividade locomotora quando comparado ao grupo controle (Falso operado/controle: $24 \pm 1,21$; 6-OHDA: $3,16 \pm 0,16$) (Figura 06).

Os animais lesionados com 6-OHDA e posteriormente tratados com o AL 100 ($13,33 \pm 1,35$) ou AL 200 ($16,67 \pm 1,05$) ou LDOPA ($9,16 \pm 1,04$) ou com as associações de AL e LDOPA (6-OHDA+AL100+LDOPA: $13,13 \pm 1,72$; 6-OHDA+AL200+LDOPA: $9,66 \pm 1,43$) apresentaram um aumento na atividade locomotora quando comparado ao grupo da 6-OHDA sozinho ($3,16 \pm 0,16$) (Figura 06).

Quando comparados os grupos lesionados e tratados com AL (6-OHDA+AL) ao grupo lesionado e tratado com LDOPA (6-OHDA+LDOPA), somente o AL200 (6-OHDA+AL200: $16,67 \pm 1,05$) foi capaz de aumentar a atividade locomotora em relação ao grupo da LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $9,16 \pm 1,04$).

Nas associações de AL e LDOPA, o grupo lesionado e tratado com a dose de 200mg/Kg (6-OHDA+AL200+LDOPA: $9,66 \pm 1,43$) apresentou um menor número de cruzamentos nos quadrantes no teste de campo aberto quando comparado ao grupo do AL 200 sozinho (6-OHDA+AL200: $16,67 \pm 1,05$) [$F(6,41)=28,38$; $p<0,0001$] (Figura 06).

Na avaliação da atividade exploratória vertical (*rearing*) os resultados mostraram que o grupo pré-tratado com 6-OHDA sem tratamento posterior apresentou uma redução na frequência de *rearing* quando comparado ao grupo controle (Falso operado/controle: $14,17 \pm 0,65$; 6-OHDA: $3,83 \pm 0,4$).

Com relação aos grupos lesionados com 6-OHDA e tratados com LDOPA ou AL sozinhos ou com as associações de AL e LDOPA, apenas o grupo do AL 200 (6-OHDA+AL200: $14,5 \pm 0,42$) e LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $9,83 \pm 0,83$) apresentaram um aumento no número de *rearing* quando comparado ao grupo pré-tratado com 6-OHDA sem tratamento posterior (6-OHDA: $3,83 \pm 0,4$) (Figura 07).

O grupo tratado com AL 200 (6-OHDA+AL200: $14,5 \pm 0,42$) aumentou o número de *rearing* em relação ao grupo da LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $9,83 \pm 0,83$). Contudo, os grupos tratados com AL 100 (6-OHDA+AL100: $5,66 \pm 0,84$) e as

associações de AL e LDOPA em ambas as doses (6-OHDA+AL100+LDOPA: $4,5 \pm 0,71$; 6-OHDA+AL200+LDOPA: $5 \pm 0,63$) reduziram o *rearing* quando comparado ao grupo da LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $9,83 \pm 0,83$) [$F(6,41)=48,02$; $p < 0,0001$].

O número de *grooming* no teste do campo aberto foi menor no grupo da 6-OHDA e no grupo da LDOPA (6-OHDA+LDOPA) em comparação ao controle (Falso operado/controle: $5,5 \pm 0,34$; 6-OHDA: $2 \pm 0,25$; 6-OHDA+LDOPA: $2,33 \pm 0,21$). Os grupos lesionados com 6-OHDA e tratados com AL 100 (6-OHDA+AL100: $4,5 \pm 0,34$) e em ambas as associações (6-OHDA+AL100+LDOPA: $4,33 \pm 0,42$; 6-OHDA+AL200+LDOPA: $7,83 \pm 0,16$) apresentaram um aumento no número de *grooming* quando comparado ao grupo pré-tratado com 6-OHDA ou LDOPA (6-OHDA: $2 \pm 0,25$; 6-OHDA+LDOPA: $2,33 \pm 0,21$) (Figura 08).

Com relação aos grupos lesionados e tratados com AL, o AL 200 (6-OHDA+AL200: $1,16 \pm 0,16$) apresentou uma diminuição do *grooming* quando comparado ao controle e AL 100 (6-OHDA+AL100: $4,5 \pm 0,34$; Falso operado/controle: $5,5 \pm 0,34$). Já os grupos lesionados e tratados com as associados de AL e LDOPA, a dose de 200mg/Kg (6-OHDA+AL200+LDOPA: $7,83 \pm 0,16$) teve um aumento do *grooming* quando comparado aos grupos, controle (Falso operado/controle: $5,5 \pm 0,34$), 6-OHDA ($2 \pm 0,25$) do AL 200 (6-OHDA+AL200: $1,16 \pm 0,16$) e com a associação de AL100 (6-OHDA+AL100+LDOPA: $4,33 \pm 0,42$) [$F(6,41)=64,81$; $p < 0,0001$].

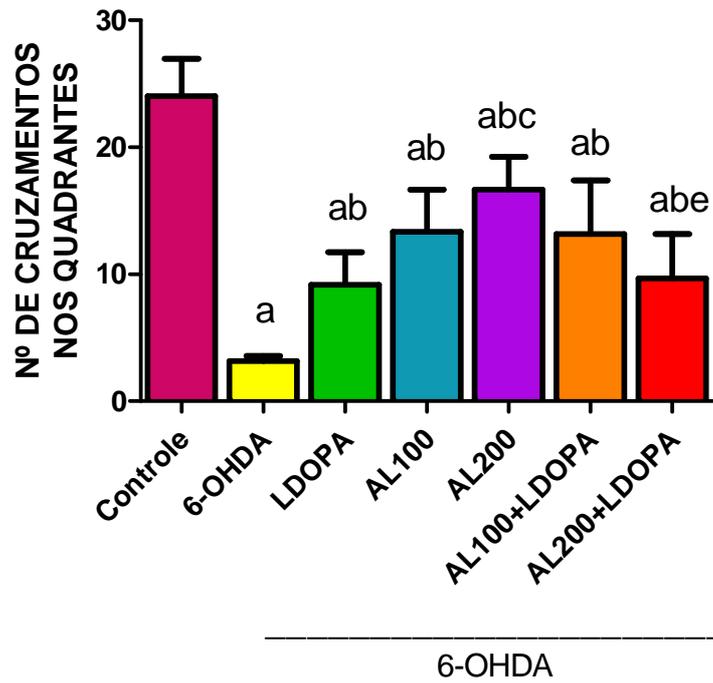


Figura 06 - Determinação do efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA no número de cruzamento no teste de campo aberto em animais pré-tratados com 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm E.P.M do número de observações. Foram utilizados 8 animais por grupo. Foram usados os testes ANOVA e Tukey como teste *post hoc*. a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHDA+LDOPA, d vs 6-OHDA+AL100, e vs 6-OHDA+AL 200 com $p < 0,0001$.

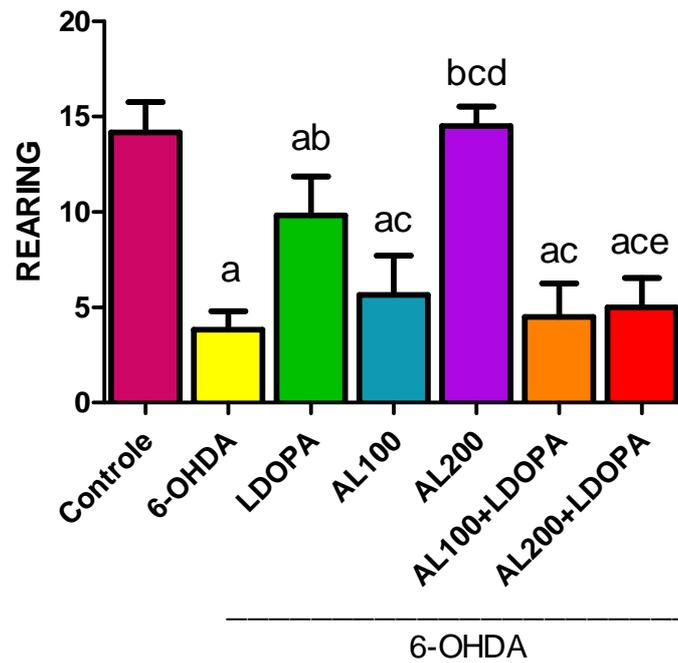


Figura 07 - Determinação do efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado a LDOPA no número de rearing no teste de campo aberto em animais pré-tratados com 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm E.P.M do número de observações. Foram utilizados 8 animais por grupo. Foram usados os testes ANOVA e Tukey como teste *post hoc*. a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHDA+LDOPA, d vs 6-OHDA+AL100, e vs 6-OHDA+AL200 com $p < 0,0001$.

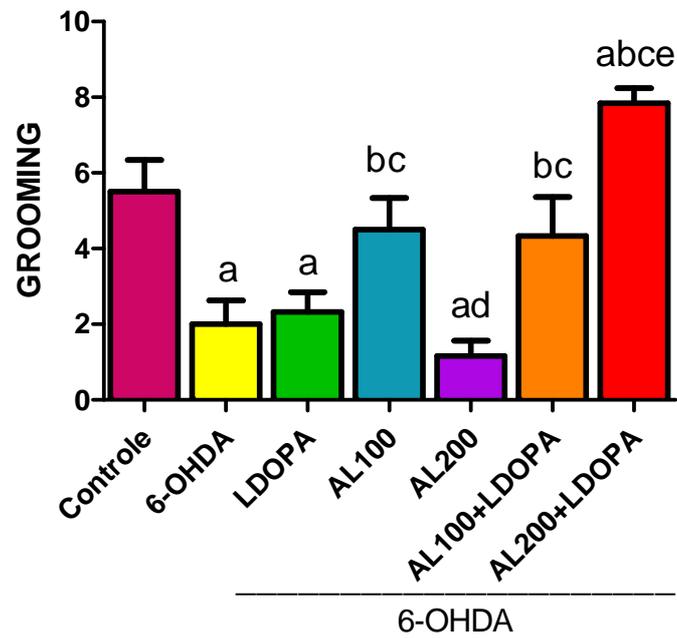


Figura 08 - Determinação do efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado à LDOPA no número de grooming no teste de campo aberto em animais pré-tratados com 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm E.P.M do número de observações. Foram utilizados 8 animais por grupo. Foram usados os testes ANOVA e Tukey como teste *post hoc*. a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHDA+LDOPA, d vs 6-OHDA+AL100, e vs 6-OHDA+AL200 com $p < 0,0001$.

5.3 Determinação do efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado à LDOPA no teste do cilindro em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA.

O teste do cilindro é utilizado como ferramenta de avaliação da atividade motora fina, através do percentual de vezes com que o animal durante atividade exploratória vertical (*rearing*), toca a parede do cilindro com as patas dianteiras [ipsilateral a lesão (IP), contralateral a lesão (CP) e ambas as patas simultâneas (2P)]. No grupo controle o animal tocou mais vezes à parede do cilindro com ambas às patas simultaneamente (Falso operado/controle IP:10,2%; CP:7,5%; 2P: 82,3%). Com relação ao grupo da 6-OHDA, somente a pata IP tocou a parede do cilindro (6-OHDA IP: 100%, CP: 0,0%, 2P: 0,0%) (Tabela 02).

O percentual de toques com as duas patas simultâneas na parede do cilindro aumentou nos animais tratados com o ácido α -lipóico (6-OHDA+AL100: 21,9%; 6-OHDA+AL200: 15%) e na associação de AL100 e LDOPA (6-OHDA+AL100+LDOPA: 52,8%) quando comparado com os grupos da 6-OHDA ou LDOPA sozinhos (6-OHDA: 0,0%; 6-OHDA+LDOPA: 4%) [F(6,41)=181,7; $p<0,0001$] (Tabela 02).

Os animais tratados com o ácido α -lipóico nas doses individuais de 100 ou 200mg/Kg (6-OHDA+AL100: 16,2%; 6-OHDA+AL200: 18,3%) e as associações de ácido α -lipóico e LDOPA (6-OHDA+AL100+LDOPA: 34,2%; 6-OHDA+AL200+LDOPA: 17,2%) em ambas as doses apresentaram uma melhora significativa do teste de avaliação da atividade motora fina, uma vez que, os animais tocaram mais vezes à parede do cilindro com a pata contralateral a lesão quando comparado ao grupo da 6-OHDA ou LDOPA sozinhos (6-OHDA: 0,0%; 6-OHDA+LDOPA: 4,59%)(Tabela 02).

O grupo tratado com a associação de AL100 e LDOPA (6-OHDA+AL100+LDOPA: 31,3%) aumentou à utilização da pata contralateral a lesão em relação ao grupo do AL100 sozinho e a associação de AL200 e LDOPA (6-OHDA+AL100: 16,2%; 6-OHDA+AL200+LDOPA: 17,2%) [F(6,41)=15,98; $p<0,0001$].

Tabela 02 - Avaliação dos efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado à LDOPA no teste do cilindro em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA

Grupo	Pata contralateral a lesão	Pata ipsilateral a lesão	Ambas as patas
Falso operado/controle	7,5%	10,2%	82,3%
6-OHDA	0,0%	100% ^a	0,0% ^a
6-OHDA+LDOPA	4,59%	91,41% ^a	4 % ^a
6-OHDA+AL100	16,2% ^{abc}	61,9% ^{abc}	21,9% ^{abc}
6-OHDA+AL200	18,3% ^{abc}	66,7% ^{abc}	15,0% ^{abc}
6-OHDA+AL100+LDOPA	31,3% ^{abcd}	15,9% ^{bcd}	52,8% ^{abcd}
6-OHDA+AL200+LDOPA	17,2% ^{abcf}	82,8% ^{af}	0,0% ^{aef}

Os valores são expressos como percentual do número de observações. Foram utilizados 8 animais por grupo. Foram usados os testes ANOVA e Tukey como teste *post hoc*. a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHDA+LDOPA, d vs 6-OHDA+AL100, e vs 6-OHDA+AL200, f vs 6-OHDA+AL100+LDOPA com $p < 0,0001$. AL100 (ácido α -lipóico 100mg/Kg), AL200 (ácido α -lipóico 200mg/Kg), LDOPA (50mg/Kg).

5.4 Determinação dos efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado à LDOPA sobre a peroxidação lipídica em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA.

A peroxidação lipídica foi avaliada através da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com a finalidade de demonstrar a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA e os efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou em associação com LDOPA sobre o estresse oxidativo.

As figuras 09, 10 e 11 mostram os efeitos da administração crônica do ácido α -lipóico (100mg/Kg e 200mg/Kg) sozinho ou em associação com a LDOPA (50mg/Kg) sobre o conteúdo de MDA no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE), respectivamente.

Os resultados mostraram que a exposição das células do CPF, HC e CE a 6-OHDA ($234 \pm 12,46$, $161,6 \pm 10,01$, $127,6 \pm 7,15$, respectivamente) e a LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $210,8 \pm 2,60$, $216,9 \pm 9,41$, $186 \pm 5,87$, respectivamente) causaram um aumento no conteúdo de MDA quando comparado com o grupo controle (Falso operado/controle: $142,6 \pm 5,17$, $79,05 \pm 9,79$, $70,19 \pm 8,38$, respectivamente) demonstrando que o estresse oxidativo tem um papel importante no mecanismo de lesão induzida pela 6-OHDA (Figura 09, 10, 11).

No CPF os grupos lesionados e tratados com AL 100 (6-OHDA+AL100: $109,8 \pm 7,94$) ou AL 200 (6-OHDA+AL200: $70,92 \pm 4,29$) apresentaram uma redução significativa nos níveis de TBARS quando comparado com o grupo pré-tratado com 6-OHDA ($234 \pm 12,46$) e em relação ao grupo da LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $210,8 \pm 2,60$) sozinho. O AL 200 apresentou uma melhor resposta na diminuição da peroxidação lipídica em relação ao AL 100 (Figura 09).

Ao comparar os grupos lesionados e tratados com as associações de ácido α -lipóico e LDOPA (6-OHDA+AL+LDOPA) ao grupo da 6-OHDA ($234 \pm 12,46$) ou LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $210,8 \pm 2,60$) sozinhos, apenas a dose de 200mg/Kg (6-OHDA+AL200+LDOPA: $120,9 \pm 10,18$) foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica no teste do TBARS (Figura 09).

Os grupos tratados com ácido α -lipóico (6-OHDA+AL100: $109,8 \pm 7,94$; 6-OHDA+AL200: $70,92 \pm 4,29$) obtiveram melhores respostas na diminuição do estresse oxidativo quando comparado aos grupos das associações (6-

OHDA+AL100+LDOPA: $208,6 \pm 11,87$; 6-OHDA+AL200+LDOPA: $120,9 \pm 10,18$) [F(6,41)=51,24; $p < 0,0001$] (Figura 09).

No HC e CE quando comparado o grupo da LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $216,9 \pm 9,41$; $186 \pm 5,87$, respectivamente) ao grupo da 6-OHDA (6-OHDA: $161,6 \pm 10,01$; $127,6 \pm 7,15$, respectivamente), observou-se que a LDOPA foi capaz de promover um aumento significativo nos níveis de MDA no teste de TBARS.

O ácido α -lipóico 100 ou 200mg/Kg reduziu a peroxidação lipídica no HC (6-OHDA+AL100: $86,06 \pm 9,19$; 6-OHDA+AL200: $52,38 \pm 3,54$) ou CE (6-OHDA+AL100: $70,18 \pm 3,33$; 6-OHDA+AL200: $54,15 \pm 7,06$) quando comparado ao grupo da 6-OHDA (HC: $161,6 \pm 10,01$; CE: $127,6 \pm 7,15$) ou LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $216,9 \pm 9,41$; $186 \pm 5,87$; respectivamente) (Figura 10, 11).

Efeitos semelhantes foram observados nas associações de ácido α -lipóico e LDOPA no HC (6-OHDA+AL100+LDOPA: $83,99 \pm 10,44$; 6-OHDA+AL200+LDOPA: $113,4 \pm 9,34$) ou CE (6-OHDA+AL100+LDOPA: $78,20 \pm 5,95$; 6-OHDA+AL200+LDOPA: $56,82 \pm 4,59$) quando comparadas com o grupo da 6-OHDA (HC: $161,6 \pm 10,01$; CE: $127,6 \pm 7,15$) ou LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $216,9 \pm 9,41$; $186 \pm 5,87$, respectivamente) [HC: F(6,41)=39,42; $p < 0,0001$] ou [CE: F(6,41)=59,31, $p < 0,0001$] (Figura 10,11).

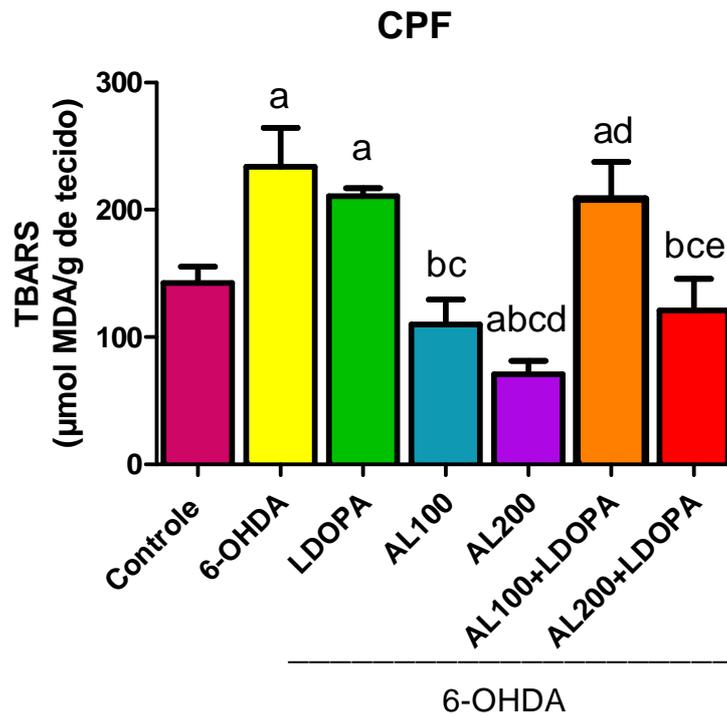


Figura 09 - Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA sobre a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA. Os valores representam a média \pm E.P.M das quantidades de TBARS expressos em MDA/g de tecido. 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ácido α -lipóico (AL). Foram utilizados 8 animais por grupo; $p < 0,0001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHDA+LDOPA, d vs 6-OHDA+AL100, e vs 6-OHDA+AL200.

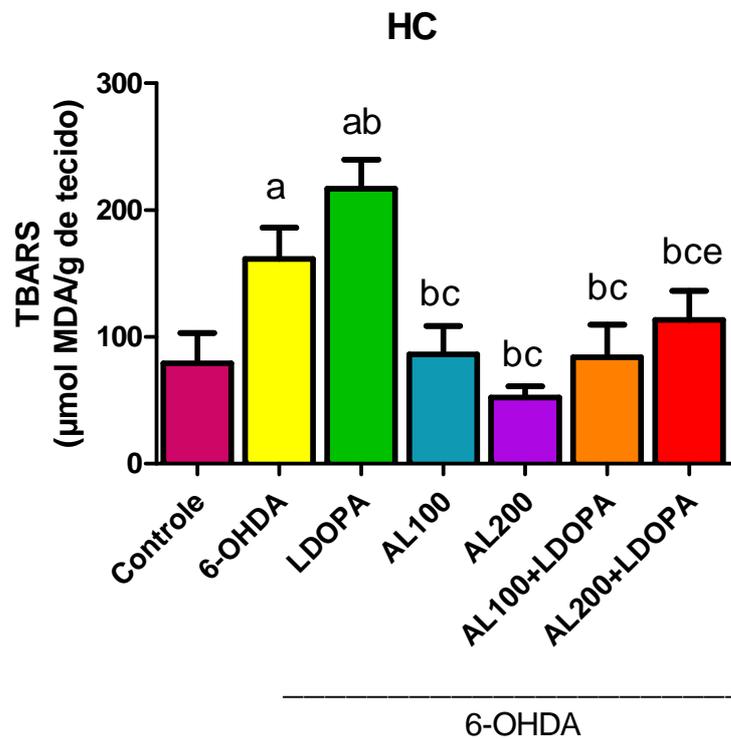


Figura 10 - Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA sobre a peroxidação lipídica no hipocampo de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA. Os valores representam a média \pm E.P.M das quantidades de TBARS expressos em MDA/g de tecido. 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), ácido α -lipóico (AL). Foram utilizados 8 animais por grupo; $p < 0,0001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHDA+LDOPA, e vs 6-OHDA+AL200.

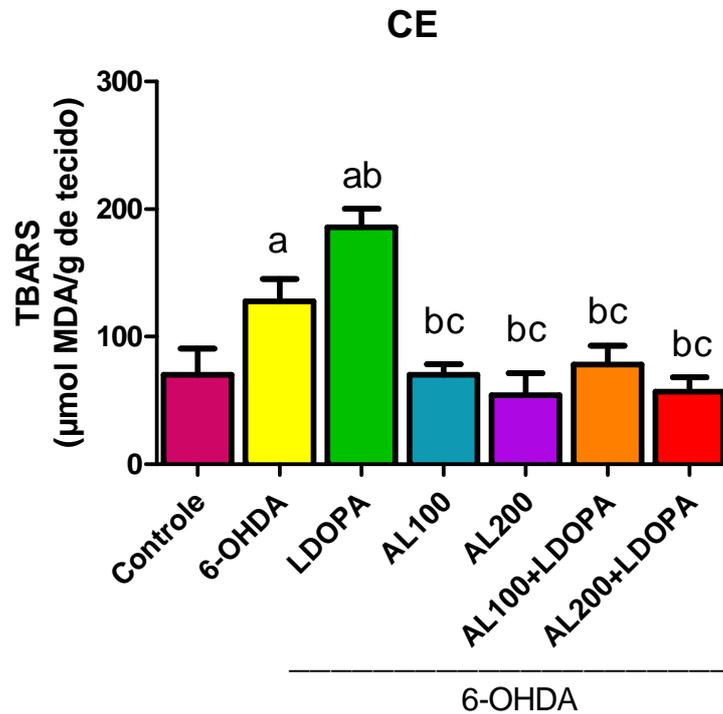


Figura 11 - Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA sobre a peroxidação lipídica no corpo estriado de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA. Os valores representam a média \pm E.P.M das quantidades de TBARS expressos em MDA/g de tecido. 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ácido α -lipóico (AL). Foram utilizados 8 animais por grupo; $p < 0,0001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHDA+LDOPA.

5.5 Efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou em associação com LDOPA sobre a produção de nitrito/nitrato em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA.

Os resultados mostraram que as concentrações de nitrito/nitrato no grupo da 6-OHDA aumentaram no CPF ($2,44\pm 0,12$), HC ($2,31\pm 0,13$) ou CE ($2,55\pm 0,11$) quando comparado ao grupo controle (Falso operado/controle: $0,90\pm 0,1$; $0,90\pm 0,1$; $0,64\pm 0,02$, respectivamente) (Figura 12, 13, 14).

O grupo da LDOPA (6-OHDA+LDOPA: $1,42\pm 0,15$), AL 100 (6-OHDA+AL100: $1,6\pm 0,12$) e associação de ácido α -lipóico 100 (6-OHDA+AL100+LDOPA: $1,48\pm 0,08$) apresentaram um aumento nas concentrações de nitrito/nitrato quando comparado ao controle no CPF (Falso operado/controle: $0,90\pm 0,1$) (Figura 12, 13).

Nas três áreas cerebrais os níveis de nitrito/nitrato foram reduzidos nos animais lesionados e pré-tratados com LDOPA [CPF (6-OHDA+LDOPA: $1,42\pm 0,15$); HC (6-OHDA+LDOPA: $1,46\pm 0,10$), CE (6-OHDA+LDOPA: $1,09\pm 0,03$)], AL 100 [CPF (6-OHDA+AL100: $1,6\pm 0,12$), HC (6-OHDA+AL100: $1,19\pm 0,09$), CE (6-OHDA+AL100: $1,57\pm 0,16$)], AL200 [CPF (6-OHDA+AL200: $1,38\pm 0,08$), HC (6-OHDA+AL200: $1,69\pm 0,1$), CE (6-OHDA+AL200: $1,53\pm 0,08$)] e associações [CPF (6-OHDA+AL100+LDOPA: $1,48\pm 0,08$), HC (6-OHDA+AL100+LDOPA: $1,47\pm 0,06$), CE (6-OHDA+AL100+LDOPA: $1,34\pm 0,12$); CPF (6-OHDA+AL200+LDOPA: $1,23\pm 0,03$), HC (6-OHDA+AL200+LDOPA: $1,24\pm 0,1$), CE (6-OHDA+AL200+LDOPA: $1,42\pm 0,11$)] quando comparado ao grupo da 6-OHDA [CPF ($2,44\pm 0,12$), HC ($2,22\pm 0,11$), CE ($2,58\pm 0,12$)] [CPF: $F(6,42)=19,94$; $p<0,0001$], [HC: $F(6,43)=19,31$; $p<0,0001$], [CE $F(6,45)=34,33$; $p<0,0001$] (Figura 12,13,14).

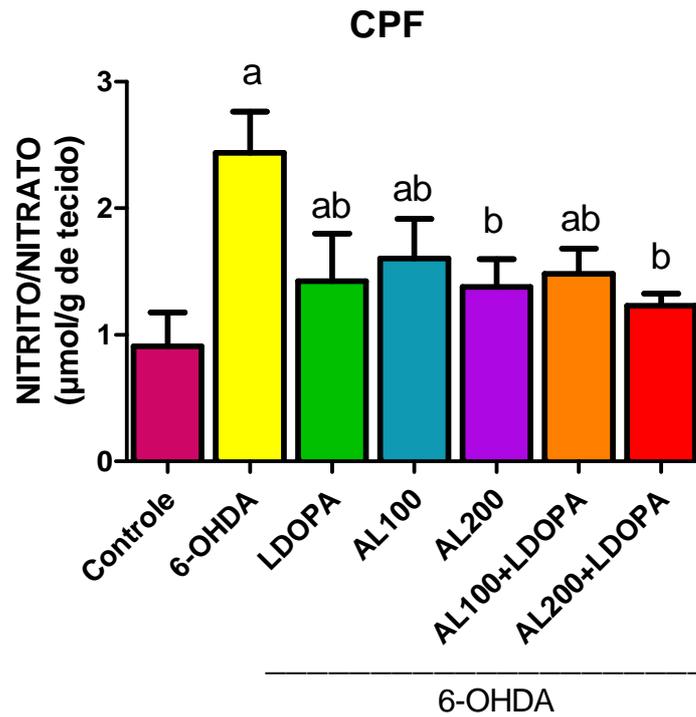


Figura 12 - Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA sobre a concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA. Os valores representam a média \pm E.P.M das quantidades de nitrito/nitrato expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ácido α -lipóico (AL). Foram utilizados 8 animais por grupo; $p < 0,0001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs controle, b vs 6-OHDA.

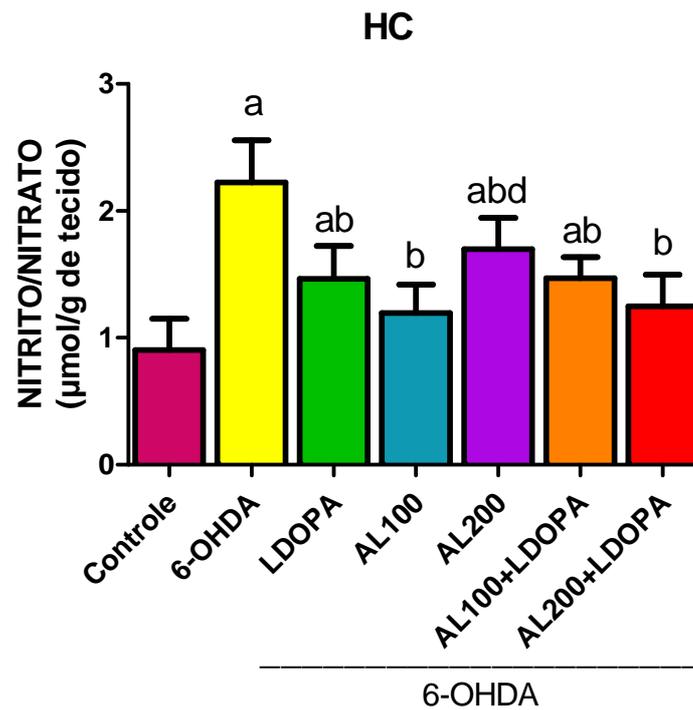


Figura 13 - Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA sobre a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA. Os valores representam a média \pm E.P.M das quantidades de nitrito/nitrato expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ácido α -lipóico (AL). Foram utilizados 8 animais por grupo; $p < 0,0001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs controle, b vs 6-OHDA, d vs 6-OHDA+AL100.

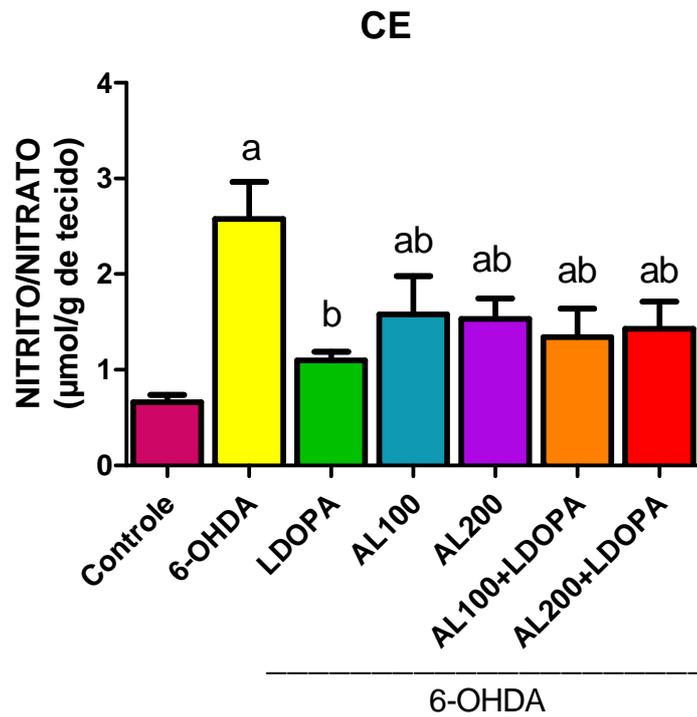


Figura 14 - Efeito do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA sobre a concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA. Os valores representam a média \pm E.P.M das quantidades de nitrito/nitrato expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ácido α -lipóico (AL). Foram utilizados 8 animais por grupo; $p < 0,0001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs controle, b vs 6-OHDA

5.6 Avaliação do efeito do ácido α -lipóico na atividade da enzima catalase em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA

Quanto à determinação da atividade da catalase no CPF, HC e CE foi identificado um aumento significativo em todas às áreas quando comparado o grupo da 6-OHDA (CPF: $2865 \pm 173,2$; HC: $1890 \pm 100,4$; CE: $2961 \pm 148,4$) com o controle (CPF: $480,8 \pm 43,89$; HC: $890,3 \pm 114,5$; CE: $478,1 \pm 19,33$) (Figura 15, 16, 17).

Nos grupos tratados com o ácido α -lipóico 100 (6-OHDA+AL100) ou 200 (6-OHDA+AL200) houve uma redução na atividade da catalase em comparação com o grupo da 6-OHDA no CPF (6-OHDA: $2865 \pm 173,2$; 6-OHDA+AL100: $1463 \pm 183,6$; 6-OHDA+AL200: $663,9 \pm 89,38$), HC (6-OHDA: $1890 \pm 100,4$; 6-OHDA+AL100: $641,7 \pm 73,29$; 6-OHDA+AL200: $686,8 \pm 61,38$) ou CE (6-OHDA: $2961 \pm 148,4$; 6-OHDA+AL100: $410,4 \pm 22,62$; 6-OHDA+AL200: $436,9 \pm 75,09$) (Figura 15, 16, 17).

Nas associações do ácido α -lipóico com LDOPA (6-OHDA+AL+LDOPA), ambas as doses reduziram a atividade da catalase no CPF (6-OHDA: $2865 \pm 173,2$; 6-OHDA+AL100+LDOPA: $1429 \pm 38,8$; 6-OHDA+AL200+LDOPA: $1297 \pm 51,89$), HC (6-OHDA: $1890 \pm 100,4$; 6-OHDA+AL100+LDOPA: $1268 \pm 98,49$; 6-OHDA+AL200+LDOPA: $844,6 \pm 48$) ou CE (6-OHDA: $2961 \pm 148,4$; 6-OHDA+AL100+LDOPA: $903,1 \pm 138,4$; 6-OHDA+AL200+LDOPA: $585,5 \pm 48,41$) em relação ao grupo da 6-OHDA nessas áreas (Figura 15, 16, 17).

No HC e CE, a associação do ácido α -lipóico com LDOPA (6-OHDA+AL200+LDOPA: $844,6 \pm 48$; $585,5 \pm 48,41$, respectivamente) reduziu a atividade da catalase quando comparada com o grupo da LDOPA sozinho, mostrando que o ácido α -lipóico reduziu o estresse oxidativo, resultando em uma menor necessidade de ativação dessa enzima [CPF: $F(6,41)=34,12$; $p<0,0001$], [HC: $F(6,41)=21,53$; $p<0,0001$], [CE: $F(6,41)=94,93$; $p<0,0001$] (Figura 17).

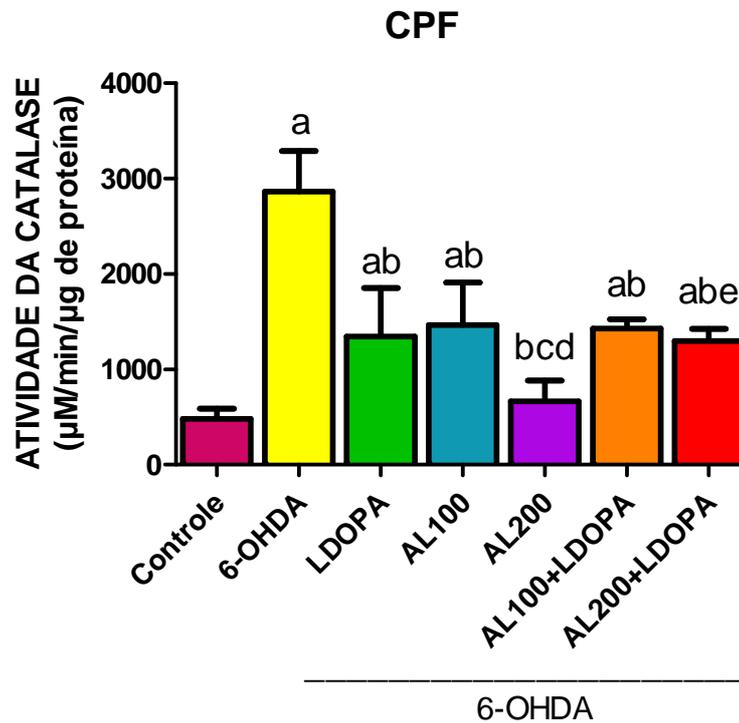


Figura 15 - Efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA sobre a atividade da catalase no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA. Os valores representam a média \pm E.P.M da atividade enzimática expressa em $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$ de tecido. 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), ácido α -lipóico (AL). Foram utilizados 8 animais por grupo; $p < 0,0001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHDA+LDOPA, d vs 6-OHDA+AL100, e vs 6-OHDA+ AL200.

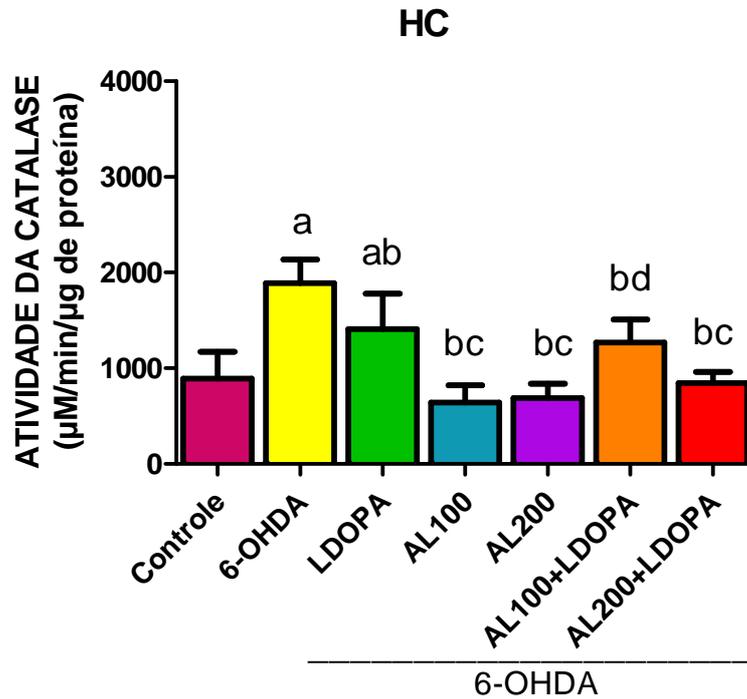


Figura 16 - Efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA sobre a atividade da catalase no hipocampo de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA. Os valores representam a média \pm E.P.M da atividade enzimática expressa em $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$ de tecido. 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ácido α -lipóico (AL). Foram utilizados 8 animais por grupo; $p < 0,0001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHD+LDOPA, d vs 6-OHDA+AL100.

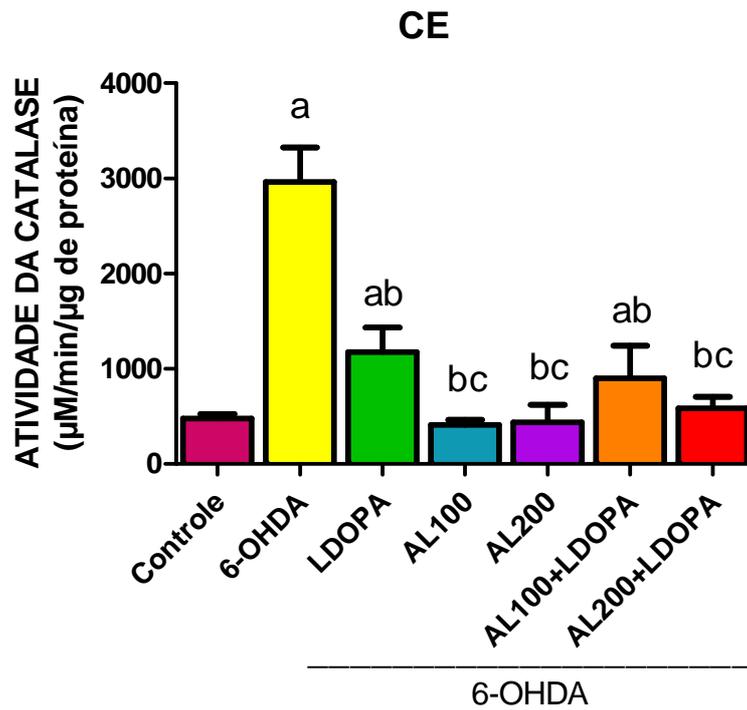


Figura 17 - Efeitos do ácido α -lipóico sozinho ou associado com LDOPA sobre a atividade da catalase no corpo estriado de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA. Os valores representam a média \pm E.P.M da atividade enzimática expressa em $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$ de tecido. 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ácido α -lipóico (AL). Foram utilizados 8 animais por grupo; $p < 0,0001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs controle, b vs 6-OHDA, c vs 6-OHDA+ LDOPA.

6 DISCUSSÃO

Os antioxidantes vem sendo utilizados como ferramenta de combate as doenças neurodegenerativas, uma vez que, o estresse oxidativo é um dos mecanismos envolvidos na patogênese de várias doenças do SNC. O ácido α -lipóico, enquanto antioxidante, vem sendo investigado como nova alternativa terapêutica para doenças como: doença de Alzheimer, depressão, isquemia, DP entre outras (SALAZAR, 2000; FUJITA *et al.*, 2008; ROSINIA *et al.*, 2011; CONELL *et al.*, 2012; MYTHRI e BHARATH, 2012; ALBARRACIN *et al.*, 2012).

O presente estudo analisou os efeitos do ácido α -lipóico no modelo de Parkinson induzido pela injeção unilateral no estriado (hemisfério direito) com 6-OHDA. Essa neurotoxina promove destruição nigroestriatal, resultando na diminuição dos níveis de DA e seus metabólitos nessa via, sendo responsável por grande parte dos distúrbios motores presentes na DP (PALLARES *et al.*, 2007; BLANDINI *et al.*, 2008; AGUIAR, 2009; AHMAD *et al.*, 2012).

Os resultados mostraram que a 6-OHDA produziu um aumento no número de rotações (contralaterais a lesão) induzidas pela apomorfina. Isso se deve, provavelmente, a hipersensibilização e o aumento no número de receptores dopaminérgicos no lado contrário a lesão, decorrente da perda dos terminais dopaminérgicos no estriado lesionado com 6-OHDA (AGUIAR, 2009).

Lesões do sistema nigroestriatal, decorrentes da auto-oxidação da 6-OHDA, estão diretamente relacionadas ao aumento da estimulação dopaminérgica via adenililciclase no receptor D1 (AGUIAR, 2009). O modelo animal de DP, induzido por essa neurotoxina, apresenta alterações comportamentais no tratamento com agonistas dos receptores D1 decorrentes da *up-regulation* desses receptores como mecanismo compensatório para a perda dos neurônios dopaminérgicos provocados pela 6-OHDA (LAZZARETTI, 2001).

Os resultados demonstraram que o ácido α -lipóico reverteu parcialmente o comprometimento motor produzido pela 6-OHDA ao promover uma redução significativa no comportamento rotacional induzido pela administração de apomorfina, bem como ao aumentar a atividade locomotora no teste de campo aberto. Esse efeito pode estar relacionado à atividade antioxidante do ácido α -lipóico que, possivelmente, promoveu a redução no processo de hipersensibilização dos

receptores dopaminérgicos resultando na diminuição de rotações induzidas pela apomorfina (DOOLEY *et al.*, 2012).

No trabalho realizado por Zaitone e colaboradores (2012) no modelo animal de DP induzido por rotenona, o ácido α -lipóico apresentou resultados similares aos encontrados neste estudo, o ácido α -lipóico foi capaz de aumentar o número de cruzamentos na exploração horizontal em relação ao grupo pré-tratado com 6-OHDA sem tratamento posterior. Isso comprova a melhora no desempenho motor no teste de campo aberto produzido pelo ácido α -lipóico.

O teste de campo aberto tem como objetivo estudar a ação do sistema dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico no comportamento emocional e exploratório através da exploração horizontal (locomoção), vertical (*rearing*) e auto-limpeza (*grooming*). Sendo muito utilizado como ferramenta de avaliação da ação de substâncias que podem atuar sobre esses sistemas de neurotransmissão promovendo alterações motoras (bradicinesia ou hiperlocomoção) e emocionais (ansiedade) (GHIDINI, 2006).

Ainda com relação ao teste de campo aberto os resultados mostraram que os animais pré-tratados com 6-OHDA sem tratamento posterior apresentaram um número de grooming menor do que os animais controle e os animais tratados com ácido α -lipóico.

O comportamento de auto-limpeza tem como finalidade investigar os níveis de ansiedade do animal submetido ao teste de campo aberto. Entretanto, esse pode aumentar quando o animal está tranqüilo ou ansioso de modo que apresenta uma curva em U invertido com relação ao grau de ansiedade. Assim, não pode ser usado como parâmetro isolado para a determinação do estado de ansiedade (LAUREANO, 2010).

O teste do cilindro é utilizado como ferramenta de avaliação da atividade motora fina (SCHALLERT *et al.*, 2000). No presente estudo, os animais saudáveis utilizaram as duas patas de forma simultâneas para tocar a parede do cilindro, enquanto que, os animais pré-tratados com 6-OHDA tocaram a parede do cilindro apenas com o membro ipsilateral a lesão.

Resultado semelhante foi relatado no trabalho desenvolvido por Jouve *et al.* (2010), no qual estudaram o efeito anti-parkinsoniano da estimulação cerebral profunda no modelo de DP induzido pela 6-OHDA. Nesse estudo o grupo controle apresentou uma maior utilização das patas de forma simultânea para tocar a parede

do cilindro, enquanto que, o grupo pré-tratado com 6-OHDA apresentou uma redução significativa na utilização das duas patas simultaneamente.

Esta pesquisa mostrou que o ácido α -lipóico foi capaz de promover uma melhora da função motora fina, uma vez que, os animais pré-tratados com 6-OHDA e receberam o ácido α -lipóico tocaram mais vezes a parede do cilindro com a pata contralateral a lesão quando comparado ao grupo pré-tratado com 6-OHDA sem tratamento posterior.

A lesão unilateral provocada pela 6-OHDA promove um déficit crônico na função sensório-motora, somatossensorial e utilização do membro contralateral, gerando uma assimetria na utilização das patas dianteiras no teste do cilindro, o que implica em maior utilização do membro ipsilateral a lesão. A utilização máxima e exclusiva do membro ipsilateral indica uma depleção dos níveis de DA na via nigroestriatal (SCHALLERT *et al.*, 2000).

A origem da neurodegeneração que acomete a DP ainda não está bem elucidada, entretanto, sabe-se que alguns eventos estão envolvidos no desenvolvimento desta patologia, dentre eles, o estresse oxidativo. Evidências sugerem que a disfunção mitocondrial, o acúmulo de Fe^{2+} , a peroxidação lipídica e a falha do sistema antioxidante façam parte deste processo.

Esse estudo investigou o possível efeito neuroprotetor do ácido α -lipóico no modelo de DP induzido pela 6-OHDA. O ácido α -lipóico é um agente antioxidante e atua na redução do processo oxidativo e da peroxidação lipídica.

A literatura mostra que a 6-OHDA produz lesão seletiva dos neurônios catecolaminérgicos por dois mecanismos principais, através da formação de radicais livres e pela inibição direta do complexo I e IV da cadeia transportadores de elétrons mitocondrial (BLUM *et al.*, 2001; LEHMENSIEK *et al.*, 2006; MILLER *et al.*, 2008).

A inibição direta da 6-OHDA sobre a cadeia transportadora de elétrons culmina com a diminuição do aporte de ATP, acarretando severa disfunção mitocondrial. Tal disfunção promove alterações na permeabilidade na membrana da mitocôndria com conseqüente perda de elétrons, esses por sua vez, contribuem diretamente para a formação de radicais livres nos neurônios dopaminérgicos levando a destruição dos mesmos de forma progressiva e irreversível (ZHANG *et al.*, 2011).

O sistema nervoso é mais sensível à ação nociva dos radicais livres do que outros tecidos do nosso organismo, uma vez que o metabolismo do cérebro é

extremamente alto o que favorece a formação constante de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, além do sistema de defesa antioxidante não ser tão eficiente na remoção destes agentes, favorecendo, assim, a neurodegeneração (FERREIRA e ABREU, 2007).

Nesta pesquisa a 6-OHDA promoveu um aumento dos níveis de MDA no teste de TBARS indicando que houve peroxidação lipídica no corpo estriado. Outro resultado interessante é que a lesão oxidativa não ficou restrita apenas a esta área cerebral, mas também acometeu córtex pré-frontal e hipocampo. Isso demonstra que a destruição progressiva produzida pela 6-OHDA não está restrita somente aos neurônios da via nigroestriatal.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com outras pesquisas, evidenciando que, a 6-OHDA apresenta efeitos deletérios sobre várias regiões do cérebro, tais como, córtex pré-frontal, cerebelo e hipocampo, sendo este último o primeiro a sofrer os efeitos da 6-OHDA na indução do processo oxidativo, mesmo antes do surgimento do comprometimento motor decorrente da perda da regulação pela via nigroestriatal (FERRO, 2007; MATSUMOTO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011)

O ácido α -lipóico apresentou um possível efeito neuroprotetor, uma vez que este foi capaz de reduzir de forma significativa a peroxidação lipídica no teste de TBARS no corpo estriado, bem como no córtex pré-frontal e hipocampo. Resultados similares foram observados no trabalho de Zaitone *et al.* (2012) utilizando o modelo da rotenona. O ácido α -lipóico também reduziu os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, atuando, assim, como agente protetor.

A peroxidação lipídica é o processo mais amplo de lesão oxidativa promovendo a quebra dos lipídios da membrana celular e a formação do radical peroxil. Uma vez iniciado o evento, este se propaga induzindo uma destruição celular em cadeia. (BARBOSA *et al.*, 2006).

Ainda com relação à peroxidação lipídica o tratamento com a LDOPA promoveu um aumento significativo dos níveis de MDA quando comparado ao grupo pré-tratado com 6-OHDA. Esse achado sugere que a LDOPA tem efeito pró-oxidante, favorecendo a formação de radicais livres, o que culmina com a progressão da neurodegeneração. A associação do ácido α -lipóico com a LDOPA reverteu esse efeito da LDOPA e mais uma vez, fica evidente o possível efeito neuroprotetor deste antioxidante.

Stefano *et al* (2006) mostraram que a utilização combinada de ácido α -lipóico e LDOPA melhorava a função motora de ratos no teste de campo aberto, bem como, promovia uma redução significativa do estresse oxidativo ao reduzir a formação dos radicais livres e melhorar o sistema de defesa antioxidante endógeno.

A LDOPA é o tratamento padrão para controlar a disfunção motora presente na DP. Entretanto, o uso crônico desta droga pode trazer prejuízos severos, tais como, o surgimento de discinesias e agravamento da neurodegeneração dos terminais dopaminérgicos. Esse mecanismo está relacionado ao aumento extracelular de DA decorrente da metabolização da LDOPA, bem como, da atividade reduzida do transportador dessa catecolamina (DAT). O acúmulo desse neurotransmissor promove uma hiperexcitação dos receptores D1, bem como, alterações na expressão destes receptores estando envolvido diretamente no agravamento motor (LIPSKI *et al.*,2011).

Estudos mostram que a LDOPA, bem como seus metabólitos, promovem estresse oxidativo (LIPSKI *et al.*,2011; PEDROSA e SILVA, 2002). Esse mecanismo está diretamente relacionado ao fato de a LDOPA provocar diminuição da atividade do complexo I da cadeia mitocondrial em ratos como demonstrado na pesquisa de Przedborski e colaboradores (1993).

A LDOPA sofre auto-oxidação promovendo a formação de espécies reativas do oxigênio na presença do Fe^{2+} pela reação de Fenton, dentre as mais produzidas estão, H_2O_2 , OH^- , ânion superóxido entre outros. Além de aumentar a produção desses radicais livres a LDOPA age reduzindo a atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD). Esse desequilíbrio entre a produção e eliminação dos radicais culmina com o estresse oxidativo, favorecendo, assim a progressão da doença (MINELLI *et al*, 2010).

O ácido α -lipóico é considerado um dos mais potentes sistemas de defesa endógeno no combate a formação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, além de o mesmo promover a renovação de outros agentes antioxidantes como, vitamina E, C, A, coenzima Q10 e GSH reduzida, bem como, atuar como quelante de metais (SANTOS *et al.*,2010).

Outro fator importante que classifica o ácido α -lipóico como antioxidante universal é o fato de o mesmo atuar tanto no meio aquoso quanto no meio

gorduroso, uma vez que o mesmo é anfipático, podendo, assim, promover o seu efeito antioxidante no citosol, na membrana plasmática, no plasma e nas lipoproteínas (YING *et al.*, 2010).

O DHLA é a forma reduzida do ácido α -lipóico e ele é que interage predominantemente com as espécies reativas do oxigênio, mas a forma oxidada do ácido α -lipóico também pode inativar os radicais livres. O LA é encontrado naturalmente na mitocôndria ligado a subunidade E2 atuando como co-fator para a enzima piruvato desidrogenase e para α -cetoglutarato desidrogenase. Além disso, a ação benéfica do LA pode resultar em sua capacidade para reduzir o dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato oxidase (NADPH) e melhorar a expressão de enzimas antioxidantes (GORACA *et al.*, 2011).

Ainda com relação à ação antioxidante do ácido α -lipóico os resultados mostraram que esse agente foi capaz de promover uma diminuição nas concentrações de nitrito e nitrato no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado dos ratos submetidos à lesão pela 6-OHDA.

Bilska *et al* (2007) também demonstraram que o ácido α -lipóico foi capaz de reduzir a produção do óxido nítrico e S-nitrosotiol no córtex pré-frontal e estriado de ratos submetidos ao modelo da reserpina. Assim, o LA pode ter um potencial valor terapêutico na DP.

O óxido nítrico (NO) é um gás sintetizado a partir do amínoácido L-arginina em uma reação catalisada pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS). Esse gás tem um papel importante nos processos fisiológicos, entretanto, na presença do ânion superóxido o óxido nítrico é convertido num potente radical livre, o peroxinitrito é um agente extremamente nocivo às células (OLIVEIRA, 2011)

Outro importante radical livre presente no modelo de DP induzido com 6-OHDA é o H_2O_2 . Essa neurotoxina sofre auto-oxidação na presença de oxigênio molecular levando a formação deste agente lesivo (SOTO-OTERO *et al*, 2000; MILLER *et al*, 2009).

O H_2O_2 resultante da auto-oxidação da 6-OHDA na presença de ferro pode ser convertido ao radical hidroxila pela reação de Fenton, que é um dos radicais livres mais prejudiciais às células. Os neurônios dopaminérgicos mesencefálicos por serem ricos em ferro decorrente da sua acumulação por neuromelanina favorece a atração/seletividade pela 6-OHDA, sendo alvo potencial desta toxina (SOTO-OTERO *et al*, 2000).

O ácido α -lipóico é capaz de reduzir a formação do H_2O_2 como mostra essa pesquisa, uma vez que os grupos tratados com este antioxidante reduziram a atividade da catalase, enzima responsável por remover este radical livre, em comparação ao grupo pré-tratado com 6-OHDA sem tratamento.

O oxigênio livre leva a formação do ânion superóxido que é dismutado cataliticamente pela ação da SOD em H_2O_2 , esse por sua vez é metabolizado pela catalase e GPx em água e oxigênio. Essas enzimas tem como principal função evitar a conversão destes radicais no radical $-OH$, que é um dos mais lesivos, assim, como o peroxinitrito (CHORILLI *et al.*, 2007).

Como antioxidante o ácido α -lipóico trabalha removendo os radicais de hidroxila, peróxido de hidrogênio em sua forma livre, superóxido e o peroxinitrito. Devido a esse potente efeito o ácido α -lipóico, seria também capaz de evitar lesão neuronal ocasionado pelas espécies reativas derivadas do oxigênio produzidas durante as doenças neurodegenerativas (MACZUREK *et al.*, 2008). Também foi descrito uma importante ação para esse composto antioxidante na redução do processo inflamatório cerebral induzido por radicais livres (BIEWENGA, HAENEN e BAST, 2000).

A ação anti-inflamatória do ácido α -lipóico e do DHLA se dá pela regulação o estado redox nas células afetando a expressão gênica e a transcrição oxidativamente induzida de fatores pró-inflamatórios como o NFKB e o AP1 (GORACA *et al.*, 2011).

Outra importante atividade do ácido α -lipóico e da sua forma reduzida, o DHLA é a sua atuação como quelante de metais como o ferro, o cobre o manganês e o zinco. Estes metais podem causar lesões oxidativas por favorecerem a formação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio. Bush *et al.* (2002) descobriu que o DHLA promoveu a quelação do ferro e do cobre no cérebro, apresentando um efeito neuroprotetor sobre a doença de Alzheimer ao diminuir as lesões provocadas pelos radicais livres.

De fato, o ácido α -lipóico mostrou-se capaz de reduzir as lesões associadas a injeção intracerebral da 6-OHDA. A diminuição na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, a diminuição na atividade da catalase e a redução na produção do nitrito explica a ação protetora dessa droga.

7. CONCLUSÃO

O ácido α -lipóico apresentou uma ação protetora contra a lesão induzida pela 6-OHDA avaliadas através dos testes comportamentais e no estresse oxidativo, sugerindo a sua possível utilização como co-adjuvante no tratamento da doença de Parkinson.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. M. *et al.* CSC, an adenosine A_{2A} receptor antagonist and MAO B inhibitor, reverses behavior, monoamine neurotransmission, and amino acid alterations in the 6-OHDA-lesioned rats. **Brain Research**, v.1191, n. 2, p. 192-9, 2008.

AGUIAR, L.M. **Antagonismo do receptor da adenosina A_{2a}: uma nova perspectiva para o tratamento da**. Tese (Doutorado em farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2009. 215p.

AGUIAR, L.M. *et al.* Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 84, n. 3, p. 415-9, 2006.

AHMAD, S. *et al.* Neuroprotective Effect of Sesame Seed Oil in 6-Hydroxydopamine Induced Neurotoxicity in Mice Model: Cellular, Biochemical and Neurochemical Evidence. **Neurochem Res**. v.37, p. 516–526, 2012. DOI 10.1007/s11064-011-0638-4.

ALBARRACIN, S.L. *et al.* Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. **Nutr Neurosci**. v.15, n.1, p.1-9, 2012.

ARAÚJO, D.P *et al.* The contributions of antioxidant activity of lipoic acid in reducing neurogenerative progression of Parkinson's disease: a review. **Int J Neurosci**, v. 121, n. 2, 2011.

BALAMURUGAN, K., *et al.* Biotin uptake by human proximal tubular epithelial cells: Cellular and molecular aspects. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.288, n.4, p.823–831, 2005

BARBOSA, M.T. Parkinsonism and parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). **Movement Disorders**, v. 21, n.6, p. 800-8, 2006.

BAUMANN, C.R. Epidemiology, diagnosis and differential diagnosis in Parkinson's disease tremor. **Parkinsonism and Related Disorders**, v.18, Supl. 1, p. S90–S92, 2012.

BIEWENGA, G.P.; HAENEN, G.R.M. M.; BAST, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. **General Pharmacology**, v.29, n.3, p. 315–331, 2000

BIST, R.; BHATT, D. K. The evaluation of effect of alpha-lipoic acid and vitamin E on the lipid peroxidation, gamma-amino butyric and serotonin level in the brain of mice musculus acutely intoxicated with lindane. **Journal of the Neurology Science**, v.276, n.1–2, p. 99–102, 2009.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from de past. **Parkinsonism Relat. Disord**, v.2, p.124-29, 2008.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from de past. **Parkinsonism Relat. Disord**, v.2, p.124-29, 2008.

BLUM, D. *et al.* Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.**, v. 65, p. 135-72, 2001.

BRANCHIA, I. *et al.* Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v.208, p.137–143, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Brasília, DF, 2006

BUSH, A.J. Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 23, p. 1031–1038, 2002.

CHEN, J. F. The adenosine A(2A) receptor as an attractive target for Parkinson's disease treatment. **Drug news & perspectives**, v. 16, n. 9, p. 597-604, 2003.

CHNG, H.T *et al.* Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues. **Brain Research**, v.1251, n.2, p. 80–86, 2009.

CHORILLI, M. *et al.* Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Rev. Bras. Farm.**, v.88, n.3, p.113-8, 2007.

COLETTE, T *et al.* Toxicity of 6-hydroxydopamine: live cell imaging of cytoplasmic redox flux. **Cell Biol Toxicol**, 2012. DOI:10.1007/s10565-011-9209-3.

CONNELL, B.J. *et al.* Upei-100, a conjugate of lipoic acid and apocynin, mediates neuroprotection in a rat model of ischemia/reperfusion. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.25, 2012.

CROSS, A. K.; WOODROOFE, M. N. Immunoregulation of microglial functional properties. **Microscopy research and technique**, v.54, p. 10-7, 2001.

DAUER , W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuroscience**, v. 39, n. 2, p. 889-909, 2003.

DIETRICH, E. Bevegelsesforstyrrelser og basal ganglienes funksjon. **Tidsskr NorLegeforen**, v.128, n.17, p. 1968–71, 2008.

FEKETE, R; JANKOVIC, J. Revisiting the relationship between essential tremor and Parkinson's disease. **Mov Disord** v.26, p.391–8, 2011.

FERREIRA, I.C.R.F.; ABREU, R.M.V. Oxidative Stress, Antioxidants and Phytochemicals. **Bioanálise**, v. 4, n. 2, p. 12-18, 2007.

FERREIRA, P. M. P.; MILITAO, C. G. C.; FREITAS, R. M. Lipoic acid effects on lipid peroxidation level, superoxide dismutase activity and monoamines concentration in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v.464, n.2, p.131–134, 2009.

FERRO, M.M. **Caracterização neuroquímica e comportamental da lesão da via nigroestriatal com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (mptp) e 6-idroxiDA (6-ohda) em ratos.** Tese (Doutorado em Bioquímica) Universidade Federal do Paraná, 2007.

FUJITA, H. *et al.* α -Lipoic acid suppresses 6-hydroxydopamine-induced ROS generation and apoptosis through the stimulation of glutathione synthesis but not by the expression of heme oxygenase-1. **Brain Research** v.12, n. 6, p. 1 – 12, 2008.

GLAJCHA, K.E *et al.* Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, 2011.

GONÇAVES, L. H. T.; ALVAREZ, A. M.; ARRUDA, M. C. Pacientes portadores da doença de Parkinson: significado de suas vivências. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 1, 2007.

HIRSCH, E.C.; HUNOT, S.; HARTMANN, A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 11, n.1, p. 9-15, 2005.

HOLLOWAY, R. G. *et al.* Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial. **Archives of Neurology**. v. 61, p. 1044–1053, 2004.

JENNER, P. **In Principles of Treatment in Parkinson's Disease.** Philadelphia:Elsevier, 2005.

JÖBGES, E. M. *et al.* Clinical relevance of rehabilitation programs for patients with idiopathic Parkinson syndrome. II: Symptom-specific therapeutic approaches. **Parkinsonism and related disorders**, v.13, n.4, p.203-13, 2007.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Princípios de Neurociência.** São Paulo: Manole, 2003.

KUNT, T. *et al.* Alpha-lipoic acid reduces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and endothelial adhesion of human monocytes after stimulation with advanced glycation end products. **Clinical Science**, v.96, n.4, p.75–82, 1999.

LAZZARETTI, C. **Fatores interferentes na indução da atividade rotacional induzida pelo teste de motricidade sobre a grade em modelo animal de parkinson.** Dissertação (Mestrado em Neurociência) Universidade Federal Do Rio Grande do Sul, 2011.

LEHMENSIEK, V. *et al.* Dopamine transporter-mediated cytotoxicity of 6-hydroxydopamine in vitro depends on expression of mutant α -synucleins related to Parkinson's disease. **Neurochemistry International**. v.48, p. 329–340, 2006.

LIPSKI, J. *et al.* LDOPA: A scapegoat for accelerated neurodegeneration in Parkinson's disease? **Progress in Neurobiology**, v. 94, p. 389–407, 2011.

LIU, J. The Effects and mechanisms of mitochondrial nutrient α -lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview. **Neurochem Res**, v.33, p.194–203, 2008.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. São Paulo: Atheneu, 2006.

MACZUREK, A. *et al.* Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, n.2, p. 1463–1470, 2008.

MARTIN, J. H. **Neuroanatomia: Text and Atlas**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999.

MATSUMOTO *et al.* Excessive expression of hippocampal ezrin is induced by intrastriatal injection of 6-OHDA. **Biol. Pharm Bull**, v.34, n.11, p.1753-58, 2011.

MILLER, R.L. *et al.* Oxidative and inflammatory pathways in parkinson's disease. **Neurochim. Res.** v.36, p.55-65, 2009.

MINELLI, A. *et al.* N-Acetyl-L-Methionyl-LDOPA-Methyl Ester as a dual acting drug that relieves LDOPA-induced oxidative toxicity. **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, p. 31–39, 2010.

MONTGOMERY, E.B. Subthalamic nucleus neuronal firing rates in Parkinson's disease. **Mov Disord.** v.20, 2012. DOI: 10.1002/mds.24901.

MOSLEY, R. L. *et al.* Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clinical neuroscience research**, v. 6, n.3, p. 261-281, 2006.

MYTHRI, R.B.; BHARATH, M.M. Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. **Curr Pharm Des.** v.18, n.1, p.91-9, 2012.

NAGATSU, T. *et al.* Cytokines in Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmition**, v. 58, n.4, p. 143-51, 2000.

OBESO, J. A. *et al.* Functional organization the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 23, p. 548-58, 2008.

PACKER, L. **Oxygen Club of Calif'ornia Annual Meeting Oxidants & Antioxidantes in Biology**. San Francisco, 1999.

PACKER, L; CADENAS, R. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. **J Clin Biochem Nutr**, v.48, n.1, p. 26–32, 2011.

PALLARES, J. R. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamineinduced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal of Neurochemistry**, v.103, p.145–156, 2007.

PEDROSA, R.; SILVA, S.P. Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (LDOPA) and dopamine. **Br. J. Pharmacol.** v.137, n.8, p. 1305–1313, 2002.

PEREIRA, M.C.L. *et al.* Estratégias para neuro-restauração em modelos experimentais de doença de Parkinson. **Einstein**, v.5, n.4, p. 142-8, 2007.

PETERNELLA, F.M.N.; MARCON, S.S. Descobrimos a Doença de Parkinson: impacto para o parkinsoniano e seu familiar. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 62, n.1, p. 25-31, 2009.

PRZEDBORSKI, S. *et al.* Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity. **Ann. Neurol.** v.34, n.5, 715–723, 1993.

ROBINSON, T.E.; KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology**, v.47, Suppl. 1, p.33–46, 2004.

RODRIGUES, M.; CAMPOS, L. C. Tegy for treatment with levodopa in Parkinson's disease. *Revista Analytica*, v.5, n.23, 121–129, 2006.

ROSINIA, M *et al.*. Exploiting the lipoic acid structure in the search for novel multitarget ligands against Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry** v.46, p. 5435-5442, 2011.

SALAZAR, M.R. Alpha lipoic acid: a novel treatment for depression. **Medical Hypotheses**. v. 55, n.6, p.510–512, 2000.

SALINTHONE, S. *et al.* Lipoic acid: A novel therapeutic approach for multiple sclerosis and other chronic inflammatory diseases of the CNS. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets**, v.8,n.2, p.132–142, 2008.

SANTOS, I.M.S *et al.* Alterations on monoamines concentration in rat hippocampus produced by lipoic acid. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 68, n.3, p.362-366, 2010.

SCHALLERT, T *et al.* CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, v.39, p.777–87, 2000.

SCHILLACE, R. V *et al.* Lipoic acid stimulates cAMP production in T lymphocytes and NK cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.354, n.3, p.259–264, 2007.

SCOTTI, L. *et al.* Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.2, 2007

SHAY, K. P., *et al.* Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. **Biochim et Biophys Acta**, v.1790, n.2, p.1149–1160, 2009.

SMITH, A. R. *et al.* Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, n.2, p.4–12, 2004.

SOTO-OTERO, R. *et al.* Autoxidation and Neurotoxicity of 6-Hydroxydopamine in the Presence of Some Antioxidants: Potential Implication in Relation to the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **J. Neurochem.**, v. 74, n. 4, 2000.

STEFANO, A. *et al.* LDOPA- and Dopamine-(R)-r-Lipoic Acid Conjugates as Multifunctional Codrugs with Antioxidant Properties. **J. Med. Chem.** v.49, p.1486-1493, 2012.

TEICHERT, J. *et al.* Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.36, n.3, p.625–628, 2000.

TEIVE, H.A.G. Etiopatogenia da Doença de Parkinson. **Revista de Neurociências**, v.13, n. 4, p. 201-214, 2005.

VALE, O. C. *et al.* A dual action of α -lipoic acid in the brain an electrophysiological evaluation. **Arq Neuropsiquiatria**, v.61, n.3-B, p. 738–745, 2003.

WANG, P. G. *et al.* Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. **Chemical Reviews**, v.102, n.2, p.1091–1134, 2002.

WEINTRAUB, D.; COMELLA, C.L.; HORN, S. Parkinson's Disease Part 2: Treatment of Motor Symptoms. **The American journal of managed care**, v. 14, n. 2, p. 59-69, 2008.

WIRDEFELDT, K. *et al.* Complete ascertainment of Parkinson disease in the Swedish Twin Registry. **Neurobiol Aging**.v.29, p.1765–73, 2008.

WIRDEFELDT, K. *et al.* Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol**, v.26, p.S1–S58, 2011. DOI 10.1007/s10654-011-9581-6

WOLLIN, S. D.; JONES, P. J. Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition**, v.133, n.2, 2003.

XU, K.; BASTIA, E.; SCHWARZSCHILD, M. A. Therapeutic potential of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, p. 267-310, 2005.

YING, Z. *et al.* Lipoic acid effects on established atherosclerosis. **Life Sci**, v. 86, p. 95–102, 2010.

ZHANG, Q.J. *et al.* The pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex show decreased response to 5-hydroxytryptamine-3 receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v.13, n.84, p. 69 – 79, 2011.