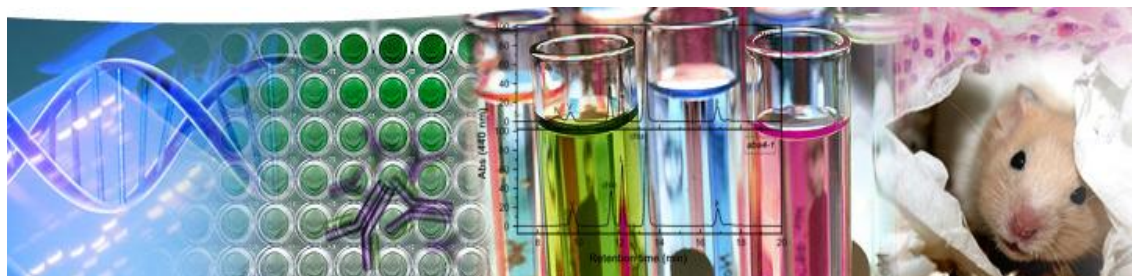




**UNIVERSIDADE DE COIMBRA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**Influência do Exercício na Neurotoxicidade causada pela  
Metanfetamina no Córtex Frontal do Murganho**



Ana Filipa Vicente Neves

Mestrado em Patologia Experimental

**2012**



**UNIVERSIDADE DE COIMBRA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**Influência do Exercício na Neurotoxicidade causada pela  
Metanfetamina no Córtex Frontal do Murganho**

Dissertação elaborada com vista à obtenção do grau de Mestre  
em Patologia Experimental

Trabalho realizado sob a orientação de:

Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro

Professor Doutor Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira



Ao meu avô Beta e meu avô Vicente,  
Nunca vos esquecerei...

## Agradecimentos

O caminho da sapiência nem sempre é afável, o trilho da excelência é muitas vezes impossível... sozinha!

De facto, este árduo percurso, com tantos dissabores, desilusões, dias e meses de trabalho não teriam sido possível sem a companhia, motivação e inspiração de muitos.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro, pela prontidão em solucionar todos os percalços, ao Professor Doutor Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira, pela simpatia, bom humor e sabedoria.

Aos meus pais e irmã pelo amor incondicional, por serem uma fonte de alegria, confiança e por me darem a mão em tantas alturas de desalento.

Aos meus amigos, pela companhia, motivação mas acima de tudo pelos momentos de pura felicidade que me proporcionam diariamente.

Em especial, não poderia deixar de mencionar a minha gratidão,

Daniel, pelo tempo que ofereceste, pelo companheirismo e por me fazeres acreditar que tudo era possível.

Rita, pela companhia, amizade e prontidão quando mais precisava de ajuda.

Ricardo, pelas palavras sábias, motivação e por seres para mim uma fonte diária de inspiração.

Por fim, à Lilly Portugal, por acreditar em mim.

A todos, o meu profundo e sincero reconhecimento...

*“If we were truly hardwired, it would be impossible for us to learn...”*

CARLA SHATZ

(Keystone Millenium Meeting, 2000)



# Índice

AGRADECIMENTOS.....	I
ÍNDICE .....	II
ÍNDICE DE TABELAS .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
ABREVIATURAS .....	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT .....	X

## INTRODUÇÃO.....1

<b>1. CÓRTEX .....</b>	<b>2</b>
1.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DO CÓRTEX FRONTAL.....	2
1.2. SISTEMA DE NEUROTRANSMISSORES DO CÓRTEX FRONTAL .....	6
1.2.1. NEUROTRANSMISSORES .....	7
1.2.2. NEUROTRANSMISSORES CORTICAIS: <i>INPUTS</i> MONOAMINÉRGICOS .....	9
<b>2. ANFETAMINAS .....</b>	<b>11</b>
2.1. METANFETAMINA .....	11
2.2. AÇÃO DA METANFETAMINA NOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E SEROTONÉRGICO .....	13
2.2.1. BIOSÍNTESE DA DOPAMINA E SEROTONINA .....	13
2.2.2. RECAPTAÇÃO E METABOLISMO DA DOPAMINA E DA SEROTONINA .....	16
2.2.3. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS E SEROTONÉRGICOS .....	17
2.2.4. INFLUÊNCIA DA METANFETAMINA NO CIRCUITO DOPAMINÉRGICO E SEROTONÉRGICO.....	18
2.3. NEUROTOXICIDADE: ASTROGLOSE E DISRUPÇÃO DA HOMEOSTASIA DOPAMINÉRGICA.	20
<b>3. EXERCÍCIO .....</b>	<b>24</b>
3.1. TREADMILL / TAPETE ROLANTE .....	24
3.2. OS EFEITOS DO EXERCÍCIO NO CÉREBRO: NEURORREGENERAÇÃO .....	27
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>

## MATERIAIS E MÉTODOS.....31

<b>1. ANIMAIS.....</b>	<b>32</b>
<b>2. NEUROTÓXICO E REAGENTES UTILIZADOS .....</b>	<b>33</b>
<b>3. TREADMILL.....</b>	<b>34</b>
<b>4. DESENHO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>36</b>



4.1.	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	36
4.2.	ADAPTAÇÃO AO <i>TREADMILL</i> .....	36
4.3.	ADMINISTRAÇÃO DO NEUROTÓXICO .....	38
4.4.	PROTOCOLO DE EXERCÍCIO .....	39
4.5.	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E ISOLAMENTO DO CÓRTEX FRONTAL .....	41
5.	<b>DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MONOAMINAS E DOS SEUS METABOLITOS POR HPLC</b>	<b>42</b>
6.	<b>QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TH E DE GFAP POR WESTERN BLOTTING</b> .....	<b>44</b>
7.	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>47</b>

## **RESULTADOS**.....48

1.	<b>ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE METANFETAMINA</b> .....	<b>49</b>
2.	<b>NÍVEIS CORTICAIS TOTAIS DE DOPAMINA E DOS SEUS METABOLITOS (DOPAC E HVA) SETE SEMANAS (DURAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO) APÓS A INJEÇÃO COM METH</b> .....	<b>50</b>
3.	<b>NÍVEIS CORTICAIS DE TH SETE SEMANAS (DURAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO) APÓS A INJEÇÃO COM METH</b> .....	<b>52</b>
4.	<b>NÍVEIS CORTICAIS TOTAIS DE SEROTONINA SETE SEMANAS (DURAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO) APÓS A INJEÇÃO COM METH</b> .....	<b>52</b>
5.	<b>CROMATOGRAFIA POR HPLC DOS NÍVEIS CORTICAIS DE DA, DOPAC, HVA E 5-HT</b> .....	<b>53</b>
6.	<b>NÍVEIS CORTICAIS DE GFAP SETE SEMANAS (DURAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO) APÓS A INJEÇÃO COM METH</b> .....	<b>55</b>

## **DISCUSSÃO**.....57

## **CONCLUSÃO**.....63

## **BIBLIOGRAFIA**.....65

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> <i>Funções de cada área cortical</i> .....	4
<b>Tabela 2</b> <i>Alguns neurotransmissores do SNC</i> .....	7
<b>Tabela 3</b> <i>Vias monoaminérgicas</i> .....	10
<b>Tabela 4</b> <i>Tempos de retenção registados das monoaminas e respectivos metabolitos por HPLC.</i> .....	44
<b>Tabela 5</b> <i>Anticorpos primários e secundários utilizados na análise por Western Blotting</i> .....	46

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Principais áreas funcionais na superfície lateral do córtex.....	3
<b>Figura 2</b> Representação de vários tipos de neurónios corticais.....	6
<b>Figura 3</b> Recetor ionotrópico.....	9
<b>Figura 4</b> Recetor metabotrópico.....	9
<b>Figura 5</b> Projeções da DA abrangendo toda a área cortical.....	10
<b>Figura 6</b> Efeito da anfetamina na regulação do transportador de DA.....	12
<b>Figura 7</b> Esquema da síntese e de armazenamento vesicular da DA, num neurónio dopaminérgico.....	14
<b>Figura 8</b> Esquema da síntese de Serotonina.....	15
<b>Figura 9</b> Esquema do metabolismo da DA, pelas enzimas MAO e COMT.....	17
<b>Figura 10</b> Vias dopaminérgicas.....	18
<b>Figura 11</b> Circuito de recompensa originado pelo uso de metanfetamina, através da via mesolímbica.....	19
<b>Figura 12</b> Modelos de exercício físico para roedores.....	25
<b>Figura 13</b> Exemplo de um murgancho C57BL/6.....	32
<b>Figura 14</b> Treadmills utilizados.....	34
<b>Figura 15</b> Fotografia de um treadmill com duas passadeiras separadas por divisões em acrílico.....	35
<b>Figura 16</b> Protocolo do período de adaptação dos murganhos ao treadmill.....	37
<b>Figura 17</b> Administração intraperitoneal de metanfetamina no murgancho.....	38
<b>Figura 18</b> Protocolo de exercício físico para os grupos SAL + EX e METH + EX.....	40
<b>Figura 19</b> Isolamento do córtex frontal do murgancho.....	41
<b>Figura 20</b> Esquema representativo do desenho experimental.....	42
<b>Figura 21</b> Sistema de HPLC utilizado para a quantificação de monoaminas.....	43
<b>Figura 22</b> Fotografias após a administração da METH, representando a típica ereção pilosa.....	49
<b>Figura 23</b> Efeito da administração da METH e/ou exercício físico nos níveis corticais, totais de DA (A), seus metabolitos, DOPAC (B) e HVA (C) e expressão de tirosina hidroxilase (TH) (D).....	51

<b>Figura 24</b> <i>Efeito da administração da METH (30mg/Kg) e/ou exercício físico nos níveis corticais, totais de 5-HT.....</i>	53
<b>Figura 25</b> <i>Cromatografia de um padrão de 50ng/ml.....</i>	54
<b>Figura 26</b> <i>Cromatografia referente a um murganho pertencente ao grupo Sal/Sed. ....</i>	54
<b>Figura 27</b> <i>Cromatografia referente a um murganho pertencente ao grupo METH/Sed.</i>	54
<b>Figura 28</b> <i>Cromatografia referente a um murganho pertencente ao grupo Sal/Ex. ....</i>	55
<b>Figura 29</b> <i>Cromatografia referente a um murganho pertencente ao grupo METH/Ex. .</i>	55
<b>Figura 30</b> <i>Efeito da administração da METH (30mg/Kg) e/ou exercício físico na expressão cortical da proteína ácida fibrilar glial (GFAP).....</i>	56

## Abreviaturas

3-MT - 3-metoxitiramina

5-HIAA - Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT - 5-Hidroxi-L-Triptofano (Serotonina)

AMPc – Adenosina monofosfato cíclica

BCA - Acido Bicinconínico

BFGF - Fator básico de crescimento fibrobáltico

COMT - Catecol-O-metiltransferase

CPF – Córtex pré-frontal

DA – Dopamina

DAT – Transportador de Dopamina

DOPAC - Ácido 3,4-dihidroxiifenilacético

EX - Exercício

GABA – Ácido aminobutírico

GDNF- Fator neurotrófico derivado glial

GFAP - proteína glial fibrilar ácida

GMPc - Guanosina monofosfato cíclica

HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão

HVA - Ácido homovanílico

InP<sub>3</sub> - Inositol trifosfato

L-DOPA - L-3,4 dihidroxifenolalanina

MAO - Monoaminoxidase

Meth – Metamfetamina

NAC – Nucleus accumbens

PEPS - potencial excitatório pós-sináptico

PIPS - potencial inibitório pós-sinapse

SAL – Salinos

SED - Sedentários

SERT - Transportadores de serotonina

SN – Sistema Nervoso

SNC – Sistema Nervoso Central

TH – Tirosina Hidroxilase

VMAT - transportador vesicular de DA

VTA – Área ventrotegmental

## Resumo

A metanfetamina é uma droga psicoestimulante ilícita, amplamente usada em todo o mundo. As evidências científicas sugerem que o seu uso crônico leva a alterações neurodegenerativas no cérebro, que incluem danos nos terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos e a uma astrogliose reativa.

Estas premissas sugerem que são necessárias estratégias para tratar estes efeitos deletérios, para além de uma abordagem farmacológica. O exercício físico tem-se destacado devido ao seu possível efeito neuroregenerador face a este tipo de neurotoxicidade.

Neste sentido, pretendeu-se investigar um possível efeito neuroregenerador do exercício físico nos terminais monoaminérgicos e na astrogliose do córtex num modelo por injeção de metanfetamina em murganhos C57BL/6. Para este efeito, os murganhos foram submetidos a um programa de exercício físico (cinco dias de exercício por semana durante sete semanas) com início vinte e quatro horas após a administração de uma dose elevada de metanfetamina (30 mg/kg, i.p.).

Para estimar a neurotoxicidade cortical avaliaram-se os níveis de dopamina e serotonina e seus metabolitos, recorrendo à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), à expressão de TH (Tirosina Hidroxilase – marcador da perda de neurónios dopaminérgicos) e de GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida – marcador de astrócitos) por *Western Blotting*.

A diminuição dos valores corticais de dopamina e seus metabolitos, de serotonina e da enzima TH são sugestivos de que a metanfetamina, nesta dosagem, produziu neurodegenerescência dos terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos, constituindo, desta forma, um bom modelo para avaliar a neurotoxicidade cortical. Apesar do exercício ter mostrado potencial neuroregenerador ao nível serotoninérgico não parece ter sido eficaz na reversão da neurotoxicidade dopaminérgica. O significado do impacto positivo do exercício físico nos terminais serotoninérgicos exige uma atenção mais detalhada no futuro. Globalmente este trabalho sugere que o exercício físico é uma putativa estratégia neuroregeneradora.

**Palavras-chave:** metanfetamina, neurotoxicidade, dopamina, serotonina, astrogliose, córtex, exercício-físico, neuroregeneração.

## Abstract

Methamphetamine is an illicit psychostimulant drug widely abused in the world. The scientific evidence suggests that its use leads to chronic neurodegenerative changes in the brain. These changes include damage to dopaminergic and serotonergic terminals and a reactive astrogliosis. These assumptions suggest, that strategies are needed to address these deleterious effects beyond a pharmacological approach. Exercise has stood out because of its possible neuroregenerative effect against this neurotoxicity.

In this sense, we sought to investigate a possible effect of physical exercise on neuroregenerative monoaminergic terminals and astrogliosis in the frontal cortex following methamphetamine injection in a C57BL / 6 model in. To this end mice were submitted to an exercise regimen (five days a week for seven weeks) starting 24 h post-single high dose of methamphetamine (30mg/Kg, i.p.)

To estimate the methamphetamine-induced neurotoxicity, cortical levels of dopamine, serotonin and their metabolites were evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC). The expression of TH (Tyrosine Hydroxylase - marker of dopaminergic neuron loss) and GFAP (glial fibrillary acidic protein - marker for astrocytes) were also determined by Western Blotting.

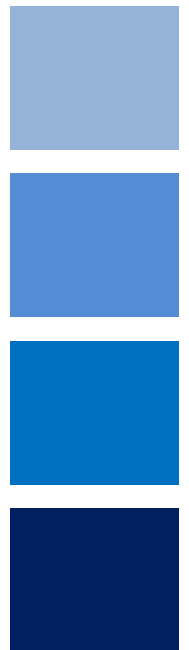
Decreased values of cortical dopamine and its metabolites, of serotonin and TH enzyme, are suggestive that methamphetamine at this dose, produced neurodegeneration of dopaminergic and serotonergic terminals, constituting a good model to evaluate the cortical neurotoxicity. Physical exercise exhibited neuroregenerative potential towards serotonergic terminals. However it failed to promote cortical dopaminergic regeneration. The meaning of the positive impact of exercise on the serotonergic cortical pathway warrants further scrutiny. Overall this study suggests that physical activity is a putative neuroregenerative strategy

**Keywords:** *methamphetamine neurotoxicity, dopamine, serotonin, astrogliosis, cortex, physical-exercise, neuroregeneration.*



## Capítulo 1

# Introdução



## 1. Córtex

O sistema nervoso central (SNC) é composto por, no mínimo, cem bilhões de neurónios. São células únicas capacitadas de receber, conduzir e transmitir sinais. São capazes de garantir os sentidos da visão, audição, tato, olfato e gustação; de perceber o meio externo, de reagir com ações, emoções e secreções hormonais face aos estímulos. São uma rede de funcionamento complexo que permite ao cérebro a habilidade de processar, computar, integrar, transmitir e armazenar informação (Wong-Riley, 2003).

Existe apenas um SNC. Contudo, este encontra-se subdividido em áreas de semelhança anatômica, estrutural e/ou funcional, constituído por vários tipos de células. As células que têm a seu cargo a atividade nervosa são os neurónios constituídos por uma parte ramificada, a dendrite, e uma região não ramificada, o axónio. Há depois vários tipos de células de sustentação aos neurónios denominadas no seu conjunto de neuróglia ou células gliais que possuem um papel importante na nutrição, proteção e regeneração do SNC (Garcia *et al.*, 2009).

Como refere Seeley *et al.* (2001), o tecido nervoso organiza-se de forma a que a sua rede axonal se disponha em feixes. Os feixes de axónios paralelos mielinizados agrupam-se na substância branca, os conjuntos de corpos celulares neuronais não mielinizados agrupam-se na substância cinzenta. A superfície exterior da maior parte do cérebro consiste em matéria cinzenta denominada de córtex cerebral.

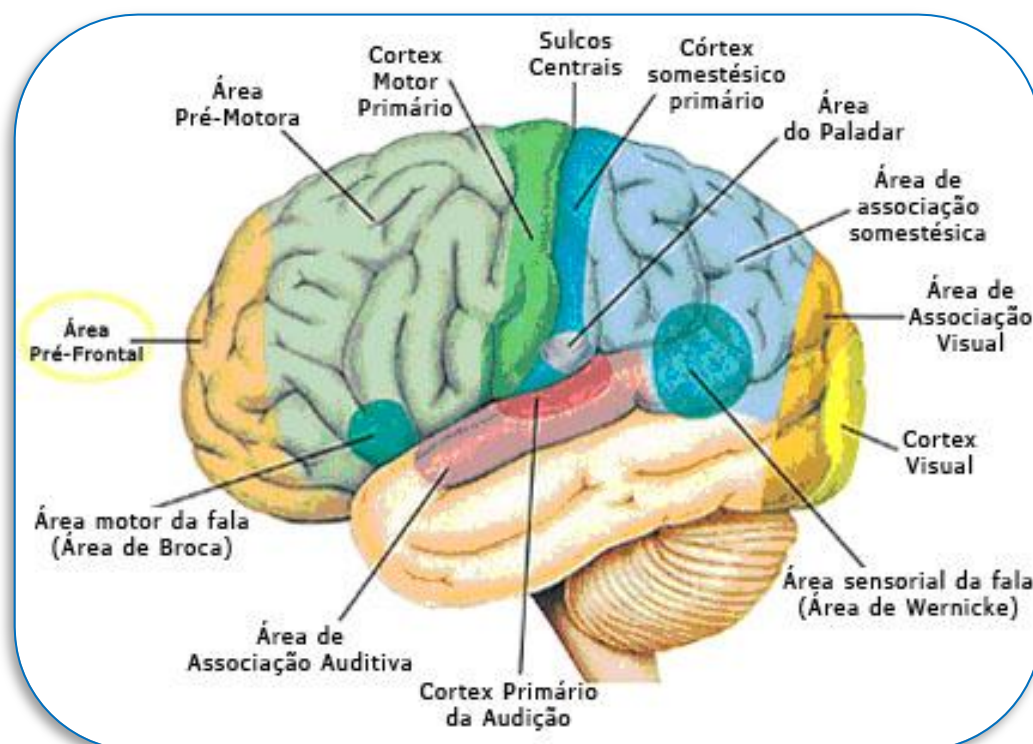
Córtex, palavra latina que significa “casca”, e que por definição constitui a parte externa de um órgão. Especificamente, córtex cerebral refere-se à zona contínua de substância cinzenta, com três a quatro mm de espessura, que ocupa toda a superfície das circunvalações cerebrais (Fonseca *et al.*, 2012).

### 1.1. Anatomia e Fisiologia do Córtex Frontal

O córtex cerebral assume-se como um detentor de funções integrativas de máxima importância, sendo responsável pelos processos de percepção sensorial,

controla ações e reações das mais simples às mais complexas, permite executar funções mentais complexas e integrar memórias passadas com eventos do presente. No entanto, todas estas funções não são executadas pelas mesmas áreas corticais, podendo falar-se em especialização dessas mesmas áreas apesar de serem comunicantes. O córtex cerebral apresenta-se dividido em três pólos – frontal, occipital e temporal e quatro lobos – frontal, parietal, temporal, occipital (Wong-Riley, 2003).

Contudo, torna-se necessário fazer uma divisão do córtex em áreas funcionais, como é demonstrado na figura 1, para melhor compreender a relação da localização com as funções gerais de cada área cortical como é descrito na tabela 1:



**Figura 1** Principais áreas funcionais na superfície lateral do córtex.

<b>Área Cortical</b>	<b>Função</b>
<b>Área Pré-frontal</b>	Raciocínio, emoção e seleção de comportamentos adequados
<b>Área Pré-Motora</b>	Seleção dos circuitos de programas motores
<b>Córtex de Associação Motora</b>	Coordenação de movimentos complexos
<b>Córtex Motor Primário</b>	Produção de movimentos voluntários
<b>Córtex Sensorial Primário</b>	Recebe informação sensorial do corpo
<b>Área de Associação Sensorial</b>	Integra informação dos sensitiva/sensorial
<b>Área de Associação Visual</b>	Processa informação visual complexa
<b>Córtex Visual</b>	Deteta estímulos visuais simples
<b>Área de Wernicke</b>	Compreensão de linguagem
<b>Área de Associação Auditiva</b>	Processamento de informação auditiva complexa
<b>Córtex Auditivo</b>	Deteta qualidades básicas do som (tom, intensidade)
<b>Centro da Fala (Área de Broca)</b>	Produção e uso da fala

**Tabela 1** Funções de cada área cortical (adaptado de Bear et al., 1998, e Mackay, 2011).

O Córtex Frontal desempenha funções mentais complexas geralmente designadas de cognição, desde processos de tomada de decisão até à memória de longo prazo. Está associado ao raciocínio, planeamento, discurso, movimento, emoções e resolução de problemas. Esta região cortical inclui a área pré-frontal, a área pré-motora e o córtex motor primário. De forma mais detalhada, como refere Wong-Riley (2003), a propriedade comum de todas as áreas corticais motoras – área 4 e 6 – é que a sua estimulação elétrica induz movimentos e contrações tónicas dos músculos do lado oposto do corpo e algumas vezes no lado ipsilateral. As áreas motoras controlam o planeamento, a programação, a iniciação e a execução dos movimentos.

Já a área cortical Pré-Frontal, situada anteriormente às áreas motor e pré-motor, tem uma função de nível superior ou executiva e integradora, nomeada-

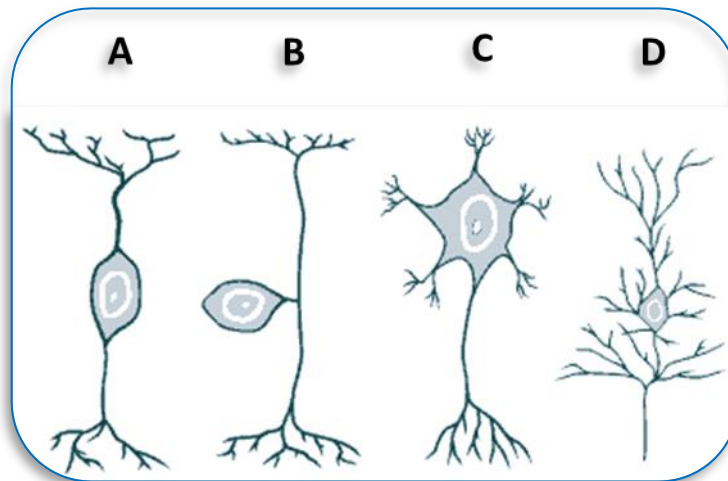
mente a seleção de comportamentos adequados face às circunstâncias e exigências do meio. Segundo Mackay (2011), esta região recebe informação visual altamente processada, bem como informação auditiva a fim de orientar a decisão comportamental. O influxo parietal providencia um contexto que permite ao córtex pré-frontal (CPF) organizar objetivos motores ativando as partes adequadas da parte pré-motora. Para além disso, atua como uma memória circulante de trabalho. Em particular, o CPF tem-se evidenciado como uma área crítica na seleção de ações, tendo por base avaliações para atingir os objetivos com sucesso e controlo cognitivo (Miller *et al.*, 2001; Rolls, 2004).

Dentro do lobo frontal os objetivos gerais do comportamento são selecionados nas áreas anteriores. Contudo, os comportamentos sucessivamente mais detalhados são selecionados em áreas progressivamente mais centrais. Tal como refere Mackay (2011), quanto mais perto do sulco central mais especificados se tornam os detalhes dos padrões motores organizados pelas colunas corticais. Resumidamente, o pólo frontal seleciona uma estratégia ou tarefa a executar, o CPF seleciona o programa motor que irá ativar ligações sensório-motoras específicas no córtex pré-motor. O córtex motor faz a seleção final das sinergias musculares adequadas de acordo com todos os objetivos e programas previamente especificados. De realçar que o pólo frontal fica seletivamente ativado enquanto se mantém um objetivo principal em decurso, mesmo que esteja a executar sub-objetivos concorrentes, tornando este processo essencial para o planeamento e raciocínio abstrato.

Como sugere Garcia (2009), lesões na região frontal e pré-frontal podem induzir alterações da personalidade no seu cerne, desde a perda da flexibilidade mental para formulação de hipóteses para a resolução de problemas, como perder a crítica ou a noção de adequação social – jocosidade despropositada, ou ainda e claramente uma situação mais grave, o mutismo acinético, concluindo assim que o CPF em pleno funcionamento pode eventualmente suprimir respostas mal-adaptativas (Schoenbaum e Roesch, 2005).

## 1.2. Sistema de Neurotransmissores do Córtex Frontal

Segundo Wong-Riley (2003), o córtex humano tem entre dez a vinte bilhões de neurónios, subdivididos em dois tipos celulares diferentes principais: piramidal e não-piramidal. As piramidais com dendrites espinhosas apicais e basais que se ramificam nos planos vertical e horizontal respetivamente; o axónio deixa o córtex em direção a outras áreas corticais e subcorticais. Em suma, as células piramidais são os neurónios de projeção do córtex, já as células não-piramidais formam um grupo diverso de interneurónios, cujos axónios não deixam o córtex, como sugerido na figura 2:



**Figura 2** Representação de vários tipos de neurónios corticais:

A - *Célula Bipolar (interneurónio);*

B - *Célula Unipolar (sensorial);*

C - *Célula Multipolar (motor);*

D - *Célula Piramidal.*

Na verdade, os neurónios formam uma rede que interage funcionalmente com outras regiões do cérebro, como confere Garcia (2009), exemplificando que um axónio exclusivamente cortical pode estabelecer ligação com a dendrite de outro neurónio cortical, e que este pode então enviar o seu axónio através da substância branca até um outro neurónio de uma região distante do córtex.

### 1.2.1. Neurotransmissores

Sendo o SNC uma rede altamente organizada, necessita também de uma forma de comunicação muito eficaz. De uma forma geral, os potenciais de ação de uma célula podem resultar em potenciais de ação a serem produzidos noutra célula, permitindo uma comunicação entre elas – a sinapse (Seeley *et al.*, 2001). Os componentes essenciais de uma sinapse são o terminal pré-sináptico, a fenda sináptica e a membrana pós-sináptica. Os potenciais de ação não passam diretamente de um terminal para a membrana, provocam sim a libertação de substâncias químicas, denominadas de neurotransmissores, a partir do terminal pré-sináptico. Estes têm a capacidade de se difundir através da fenda e estimular ou inibir a produção de potenciais de ação na membrana pós-sináptica.

Segundo Rose (1998), conhecem-se mais de cinquenta neurotransmissores, onde estão incluídas as aminas biogénicas, os aminoácidos ou neuropeptídeos, como é referido na tabela 2:

Aminas biogénicas	Aminoácidos	Neuropeptídeos
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acetilcolina</li> <li>- Catecolaminas – dopamina (DA), epinefrina, norepinefrina</li> <li>- Histamina</li> <li>- Indolaminas: Serotonina (5-HT)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácido gama aminobutírico (GABA)</li> <li>- Glicina</li> <li>- Glutamato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Encefalina</li> <li>- Beta-endorfina</li> <li>- Substância P</li> <li>- Colecistoquinina</li> <li>- Fator libertador da corticotrofina</li> <li>- Neuropeptídeo Y</li> </ul>

**Tabela 2** Alguns neurotransmissores do SNC (Garcia, 2009).

Além da categoria dos neurotransmissores deve ainda considerar-se os neuromoduladores e as neuro-hormonas. Neuromodulador será a substância que modula a ação dos neurotransmissores, ou seja, modifica o ambiente químico em que a neurotransmissão se processa alterando o seu resultado, estes podem atuar

pré ou pós sinapse. Como refere Cooper *et al.* (1991), as substâncias acima mencionadas podem atuar como neurotransmissores num local do SN e como neuromoduladores noutra local.

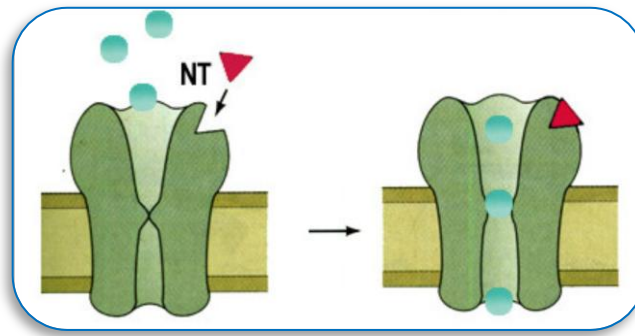
O efeito provocado por um neurotransmissor, seja a produção de um potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) ou um potencial inibitório pós-sináptico (PIPS) ou de uma alteração na produção de um nucleótido cíclico, depende apenas de um recetor, de tal forma que uma única substância transmissora pode produzir todos estes efeitos em diferentes sinapses, ou uma combinação destes efeitos numa mesma sinapse (Garcia, 2009).

A maior parte dos medicamentos ou outras substâncias como a cafeína, nicotina ou drogas ilícitas, atuam no SNC através de recetores neuronais. É o recetor que determina a ação ionotrópica ou metabotrópica do transmissor. Como exemplifica Mackay (2011), os recetores ionotrópicos podem classificar-se com recetores rápidos porque o efeito direto da ligação recetor-transmissor é uma alteração imediata da condutância iónica da membrana local; já os recetores metabotrópicos, em vez de alterarem diretamente a permeabilidade iónica, funcionam catalizando reações enzimáticas, aumentando, por exemplo, a produção de “segundos mensageiros” – os nucleótidos cíclicos: a adenosina monofosfato cíclica (AMPc), a guanosina monofosfato cíclica (GMPc) ou inositol trifosfato (InP<sub>3</sub>), que iniciam efeitos metabólicos dentro dos neurónios. A DA e a 5-HT são exemplos de aminas biogénicas, catecolamina e endolamina respetivamente, que necessitam de recetores metabotróficos.

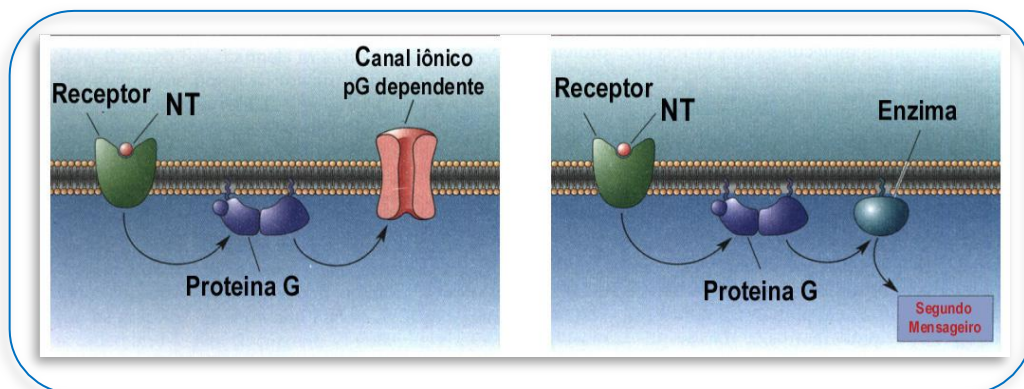
Ainda segundo Nishida (2007), a maioria dos recetores metabotrópicos pós-sinápticos ativam uma proteína reguladora, denominada de proteína G, que por sua vez aciona uma outra proteína efetora que poderá alterar a conformação de um canal iónico, ou então ativar uma enzima chave, que modifica o metabolismo do neurónio pós-sináptico. Este tipo de recetores ativam uma reação em cascata, como exemplifica a figura 3 e a figura 4.

Alguns neurotransmissores são recaptados para o terminal pré-sináptico ou para os astrócitos através de moléculas transportadoras específicas. Existem transportadores específicos para a DA e para a 5-HT. Algumas drogas psicoestimulantes atuam ao nível do bloqueio desses mesmos transportadores.





**Figura 3** Recetor ionotrópico.



**Figura 4** Recetor metabotrópico, mostrando dois sistemas da proteína G: ação direta e via 2º mensageiro.

### 1.2.2. Neurotransmissores Corticais: *Inputs* Monoaminérgicos

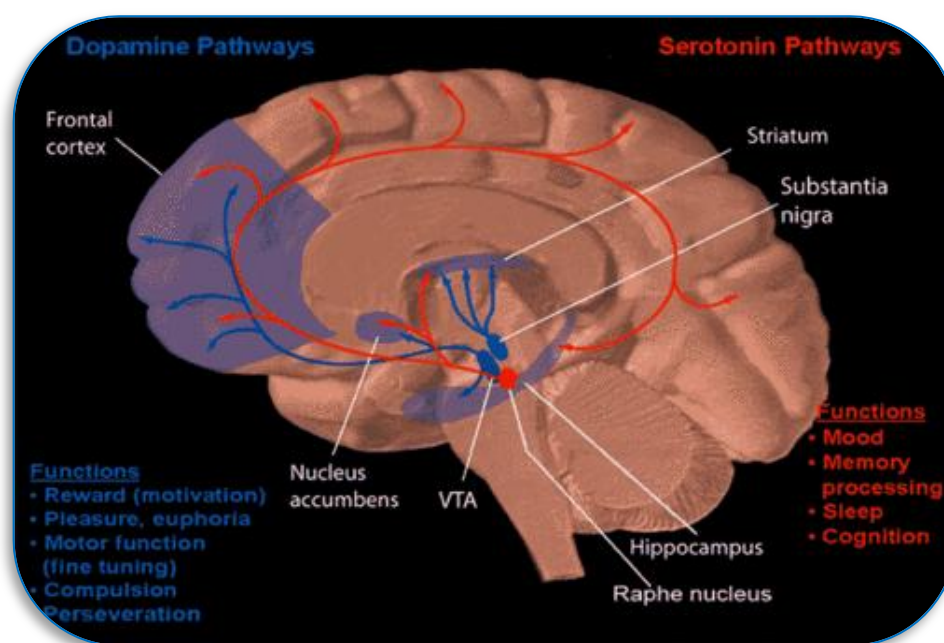
A grande maioria dos neurónios piramidais usa o glutamato como principal neurotransmissor excitatório; os não-piramidais utilizam o GABA como neurotransmissor principal. Alguns neurónios corticais contêm também óxido nítrico sintase, uma enzima que sintetiza óxido nítrico – um neurotransmissor gasoso. Além de neurotransmissores, os neurónios corticais produzem neuromoduladores, como os vários neuropeptídeos que modulam a transmissão sináptica.

Segundo Wong-Riley (2003), existem vias monoaminérgicas que se projetam para amplas áreas corticais, como é exemplificado na tabela 3. Sabe-se que as monoaminas estão envolvidas em transtornos mentais, doenças neurológicas e neurodegenerativas e na dependência de drogas.

Vias monoaminérgicas	Origem
Via serotoninérgica	Núcleos do rafe na linha média do tronco cerebral
Via dopaminérgica	Área ventrotegmental (VTA) do mesencéfalo (projeções mesolímbicas e mesocorticais)
Via noradrenérgica	Locus coeruleus

**Tabela 3** Vias monoaminérgicas (adaptado de Wong-Riley, 2003).

Como reforça Hyman *et al.* (2006), a origem da DA do CPF, bem como da amígdala, estriado, *nucleus accumbens* (NAc) e hipocampo é a VTA do mesencéfalo, bem como a origem da 5-HT é o tronco cerebral como é sugerido na figura 5.



**Figura 5** Projeções da DA desde a VTA até ao NAc, CPF, estriado e hipocampo, bem como a projeções da 5-HT desde os núcleos de rafe do tronco cerebral abrangendo toda a área cortical.

Cohen *et al.* (2002) e Montague *et al.* (2004), sugerem ainda que pelo facto do CPF receber inervação dopaminérgica da VTA, promove que haja uma libertação faseada de DA, que poderá estar relacionada com a atualização de informação, seleção e codificação de novos objetivos.

## 2. Anfetaminas

Anfetamina é o nome que designa uma classe de fármacos sintéticos, de baixo peso molecular, que possuem propriedades psicotrópicas. Este grupo de psicoestimulantes produzem ações biológicas similares às mediadas por neurotransmissores endógenos - as aminas biogénicas, como refere Patiño (2008), ou seja, possuem uma atividade farmacodinâmica no *input* das várias monoaminas no SNC. Em termos farmacocinéticos, a absorção da anfetamina no trato intestinal é rápida e completa, o que permite esta droga ser consumida oralmente. Também pode ser consumida via endo-venosa potenciando a estimulação do SNC. A sua metabolização acontece no fígado; contudo, a maior parte da anfetamina é excretada de forma inalterada (Tarter *et al.*, 2010).

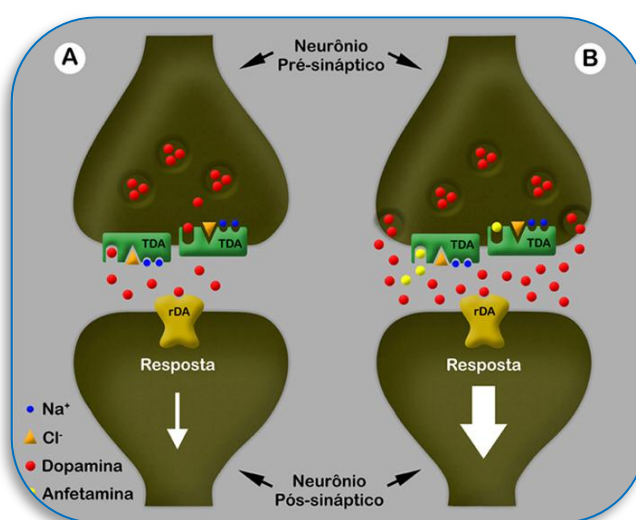
Homer *et al.* (2008) referem que a anfetamina quando consumida suprime o apetite e apresenta sintomas positivos como euforia, excitabilidade, aumento de produtividade e agitação psicomotora, mas, também provoca adição, uma desordem que se manifesta pela procura e consumo compulsivo da droga e sintomas de privação (Koob e Volkow, 2010).

### 2.1. Metanfetamina

A metanfetamina (METH) é um derivado das anfetaminas, de uso ilegal, que se tem vindo a tornar um problema de Saúde Pública devido ao seu uso indiscriminado. Calcula-se que no mundo inteiro existam quinze a dezasseis milhões de utilizadores de anfetaminas e seus derivados, o que as torna na segunda droga mais consumida a seguir à cannabis (United Nations Office on Drugs and Crime, 2007). A METH tornou-se muito popular devido à sua produção pouco dispendiosa, baixo custo na sua aquisição, e durabilidade em termos de efeitos (Koob e Volkow, 2010).

Os efeitos da METH são imediatos e devidos à libertação de 5-HT e DA, como também à inibição da recaptção da 5-HT, DA e noradrenalina, uma vez que diminuiu a quantidade de transportadores das monoaminas disponíveis, 5-HTT e DAT, respetivamente (O'Dell *et al.*, 2012).

Estudos têm demonstrado que a anfetamina e seus análogos, incluindo a METH, aumentam os níveis de DA no cérebro. Este aumento pode acontecer pela liberação ou pela diminuição da recaptação de DA. Porém, o bloqueio da recaptação somente ocorre em doses próximas daquelas capazes de produzir toxicidade, sendo que a estimulação da liberação ocorre em doses mais baixas. Tarter *et al.* (2010) ainda referem que doses elevadas de anfetaminas podem induzir alcalinização nas vesículas que armazenam DA e ainda inibir os seus recetores, potenciando a liberação deste neurotransmissor, como é demonstrado na figura 6:



**Figura 6** Efeito da anfetamina na regulação do transportador de DA

*A: Finalização da neurotransmissão de DA realizada através do seu transportador – DAT no neurônio pré-sináptico. O transporte de DA ocorre com a ligação de uma molécula de DA, dois íons  $\text{Na}^+$  e um  $\text{Cl}^-$ . Após a formação deste complexo, o transportador é integrado e a DA é armazenada em vesículas.*

*B: A anfetamina como substrato liga-se no local específico da DA. Este efeito diminui a quantidade de DAT disponíveis na membrana para a recaptação da DA, pelo que se mantém mais tempo na fenda sináptica.*

Estudos neuroquímicos, utilizando ensaios com microdiálise, sugerem um aumento dos transportadores de DA na superfície da membrana e que este fenómeno é tempo-dependente, como reforça Neto *et al.* (2003), mencionando que o mecanismo de ação das anfetaminas depende substancialmente de dois fatores: tempo de atuação dos neurotransmissores envolvidos no processo, e aumento da

libertação de DA através do transportador da membrana plasmática, impedindo o armazenamento vesicular de catecolaminas.

Darke *et al.* (2008) referem ainda que a ingestão de grandes doses a curto-prazo apresentam consequências graves, podendo colocar a vida em causa com hipertermias severas, falhas hepáticas e renais, hemorragias cérebro-vasculares e convulsões; a longo-prazo de surgir ansiedade, depressão, isolamento social, psicose, perturbações de humor e disfunção psicomotora.

Citando O'Dell *et al.* (2012), os estudos referem como conclusão validada, que o uso e a dependência prolongada de METH causa mudanças significativas em todo o sistema das monoaminas, seja dopaminérgico ou serotoninérgico, como se descreve mais detalhadamente na secção 2.3.

## **2.2. Ação da Metanfetamina nos Sistemas Dopaminérgico e Serotoninérgico**

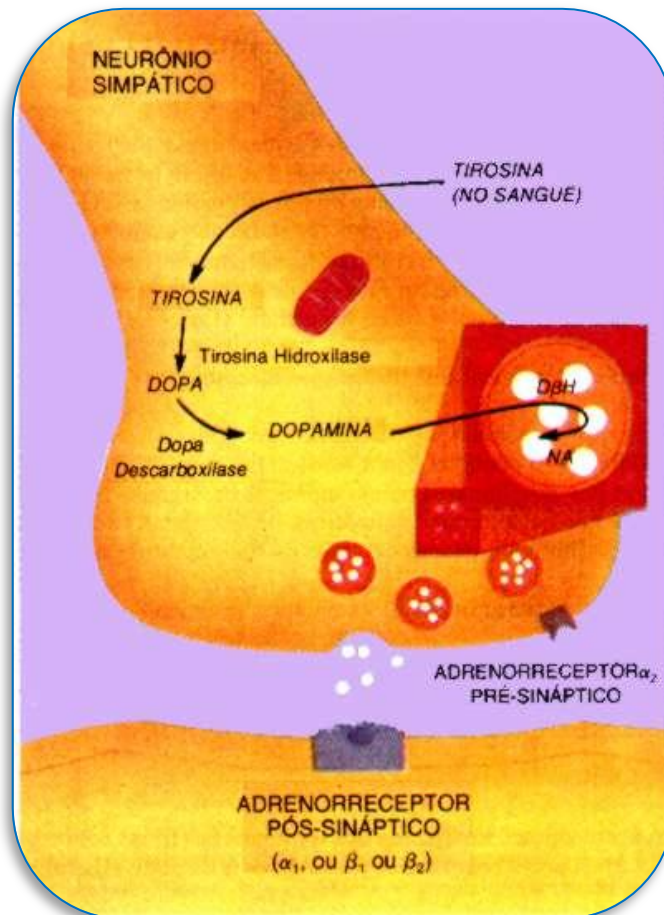
A METH, bem como outras drogas de abuso, como a cocaína ou heroína, têm em comum o facto de atuarem direta ou indiretamente nos sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos, induzindo mudanças neuropatológicas e neurodegenerativas, como referem Aron e Paulus (2007) e Chang *et al.* (2007). Estas alterações incluem uma persistente queda nos níveis dos transportadores de DA (DAT) e de 5-HT (5-HTT) no CPF e noutras regiões cerebrais (Sekine *et al.*, 2006).

### **2.2.1. Biossíntese da Dopamina e Serotonina**

Tal como já foi referido, a DA e 5-HT, neurotransmissores do SNC, são denominados de aminas biogénicas ou monoaminas. Existem, no entanto, algumas diferenças químicas estruturais, a DA porque possui um grupo catecol designa-se por catecolamina, já a 5-HT não possui esse grupo mas sim o grupo indolamina. (Nishida, 2007).

A síntese de DA é feita a partir do aminoácido tirosina, que é convertido em L-3,4 dihidroxifenolalanina (L-DOPA), pela enzima tirosina hidroxilase (TH), sendo esta

a etapa que limita a produção de DA. A L-DOPA, por sua vez, é convertida em DA por uma descarboxilase não específica. A DA é posteriormente armazenada em vesículas sinápticas cuja entrada está dependente de um transportador existente na membrana – transportador vesicular (VMAT) (Estevinho e Furtunato, 2003), como é demonstrado na figura 7:

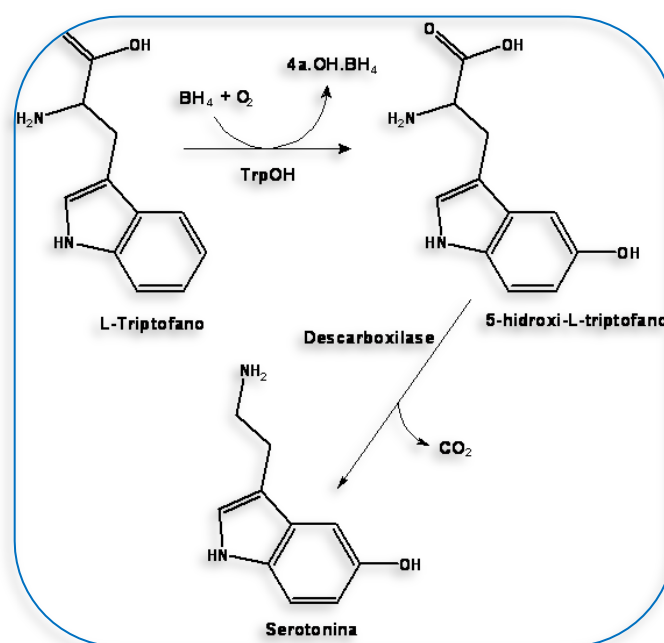


**Figura 7** Esquema da síntese e de armazenamento vesicular da DA, num neurónio dopaminérgico.

A libertação de DA envolve excitação, provocada por um influxo de cálcio, para o espaço sináptico (Granner, 2000). A DA ainda pode ser libertada para o meio extraneural por inversão do DAT localizado na membrana plasmática do terminal pré-sináptico, quando a concentração de DA no citoplasma do neurónio pré-

sináptico se eleva (Sulzer *et al.*, 1995). Tanto os VMAT como os DAT são alvo de inibição por parte das anfetaminas (Jones *et al.*, 1998).

A 5-HT é sintetizada também a partir de um aminoácido, o L- triptofano, que se hidroxila por ação da enzima triptofano-hidroxilase, processo que limita a produção de 5-HT. De seguida, a molécula é sujeita a uma descarboxilação, como é demonstrado na figura 8 (Nishida,2007). Uma vez produzida, a 5-HT é transportada pelo VMAT e armazenada em vesículas pré-sinápticas localizadas nos terminais axonais, estando a sua liberação dependente da atividade neuronal. Após a libertação da 5-HT na fenda sináptica para exercer a sua ação como neurotransmissor, esta pode ser recaptada para o terminal axonal pelos transportadores pré-sinápticos ou, então, ser degradada na sinapse (Kapczinski, 1998).



**Figura 8** Esquema da síntese de Serotonina.

Berger e Roth (2011) ainda acrescentam que o VMAT é um transportador inespecífico de monoaminas, tendo a capacidade de fazer o transporte de todas as aminas biogénicas ao nível vesicular. Já pelo contrário, os transportadores de recaptação de monoaminas exibem seletividade, alta afinidade e baixa capacidade para cada monoamina específica. Os transportadores seletivos de monoaminas, que

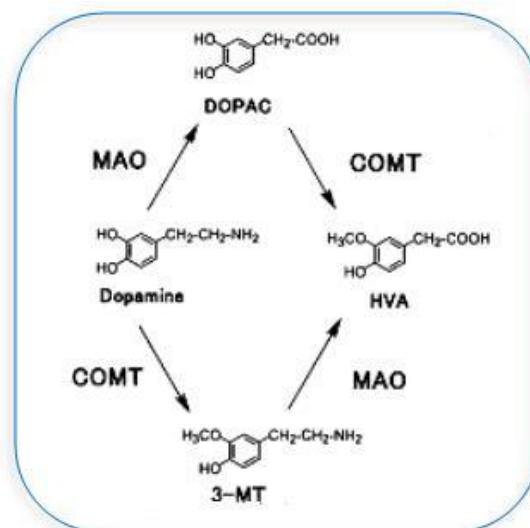
incluem o transportador de serotonina (5-HTT) e o transportador de dopamina (DAT), também são capazes de transportar as outras monoaminas, mas com menos eficácia.

### **2.2.2. Recaptação e Metabolismo da Dopamina e da Serotonina**

De modo a impedir a permanente estimulação dos recetores, a ação dos neurotransmissores libertados é terminada basicamente por duas formas: através da recaptação ou através de mecanismos de inativação. No que se refere à DA, uma vez estando no espaço sináptico, pode ser recaptada para o neurónio pré-sináptico e reincorporada em vesículas por transportadores de alta afinidade, o DAT (Estevinho e Fortunato, 2003). A METH possui bastante afinidade com este transportador impedindo a recaptação de DA para o terminal nervoso.

Dentro dos terminais dopaminérgicos, a principal via catabólica da DA está a cargo da enzima monoaminoxidase (MAO). Existem duas isoformas da MAO – A e B, sendo a DA preferencialmente metabolizada pela MAO-A (Berge e Roth, 2011). Esta enzima localiza-se na membrana mitocondrial externa e é responsável pela conversão da DA em ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). A DA pode ainda ser degradada, como refere Granner (2000), por uma outra enzima, a catecol-O-metiltransferase (COMT), que converte este neurotransmissor em 3-metoxitiramina (3-MT) ou o DOPAC em ácido homovanílico (HVA), sendo este o produto final do metabolismo da DA (Estevinho e Fortunato, 2003), como pode ser demonstrado na figura 9.





**Figura 9** Esquema do metabolismo da DA, pelas enzimas MAO e COMT.

Como refere Nashida (2007), a 5-HT apresenta um processo de recaptação e metabolização muito semelhante à DA e às restantes catecolaminas. É recaptada para o neurónio pré-sináptico e reincorporada nas vesículas sinápticas por transportadores específicos, o 5-HTT, processo também inibido pela METH. A principal via de degradação da serotonina é a oxidação pela MAO-B, formando como produto de excreção o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Berger e Roth, 2011).

### 2.2.3. Recetores Dopaminérgicos e Serotonérgicos

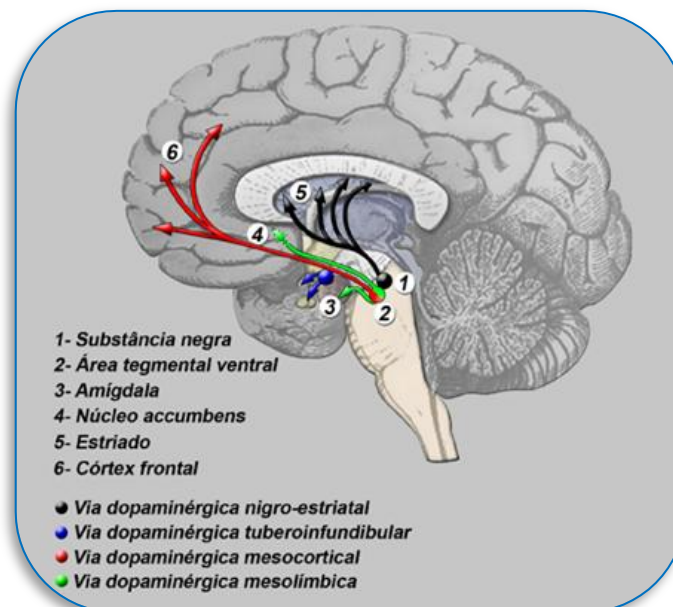
Os recetores de DA pertencem aos recetores metabotrópicos. São encontrados no SNC e até em tecidos não neurais (Estevinho e Fortunato, 2003). Existem duas sub-famílias, os recetores do tipo D<sub>1</sub>, que incluem os recetores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>, e os recetores do tipo D<sub>2</sub>, que incluem os D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>. Esta divisão baseia-se em critérios de semelhanças bioquímicas, moleculares e farmacológicas.

Tal como já foi descrito, os recetores dopaminérgicos estão associados a proteínas G, que na família do tipo D<sub>1</sub> são responsáveis por estimular a enzima adenilato ciclase e, por consequência, aumentar da produção de cAMP (Nishida, 2007). Já a

família do tipo D<sub>2</sub> está ligada à inibição da adenilato ciclase, interferindo na abertura de canais de cálcio e potássio (Ricci *et al.*, 2001).

Estão identificados cerca de catorze subtipos de recetores para a 5-HT, entre os quais podem ser citados os recetores 5-HT<sub>1</sub>, relacionados com a inibição da atividade da adenilato ciclase ou com a regulação de canais de potássio ou cálcio, e os recetores 5-HT<sub>2</sub>, ligados à ativação da fosfolipase C, bem como o recetor 5-HT<sub>3</sub>, o qual leva a correntes aumentadas de sódio e potássio (Olivier e Oorschot, 2005).

#### 2.2.4. Influência da Metanfetamina no Circuito Dopaminérgico e Serotinérgico



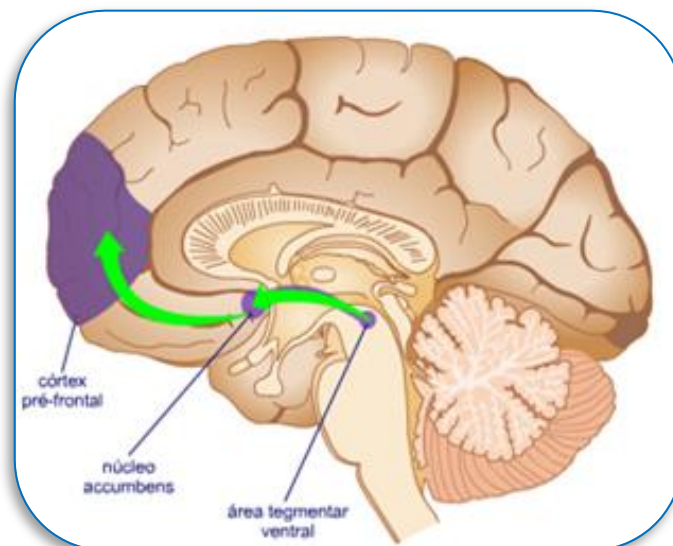
**Figura 10** Vias dopaminérgicas.

*Neurónios dopaminérgicos da substância negra (mesencéfalo) projetam-se para o estriado e controlam a motricidade.*

*Neurónios da VTA projetam-se para estruturas límbicas, tais como a amígdala, estriado, NAc. Neurónios da ATV também se projetam para o córtex pré-frontal.*

São várias as vias dopaminérgicas, a nigro-estriatal, a tuberoinfundibular, a mesolímbica e a mesocortical, representadas na figura 10, sendo as duas últimas as

que se revelam mais afetadas com o uso de METH. A via mesolímbica origina-se na VTA, sendo a principal responsável pelo comportamento motivado; a via mesocortical inicia-se na VTA e inerva o córtex frontal, encontrando-se envolvida em fenômenos de aprendizagem e memória (Wong-Riley, 2003). Estas vias, que incluem os recetores  $\mu$  opióides, são as mais afetadas e ativadas pelo consumo da METH, uma vez que, devido às suas características funcionais, são suscetíveis a uma adaptação e tolerância à droga, bem como ativam um comportamento aditivo de recompensa, procura e a formação de uma memória associada à dependência (figura 11) (Robinson e Berridge, 2000). A tolerância ocorre devido a alterações de curto e longo prazo nos recetores específicos  $\mu$ , bem como adaptações nos mecanismos de sinalização intracelular, necessitando de doses cada vez maiores para obter o mesmo efeito. Mackay (2011) acrescenta que os opiáceos apresentam um mecanismo de inibição pré-sináptica diferente, que pode ocorrer ao longo dos axónios e não apenas na porção terminal, ligando-se ao recetores  $\mu$  da membrana axonal. Esta afinidade, estimula em geral o sistema dopaminérgico. Como refere Bear *et al.* (1998), as anfetaminas atuam também como agonistas dopaminérgicos.



**Figura 11** Circuito de recompensa originado pelo uso de metanfetamina, através da via mesolímbica.

As drogas aditivas ativam ainda os receptores  $D_1$ , que iniciam uma sequência metabólica e molecular, que induz uma modificação na expressão génica e que poderá estar na origem da modificação da estrutura e função dos neurónios (Hyman e Malenka, 2001; Nestler, 2001; Robinson e Kolb, 1999). Contudo, a relação entre as mudanças moleculares e as respostas comportamentais ainda não estão totalmente esclarecidas.

A METH ativa a neurotransmissão dopaminérgica através de uma ação direta sobre os seus transportadores, quer o DAT, este mais seletivo, impedindo a recaptção, quer o VMAT, impedindo o ser armazenamento vesicular, conduzindo a um aumento da secreção dopaminérgica na via mesolímbica (Nestler, 2001).

Sousa *et al.* (2004) acrescentam ainda que a METH interfere em diferentes neurotransmissores, nomeadamente nos neurónios serotoninérgicos, que são muito suscetíveis ao consumo deste tipo de drogas. A METH promove a libertação maciça de 5-HT, seguida de um período de depleção da mesma (Gree *et al.*, 2003). Estudos em roedores demonstram que o uso da METH promove um rápido aumento da concentração de 5-HT, mediado por diferentes mecanismos: para além de estimular a libertação de 5-HT, inibe a sua recaptção (Brodkin *et al.*, 1993) e bloqueia a enzima MAO-A, responsável pelo metabolismo da 5-HT (Leonardi e Azmitia, 1994).

Outro efeito do uso de METH consiste na diminuição de terminações nervosas serotoninérgicas, primariamente nos núcleos do rafe do tronco cerebral, como referem O'Hearn *et al.* (1988). Além deste efeito, Schmidt e Taylor (1987) ainda mencionam que a METH também provoca decréscimo na atividade da enzima triptofano-hidroxilase, uma das enzimas responsáveis pela síntese de 5-HT.

### **2.3. Neurotoxicidade: Astroglíose e Disrupção da Homeostasia Dopaminérgica**

A metanfetamina é uma droga de abuso ilícita, cuja evidência científica sugere causar uma situação de neurodegeneração quando administrada em altas dosagens (Cadet e Krasnova, 2009).

Scott *et al.* (2007) ainda acrescentam que o uso desta mesma droga é responsável pela indução de alterações neuropatológicas e morfológicas nos cérebros dos indivíduos a ela expostos. Estudos imagiológicos corroboram que a metanfetamina causa mudanças neurodegenerativas (Aron e Paulus, 2007; Chang *et al.*, 2007), demonstrando-se uma activação microglial em várias regiões do cérebro, sendo o córtex uma das mais afetadas (Sekine *et al.*, 2008). Estas mudanças também incluem uma perda de substância cinzenta nas projeções mesolímbicas e hipertrofia da substância branca (Thompson *et al.*, 2004). Bowyer *et al.* (2004) reforçam ainda que o córtex frontal está implicado como sendo um alvo para os efeitos neurotóxicos provocados pela METH.

De acordo com a literatura, um grande número de estudos animais demonstram que a METH pode causar uma destruição específica dos terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos, e também tem sido evidenciado que existe morte neuronal por fenómenos apoptóticos (Cadet e Krasnova, 2009). Kuczenski *et al.* (2007) ainda acrescentam que pelo uso desta droga de abuso, especificamente no córtex, é demonstrada uma perda bastante significativa da complexidade dendrítica dos neurónios piramidais, acompanhada de distrofia local consistente com o processo neurodegenerativo, que é representado por múltiplos eventos como *stress* oxidativo, exotocidade, hipertermia, respostas neuroinflamatórias e disfunção mitocondrial, sinais que caracterizam um estado de neurotoxicidade (Cadet e Krasnova, 2009).

A resposta dominante do SNC a lesões, quer traumáticas quer patológicas, ou mesmo induzidas por agentes químicos, parece ser bastante parecida, traduzindo-se em astrogliose em todos os locais suscetíveis de serem danificados, tal como referem O'Callaghan *et al.* (2008). Existe desta forma a possibilidade que uma exposição a agressões neurotóxicas ative diretamente a glia, originando uma resposta subsequente com o aumento das concentrações de mediadores neuroinflamatórios, como acontece com a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), com o fator básico de crescimento fibroblástico (BFGF) ou com o fator neurotrófico derivado glial (GDNF) (O'Callaghan *et al.* 2008).

O fenómeno da neuro-inflamação tem sido tido como o resultado de agressões tóxicas e de várias doenças neurológicas do SNC (Block *et al.*, 2007; Kraft e Harry, 2011; Sriram e O'Callaghan, 2007). Contudo, os mecanismos de causa e con-

sequência ainda não se encontram devidamente elucidados (Streit, 2010). No entanto, é conhecido que a METH causa danos neurotóxicos significativos nos terminais dopaminérgicos (Kelly *et al.*, 2012), refletindo-se num declínio da DA e da tirosina hidroxilase (TH) e a uma ativação dos neurónios gliais que são responsáveis pelo aumento de GFAP (O'Callaghan *et al.*, 2008).

Como refere O'Dell (2012), vários estudos confirmam que a administração de METH produz de facto lesões ao nível dos terminais dopaminérgicos, que são observadas através da quantificação dos níveis de DAT, VMAT e TH (marcadores dopamínicos), que após o insulto neurotóxico se encontram significativamente mais baixos à semelhança das concentrações de DA. Tansey (2007) e Kuhn (2006), ainda acrescentam que os neurónios dopaminérgicos parecem ser particularmente vulneráveis a este tipo de insultos aumentando o *stress* oxidativo tecidual, uma vez que já se encontram habitualmente em processos intracelulares oxidativos relacionados com a síntese de DA.

A METH também atua nos terminais serotoninérgicos ao nível do córtex pré-frontal (O'Dell, 2012), resultando numa depleção de 5-HT. Estudos confirmam que após a agressão existe, não só uma diminuição dos transportadores de 5-HT (SERT), bem como consequentemente uma diminuição da concentração efetiva de 5-HT.

Como tem sido amplamente descrito, a administração de METH atua como agente neurotóxico, sendo uma causa possível de neurodegeneração, tendo como consequências diretas a depleção de DA, TH e também de DOPAC e HVA. Apesar de este psicoestimulante ser um neurotóxico dopaminérgico, afeta outras monoaminas como a 5-HT, tal como refere Cadet e Krasnova (2009), uma vez que a agressão prejudica em primeira instância os *inputs* vindos da substância *nigra pars compacta* e dos núcleos do rafe, responsáveis pela homeostasia da área cortical (Pereira, 2012). Pode dizer-se com alguma certeza que a neurotoxicidade assenta em dois acontecimentos basilares: a perda de neurónios e terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos, bem como a indução da astrogliose (Kelly *et al.*, 2012).

A neurotoxicidade causada pela METH é demonstrada nas regiões cerebrais do córtex e no estriado (Bowyer, 2004). Contudo, da sua administração não resultam apenas disrupções bioquímicas, traduzem-se também em respostas comportamentais (Robinson e Berridge, 2000), não apenas na adição física sentida pelos

consumidores, mas também na agitação motora e défices cognitivos (Sekine *et al.*, 2006; Volkow *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 1996).

Em suma, um cérebro alvo de drogas de abuso é caracterizado por mudanças neuropatológicas que incluem degeneração dos terminais monoaminérgicos, *stress* oxidativo, ativação da glia e astrogliose (Cadet e Krasnova, 2009). Estes efeitos têm sido repetidamente reproduzidos em modelos animais, que permitem identificar os mecanismos de neurotoxicidade e de neurodegeneração no sentido de desenvolver abordagens e estratégias para promover a recuperação dos sistemas aminérgicos (Cadet e Krasnova, 2009).

Petzinger (2009) ainda acrescenta que estudos com METH têm vindo a demonstrar uma dinâmica neuroplástica do sistema nigroestrial, e a sua capacidade de responder a uma agressão tóxica, testando os mecanismos moleculares e bioquímicos degenerativos dos neurónios dopaminérgicos axonais e serotoninérgicos, sugerindo que o entendimento destes mesmos mecanismos poderá conduzir a novas modalidades terapêuticas, nomeadamente abordagens neuroprotetoras ou neurorregeneradoras (Frost e Cadet, 2000).

### 3. Exercício

Speelman *et al.* (2011) referem que um estilo de vida sedentário pode apresentar inúmeras consequências, quer ao nível físico, motor, cognitivo ou mesmo bioquímico. Evidências sugerem que o exercício físico pode, em geral, melhorar não só a resposta às agressões externas como a alterações patológicas endógenas. Investigadores ainda acrescentam que o exercício apresenta benefícios adicionais ao nível das funções executivas (Takana, 2009) e tem sido reconhecido como uma das estratégias principais para a manutenção de perturbações metabólicas e a forma de alcançar benefícios sustentados no tempo (Fu *et al.*, 2010).

A plasticidade cerebral é um mecanismo fundamental da cognição em geral. A literatura suporta que o exercício pode facilitar a neuroplasticidade, bem como aumentar a expressão génica de fatores de transcrição que estão relacionados com este fenómeno (Berchtold *et al.*, 2010; Gomez-Pinilla *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2001; Stranaham *et al.*, 2010).

Arida *et al.* (2011) mencionam que o exercício parece estar implicado como um fator influenciador em todos os circuitos neuronais, favorecendo o seu normal funcionamento e influenciando a sua plasticidade na resposta a alterações neurológicas. Neste sentido, muitos protocolos e modelos têm sido utilizados para explorar os efeitos do exercício no cérebro e o impacto no seu funcionamento; no entanto, também tem sido amplamente reconhecido que apenas um tipo de exercício físico poderá não ser suficiente para alcançar todos os objetivos investigacionais (Arida *et al.*, 2011).

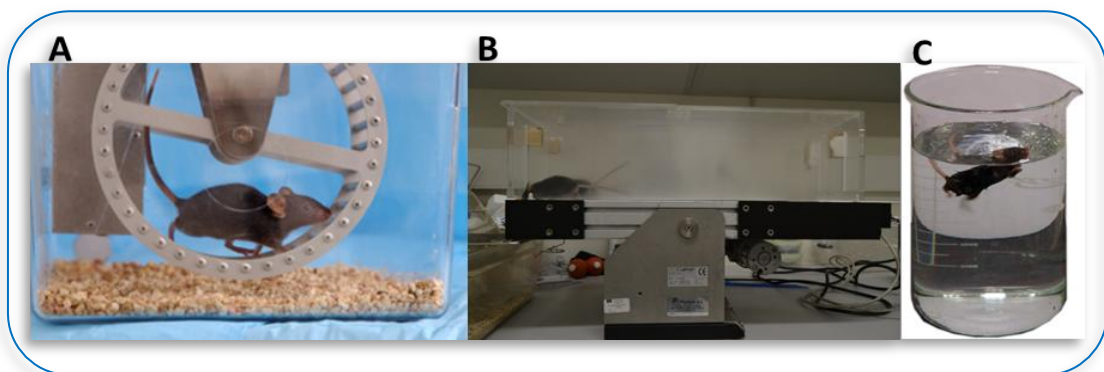
#### 3.1. Treadmill / Tapete Rolante

Os modelos de exercício físico foram desenvolvidos para estudos animais com o objectivo de simular a atividade física em humanos e são designados de “modelos de exercício”. Estes modelos podem variar na intensidade, frequência, duração e formas de atividade (Arida *et al.*, 2011).



Torna-se importante diferenciar atividade física de exercício físico. Por atividade física entende-se qualquer movimento do corpo produzido pelos músculos esqueléticos e que implica dispêndio de energia. Por sua vez, o exercício físico compreende um conjunto de atividades físicas programadas que objectivam a manutenção ou a melhoria da condição física em uma ou mais componentes (Arida *et al.*, 2011).

Existem vários modelos para induzir os animais ao exercício, tais como *swimming* (Rupp e Wahl, 1990), *weight lifting* (Wong e Booth, 1988), *climbing laddermill* (Norton *et al.*, 1990), *wheel running* (O'Dell *et al.*, 2012), e sistema de *treadmill* (Desai *et al.*, 1997; Kemi *et al.*, 2002; Lambert e Noakes, 1989; Schefer e Talan, 1996). Contudo, segundo Arida *et al.* (2011), os modelos mais utilizados para estudar as adaptações fisiológicas do exercício são o *wheel running* (figura 12A), *treadmill* (figura 12B), e *swimming* (figura 12C).



**Figura 12** Modelos de exercício físico para roedores:

- A – *Wheel running*;
- B – *Treadmill*;
- C – *Swimming*.

O *treadmill* ou tapete rolante tem sido largamente utilizado nas últimas décadas para estudar respostas comportamentais, fisiológicas, bioquímicas e moleculares ao exercício. Apesar de se terem usado diversas espécies animais, têm-se preferido os roedores para os estudos no *treadmill* (Kregel *et al.*, 2006).

O *treadmill* apresenta vantagens relativamente aos outros modelos animais, uma vez que apenas neste modelo, a intensidade, a velocidade e a duração do exercício pode ser manipulada e quantificada pelo investigador, ao contrário da *wheel running* ou *swimming*, em que o exercício é voluntário (Arida *et al.*, 2011; Kregel *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2008). Este controlo preciso de variáveis permite ainda uma carga de exercício controlada e uniforme (Holydal *et al.*, 2007).

O *treadmill* apresenta outras vantagens, tais como a facilidade na observação da cinemática dos roedores comparativamente aos outros modelos de exercício (Kregel *et al.*, 2006). Kemi *et al.* (2004) referem ainda que apenas o *treadmill* representa um modo fiável pelo qual o exercício e os parâmetros cardiovasculares podem ser medidos sobre condições controladas, o que leva a uma baixa variação dentro dos grupos experimentais e pequenas diferenças a serem detetadas.

Os programas do *treadmill* induzem respostas adaptativas estruturais e funcionais benéficas para os múltiplos sistemas (Haram *et al.*, 2008; Kemi *et al.*, 2007).

Estas vantagens levam ao extenso uso do *treadmill* em estudos animais que pesquisam a adaptação fisiológica ao exercício (Apple e Billadello, 1994; Zhou e Dohm, 1997). A sua simplicidade e eficácia, assim como a facilidade em treinar vários animais ao mesmo tempo e a sua relevância para a realização do exercício aeróbio e/ou anaeróbio, levam ao uso deste modelo (Arida *et al.*, 2011).

Contudo, este modelo apresenta algumas limitações. Se os roedores são induzidos ao exercício, a actividade é considerada involuntária e portanto requer algum tipo de estímulo que pode ser aversivo (depende da intensidade e duração do exercício), como é o exemplo dos choques eléctricos que podem ter influência a nível cerebral ou bioquímico (Arida *et al.*, 2011).

No exercício forçado, o roedor não tem a opção de participar ou não na actividade, verificando-se dificuldade na motivação do mesmo. Desta forma, o modelo de exercício não representa o padrão normal de actividade física (Kregel *et al.*, 2006) e os animais podem ficar sujeitos ao *stress* físico e psicológico (Helmreich *et al.*, 2005; Moraska *et al.*, 2000). Neste sentido, torna-se importante utilizar estratégias para reduzir o nível de *stress*, nomeadamente a motivação física manual, em detrimento dos choques eléctricos, pois estes últimos geram ainda mais *stress* (Arida *et al.*, 2011).

Outra preocupação a considerar é a dos roedores que participam nestes modelos de exercício poderem correr o risco de desenvolver lesões ao nível das patas e unhas. É portanto necessária uma supervisão constante para evitar lesões (Kregel *et al.*, 2006).

As várias interpretações de dados revelam que os modelos animais não apresentam uniformidade na descrição e controlo das características do exercício físico, nos diferentes tipos de atividade. No entanto, modelos de exercício, incluindo o *treadmill*, têm sido relacionados com a plasticidade neuronal e alterações neurológicas. Na verdade, estes modelos permitem, *in vivo*, investigar os benefícios do exercício físico no cérebro antes e depois da agressão neurotóxica (Arida *et al.*, 2011).

### **3.2. Os Efeitos do Exercício no Cérebro: Neuroregeneração**

O conceito do exercício físico ser essencial para a manutenção de uma boa saúde não é novo. Contudo, começa a ser evidenciado que o treino regular pode ser responsável por uma série de respostas adaptativas favoráveis (Chow *et al.*, 2010).

Hillman (2008) atesta que os efeitos benéficos do exercício no cérebro, presumivelmente, atuam na via adaptativa neuroplástica, que se traduzem na capacidade do cérebro em ajustar-se ao estímulo através de uma reorganização neuronal dinâmica. Estudos em roedores testemunham que o exercício aeróbio regular desencadeia mudanças relacionadas com a plasticidade do SNC, incluindo sinaptogénese, neurogénese ou mesmo angiogénese, como referem Hirschi e Farley (2009). Cotman (2007) ainda acrescenta que o exercício pode promover a redução da neuroinflamação e até suprimir o *stress* oxidativo. Está ainda associado à libertação de fatores de crescimento neurotróficos, associados à plasticidade sináptica, podendo desta forma aumentar a performance cognitiva, de aprendizagem e de memória. (Colcombe e Kramer, 2003; Dishman, 2006).

Estudos imagiológicos demonstram que o exercício pode provocar aumento do volume da substância cinzenta e branca e alterações gliais. Contudo, o mecanis-

mo que induz a alteração estrutural e funcional ainda não se encontra devidamente esclarecido (Lange, 2008; Buhmann, 2005).

Como tem vindo a ser descrito, os psicoestimulantes são responsáveis pela indução de processos degenerativos pela sua elevada capacidade neurotóxica. Numerosos estudos têm, contudo, reportado que o exercício físico apresenta potencial para a redução dos prejuízos causados por tais agressões tóxicas (Cotman e Berchtold, 2002; Elder e Marincek, 2000; Smih e Zigmond, 2003), e até mesmo prevenir a continuação da degeneração caso a agressão tóxica persista (Anstrom *et al.*, 2007; Tillerson *et al.*, 2003).

A prevenção ou o não aumento da neurotoxicidade também parece ser fomentada pelo melhoramento da conectividade funcional e ativação cortical, parâmetros na base da melhoria das funções cognitivas e motoras (Colcombe *et al.*, 2004; Voss *et al.*, 2010). Para reforçar este facto, Stephenson (2009) sugere que o aumento da performance pode dever-se a um aumento da síntese e libertação de DA e outras monoaminas, como a 5-HT, no córtex e *nucleus accumbens*, entre outros locais.

Gerecke *et al.* (2010) acrescentam que em roedores previamente expostos a agressões tóxicas, após uma intervenção com exercício físico, existe uma elevação da DA, DOPAC e HVA, comparativamente aos roedores que foram mantidos em sedentarismo. Smith e Zigmond (2003) e Tillerson *et al.* (2003) verificam também nas suas investigações que o exercício diminui o dano provocado pela exposição às neurotoxinas. Tem sido demonstrado que o exercício leva a um aumento da síntese e libertação de DA e estimula a neuroplasticidade (Fontes-Ribeiro *et al.*, 2010).

Em suma, não só o exercício atenua a dimensão da agressão tóxica, apresentando características de neuroproteção, mas também restaura os terminais monoaminérgicos e a glia, através de mecanismos adaptativos que envolvem todo o processo de neurotransmissão das várias monoaminas (Cohen, 2003; Pothakos, 2009). O treino, recorrendo ao *treadmill*, parece facilitar a recuperação neuronal. Em vários estudos os animais demonstraram mudanças compensatórias, principalmente ao nível das concentrações da DA, que aumentam, bem como a expressão do receptor D<sub>2</sub> da DA (Petzinger, 2007). Pode afirmar-se que os mecanismos de neuroprotecção e neuroregeneração existem ao nível celular através de resultados que

são consistentes com a elevação de fatores neurotróficos (Neeper, 1996; Shen, 2001).

Também O'Dell *et al.* (2012) referem que o exercício antes ou depois da exposição ao neurotóxico pode maximizar a probabilidade de obtenção de melhorias nos terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos, bem como dos seus marcadores.

## 4. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo encontrar um possível efeito neuroregenerador relativamente aos sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos do córtex frontal, implementando um protocolo de exercício físico. Para este desenho experimental, recorreu-se a um modelo de neurotoxicidade induzido pela METH, em murganhos C57BL/6.

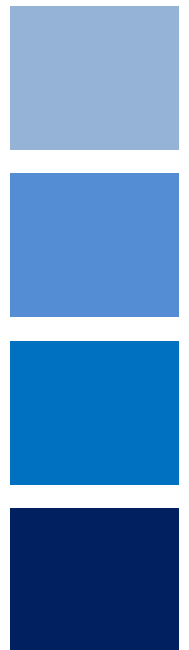
Para a concretização deste objetivo foram executadas diferentes tarefas, nomeadamente:

- Administração de uma dose elevada de METH (30mg/Kg) uma única vez;
- Confirmação da neurotoxicidade através da determinação da expressão da tirosina hidroxilase (TH; marcador de neurónios dopaminérgicos) e da expressão de GFAP (marcador de astrócitos), através do método de “*Western Blotting*”, no córtex frontal do murganho;
- Determinação no córtex do murganho dos níveis da dopamina e da serotonina, bem como dos seus respectivos metabolitos, usando a técnica de HPLC (*high performance liquid chromatography*) com deteção eletroquímica;
- Implementação de um protocolo de exercício físico, utilizando *treadmill*, após o qual se repetiram os procedimentos anteriores.

Em suma, e levando em conta o supracitado, este estudo tem como principal finalidade ou objetivo delinear uma possível estratégia neuroregeneradora recorrendo ao exercício físico.

## Capítulo 2

# Materiais e Métodos



## 1. Animais

Nesta investigação foram utilizados vinte e quatro murganhos machos C57BL/6 (figura13), (23-26g; 12 semanas; Charles-River, Barcelona - Espanha), divididos em quatro gaiolas, seis em cada, e mantidos em condições ambientais controladas no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (temperatura,  $22 \pm 1$  °C; humidade,  $50 \pm 10\%$ ; ciclo de luz, 12/12 horas) com ração e a água fornecidas *ad libitum*.



**Figura 13** Exemplo de um murganho C57BL/6.

Esta estirpe de roedores foi escolhida pelo facto das suas estruturas cerebrais serem sensíveis à METH, verificando-se depleção ao nível do córtex de DA e outras monoaminas (Achat-Mendes *et al.*, 2005; Fantegrossi *et al.*, 2008; Ladenheim *et al.*, 2000), DAT (Achat-Mendes *et al.*, 2005; Hirata *et al.*, 1996; Ladenheim *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005) e TH (O'Callaghan e Miller, 1994; Xu *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005).

De Lira *et al.* (2008), também acrescenta que os murganhos ainda apresentam as vantagens de serem facilmente manipuláveis e se adaptam facilmente ao exercício efetuado no *treadmill*.



Foram utilizados animais jovens-adultos visto que a taxa de mortalidade neste modelo de neurotoxicidade aumenta com o envelhecimento (Przedborski *et al.*, 2001). Além disso, o envelhecimento está associado à progressiva redução de matéria cortical, e por isso as ligações sinápticas reduzem significativamente (Terry, 1987; Hof e Morrison, 2004), logo, para testar os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos na degeneração neuro axonal dopaminérgica e serotoninérgica, os autores Petzinger *et al.* (2008), referem que a administração de METH deve ser feita em animais adultos, pelos motivos supracitados.

Todos os procedimentos experimentais obedeceram às regras impostas pelas Normas Técnicas de Proteção dos Animais Utilizados para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos (Portaria nº 129/92, de 6 de Julho), bem como às normas da Convenção Europeia do Bem-Estar Animal (Portaria nº 1005/92) e de acordo com a diretrizes da Comunidade Europeia (2010/63/EU). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal e para a utilização do menor número possível de animais.

## 2. Neurotóxico e Reagentes Utilizados

Neste trabalho investigacional foi utilizado um derivado das anfetaminas, a metanfetamina. Note-se que para a obtenção desta droga foram pedidas todas as autorizações necessárias para a sua aquisição, quer à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, quer ao INFARMED Portugal (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.).

O cloridrato de metanfetamina bem como padrões de DA, DOPAC, HVA e 5-HT foram adquiridos à *Life Science and High Technology Company Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA)

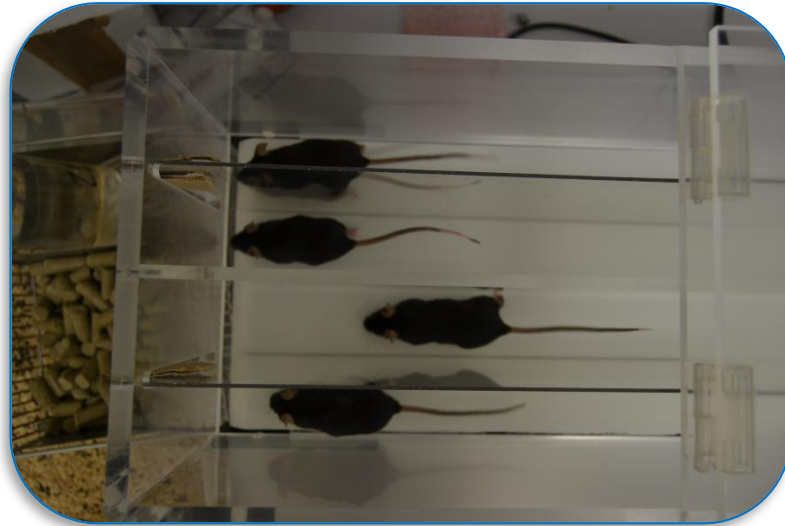
### 3. Treadmill

Para a realização deste procedimento experimental foram utilizados dois treadmills - modelo LE8700, *serial number* 2187/07 e o modelo LE8706, *serial number* 8589/04, Panlab, S.L., Barcelona - Espanha, ambos de 50w, 110/120v e 50/60Hz (figura 14):



**Figura 14** Treadmills utilizados (Fotografia obtida no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Estes modelos foram utilizados, embora com algumas adaptações, nomeadamente a separação de cada passadeira com acrílico transparente com o objetivo de redimensionar a largura de cada linha de corrida, como exemplifica a figura 15, uma vez que estes modelos são apropriados para ratos e não para murganhos, desta forma tornou-se possível correrem dois murganhos em vez de correr apenas um como seria suposto originalmente em cada corredor.



**Figura 15** Fotografia de um treadmill com duas passadeiras separadas por divisões em acrílico, proporcionando quatro corredores individualizados.

Desta forma, as iniciais três passadeiras deram origem a seis corredores, tornando possível aos seis murganhos que constituíam cada grupo correrem simultaneamente. A divisão dos corredores foi efetuada para que os murganhos tivessem espaço suficiente para se movimentarem e executarem devidamente o protocolo de exercício, sem tocarem nas paredes do *treadmill*.

## 4. Desenho Experimental

### 4.1. Grupos Experimentais

Os murganhos foram divididos aleatoriamente por quatro grupos:

- Salino + Sedentário (SAL + SED)
- Metanfetamina + Sedentário (METH + SED)
- Salino + Exercício (SAL + EX)
- Metanfetamina + Exercício (METH + EX)

### 4.2. Adaptação ao *Treadmill*

Rosa *et al.* (2007) referem que no mínimo os animais devem experienciar cinco dias de adaptação ao biotério. Neste sentido, os murganhos em estudo foram alvo de um período de adaptação às condições do biotério, após terem sido divididos pelas respetivas gaiolas (n = 6).

Após a adaptação ao biotério, apenas os animais que entravam na constituição dos grupos de exercício (SAL + EX e METH + EX) foram submetidos a um período de adaptação ao *treadmill*. De Lira *et al.* (2008) referem que o principal objetivo da adaptação às condições do exercício, incluindo velocidade e o próprio *treadmill*, é minimizar variáveis como o *stress* que podem interferir com o desempenho do exercício ou até possíveis lesões. Kregel *et al.* (2006) ainda acrescentam que a familiarização com o *treadmill* tem que ser parte integrante do protocolo de exercício, constituída por um período de cinco dias a duas semanas com velocidades variáveis no sentido crescente. Desta forma, durante duas semanas (cinco dias/semana), os murganhos concretizaram treinos com velocidades e tempo de exercício crescentes até atingirem a velocidade e o tempo utilizado no protocolo de exercício, tal como demonstra a figura 16:

Período de Adaptação ao Treadmil													
TR1	TR1	TR2	TR2	TR2	D	D	TR3	TR3	TR3	TR4	TR4	D	D
<b>LEGENDA:</b> Tr – Treino- D – Descanso													
<b>PROTOCOLO:</b>													
- <b>Tr 1:</b> Velocidade – 20 cm/seg; 20 minutos													
- <b>Tr 2:</b> Velocidade – 20 cm/seg - 5 minutos; 25 cm/seg - 20 minutos; 20 cm/seg – 5 minutos													
- <b>Tr 3:</b> Velocidade – 20 cm/seg – 5 minutos; 30 cm/seg – 20 minutos; 20 cm/seg – 5 minutos													
- <b>Tr 4:</b> Velocidade – 20 cm/seg – 5 minutos; 30 cm/seg – 30 minutos; 20 cm/seg – 5 minutos													

**Figura 16** Protocolo do período de adaptação dos murganhos ao treadmill.

Levou-se em conta a consideração de nunca colocar os animais no *treadmill* com as passadeiras em andamento. De cada vez que os murganhos eram sujeitos a algum tipo de exercício, estes eram colocados no aparelho, e este encontrava-se desligado para evitar lesões ou um estímulo inicial demasiado agressivo (De Lira, 2008). Só após os animais estarem todos nos respetivos corredores, o tapete era ligado a uma velocidade mínima de 5cm/seg. Posteriormente, a velocidade ia sendo aumentada gradualmente (cerca de 1cm/seg) até atingir a velocidade pretendida, cumprindo desta forma a fase inicial da sessão - o aquecimento. Após realizado o tempo e a intensidade estipulada para a sessão de treino, a velocidade regredia periodicamente na mesma proporção até o *treadmill* ser desligado, efetuando desta forma a fase final do treino - o arrefecimento (Rosa *et al.*, 2008). Petzinger *et al.* (2007) e Gorton *et al.* (2010), realçam que as fases do aquecimento e arrefecimento são importantes, uma vez que ambas estão relacionadas com a prevenção de lesões.

### 4.3. Administração do Neurotóxico

Posteriormente à adaptação ao exercício no *treadmill*, e antes de se dar início ao protocolo de exercício, os murganhos pertencentes aos grupos da metanfetamina (METH + EX e METH + SED) foram pesados e os seus pesos registados, no sentido de aferir exatamente a dose correta para cada murganho.

A dose para cada murganho foi extraída da solução mãe de metanfetamina - 3mg/ml, numa relação de 30mg/kg. Para o efeito, os murganhos pertencentes aos grupos da metanfetamina (METH + EX e METH + SED) foram pesados e os seus pesos foram registados. Após pesagem, os animais foram administrados com uma única injeção intra-peritoneal de metanfetamina (30mg/kg), como ilustra a figura 17. Travassos *et al.* (2011) e Pereira *et al.* (2012) consideram que uma única administração de 30mg/kg é neurotóxica, induzindo depleção das monoaminas, dos seus metabolitos e provocando neurodegeneração nos terminais monoaminérgicos.



**Figura 17** Administração intraperitoneal de uma dose (30mg/kg) de metanfetamina no murganho.

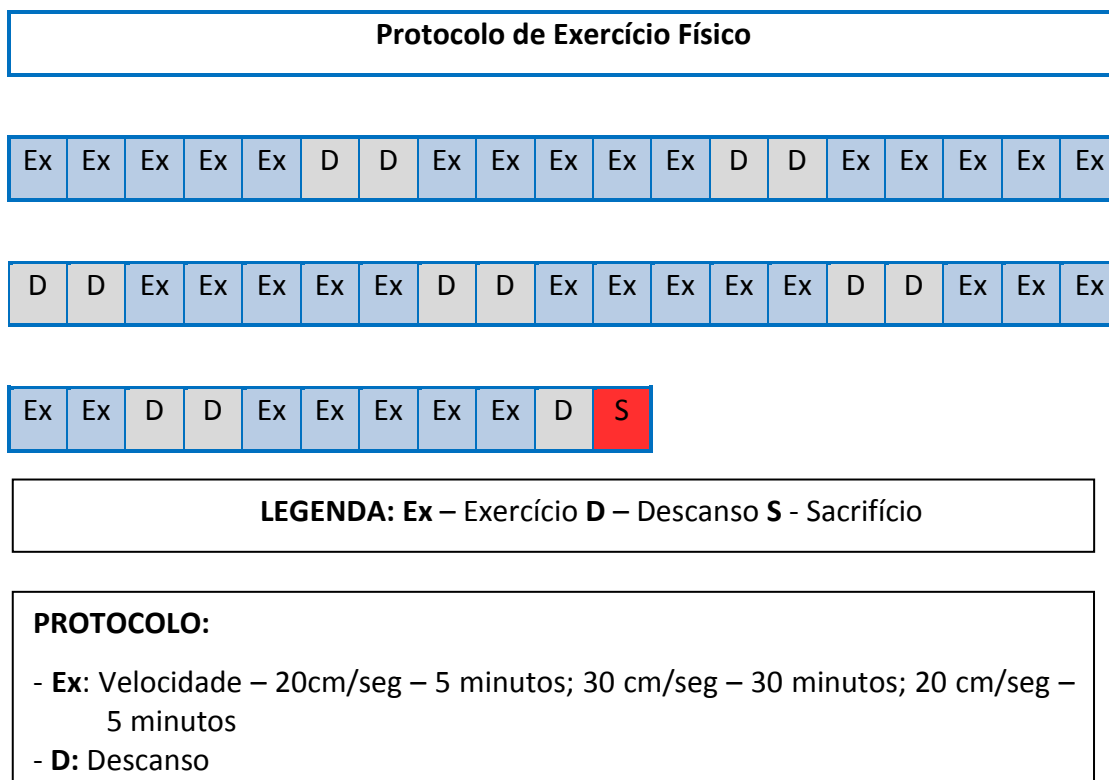
Os restantes animais dos grupos de solução salina (SAL + SED e SAL + EX), seguiram o mesmo procedimento, mas, em vez de se proceder à administração da METH, substituiu-se por uma solução salina NaCl 0,9%, 250µl.

Após a injeção, todos os animais foram sendo observados cuidadosamente às 0h, à 1h e às 3h subsequentes.

#### **4.4. Protocolo de Exercício**

Vinte e quatro horas após a injeção da METH e de NaCl, os animais dos grupos Sal + Ex e METH + Ex foram submetidos a cinco dias de exercício por semana durante sete semanas, como sugerem Fu *et al.* (2011). O exercício foi feito no período das manhãs e sempre à mesma hora. Os animais de cada grupo (um grupo de cada vez) correram simultaneamente, uma vez que para os seis murganhos que constituíam cada grupo, havia um corredor individual disponível.

Assim, os grupos do exercício foram submetidos a um treino diário, de acordo com o seguinte esquema: 1) cinco minutos de aquecimento a 20cm/seg; 2) corrida durante trinta minutos a 30cm/seg; 3) cinco minutos de arrefecimento a 20cm/seg (Figura 18). A inclinação do *treadmill* foi sempre 0%, como sugere Rosa *et al.* (2008). Os murganhos foram estimulados e motivados para a corrida com ligeiros estímulos manuais, uma vez que os choques elétricos não foram utilizados, por se considerar que seriam um possível fator de *stress* que não está normalmente associado ao exercício (De Lira *et al.*, 2008).



**Figura 18** Protocolo de exercício físico para os grupos SAL + EX e METH + EX.

Os animais dos grupos sedentários correram apenas uma vez por semana, durante dez minutos à velocidade mínima de cinco cm/seg, para que desta forma os animais também fossem expostos às mesmas condições de manipulação, barulho do motor do *treadmill*, vibração, textura do tapete rolante e privação de água e comida durante o período de corrida, como propõem Woods *et al.* (2003).

Após cada sessão de exercício os animais foram cuidadosamente inspecionados com o objetivo de pesquisar algum tipo de lesão física subsequente à sessão de exercício, como algum tipo de hemorragias, deformidades corporais, diarreias, vômitos ou comportamentos anormais, que eventualmente pudessem interferir com a performance no cumprimento das sessões de exercício e futuramente com os resultados. Durante todo o protocolo não foi detetada nenhuma intercorrência, pelo que nenhum animal foi excluído.



#### 4.5. Sacrifício dos Animais e Isolamento do Córtex Frontal

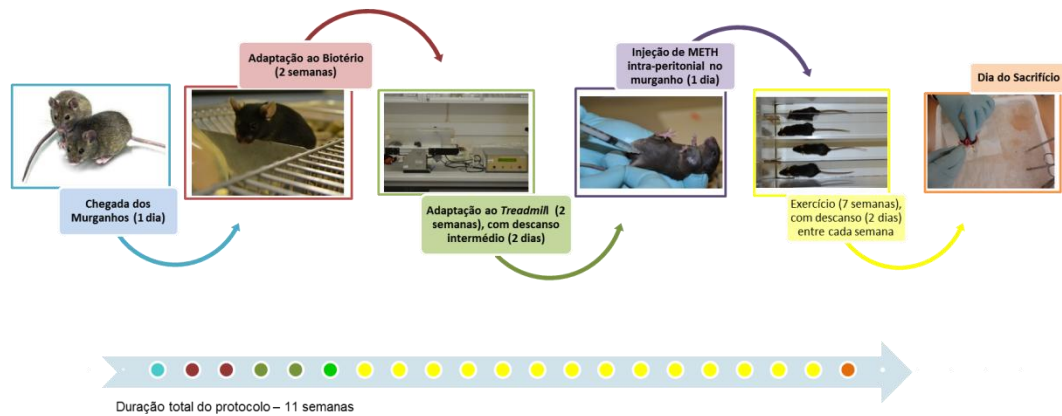
Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados quarenta e oito horas após o *terminus* do protocolo de exercício físico (no segundo dia de repouso).

Os cérebros foram rapidamente removidos e dissecados sobre gelo e procedeu-se ao isolamento do córtex frontal com base nas coordenadas descritas para o cérebro do murganho segundo Paxinos e Franklin (2004), como demonstra a figura 19. As amostras biológicas foram imediatamente congeladas em azoto líquido e guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas. As áreas do hemisfério esquerdo foram usadas para a avaliação da expressão das proteínas GFAP e TH por *Western Blot* e as áreas do hemisfério direito foram usadas para a determinação dos níveis de monoaminas e dos seus metabolitos por cromatografia líquida de alta pressão com deteção eletroquímica (HPLC) (Pereira *et al.*, 2012).



**Figura 19** *Isolamento do córtex frontal do murganho.*

Todas as fases do desenho experimental estão definidas esquematicamente na figura 20:



**Figura 20** Esquema representativo do desenho experimental.

## 5. Determinação dos Níveis de Monoaminas e dos seus Metabolitos por HPLC

Para a quantificação dos níveis de DA e de 5-HT, bem como dos respetivos metabolitos – DOPAC e HVA, utilizou-se um método de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa com deteção eletroquímica (amperométrica) (Morgadinho *et al.*, 2004). O equipamento utilizado incluiu uma bomba Gilson (modelo 307), um auto-injetor Gilson (modelo 234; *loop* 50 $\mu$ l), um detetor Gilson (modelo 142) e *software* v5.11 (Figura 21).



**Figura 21** Sistema de HPLC utilizado neste estudo para a quantificação de monoaminas (Fotografia tirada no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Após o sacrifício dos animais e concluída a colheita da região cerebral em estudo – o córtex frontal – as amostras foram descongeladas e homogeneizadas em ácido perclórico 0,2 M. Os homogeneizados foram centrifugados e filtrados e as amostras foram mantidas a 4 °C até à análise pelo método de HPLC.

As amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,2 M. Os homogeneizados foram centrifugados (13.000 rpm durante 7 minutos, 4 °C) e os sobrenadantes foram filtrados com microfiltros 0,22 µm Nylon (Spin-X® Centrifuge Tube Filter, Costar) a 10.000 rpm, durante 4 minutos (4 °C). Os pellets foram ressuspensos em NaOH 1M e utilizados para a quantificação da proteína, por método do ácido bicinonínico (BCA) e leitura pelo método ELISA. Os sobrenadantes filtrados bem como os *pellets* foram armazenados a -80°C.

Para a separação e quantificação das diferentes monoaminas utilizou-se uma coluna ODS 2 Waters Spherisorb® (4.6 x 250 mm; tamanho das partícula: 5 µm). A fase móvel, desgaseificada e filtrada, foi constituída por acetato de sódio trihidratado (0,1 M), ácido cítrico monohidratado (0,1M), octilsulfato de sódio (0,5 mM),

EDTA (0,15 mM), dibutilamina (1 mM) e metanol (10 %) (pH 4,5). O fluxo foi de 1 ml/minuto e a sensibilidade foi mantida a 2nA/V. Os tempos de retenção obtidos estão apresentados na tabela 4:

Monoaminas e Metabolitos	Tempo médio de retenção (minutos)
DOPAC	6,69
DA	9,03
HVA	16,4
5-HT	23,3

**Tabela 4** *Tempos de retenção registados das monoaminas e respectivos metabolitos avaliados em estudo por HPLC.*

A concentração das monoaminas em cada amostra foi calculada tendo como referência curvas padrão de cada monoamina. Os resultados foram apresentados em ng/mg de proteína.

## 6. Quantificação da Expressão de TH e de GFAP por Western Blotting

A análise dos níveis de TH e de GFAP foi feita a partir da técnica de *Western blot*. O hemisfério esquerdo do córtex frontal foi homogeneizado em 400µl de tampão de lise RIPA (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH=8.0; 5 mM EGTA; 1 % Triton X-100; 0.5% DOC; 0.1 % SDS) complementado com uma mistura de inibidores de proteases e de fosfatases (1 mM fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), 1 mM ditioneitol (DTT), 1µg/mL quimostatina, 1 µg/mL leupeptina, 1 µg/mL antiparina, 5 µg/mL pepstatina A, 50 mM fluoreto de sódio e 1 mM ortovanadato de sódio (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal)). A mistura de inibidores de eproteases e de fosfatases foi adicionada ao tampão de lise imediatamente antes de usar. O tecido foi homogeneizado por ultra-sons (3 pulsos de 15 segundos). Posteriormente, os lisados foram centrifugados a 13000 rpm, durante 15 minutos a 4°C (Simões *et al.*, 2007).

O sobrenadante (extrato total) foi recolhido e conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A concentração de proteína total foi determinada através do método de ácido bicinconínico (BCA -Thermoscientific®) (Smith *et al.*, 1985).

As amostras foram desnaturadas por fervura a  $95^{\circ}\text{C}$ , durante 5 minutos em solução desnaturante 6x (Tris-HCl, 0,5M, pH 6,8; SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% (m/v); glicerol 30% (v/v), DTT 0,6M, azul de bromofenol 0,01% (m/v)) e separadas, por electroforese, em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de lauril sulfato de sódio (SDS) de acordo com Laemmli (1970). Os géis de separação foram preparados com 10 % de Bis acrilamida. Na electroforese usou-se um tampão com Tris base 25 mM, glicina 100 mM e SDS 0,150 % (m/v), pH 8,3. Seguidamente, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF) (*Immobilon PVDF transfer membranes 0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore*) previamente activadas em metanol, por electrotransferência. A transferência ocorreu durante 90 min a 110V, em gelo. A composição do tampão usado na electrotransferência foi a seguinte: CAPS 10mM, metanol 20 % (v/v), pH 11. Depois da transferência, as membranas foram bloqueadas com soluções 5 % (m/v) de leite magro em PBS-T [(*Tween 20* 0,5 % em tampão fosfato (NaCl 136,8mM, KCl 2,6mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 12,7mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM; pH 7,4)] durante 1h, sob agitação à temperatura ambiente, para deteção de TH e bloqueadas em soluções de 1% (m/v) de BSA (*Bovine serum albumin – A9647 Sigma - Aldrich*) em PBS-T, para deteção de GFAP. As membranas foram posteriormente incubadas com os anticorpos primários (ver tabela) preparados numa solução 5 % (m/v) de leite magro em PBS-T, à exceção do anti - GFAP que foi preparado numa solução 1% (m/v) de BSA em PBS-T , durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas durante 60 minutos (6 x 10 minutos), com solução PBS-T sob agitação e incubadas à temperatura ambiente, durante uma hora, com o respectivo anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (Tabela 5) preparado em 5 % (m/v) de leite magro em PBS-T. Após ter-se dado a reacção com o ECF (*Enhanced chemifluorescence – GE Healthcare Life Sciences*) as membranas foram reveladas no detector *Fluorescent Image Analyzer Typhoon FLA 900* (GE Healthcare Bio-Sciences).

Depois de uma nova série de lavagens com 0,5% de PBS-T e para confirmar a carga igual de proteína e transferência das amostras, as membranas foram re-incubadas *overnight* com anticorpos anti- $\beta$ -tubulina ou anti-GAPDH para TH e GFAP, respectivamente.

A densidade relativa de cada banda foi normalizada contra o da  $\beta$ -tubulina ou GAPDH e quantificada em unidades arbitrárias pelo *software ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics)*. Cada *blot* foi repetido três vezes (Zhang et al, 2012).

Os resultados foram expressos como percentagens de controlo (SAL + SED) e apresentados como média  $\pm$  EPM.

ANTICORPOS	PESO MOLECULAR (kDa)	LOADING ( $\mu$ L)	DILUIÇÃO	REFERÊNCIA	COMPANHIA
Mouse anti-GFAP	50	10	1:1000	IF03L	Milipore
Mouse anti-TH	62	10	1:2000	MAB318	Milipore
Mouse anti-GAPDH	34	-	1:2000	Ab-9484	Abcam
Mouse anti- $\beta$ -Tubulin	55	-	1:20000	T7816	Sigma Life Sciences
Goat anti-mouse	-	-	1:5000	A 3582	Sigma Life Sciences

**Tabela 5** Anticorpos primários e secundários utilizados na análise por Western Blotting.

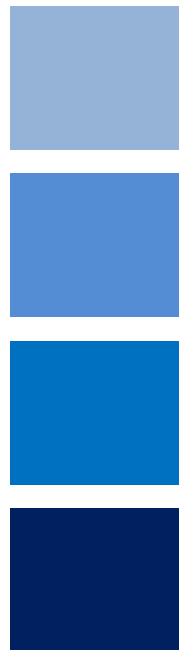
## 7. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão (EPM). Foram utilizados dois testes estatísticos. Na comparação entre os diferentes grupos utilizou-se o ANOVA seguido do teste *Post-hoc Bonferroni multiple comparison*, em que \*, #  $p < 0,05$ , \*\*, ##  $p < 0,01$  e \*\*\*, ###  $p < 0,001$ . Para comparação entre dois grupos simples foi utilizado o t-*Student* não emparelhado, em que \*, #  $p < 0,05$ .

Em ambos, \* refere-se à comparação dos grupos com o grupo de controlo e o # resulta da comparação entre os grupos que não o grupo de controlo.

## Capítulo 3

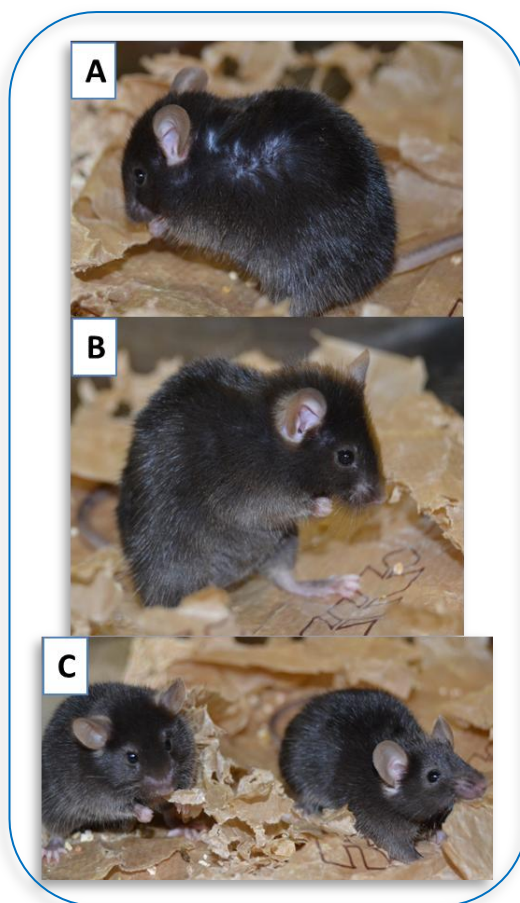
# Resultados





## 1. Alterações Comportamentais após Administração de Metanfetamina

Foram observadas alterações comportamentais logo após a administração intra-peritoneal da METH. Os animais revelaram bastante agitação psicomotora característica deste tipo de drogas de abuso, bem como o pêlo eriçado como demonstra a figura 22. Uma hora após, alguns animais apresentavam o efeito de *Straub* (cauda erguida). O efeito da METH manteve-se pelo menos durante vinte e quatro horas. Após este período, os murganhos retomaram o seu comportamento normal, notando-se apenas durante alguns períodos, principalmente noturnos, alguma letargia reativa ao estímulo luminoso e físico.



**Figura 22** Fotografias retiradas uma hora (C) e três horas (A e B) após a administração da METH, representando a típica ereção pilosa

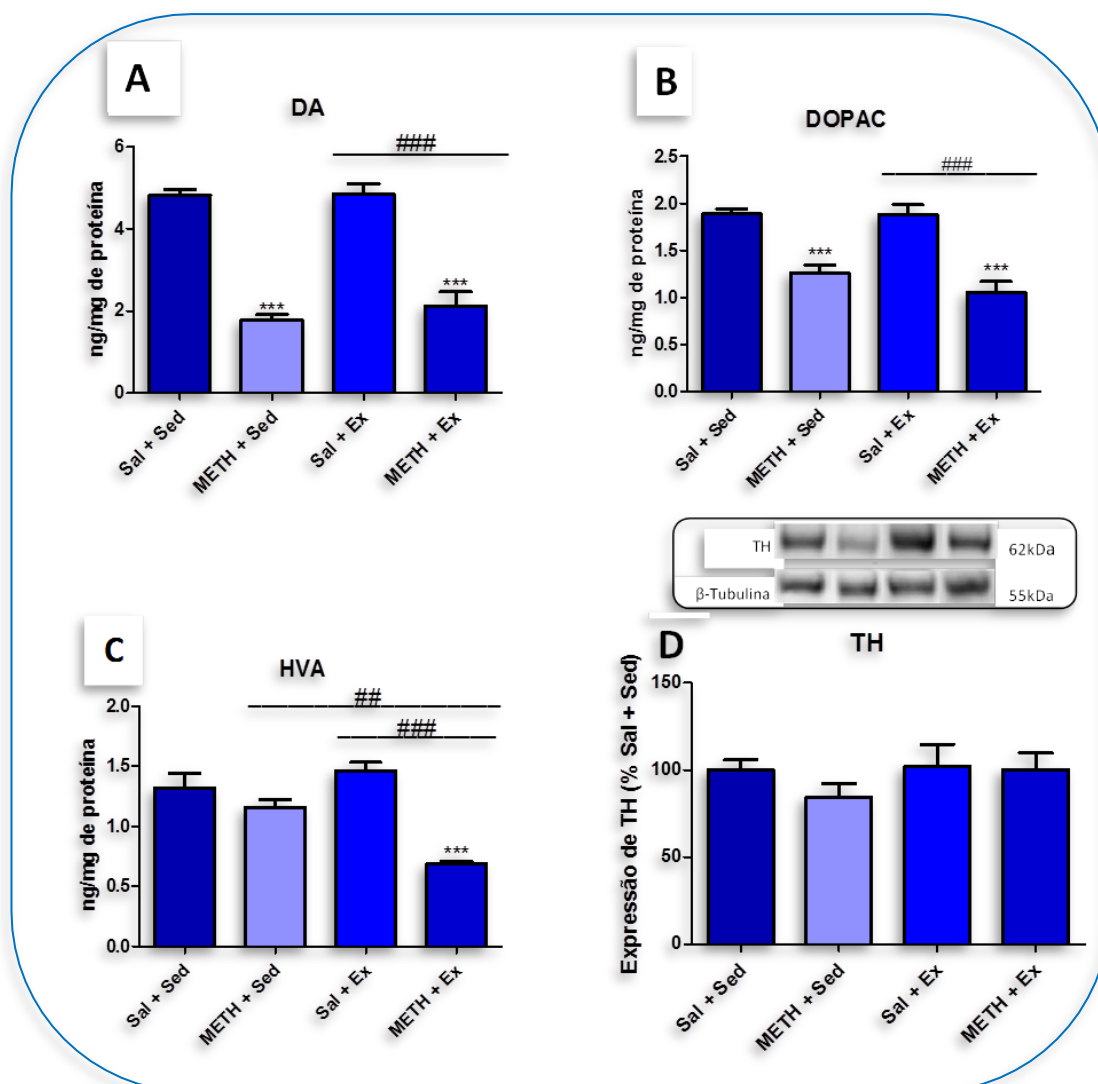
---

## **2. Níveis Corticais Totais de Dopamina e dos seus Metabolitos (DOPAC e HVA) Sete Semanas (duração do exercício físico) após a Injeção com METH**

Os níveis de DA, DOPAC e HVA foram analisados nas amostras corticais sete semanas após a injeção com METH e 48 horas após a conclusão do protocolo de exercício físico.

A METH produziu uma depleção significativa de DA e DOPAC relativamente ao respectivo grupo de controlo (Sal + Sed). É importante constatar que o exercício físico não produziu quaisquer alterações nos teores totais destas aminas. Adicionalmente, o exercício não corrigiu esta depleção de DA e de DOPAC no grupo METH + Ex ( $p < 0,001$ ) (figura 23 A e B).

Relativamente ao HVA, a METH produziu uma depleção que não foi estatisticamente significativa relativamente ao grupo de controlo (Sal + Sed) e que foi acentuada pelo exercício físico. Com efeito o grupo METH + Ex apresenta valores de HVA mais baixos do que os restantes três grupos experimentais ( $p < 0.01$ ) (figura 23C).



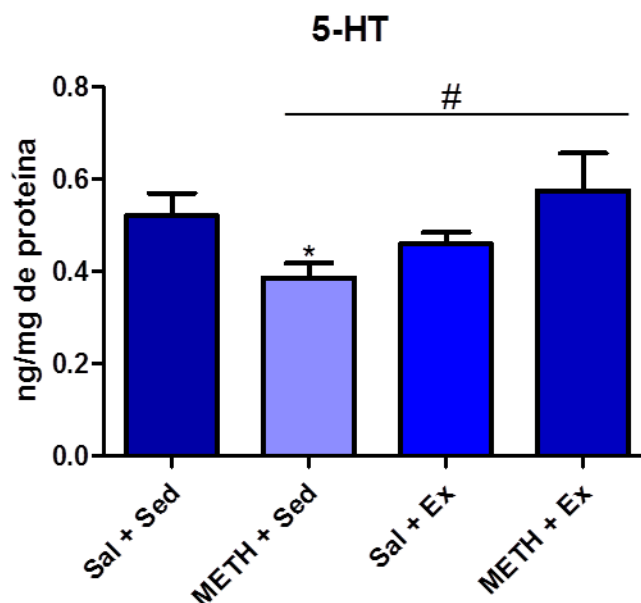
**Figura 23** Efeito da administração da METH (30mg/Kg) e/ou exercício físico nos níveis corticais, totais de DA (A), seus metabolitos, DOPAC (B) e HVA (C) e expressão de tirosina hidroxilase (TH) (D). Os animais dos grupos Sal + Sed e Sal + Ex foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi feito sete semanas após a administração de METH e 48 horas após o terminus do protocolo de exercício físico. Os níveis de DA, DOPAC e HVA foram determinados por HPLC, e os níveis de TH foram determinados por Western Blot. A  $\beta$ -tubulina foi utilizada como controlo de loading. Os valores são representados pela média  $\pm$ EPM ( $n=5-6$ ). Para o TH os valores são representados pela média (% Sal + Sed)  $\pm$ EPM ( $n=5-6$ ). Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison, em que ##  $p<0,01$ ; \*\*\*,###  $p<0,001$ .

### **3. Níveis Corticais de TH Sete Semanas (duração do exercício físico) após a Injeção com METH**

Nem a metanfetamina nem o exercício físico produziram alterações estatisticamente significativas nos níveis de TH corticais relativamente ao grupo Sal + Sed (Figura 23 D).

### **4. Níveis Corticais Totais de Serotonina Sete Semanas (duração do exercício físico) após a Injeção com METH**

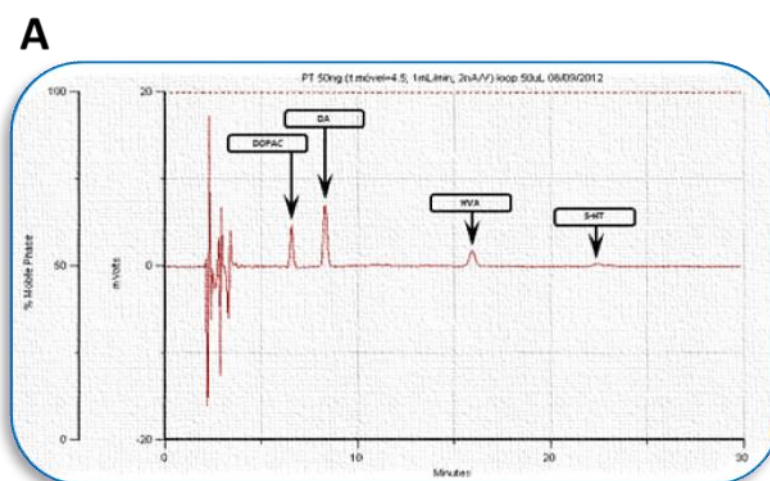
Relativamente aos níveis de 5-HT, esta indolamina também se encontra depletada no grupo METH + Sed, face ao controlo ( $0,39 \pm 0,03$  vs  $0,52 \pm 0,05$  ng/mg de proteína;  $p < 0,05$ , *t-Student*). Esta depleção foi revertida pelo exercício físico ( $p < 0,05$ ). De notar que o exercício isoladamente não teve qualquer impacto nos teores totais de 5-HT (Figura 24).



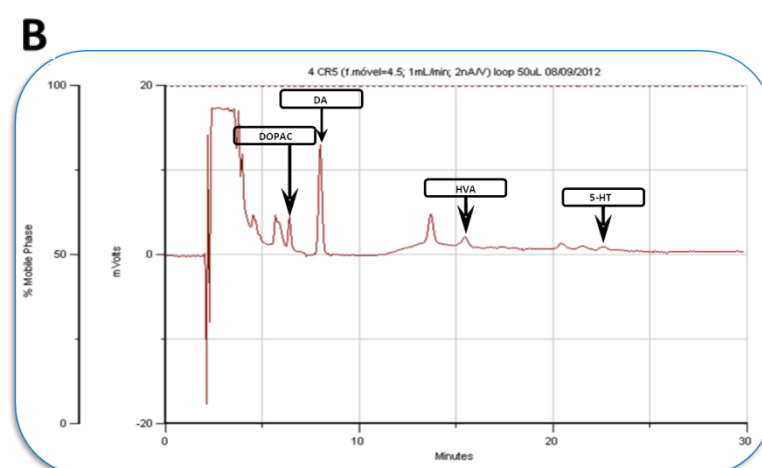
**Figura 24** Efeito da administração da METH (30mg/Kg) e/ou exercício físico nos níveis corticais, totais de 5-HT. Os animais controlo (Sal+Sed) foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi executado sete semanas após a administração da METH e 48h após o terminus do protocolo de exercício. Os níveis de 5-HT foram determinados por HPLC. Os valores são representados pela média  $\pm$ EPM (n=5-6). Utilizaram-se os testes ANOVA, seguido do teste Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison e o t-Student não emparelhado, em que \*, #  $p < 0,05$ .

## 5. Cromatografia por HPLC dos Níveis Corticais de DA, DOPAC, HVA e 5-HT

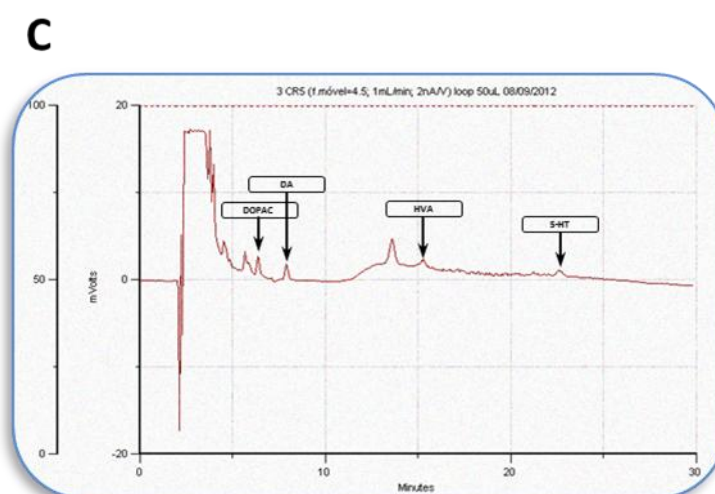
Como já foi referido anteriormente, para a deteção das monoaminas e seus metabolitos foi utilizado o método de cromatografia por HPLC, como demonstram os cromatogramas presentes nas figuras 25, 26, 27, 28 e 29.



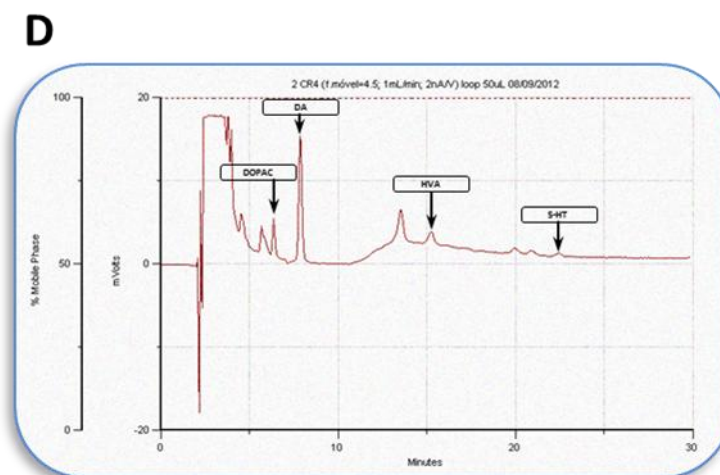
**Figura 25** Cromatografia de um padrão de 50ng/ml, utilizado para a determinação de tempos médios de retenção de Dopac, DA, HVA e 5-HT.



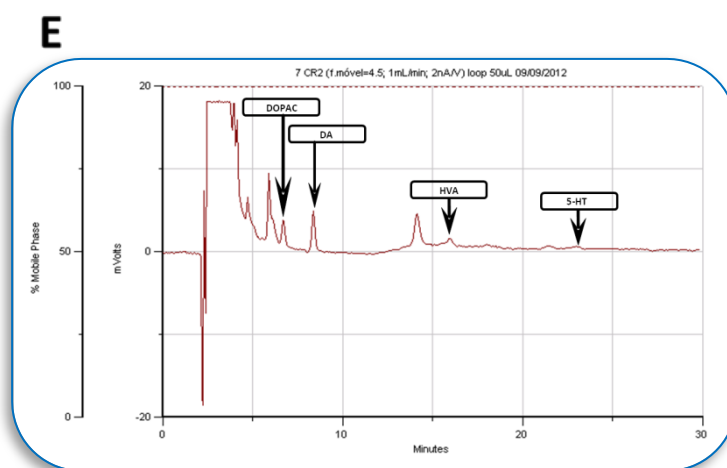
**Figura 26** Cromatografia referente a um murgancho pertencente ao grupo Sal/Sed.



**Figura 27** Cromatografia referente a um murgancho pertencente ao grupo METH/Sed.



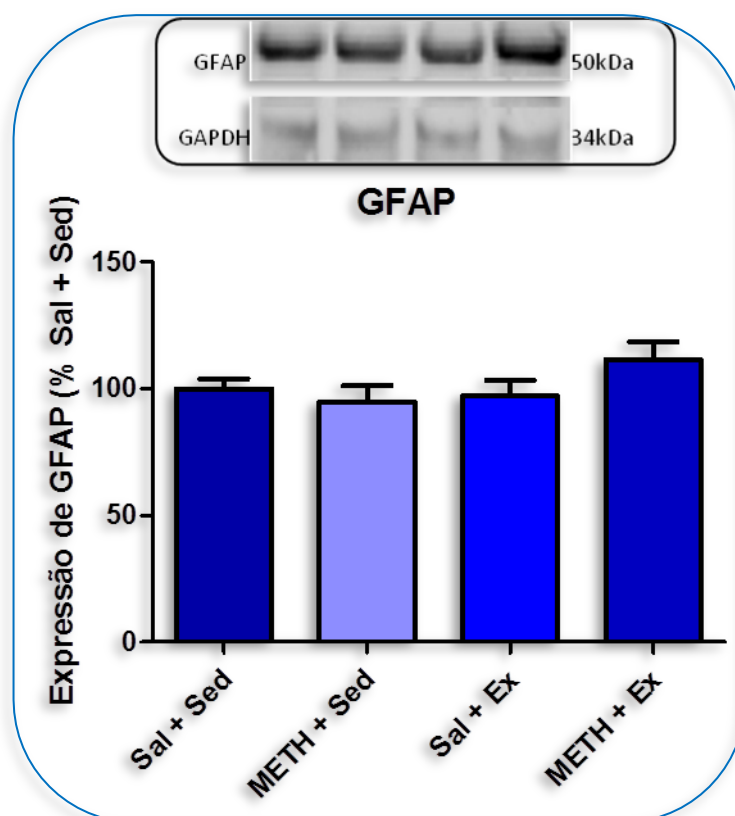
**Figura 28** Cromatografia referente a um murgancho pertencente ao grupo Sal/Ex.



**Figura 29** Cromatografia referente a um murgancho pertencente ao grupo METH/Ex.

## 6. Níveis corticais de GFAP sete semanas (duração do exercício físico) após a injeção com METH

Nem a metanfetamina nem o exercício físico nem a sua combinação produziram alterações estatisticamente significativas nos níveis de GFAP corticais relativamente ao grupo Sal + Sed (Figura 30).

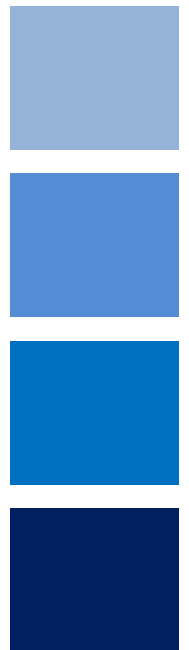


**Figura 30** Efeito da administração da METH (30mg/Kg) e/ou exercício físico na expressão cortical da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Os animais controlo (Sal) foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi executado sete semanas após a administração da METH e 48h após o terminus do protocolo de exercício físico. Os níveis de GFAP foram analisados por Western Blot. O GAPDH foi utilizado como controlo de loading. Os valores são representados pela média (% Sal + Sed)  $\pm$ EPM (n=5-6). Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison.



## Capítulo 4

# Discussão



---

## Discussão

As anfetaminas hoje constituem um flagelo social, não só pelo número de consumidores, mas também pelo perfil toxicocinético que apresentam, conduzindo a danos neurológicos e psiquiátricos. Modelos animais de neurotoxicidade induzidos por estas drogas de abuso proporcionam um meio de excelência para compreender os mecanismos de lesão cerebral provocados por estes compostos tóxicos, bem como para determinar os seus efeitos a longo prazo. Finalmente, podem constituir o caminho para a descoberta e inovação terapêutica de algumas doenças neurodegenerativas, como é o exemplo da doença de Parkinson (Giselle, 2009).

O uso crónico da METH cursa com neurotoxicidade, circunstância que inclui danos na estrutura axonal dopaminérgica e serotoninérgica (que podem ser acompanhados pela degeneração dos terminais monoaminérgicos) bem como um comprometimento de toda a estrutura glial com uma astrogliose reativa (Krasnova e Cadet, 2009). Estas evidências sugerem que apenas uma abordagem farmacológica é insuficiente na recuperação da funcionalidade das estruturas cerebrais, sendo necessário testar e comprovar que outras estratégias como o exercício físico podem ser uma resposta na resolução de vários problemas, nomeadamente na regeneração monoaminérgica, glial e até ser um fator que altere a circuitagem neuronal envolvida nos comportamentos de adicção (Fontes-Ribeiro *et al.*, 2010).

O objectivo principal deste estudo foi avaliar o potencial regenerador do exercício físico do sistema monoaminérgico cortical após uma agressão tóxica aguda (30mg/kg de METH). A literatura apresenta a METH como um neurotóxico do SNC, existindo zonas mais sensíveis como o estriado, hipotálamo e regiões corticais (Bowyer *et al.*, 2008; Eisch *et al.*, 1998; O'Callaghan e Miller, 1994; Schmued e Bowyer, 1997).

Tipicamente os investigadores utilizam para estudos de neurotoxicidade um regime de várias administrações (5-12,5 mg/kg, 4 x com intervalos de 2 h), mimetizando assim estados neurofisiopatológicos (Krasnova and Cadet, 2009). Foi demonstrado que estes regimes produziram alterações persistentes nos terminais

---

catecolaminérgicos estriatais e corticais. Por exemplo, foi descrito que a diminuição da actividade da TH persiste pelo menos até 1 mês pós-injeção (Hotchkiss et al., 1979; Hotchkiss and Gibb, 1980). No entanto, esta metodologia conferia complexidade aos regimes, aumentando o número de variáveis stressoras nos animais. Uma única dose tem sido utilizada para reduzir essa mesma complexidade presente nos regimes de doses repetidas evidenciando melhor a expressão neuropatológica de uma elevada, mas única, dose de METH.

Bowyer *et al.* (2008); Eisch *et al.* (1998); O'Callaghan e Miller (1994); O'Callaghan *et al.* (2008), Schmued e Bowyer (1997), já comprovaram que uma única dose elevada de METH (20mg/kg) tem a capacidade de induzir um efeito neurotóxico evidenciado pela expressão de marcadores inflamatórios, pela ativação astrogliar representada pela subida do GFAP, bem como pela depleção de marcadores catecolaminérgicos no estriado e no córtex frontal. Pereira *et al.* (2012) confirmam que 30mg/kg é também uma dose neurotóxica eficaz, tal como demonstrado pela depleção da DA, TH, bem como do DOPAC e HVA e pela astrogliose observados setenta e duas horas após a injeção de METH no estriado. Os mesmos autores ainda acrescentam que os efeitos deste fármaco também se estendem a outras monoaminas nomeadamente à 5-HT.

Os resultados obtidos nesta investigação são consistentes com a literatura que sugere que a METH induz efeitos neurotóxicos áreas corticais (Bowyer *et al.*, 2008; Eisch *et al.*, 1998; O'Callaghan e Miller 1994; Schmued e Bowyer, 1997). De facto, foi visível uma depleção de DA e dos seus metabolitos ao nível cortical do murganho, que se mantém sete semanas após a administração de METH. No entanto, a expressão das proteínas TH e GFAP não sofreu quaisquer alterações.

A Integração dos resultados da DA e metabolitos e do TH sugere que apesar da densidade dos terminais dopaminérgicos ser normal, a sua função está comprometida por acção da METH. Os valores normais do GFAP são sugestivos de que houve resolução da astrogliose que tipicamente acontece 2-3 dias após uma agressão de METH (O'Callaghan *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2012). No presente estudo evidencia-se ainda a depleção de 5-HT (ainda que ligeira) que foi gatilhada pela METH. A literatura não é consensual relativamente ao impacto da METH nos terminais serotoninérgicos. Por exemplo, Fumagalli *et al.* (1998) evidenciaram depleção de 5-HT

---

em murganhos C57BL/6J. Este facto não foi corroborado por Grace *et al.* (2010), visto que estes investigadores apenas verificaram uma ligeira tendência para a diminuição dos valores totais de 5-HT.

Por outro lado, O'Callaghan e Miller (1994) acrescentam categoricamente que a METH, bem como outras drogas de abuso, induzem neurotoxicidade no córtex, bem como astrogliose mensurada através da quantificação da expressão do GFAP, níveis de DA e TH diminuídos. No entanto, não verificaram uma depleção marcada de 5-HT nesta região cerebral. Finalmente, Krasnova e Cadet (2009) sugerem que a depleção da DA induzida pela METH está intimamente relacionada com a depleção de 5-HT. Mais estudos serão necessários para que se defina um paradigma claro relativamente ao perfil neurotóxico nos circuitos serotoninérgicos.

Caracterizado o modelo de neurotoxicidade dopaminérgica e serotoninérgica usado no presente estudo, pode avançar-se para o ponto basilar deste trabalho: a hipótese do exercício físico poder constituir um fator de recuperação neurológica após uma agressão neurotóxica. É inferido por estudos animais que o exercício através de uma variedade de biomecanismos facilita a neuroplasticidade, nomeadamente através do aumento de fatores neurotróficos gliais. Adicionalmente foi referido que os benefícios se traduzem na melhoria da memória, atenção e até nas funções executivas e motoras. Estes estudos têm evidente impacto nas doenças neurodegenerativas (Ahlskog *et al.*, 2011).

O'Dell *et al.* (2012) referem que o exercício estimulou a recuperação dos terminais dopaminérgicos estriatais e serotoninérgicos corticais na sequência de um estímulo neurotóxico (administração de metanfetamina). Os autores sugeriram que a estimulação da angiogénese pelo exercício físico pode possibilitar uma reparação dos terminais monoaminérgicos. Os mesmos autores ainda propõem que o exercício voluntário pode ser uma estratégia não farmacológica no tratamento de dependentes de METH.

No presente estudo, é interessante constatar que o exercício físico (*treadmill*) estimulou a recuperação dos terminais serotoninérgicos como é ilustrado pelo regresso dos valores de 5-HT totais grupo METH + Ex aos valores basais. Estas observações confirmam aquilo que tem sido recentemente descrito na literatura: a existência de uma relação estreita entre o exercício em *treadmill* e a recuperação

---

de 5-HT. Por exemplo, Arida *et al.* (2011) demonstraram que o exercício em *treadmill* ativa no córtex algumas monoaminas, tais como a 5-HT.

No entanto, a literatura não é ainda unânime sobre a ação neuroregeneradora do exercício físico. Em linha com a literatura inconsistente, os terminais dopaminérgicos não demonstraram sinais de recuperação no presente estudo. De facto, os teores totais de DA e DOPAC permaneceram diminuídos no grupo METH + Ex. Adicionalmente, o exercício físico intensificou a depleção do HVA induzida pela METH. Esta ausência de capacidade de regeneração das vias dopaminérgicas pode ser explicada pelo tempo de duração do protocolo, pela intensidade ou mesmo pelo facto de o exercício ser não voluntário.

De facto Rosa *et al.* (2008) sugeriram que, para uma resposta ser mais eficaz e adaptativa, o protocolo de exercício deveria ser implementado com períodos alternados de maior e menor intensidade.

Outra questão pertinente prende-se com o tipo de exercício instituído. Neste estudo foi utilizado o *treadmill* que é considerado uma forma de exercício voluntário. Hand *et al.* (2008) e McNicol *et al.* (2009) mencionam que, apesar de o exercício físico moderado poder trazer efeitos benéficos a longo prazo ao nível neuroquímico, há que considerar que este tipo de exercício é forçado, não espontâneo, e desta forma não existe a possibilidade de medir o *stress* inerente ao exercício físico forçado e avaliar o impacto deste facto nos resultados (Mello *et al.*, 2008).

Arida *et al.* (2011) referem que, de acordo com o tipo de exercício, agudo ou crónico, voluntário ou involuntário, intensidade e duração, estes modelos podem ser contraproducentes constituindo um *stress* adicional e até terem um efeito cumulativo com a agressão tóxica, facto que pode explicar a diminuição marcada dos valores de HVA no grupo que foi alvo de uma agressão com METH e que cumpriu todo o protocolo de exercício.

Assim, podem existir diferenças significativas entre implementar protocolos de exercício voluntário, que são muito menos stressantes, ao invés de implementar protocolos de exercício forçado como o *treadmill* (Arida *et al.*, 2011). A implementação de um protocolo não voluntário no presente trabalho poderá ter atenuado a eficácia neuroregeneradora do exercício nos terminais dopaminérgicos.

Para além disso, sabendo-se que existe uma janela de tempo entre lesão neurológica e a implementação do exercício como terapia, torna-se necessário avaliar o momento ideal para iniciar o protocolo de exercício físico após a agressão (Arida *et al.*, 2011). Alguns autores referem que, após lesões, todo o cérebro possui uma incrível capacidade plástica de recuperar (Steinberg *et al.*, 1997), mas apenas se o exercício for implementado numa fase precoce após lesão (cinco dias no máximo) (Buchkremer-Ratzmann, 1996). Prevenindo assim perda de tecido e estimulando a reorganização funcional do córtex (Nudo *et al.*, 1996).

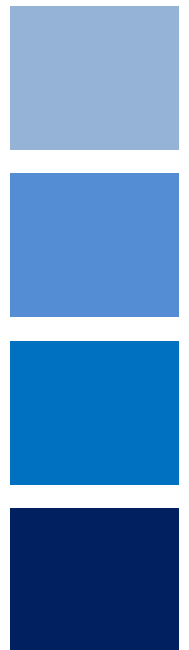
Neste trabalho, o exercício foi iniciado vinte e quatro horas após ter sido administrada a agressão. A ausência de impacto positivo nos circuitos dopaminérgicos pode sugerir que esta intervenção deveria ter começado mais cedo. De facto, a literatura mostra que vinte e quatro horas após esta dose de METH já há uma importante alteração da estrutura e função dos terminais dopaminérgicos (Pereira *et al.*, 2012).

Em suma, está a ser incrivelmente reconhecido que nenhuma modalidade ou protocolo de exercício satisfaz todas as necessidades e objetivos terapêuticos (Cotman *et al.*, 2007). O'Dell *et al.* (2012) referem que mais estudos são necessários para determinar efetivamente que o exercício acelera uma recuperação das estruturas e/ou bloqueia o embotamento característico neste tipo de neurotoxicidade, bem como se os benefícios do exercício físico são cumulativos a longo prazo, sendo necessário definir com precisão as necessidades individuais (Ahlskog *et al.*, 2011).

O presente estudo permite sugerir que o exercício físico, com as características citadas na metodologia, apresenta um efeito neuroregenerador seletivo: sendo eficaz relativamente aos terminais serotoninérgicos é ineficaz na recuperação da função dopaminérgica. Este trabalho pretende reforçar a importância do exercício físico como terapêutica neuroregeneradora. No entanto, mais estudos são necessárias para clarificar estratégias que promovam de forma mais global e eficaz a recuperação dos terminais monoaminérgicos nos modelos de toxicidade induzidos pela METH.

## Capítulo 5

# Conclusão



## Conclusão

Neste estudo foi possível validar a utilização de uma dose única de METH (30mg/Kg), como neurotóxico cortical, verificando-se uma depleção da DA e dos seus metabolitos, bem como da 5-HT em murganhos C57BL/6, sugerindo a existência de degeneração monoaminérgica.

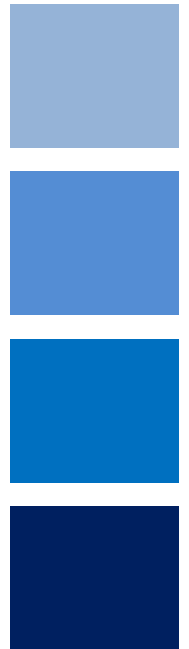
Face aos resultados obtidos é possível inferir que o exercício influenciou positivamente a função dos terminais corticais serotoninérgicos, uma vez que as concentrações desta monoamina aumentaram nos grupos sujeitos a administração da METH e ao protocolo de exercício físico, sugerindo uma possível regeneração específica nos terminais serotoninérgicos.

O exercício físico pode ser assim proposto como uma estratégia de reabilitação neuronal.



## Capítulo 6

# Bibliografía



## Bibliografia

Achat-Mendes C., Ali S., Itzhak Y., 2005. Differential effects of amphetamines-induced neurotoxicity on appetitive and aversive pavlovian conditioning in mice. *Neuropsychopharmacology*. 30: 1128-1137

Ahlskog J., Geda Y., Graff-Radford N., Petersen R., 2011. Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin Proc*. 86 (9): 876-84

Al-Jarrah M., Jamous M., 2011. Effect of endurance exercise training on the expression of GFAP, S100B, and NSE in the striatum of chronic/progressive mouse model of parkinson's disease. *NeuroRehabilitation*. 28: 359-63

Anstrom K., Scharllert T., Wooddlee M., Shattuck A., Roberts D., 2007. Repetitive vibrissae-elicited forelimb placing before and immediately after unilateral 6-hydroxydopamine improve outcome in a model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res*. 179: 183-91

Apple F., Billadello J., 1994. Expression of creatine kinase M and B m RNAs in treadmill trained rat skeletal muscle. *Life Sci*. 55(8): 585-92

Arida R., Scorza F., Gomes da Silva S., Cysneiros R., Cavalheiro E., 2011. Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents. *Am J Phys Med Rehabil*. 90: 1-13

Aron L., Paulus M., 2007. Location: Using Functional Magnetic Resonance Imaging to Pinpoint Brain Differences Relevant to Stimulant Use. *Addiction*. 102: 33-43

- Bear M., Connors B., Paradiso M., 1998. Neurociencia: explorando el cerebro. *Mason – Williams & Wilkins España, S.A.*
- Berchtold N., Castello N., Cotman C., 2010. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience. 167: 588-97*
- Berger M., Roth B., 2011. Pharmacology of serotonergia and central adrenergic neurotransmission in: principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy 3ªed. *Lippincott Williams & Willkins. 14: 207-19*
- Block M., Zecca L., Hong J., 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci. 8: 57-69*
- Bowyer J., Harris A., Delongchamp R., Jakab R., Miller D., Little A., O'Calaghan J., 2004. Selective changes in gene expression in cortical regions sensitive to amphetamine during the neurodegenerative process. *Neurotoxicology. 25: 555-72*
- Bowyer J., Thomas M., Schmued L., Ali S., 2008. Brain region-specific neurodegenerative profiles showing the relative importance of amphetamine dose, hyperthermia, seizures, and the blood-brain barrier. *Ann. N. Y. Acad. Sci. 1139: 127-39*
- Brodkin J., Mayala A., Nash J., 1993. Effects of accute monoamine depletion on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induce neurotoxicity. *Pharmacol Biochem Bahav. 45: 647-53*
- Buchkremer-Ratzmann I., August M., Hagemann G., 1996. Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical pthothrombosis in rat brain. *Stroke. 27: 1105-9*

- Buhmann C., 2005. Motor reorganization in asymptomatic carriers of a single mutant Parkin allele: a human model for presymptomatic parkinsonism. *128*: 2281-90
- Cadet J., Krasnova I., 2007. Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain research reviews, Elsevier. 60*: 379-407
- Chang L., Alicata D., Ernest T., Volkow N., 2007. Structural and metabolic brain changes in the striatum associated with methamphetamine abuse. *Addiction. 102*: 16-32
- Chow L., From A., Seaquist E., 2010. Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction. *Metabolism. 59*: 70-85
- Cohen A., 2003. Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *J Neurochem. 85 (2)*: 299-305
- Cohen J., Braver T., Brown J., 2002. Computational perspectives on dopamine function in pré-frontal cortex. *Curr Opin Neurobiol. 12*: 223-29
- Colcombe S., Kramer A., Erickson K., 2004. Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. *PNAS. 101*: 3316-21
- Colcombe S., Kramer A. Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychol. Sci. 14*: 125-130
- Coper J., Bloom F., Roth R., 1991. The biochemical basis of neurofarmacology. *Oxford University Press, 6<sup>ed</sup>*
- Cotman C., 2007. Exercise builds brian health: key roles of growth factor cascades ans inflammation. *Trends Neurosci. 30*: 464-72

- Cotman C., Berchtold N., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences. Elsevier. 25 (6): 295-301*
- Cotman C., Berchtold N., Christie L., 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci. 30: 462-72*
- De Lira C., Vancini R., Ihara S., Silva A., Aboulafia J., Nouailhetas L., 2008. Aerobic exercise affects C57BL/6 murine intestinal contractile function. *Eur J Appl Physiol. 103: 215-23*
- Desai K., Sato R., Schauble E., Barsh G., Kobilka B., Bernstein D., 1997. Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease. *American Journal of Physiology, 272 (2): 1053-61*
- Dishman R., 2006. Neurobiology of exercise. *Obesity. Silver Spring. 14 (3): 345-56*
- Eisch A., Schmued L., Marshall J., 1998. Characterizing cortical neuron injury with fluoro-jade labeling after a neurotoxic regimen of methamphetamine. *Synapse. 30: 329-30*
- Eldar R., Marincek C., 2000. Physical activity for elderly persons with neurological impairment: a review. *Scandinavian Journal of rehabilitation medicine. 32 (3): 99-103*
- Estevinho M., Fortunato J., 2003. Dopamina e Recetores. *Revista Portuguesa de Psicossomática. 5 (1): 21-31*
- Fantegrossi W., Ciullo J., Wakabayashi K., Garza R., Traynor J., Woods J., 2008. A comparison of the physiological, behavioral, neurochemical and microglial effects of methamphetamine and 3,4-methylenedioxy-methamphetamine in the mouse. *Neuroscience. 151: 533-43*

- Fonseca F., Falcato J., Anderson F., Almeida J., Tojinha M., 2012. Dicionário Médico. *Climepsi Editores*
- Fontes-Ribeiro C., Marques E., Pereira F., Silva A., Macedo T., 2010. May exercise prevent addiction. *Current Neuropharmacology. 9 (1): 45-8*
- Fu L., Liu X., Niu Y., Yuan H., Zhang N., Lavi E., 2011. Effects of high-fat diet and regular aerobic exercise on global gene expression in skeletal muscle of C57BL/6 mice. *Metabolism Elsevier. 1010-16*
- Fumagalli F., Gainetdinov R., Valenzano K., Caron M., 1998. Role of dopamine transporter in methamphetamine-induced neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J Neurosci. 18: 4861-9*
- Garcia C., Coelho M., 2009. Neurologia Clínica: Princípios Fundamentais. *Lidel*
- Gerecke K., Jiao Y., Pani A., Pagala V., Smeyne R., 2010. Exercise protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J. Brain Research Elsevier 10: 1016-53*
- Gomez-Pinilla F., Vaynman S., Ying Z., 2008. Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur J Neurosci. 28: 2278-87*
- Gorton L., Vuckovic M., Vertelkina N., Petzinger G., Jakowec M., Wood R., 2010. Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse. *Behav Brain Res. 213: 253-262*
- Grace C., Schaefer T., Herring N., Graham D., Skelton M., Gudelsky G., 2010. Effect of a neurotoxicity dose regime of (+)-methamphetamine on behavior, plasma corticosterone, and brain monoamines in adult C57BL/6 mice. *Neurotoxicol Teratol. 32: 346-55*

- Granner D., Murray R., Mayes P., Rowell V., 2000. Hormones of the Adrenal Cortex  
In Harper Biochemistry (25<sup>a</sup>ed). *Standford: Appleton e Lang*. 575-87
- Green A., Mehan A., Elliott J., O'Shea E., Colado M., 2003. The pharmacology and  
clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Pharmacol  
Rev.* 55: 463-508
- Halson S., Bridge M., Meeusen R., Busschaert B., Gleeson M., Jones D., Jeukendrup  
A., 2002. Time course of performance changes and fatigue markers during in-  
tensified training in trained cyclists. *J Appl Physiol.* 93: 947-56
- Hand G., Phillips K., Dudgeon W., William L., Larry D., Burgess S., 2008. Moderate  
exercise training reverses functional aerobic impairment in HIV-infected indi-  
viduals. *AIDS Care.* 20 (9): 1066-74
- Haram P., Kemi O., Lee S., Bendheim M., Al-Share Q., Waldum H., Wisloff U., 2008.  
Aerobic interval training vs continuous moderate exercise in the metabolic  
syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovascular  
Research.* 81: 723-32
- Helmreich D., Parfitt D., Lu X., Akil H., Watson S., 2005. Relation between  
hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-  
adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology.* 81: 183-192
- Hirata H., Landenheim B., Carlson E., Epstein C., Cadet J., 1996. Autoradiographic  
evidence for methamphetamine-induced striatal dopaminergic loss in mouse  
brain: attenuation in CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. *Brain  
Research.* 714: 95-103
- Hirsch M., Farley B., 2009. Exercise and neuroplasticity in persons living with Parkin-  
son's disease. *Eur. J. Phys. Rehabil. Med.* 45: 215-29

- Hof P., Morrison J., 2004. The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends in Neuroscience*. 27: 607-13
- Holydal M., Wisloff U., Kemi O., Ellingsen O., 2007. Running Speed and Maximal Oxygen uptake in Rats and Mice: Practical Implications for Exercise Training. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*. 14: 753-60
- Homer B., Solomon, T., Moeller R., Mascia A., DeRaleau L., Halkitis P., 2008. Methamphetamine abuse and impairment of social functioning: a review of the underlying neurophysiological causes and behavioral implications. *Psychol. Bull.* 134: 301-10
- Humm J., Kozlowski D., James D., 1998. Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period. *Brain Res.* 783: 286-92
- Hyman S., Malenka R., 2001. Addiction and brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 695-703
- Hyman S., Malenka R., Nestler E., 2006. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 29: 565-98
- Jones S., Gainetdinov R., Wightman R., Caron M., 1998. Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J. Neurosci.* 18: 1979-86
- Kalivas P., 2005. How do we determinate which drug-induced neuroplastic changes are important? *Nat. Neurosci.* 8 (11): 1440-2
- Kapczinski F., Busnello J., Abreu M., Carrão A., 1998. Aspectos da fisiologia do triptofano. *Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFRGS*



- Kelly K., Miller D., Bowyer J., O'Callaghan J., 2012. Chronic exposure to corticosterone enhances the neuroinflammatory and neurotoxic responses to methamphetamine. *J. Neurochem.* 122: 995-1009
- Kemi O., Ceci M., Wisloff U., Grimaldi S., Gallo P., Smith G., Ellingsen O., 2008. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *Journal of Cellular Physiology.* 214: 316-21
- Kemi O., Ellingsen O., Ceci M., Grimaldi S., Smith G., Condorelli G., Wisloff U., 2007. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 43: 354-61
- Kemi O., Haram P., Wisloff U., Ellingsen O., 2004. Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. *Circulation.* 109: 2897-904
- Kemi O., Loennechen J., Wisloff U., Ellingsen O., 2002. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology.* 93 (4): 1301-09
- Koob G., Volkow N., 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology Reviews.* 35: 217-38
- Kraft A., Harry J., 2011. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 8: 2980-3018
- Kregel K., Allen D., Booth F., Fleshner M., Henriksen E., Musch T., Toth L., 2006. Resource book for the design of animal exercise protocols. *American Physiological Society*

- Kregel K., Allen D., Booth F., Fleshner M., Henriksen E., Musch T., O' Leary D., Parks C., Poole D., Ra'anan A., 2006. Treadmill running in mice. In: resource book for the design of animal exercise protocols (Committee to develop an APS Resource book for the design of animal exercise protocols). *The American Physiology Society*: 43 – 48
- Kuczenski R., Everall I., Crews L., Adame A., Grant I., Masliah E., 2007. Escalating dose-multiple binge methamphetamine exposure results in degeneration of the neocortex and limbic system in the rat. *Exp. Neurol.* 207: 42-51
- Kuhn D., 2006. Dopamine quinones activate microglia and induce a neurotoxic gene expression profile: relationship to methamphetamine-induced nerve ending damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074: 31-41
- Lambert M., Noakes T., 1989. Dissociation in changes of VO<sub>2</sub>, muscle QO<sub>2</sub>, and performance with training in rats. *Journal of Applied Physiology.* 66: 1620-25
- Landenheim B., Krasnova I., Deng X., Oyler J., Poletini A., Moran T., Cadet J., 2000. Methamphetamine-induced neurotoxicity is attenuated in transgenic mice with a null mutation for interleukin-6 *Mol. Pharmacol.* 58: 1247-56
- Lange F., 2008. Increase in prefrontal cortical volume following cognitive behavioural therapy in patients with chronic fatigue syndrome. *Brain.* 131(8): 2172-80
- Leonardi E., Azmitia E., 1994. MDMA Inhibition of MAO Type A and Type B: Comparisons with fenfluramine and fluoxetine. *Neuropsychopharmacol.* 10: 231-8
- Mackay W., 2011. Neuro 101: Neurophysiology without tears. *Fundação Calouste Gulbenkian*

- Marinelli M., Piazza P., 2002. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur. J. Neurosci.* 16 (3): 387-94
- McNicol A., O'Brien B., Paton C., Knez W., 2009. The effects of increased absolute training intensity on adaptations to endurance exercise training. *J. Sci. Med. Sport.* 12 (4): 485-89
- Mello P., Benetti F., Cammrota M., Izquierdo I., 2008. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An. Acad. Bras. Cienc.* 80 (2): 301-9
- Miller E., Cohen J., 2001. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 167-202
- Montague R., Hyman S., Cohen J., 2004. Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature.* 431: 760-67
- Moraska A., Deak T., Spencer R., Roth D., Fleshner M., 2000. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley Rats. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology.* 279: 1321-29
- Morgadinho M., Fontes C., Macedo T., 2004. Influence of the sample preparation method on the serotonin determination in plasma and platelets. *Biomed Chromatogr.* 9: 739-44
- Neeper S., 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 726 (1-2): 49-56
- Nestler E., 2001. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 119-28

- Nishida S., 2007. Mecanismos de comunicação entre os neurónios e dos neurónios com os órgãos efetadores. *Departamento de Fisiologia, IB Unesp-Botucetu*. 37-53
- Norton K., Jones M., Armstrong R., 1990. Oxygen consumption and distribution of blood flow in rats climbing a laddermill. *Journal of Applied Physiology*, 68: 241-7
- Nudo R., Wise B., SiFuentes F., 1996. Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science*. 30: 252-8
- O'Callaghan J., Miller D., 1994. Neurotoxic profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 741-51
- O'Callaghan J., Sriram K., Miller D., 2008. Lessons from MPTP and methamphetamine-induced neurotoxicity. *N.Y. Academy Sci.* 1139: 318-30
- O'Dell S., Galvez B., Ball A., Marshall J., 2012. Runnig wheel exercise ameliorates methamphetamine-induced damage to dopamine and serotonin terminals. *Synapse*. 66: 71-80
- O'Hearn E., Battaglia G., Souza E., Kuhar M., Molliver M., 1988. Methylenedioxyamphetamine and methylenedioxymethamphetamine cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J Neurosci*. 8: 2788-803
- O'Callaghan J., Miller D., 1994. Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 270: 741-51
- Olivier B., Oorschot R., 2005. 5-HT<sub>1B</sub> Receptors and Aggression: A Review. *Eur J Pharmacol*. 526 (1-3): 207-17

- Patinõ N., 2008. Farmacologia médica. *Ed. Médica Panamericana C5. 2:* 753-83
- Paxinos G., Franklin K., 2004. The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2th edition. *Academic Press Limited, London, UK.*
- Pereira F., Oliveira T., Viana S., Travassos A., Nunes S., Silva C., Prediger R., Rego A., Ali S., Ribeiro C., 2012. Disrupção of striatal glutamatergic/GABAergic homeostasis following acute methamphetamine in mice. *Neurotoxicology and Teratology Elsevier.* 1-8
- Petzinger G., Togasaki D., Akopian G., Walsh J., Jakowec M., 2008. Non-human primate models of parkinson's disease and a experimental therapeutics. *In R. Nass, & S. Przedborski, Parkinson's Disease: Molecular and Therapeutic insights from model systems. USA: Elsevier.* 105-132
- Petzinger G., Walsh J., Akopian G., Hogg E., Abernathy A., Arevalo P., Turnquist P., Vucković M., Fisher B., Togasaki D., Jakowec M., 2007. Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *J Neurosci.* 27(20): 5291–5300.
- Pothakos K., 2009. Restorative effects of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *Neuroscience.* 10 (6): 6-20
- Ricci A., Rossodivita I., Avola R., Tayiebati S., 2001. The dopaminergic system in hypertension. *Clin. Exp. Hipertens.* 23: 15-24
- Robinson T., Berridge K., 2000. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction.* 95: 91-117

- Robinson T., Kolb B., 1999. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and pre-frontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur. J. Neurosci.* 11: 1598-604
- Rolls E., 2004. The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain Cognition.* 54: 25-53
- Rosa E, Freymüller E., Ihara S., Aboulafia J., Nouailhetas V., 2008. Damaging effects of intense repetitive treadmill running on murine intestinal musculature. *J Appl Physiol.* 104: 1410–17
- Rosa E., Freymüller E., Ihara S., Aboulafia J., Nouailhetas, V., 2008. Damaging effects of intense repetitive treadmill running on murine intestinal musculature. *Journal of Applied Physiology*, 104 (5): 1410-7
- Rose S., 1998. From brains to consciousness: essays on the new sciences of the mind. *Penguin Press*
- Rupp H., Wahl R., 1990. Influence of thyroid hormones and catecholamines on myosin of swim-exercised rats. *Journal of Applied Physiology.* 68: 973-8
- Schefer V., Talan M., 1996. Oxygen consumption in adult and aged C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Experimental Gerontology.* 31: 387-92
- Schmidt C., Taylor V., 1987. Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine. *Biochem Pharmacol.* 36: 4095-5102
- Schmued L., Bowyer J., 1997. Methamphetamine exposure can produce neuronal degeneration in mouse hippocampal remnants. *Brain Res.* 759: 135-40
- Schoenbaum G., Roesch M., 2005. Orbitofrontal cortex, associative learning and expectancies. *Neuron.* 47 (5): 633-36

- Scott J., Woods S., Matt G., Meyer R., Heaton R., Atkinson J., Grant I., 2007. Neurocognitive effects of methamphetamine: a critical review and meta-analysis. *Neuropsychol. Rev.* 17: 275-97
- Seeley R., Stephens T., Tate P., 2001. Anatomia e fisiologia. *Lusodidacta*
- Sekine Y., Ouchi Y., Sugihara G., Takei N., Yoshikawa E., Nakamura K., Iwata Y., Takebayashi K., Yamamoto S., Matsuzaki H., Ueki T., Mori N., Gold M., Cadet J., 2008. Methamphetamine causes microglial activation in the brain of human abusers. *J. Neurosci.* 28: 5756-61
- Sekine Y., Ouchi Y., Takei N., Yoshikawa E., Nakamura K., Futatsubashi M., Okada H., Minabe Y., Suzuki K., Iwata Y., Tsuchiya K., Tsukada H., Iyo M., Mori N., 2006. Brain Serotonin transporter density and aggression in Abstinent Methamphetamine Users. *Arch. Gen. Psychiatry.* 63: 90-100.
- Self D., 2004. Regulation of drug-taking and seeking behaviors by neuroadaptations in the mesolimbic dopamine system. *Neuropharmacology.* 47 (1): 242-55
- Shen H., Tong L., Balazs R., Cotman C., 2001. Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 107 (2): 219-29
- Shih J., Chen K., Ridd M., 1999. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev. Neurosci.* 22: 197-217
- Simth A., Zigmond M. 2003. Can the brain be protected through exercise? *Lessons from an animal model of parkinsonism.* 184: 31-9

- Sousa L., Hoshi L., Lima L., Santiago M., Alves M., Mendonça L., 2003. Revisão toxicológica e tratamento da intoxicação pelo ecstasy. *Rev. Neurociências. 11 (1): 18-22*
- Spleeman A., Warrenburg B., Nimwegwn M., Petzinger G., Munneke M., Bloem B., 2011. How might activity benefit patients with Parkinson disease?. *Nat. Rev. Neurol. 7: 528-34*
- Sriram K., O'Callaghan J., 2007. Divergent roles for tumor necrosis factor- $\alpha$  in the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol. 2: 140-53*
- Steinberg B., Augustine J., 1997. Behavioral, anatomical and physiological aspects of recovery of motor function after stroke. *Brain Res Rev. 25: 125-32*
- Stephenson R., 2009. Premotor parkinson's disease: clinical features and detection strategies. *Official Journal of the Movement Disorder Society. 24 (2): 665-70*
- Stranahan A., Lee K., Becker K., 2010. Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of memory by running in aged mice. *Neurobiol Aging. 31: 1937-49*
- Streit W., 2010. Microglia activation and neuroinflammation in alzheimer's disease: a critical examination of recent history. *Front. Aging Neurosci. 2: 1-5*
- Sulzer D., Chen T., Lau Y., Kristensen H., Rayport S., Ewing A., 1995. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J. Neurosci. 15: 4102-8*
- Tanaka K., 2009. Benefits of physical exercise on executive functions in older people with parkinson's disease. *Elsevier. 69 (2): 435-41*



- Tansey M., 2007. Neuroinflammatory mechanisms in parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp. Neurol.* 208: 1-25
- Tarter R., Ammermam R., Ott P., 2010. Handbook of substance abuse: neurobehavioral pharmacology. *Springer.* 501-13
- Terry R., DeTeresa R., Hansen L., 1987. Neocortical cells counts in normal human adult aging. *Annals of Neurology.* 21: 530-39
- Thompson P., Hayashi K., Simon S., Geaga J., Hong M., Sui Y., Lee J., Toga A., Ling W., London E., 2004. Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. *J. Neurosci.* 24: 6028-36
- Tillerson J., Caudle W., Reveron M., Miller G., 2003. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of parkinson's disease. *Neuroscience.* 119 (3): 899-911
- Travassos A., Morgadinho T., Gonçalves J., Silva A., Ribeiro C., Pereira F., 2001. Metanfetamina e o ciclo do glutamato no cérebro de murganho. *Revista Toxicodependências.* 17 (2): 67-76
- United Nations Office on Drugs and Crime, 2007. World drug report volume 1. *Analysis.* United Nations Office on Drugs and Crime, Vienna.
- Volkow N., Chang L., Wang G., Fowler J., Leonido-Yee M., Franceschi D., 1996. Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am J Psychiatry.* 158: 377-82
- Voss M., Prakash R., Erickson K., 2010. Plasticity of brain networks in a randomized intervention trial of exercise training in older adults. *Neurosci.* 2: 32

- Wilson J., Kaalasinsky K., Levey A., Bergeron C., Reiber G., Anthony R., 1996. Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users. *Nat. Med.* 2: 699-703
- Wong T., Booth F., 1988. Skeletal muscle enlargement with weight-lifting exercise by rats. *Journal of Applied Physiology.* 65: 950-54
- Wong-Riley M., 2003. Segredos em Neurociências: respostas necessárias ao dia-a-dia na clínica, em exames orais e escritos. *Artmed*
- Woods J., Ceddia M., Zack M., Lowder T., Lu Q., 2003. Exercise training increases the naïve to memory T cell ratio in old mice. *Brain Behav Immun.* 17: 384-92
- Xavier C., Lobo P., Fonteles M., Vasconcelos S., Viana G., Sousa F., 2008. Ecstasy (MDMA): pharmacological and toxic effects, mechanism of action and clinical management. *Rev. psiquiatr. clin.* 35 (3): 96-103
- Xu W., Zhu J., Angulo A., 2005. Induction of striatal pre and postsynaptic damage by methamphetamine requires the dopamine receptors. *Synapse.* 58: 110-21
- Yuen-Sum L., Gaurav P., Das-Panja K., Wei-Dong L., Ahmad S., 2011. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur. J. Neurosci.* 33 (7): 1264-77
- Zhou Q., Dohm G., 1997. Treadmill running increases phosphatidylinositol 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 236: 647-650
- Zhu J., Xu W., Angulo J., 2005. Disparity in the temporal appearance of methamphetamine-induced apoptosis and depletion of dopamine terminal markers in the striatum of mice. *Brain Research.* 1049: 171-81