



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

SHEENA MARTINA DOMINGUES MENDES

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO NA
NEURODEGENERESCÊNCIA CAUSADA PELA METANFETAMINA
NO CÓRTEX FRONTAL DO MURGANHO**

Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental

COIMBRA

2012

SHEENA MARTINA DOMINGUES MENDES

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO NA
NEURODEGENERESCÊNCIA CAUSADA PELA
METANFETAMINA NO CÓRTEX FRONTAL DO MURGANHO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro e sob a coorientação do Professor Doutor Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira.

2012

A todos vós, que fazem parte da minha vida!

Agradecimentos

Para a realização deste trabalho, apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, foi necessário reunir o contributo de várias pessoas. Desde o início deste percurso que pude contar com o apoio e confiança de inúmeras pessoas. Atrevo-me a dizer, com toda a certeza, que sem aqueles apoios, este trabalho não teria sido possível e por isso, não poderia deixar de transmitir os meus sinceros agradecimentos. Assim, quero agradecer:

Aos meus orientador e coorientador, Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro e Professor Doutor Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira, respectivamente, pela orientação, disponibilidade e pelos saberes transmitidos. Agradeço ainda, todo o apoio prestado ao longo desta “maratona” e por estimularem o meu interesse pelo conhecimento.

Ao Professor Doutor António Cabrita pelos ensinamentos transmitidos ao longo do ano curricular e pela oportunidade de frequentar este mestrado.

À Sofia Viana pela partilha do saber acerca da técnica de Western Blot (e não só!), pela paciência, pela ajuda e pela motivação.

À Sara Nunes, pelo apoio prestado e esclarecimentos acerca da técnica de HPLC.

À Sandra Correia, pela ajuda na manutenção dos animais no biotério.

Aos meus colegas de mestrado, Ana Filipa Neves, Ana Irene Dias e Hugo Freitas, pela companhia, amizade, apoio e pelas risadas. Quero deixar um especial Obrigada do tamanho do Mundo à Ana Irene, minha colega e companheira das olimpíadas dos Blots.

Aos meus pais, Ana Paula e José, por tudo o que fizeram e fazem para tentar assegurar que a minha vida seja mais facilitada que a deles. Obrigada por sempre acreditarem nas minhas capacidades quando eu própria começava a duvidar, sem a ajuda deles este trabalho não seria, de todo, possível.

Agradeço ainda, por permitirem que desenvolvesse os meus conhecimentos e por me terem proporcionado alguns dos melhores momentos da minha vida.

Ao meu irmão, Mauro Mendes, que apesar de ter um oceano a separar-nos, nunca deixou de comunicar comigo para me dar aquela palavra, no momento certo. Quero agradecer também pela enorme motivação e confiança que sempre depositou em mim.

Ao Fábio Nunes, principal prejudicado com este meu trabalho, quero agradecer a forma como aturou os meus devaneios, pelo apoio, pela motivação e, acima de tudo, por compreender a minha ausência durante esta etapa.

A todos os meus amigos por me fazerem rir, chorar e por partilharem comigo alguns dos momentos mais inesquecíveis da minha vida. Às minhas queridas *Babes* por ouvirem os meus desabaços, por me incentivarem e motivarem quando o Tempo parecia ser mais forte do que eu.

*A todos vós,
o meu enorme Obrigada e Bem-hajam!*

Índice

Lista de Abreviaturas.....	I
Lista de Figuras	II
Lista de tabelas	III
Resumo.....	IV
Abstract	V
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. DROGAS DE ABUSO	2
1.1. Breve abordagem histórica	2
1.2. Definição	3
1.3. Classificação de drogas	3
1.4. Estimulantes do SNC.....	4
1.5. Anfetaminas	5
1.6. Metanfetamina.....	7
1.6.1. Nomenclatura	7
1.6.2. Farmacologia e mecanismos de ação da metanfetamina	8
1.6.3. Farmacocinética da Metanfetamina	9
1.7. Neurotoxicidade.....	11
2. Sistema Nervoso	12
2.1. Breve descrição anatômica	12
2.2. Córtex Frontal – efeitos da metanfetamina.....	13
2.2.1. A dopamina	14
2.2.2. A serotonina	15
3. Neuroprotecção	15
1.1. Agentes neuroprotetores farmacológicos	17
4. Exercício físico.....	18
4.1. Efeitos neuroprotetores do exercício físico	18
4.2. Caracterização de modelos animais de exercício.....	19
4.3. Impacto do exercício físico no córtex frontal.....	20
II. OBJETIVOS	21
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
1. Animais.....	24

2.	<i>Treadmill</i> / Tapete rolante.....	24
3.	Protocolo experimental.....	25
3.1.	Divisão dos Animais.....	25
3.2.	Adaptação ao <i>treadmill</i>	25
3.3.	Protocolo de Exercício.....	26
3.4.	Administração da metanfetamina.....	27
3.5.	Sacrifício dos animais e isolamento do córtex frontal.....	28
4.	Quantificação da expressão de TH e GFAP por <i>Western Blotting</i>	28
5.	Determinação dos níveis de monoaminas e dos seus metabolitos por HPLC-ED.....	30
6.	Processamento dos dados e análise estatística.....	31
1.	Níveis corticais de dopamina (DA), dos seus metabolitos (DOPAC, HVA) e expressão de TH.....	34
2.	Níveis corticais totais de 5-HT.....	36
3.	Expressão da proteína GFAP.....	37
V.	DISCUSSÃO.....	38
VI.	CONCLUSÃO.....	43
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

Lista de Abreviaturas

5-HTT	Transportador de serotonina
a.C.	Antes de Cristo
ATV	Área do tegumento ventral
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
HPLC-ED	Cromatografia líquida de alta pressão com detecção eletroquímica
LSD	Dietilamida de ácido lisérgico
MA	Metanfetamina
MA + EX	Metanfetamina e exercício
MA + SED	Metanfetamina e sedentário
MAO	Monoamina oxidase
N.Ac.	<i>Nucleus Accumbens</i>
NAT	Transportador de noradrenalina
Rpm	Rotações por minuto
SAL + EX	Salino e exercício
SAL + SED	Salino e sedentário
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema nervoso periférico
TH	Tirosina hidroxilase
THP	Triptofano hidroxilase
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime
VMAT-2	Transportador vesicular de monoamina

Lista de Figuras

Figura 1. Prevalência anual do uso de drogas ilícitas entre a população (15-64anos), 2008-2010	2
Figura 2. Estrutura química de vários derivados anfetamínicos	6
Figura 3. Estrutura química da metanfetamina	8
Figura 4. Vias monoaminérgicas: Via serotoninérgica (A), Via noradrenérgica (B) e Vias dopaminérgicas (C)	13
Figura 5. Mecanismos através dos quais a metanfetamina induz o aumento das monoaminas (especialmente a DA).....	14
Figura 6. <i>Treadmills</i> utilizados neste estudo.....	24
Figura 7. Protocolo de adaptação ao <i>treadmill</i>	25
Figura 8. Protocolo de exercício físico para os grupos SAL + EX e MA + EX	26
Figura 9. Administração intraperitoneal do fármaco	27
Figura 10. Isolamento do córtex frontal	28
Figura 11. Electrotransferência	29
Figura 12. Sistema de HPLC utilizado neste estudo para a quantificação de monoaminas.....	31
Figura 13. Efeito da administração da MA (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)	35
Figura 14. Efeito da administração da MA (30mg/Kg) e/ou exercício físico nos níveis corticais, totais de 5-HT	36
Figura 15. A expressão de GFAP no córtex frontal de murganhos C57BL/6	37

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação das drogas de abuso segundo Fonseca A. (1997)	4
Tabela 2. Exemplos de agentes neuroprotetores	17
Tabela 3. Anticorpos primários e secundários utilizados na análise por <i>Western Blotting</i>	30
Tabela 4. Tempos médios de retenção das monoaminas	31

Resumo

A metanfetamina (MA) é uma droga ilícita com propriedades psicoestimulantes altamente viciante, cujo uso aumentou por todo mundo. Estudos anteriores demonstraram que uma única injeção de metanfetamina causa neurotoxicidade devido a alterações corticais dopaminérgicas e serotoninérgicas nos murganhos. Sabe-se que o exercício exerce efeitos neuroprotetores e melhora a recuperação neuronal em diversos distúrbios cerebrais.

Assim, o objetivo deste estudo foi descobrir se o exercício físico protege contra a neurotoxicidade causada pela MA no córtex frontal.

24 murganhos adultos C57BL/6 foram divididos em 4 grupos: 1) Salino + sedentário; 2) Metanfetamina + sedentário; 3) Salino + exercício; 4) Metanfetamina + exercício. Os grupos foram submetidos à prática regular de exercício num tapete rolante (5dias/semana) durante 8 semanas. Após o período de exercício, os animais foram injectados com uma dose única de metanfetamina (30mg/kg, intraperitonealmente) ou com solução salina (NaCl 0,9%) e sacrificados por deslocamento cervical três dias após a injeção. O córtex frontal foi recolhido para análise da expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e da tirosina hidroxilase (TH), para determinação dos níveis totais de dopamina (DA), e dos seus metabolitos (DOPAC e HVA) e da serotonina (5-HT). As monoaminas foram quantificadas por HPLC-ED, e os níveis de proteína enzimática foram analisados pela técnica de *Western Blot*.

O protocolo de exercício utilizado não afetou a depleção dos marcadores dopaminérgicos e serotoninérgicos causados pela MA (DA, DOPAC, HVA, TH e 5-HT). Os níveis de serotonina no grupo salino + exercício apresentou um aumento, quando comparado com o grupo controlo. O treino no tapete rolante causou um aumento nos níveis de GFAP no grupo injectado com MA.

Em conclusão, este trabalho demonstra que este protocolo de exercício não só não é neuroprotetor como potencia a neurotoxicidade induzida pela MA no córtex frontal.

Palavras Chave: Metanfetamina, Neurotoxicidade, Tapete rolante, Neuroprotecção, GFAP, TH, DA, DOPAC, HVA, 5-HT.

Abstract

Methamphetamine (MA) is an illicit drug with highly addictive psychostimulant properties, which use have increased worldwide. Previous studies have shown that a single high-methamphetamine injection causes neurotoxicity due to cortical dopaminergic and serotonergic changes in mice. It is known that exercise exerts neuroprotective effects and improves neuronal recovery in several brain disorders.

Thus, the aim of this study was to discover if exercise could be neuroprotective towards methamphetamine-induced neurotoxicity in the frontal cortex.

24 adult house mice C57BL/6 were divided in 4 groups: 1) Saline + sedentary; 2) Methamphetamine + sedentary; 3) Saline + exercise; 4) Methamphetamine + exercise. The exercise groups were submitted to regular exercise in treadmill (5days/week) for 8weeks. After exercise period the animals were injected a single dose of methamphetamine (30mg/kg, intraperitoneally) or saline (NaCl 0,9%) and sacrificed by cervical dislocation 3days after the injection. The frontal cortex was collected for analysis of the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the tyrosine hydroxylase (TH), for the determination of the total levels of dopamine (DA), and it's metabolites (DOPAC and HVA), and of serotonin (5-HT). The monoamines were quantified by HPLC-ED, and enzymatic protein levels were analyzed by Western Blot technique.

The exercise protocol used did not affect the depletion of dopaminergic and serotonergic markers caused by MA (DA, DOPAC, HVA, 5-HT and TH). Serotonin levels in group saline + exercise showed an increase compared with the control group. The workout on the treadmill caused an increase in GFAP levels in the group injected with MA.

In conclusion, this study demonstrates that this exercise protocol is not only non-neuroprotective and enhances MA-induced neurotoxicity in the frontal cortex.

Keywords: Methamphetamine, Neurotoxicity, Treadmill, Neuroprotection, GFAP, TH, DA, DOPAC, HVA, 5-HT.

I. INTRODUÇÃO

1. DROGAS DE ABUSO

1.1. Breve abordagem histórica

As drogas fazem parte da história da humanidade desde os tempos mais remotos. São imensas as referências literárias e históricas relativas ao uso de substâncias com o intuito de beneficiar o corpo, mente e/ou espírito (OBID, 2011). É na Bíblia que surge muito provavelmente a primeira referência às drogas. Noé terá bebido vinho até se embriagar, desnudando-se em seguida (Gén., 9.20-21). Esta poderá ter sido a primeira droga que a humanidade conheceu.

Já na Grécia Antiga, foi descoberta a propriedade analgésica do ópio usada e prescrita por médicos desde o século X a. C. aos séculos XVI e XVII. Achados arqueológicos vieram mostrar que a cocaína seria conhecida pelo menos desde o ano 600 a. C.; também os povos indígenas a cultivavam para aumentar a produtividade dos trabalhadores. Segundo Marco Pólo (1254-1324), o haxixe era igualmente utilizado para estimular a força dos soldados da fortaleza persa Alamut. Na Europa, o haxixe era usado principalmente pelas classes aristocráticas nos séculos de 700 e 800. Durante a Guerra da Secessão (1861-1865), uma outra droga foi abundantemente ministrada aos feridos – a morfina. A cocaína torna-se a droga da moda dos intelectuais na fase inicial do século XIX, substituindo o ópio e o haxixe. Em 1927 são sintetizadas pela primeira vez as anfetaminas e é em 1935 que se assinala o início da respetiva comercialização, uma vez que esta droga entrou facilmente nos usos da dependência por provir de laboratórios farmacêuticos e à qual estavam associadas propriedades terapêuticas comprovadas, como o emagrecimento. Cerca de uma década após terem sido sintetizadas as anfetaminas, aparece a dietilamida de ácido lisérgico (LSD) que inicialmente se acreditava ter propriedades terapêuticas ao nível da psiquiatria, o que mais tarde viria a ser refutado, desaconselhando o uso da mesma. Na década de

70, deu-se um *boom* do

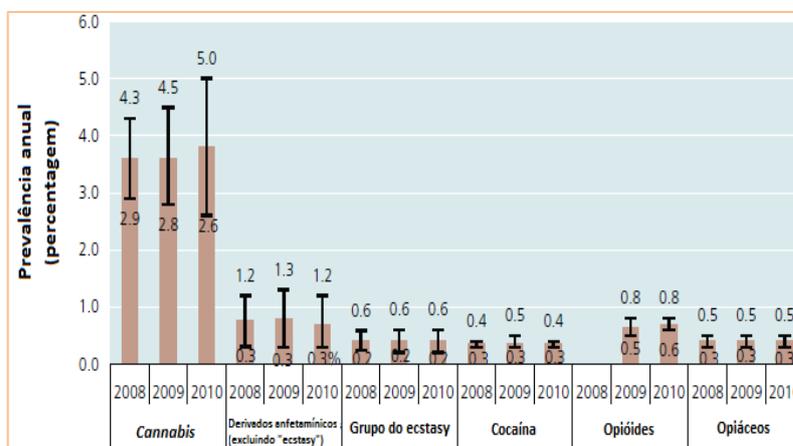


Figura 1. Prevalência anual do uso de drogas ilícitas entre a população (15-64anos), 2008-2010 (Imagem adaptada do World Drug Report, 2012 – UNODC)

consumo de drogas, sendo que as principais seriam a heroína e a cocaína (Poiares, 1999).

Atualmente, porém as anfetaminas ocupam o segundo lugar do pódio das drogas mais consumidas (Figura 1), tendo ultrapassado a cocaína e a heroína, segundo o relatório Anual das Drogas, 2012, do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC).

1.2. Definição

Com o passar dos tempos a palavra “droga” tem vindo a sofrer alterações. Este termo teve a sua origem na palavra “*droog*” (holandês antigo), cujo significado era folha seca, já que antigamente praticamente todos os medicamentos eram sintetizados a partir de vegetais. Nos dias que correm a palavra droga, assume outro significado “*qualquer substância não produzida pelo organismo, mas que tem a propriedade de atuar sobre um ou mais sistemas produzindo alterações no seu funcionamento.*” (OBID, 2011).

Porém, este termo gera uma certa controvérsia por ser muitas vezes negativamente conotado e por ser um termo bastante lato e abrangente, envolvendo todos os medicamentos ou qualquer substância ativa do ponto de vista farmacológico (Sanchez, 1982). Assim, torna-se importante distinguir medicamento de droga.

Um fármaco é designado por medicamento quando a sua utilização é sob prescrição médica, mas quando usado fora do contexto médico e com o propósito de provocar alterações comportamentais, euforia e sensação de prazer, causando vício, tomam o nome de drogas (Rang *et al.*, 2012).

1.3. Classificação de drogas

Durante o século XX, várias foram as tentativas de classificar as drogas (substâncias psicoativas) e agrupá-las. Porém, os critérios que podem ser adotados para classificá-las são imensos, dificultando o seu agrupamento. Também o surgimento de novas drogas e avanços acerca do conhecimento das características das mesmas tornam estas classificações obsoletas.

A primeira referência documentada surge em 1927 por Lewin, que as classifica de acordo com a sua ação sobre o comportamento dos indivíduos. São as eufóricas – provocam bem-estar físico ou psíquico - as fantásticas - causam alucinações - as inebriantes - substâncias embriagadoras - as hipnóticas - induzem sono - e as excitantes - agem como estimulantes (Richard, 1997).

Posteriormente, surge uma nova classificação que divide as drogas em três grupos (Tabela 1), dependendo da sua ação no sistema nervoso central (SNC) (Fonseca, 1997).

Tabela 1. Classificação das drogas de abuso segundo Fonseca A. (1997)

Depressoras do SNC	Estimulantes do SNC	Perturbadoras do SNC
Analgésicos opiáceos	Anfetaminas	Cannabis
Ansiolíticos	Cocaína	Alucinógenos
Hipnóticos não-barbitúricos	Nicotina	Ciclohexilaminas
Hipnóticos barbitúricos	Psicoestimulantes	Solventes voláteis
Neurolépticos	Aminas Simpaticomiméticas	Derivados do álcool
Anti-histamínicos		Anticolinérgicos

As substâncias com efeito depressor do SNC, também designadas de psicodélicas, têm a propriedade de diminuir as atividades físicas e mentais. Os opiáceos e os seus derivados, as benzodiazepinas e os barbitúricos e outros tranquilizantes, são exemplos de substâncias psicodélicas. Por sua vez, as anfetaminas e fármacos do tipo anfetamínico e os derivados da cocaína, são substâncias com efeito estimulante do SNC, também designadas por substâncias psicoanalépticas. As substâncias com efeito perturbador do SNC, ou psicodislépticas, perturbam as percepções e modificam as capacidades mentais. Neste grupo incluem-se os derivados de cannabis, substâncias voláteis e inalantes, álcool etílico, alucinogénios e anticolinérgicos.

As drogas podem ainda ser classificadas de acordo com os seus efeitos, riscos, perigos e consequências do seu uso continuado (OMS, 1993). Ou de acordo com a legalidade do uso das mesmas, conforme as suas origens, em função da capacidade de provocar ou não dependência física.

As diferentes drogas apresentam algumas características comuns entre si. No entanto, a mais importante é o facto de terem uma ação sobre o SNC, daí que seja a classificação mais usual (Saavedra, 2004).

1.4. Estimulantes do SNC

As drogas que funcionam como estimulantes do SNC, tal como o nome indica, estimulam a atividade do sistema nervoso central, aumentando o estado de vigília, logo

diminuem o sono, aumentam a excitação e aumentam ainda a atividade motora (Canesin, 2008). O uso deste tipo de drogas apresenta como sintomas o aumento da sudorese, aumento da pressão arterial, midríase, aumento da frequência cardíaca e hiperatividade.

Como referido acima, as anfetaminas são exemplos de estimulantes do sistema nervoso central.

1.5. Anfetaminas

As anfetaminas são produtos sintéticos que se assemelham a algumas substâncias naturais. A fenetilamina, produto natural existente em alguns alimentos, quando introduzida no organismo, através da dieta, apresenta poucos ou nenhuns efeitos, pois é rapidamente degradada pela monoamina oxidase (MAO).

A anfetamina (1-metil-2-fenetilamina) é um derivado sintético da fenetilamina, que apenas difere por possuir um grupo metilo – CH₃- associado à cadeia lateral. Esta adição do grupo metilo vai proteger a anfetamina de ser degradada pela enzima MAO, aumentando a capacidade de atravessar as membranas, o que é facilitado pela sua natureza anfipática (Carvalho *et al.*, 2012, e Iversen, 2006). Porém, este grupo metilo pode ser adicionado tanto do lado direito, como do lado esquerdo da cadeia lateral da fenetilamina, o que permite que a anfetamina se possa apresentar sob a forma de dois estereoisómeros. O dextro-isómero é biologicamente mais ativo (D-anfetamina) comparativamente ao levo-isómero (Iversen, 2006).

Este psicoestimulante, usado para tratar diversas patologias, tais como défice de atenção, narcolepsia e obesidade, faz parte de um conjunto de compostos em que, muitos dos quais são constituídos por um anel fenilo ligado a um grupo amina por meio de uma cadeia lateral com dois carbonos com um grupo metilo no primeiro carbono da cadeia lateral (Fleckenstein *et al.*, 2007).

Os derivados anfetamínicos são substâncias compostas pela anfetamina e pelos seus derivados que, quimicamente, apresentam o esqueleto básico da β -fenetilamina e apresentam semelhantes propriedades farmacológicas e são dinamicamente e cineticamente caracterizadas pela facilidade com que atravessam a barreira hemato-encefálica (alta solubilidade lipídica) para resistirem à biotransformação no cérebro e para libertarem neurotransmissores das terminações nervosas. (Carvalho *et al.*, 2012). A esta classe de fármacos designamos anfetaminas (Macedo, 2000). Várias são as alterações da estrutura básica da anfetamina

(Figura 2). Por exemplo, a adição de um segundo grupo metilo ao azoto da cadeia lateral transforma a anfetamina em metanfetamina, que apresenta ações biológicas mais potentes. Novamente, o dextro-isômero é mais potente (Iversen, 2006).

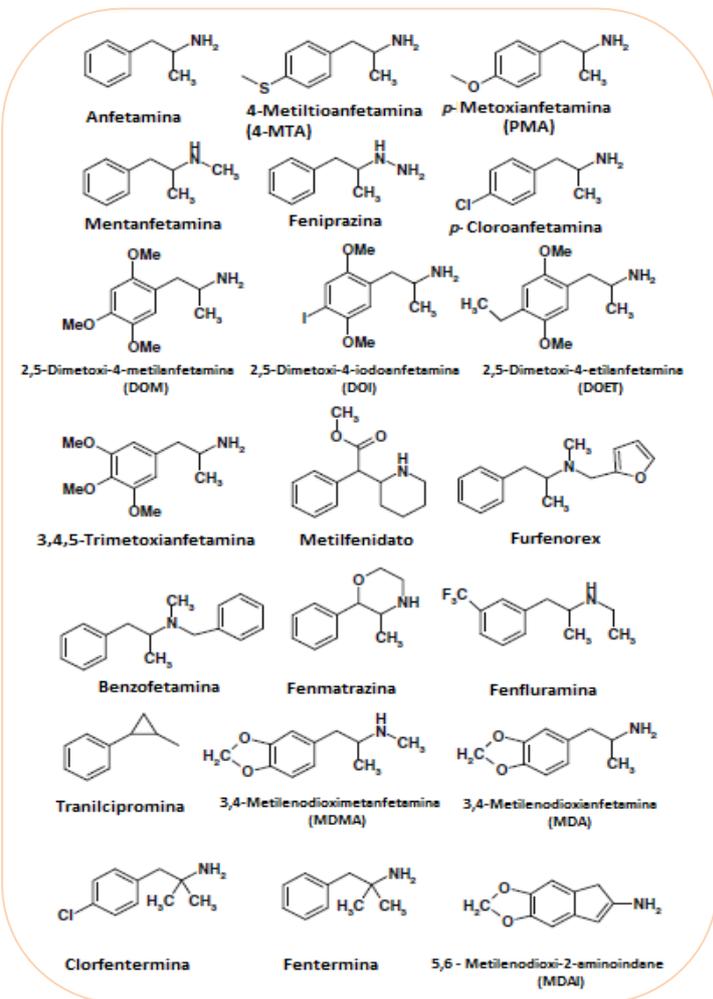


Figura 2. Estrutura química de vários derivados anfetamínicos. (Adaptado de *Toxicity of amphetamines: an update*)

estruturas límbicas do prosencéfalo. No sistema mesolímbico, e em particular no N.Ac. , as substâncias de abuso estimulam a transmissão mediada pela DA, elevando os níveis do neurotransmissor por aumento da sua liberação nas sinapses e ainda, pelo bloqueio da recaptação neuronal. Os aferentes do córtex frontal integram a informação da memória recente nas respostas comportamentais (Macedo, 2000).

As anfetaminas são simpaticomiméticos que atuam a nível central, onde aumentam o nível de catecolaminas nos recetores da dopamina e da noradrenalina (Macedo, 2000).

Para além disso, devido à sua semelhança estrutural com os neurotransmissores monoaminérgicos, as anfetaminas atuam como substratos competitivos na membrana dos transportadores de noradrenalina (NAT), dopamina (DAT) e serotonina (5-HTT), reduzindo a

Tal como várias drogas psicoativas, os derivados anfetamínicos causam dependência, uma vez que produzem um efeito de recompensa, o chamado reforço positivo. Os intervenientes neste reforço positivo são o sistema mesotelencefálico da dopamina (DA), que é crucial para o circuito de recompensa do cérebro. Este sistema tem origem na área do tegumento ventral (ATV) e projeta-se para o *Nucleus Accumbens* (N. Ac.) através do hipotálamo em direção à zona mais frontal do prosencéfalo. Para além disso, este sistema distribui os seus axónios por várias áreas, além do N.Ac. e das áreas pré-frontais do

córtex cerebral, as quais mantêm ligações importantes com as

recaptação de neurotransmissores endógenos, e portanto, a libertação de neurotransmissores não-excitóticos. As anfetaminas provocam, ainda, a libertação da dopamina e serotonina das vesículas e previnem a recaptação para as vesículas, logo, aumentando a concentração citoplasmática dos neurotransmissores e tornando-os mais disponíveis para o transporte reverso (Carvalho, 2012).

A libertação da dopamina pode ocorrer através de dois mecanismos: libertação vesicular, e a libertação mediada pelos transportadores. A libertação da dopamina causada pelas anfetaminas ocorre pelo segundo mecanismo. A este processo dá-se o nome de transporte reverso (Jones, 1998).

1.6. Metanfetamina

A metanfetamina (MA) é um estimulante do SNC, com alguns efeitos terapêuticos, sendo, porém, tremendamente aditiva. Inicialmente a MA produz uma estimulação excessiva do sistema nervoso simpático (SNP), originando hipertensão, taquicardia, dilatação das pupilas, sudorese, taquipneia e hipertermia. Além de euforia, os efeitos desejados incluem um elevado sentido de atenção, aumento de energia, agravada curiosidade, interesse elevado em estímulos ambientais, uma sensação de bem-estar, aumento de produtividade, hipersexualidade, diminuição de ansiedade, aumento de vigília e diminuição de apetite (NIDA, 2006; Homer *et al.*, 2008; Meredith *et al.*, 2005). Estes efeitos podem durar por várias horas, pois a semi-vida da eliminação da MA varia entre 10-12h (Scheppers *et al.*, 2003).

O uso prolongado resulta na depleção de catecolaminas e produz o síndrome de abstinência, marcado principalmente por efeitos psicológicos. Os principais efeitos psicológicos, são depressão, disforia, ansiedade, irritabilidade, melancolia, fadiga, paranoia, delírios e agressão (Meredith, *et al.*, 2005; Homer *et al.*, 2008; Darke *et al.*, 2008).

1.6.1. Nomenclatura

Metanfetamina (C₁₀H₁₅N) (Figura 3) é o nome comum para *N*, α -dimetilfenetilamina. É um derivado anfetamínico e pertence à classe das anfetaminas. A primeira vez que foi sintetizada foi em 1919 no Japão, por Ogata, patenteada em 1920 e licenciada à *Burroughs Wellcome*, que a comercializou como um anorexígeno, a Metedrina® (Logan, 2002). A MA é

popularmente conhecida como *meta*, *ice*, *speed*, *crank*, *crystal*, termos utilizados para preparações ilícitas de MA.

A metanfetamina à temperatura ambiente é um líquido. Assim, é-lhe adicionado um sal para que possa ser administrada por várias vias. Uma das formas é o cloridrato de metanfetamina (C₁₀H₁₆ClN). Este composto apresenta um ponto de fusão entre os 170-175°C, ou seja pode ser facilmente volatilizado sem pirólise, permitindo-lhe ser fumada sob a forma de sal (Logan, 2002).

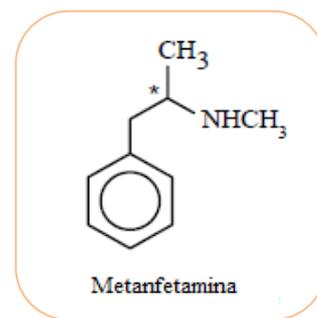


Figura 3. Estrutura química da metanfetamina. (Adaptado de Logan, 2002).

1.6.2. Farmacologia e mecanismos de ação da metanfetamina

A farmacologia da MA é complexa e envolve ações centrais e periféricas. A MA é uma droga simpaticomimética, ou seja, mimetiza neurotransmissores endógenos do sistema nervoso simpático. Os neurotransmissores simpáticos são as catecolaminas adrenalina, noradrenalina e dopamina, cujas estruturas químicas se assemelham à da MA (Logan, 2002).

A MA é um agonista indireto dos recetores de dopamina, noradrenalina e serotonina. Face à sua semelhança estrutural, a MA substitui as monoaminas nos transportadores, nomeadamente no transportador de dopamina (DAT), no transportador de serotonina (5-HTT), no transportador de noradrenalina (NAT) e no transportador vesicular de monoamina (VMAT-2). O VMAT-2 encontra-se incorporado nas vesículas, enquanto o DAT, NAT e 5-HTT são proteínas integrais na membrana celular (Cruickshank *et al.*, 2009).

A MA potencia efeitos ao nível do SNC, que parecem estar relacionados com a libertação de monoaminas das vesículas para os terminais nervosos. Aparentemente, a acentuada libertação da noradrenalina dos neurónios noradrenérgicos é responsável pelos efeitos anoréticos e de alerta das anfetaminas, e juntamente com a libertação da dopamina dos terminais dopaminérgicos é responsável pelos efeitos estimulantes do sistema locomotor. Doses elevadas de anfetaminas, que provocam a libertação de dopamina no sistema mesolímbico e acentuam a libertação da serotonina nos neurónios serotoninérgicos, podem ainda estar relacionadas com distúrbios de perceção. Assim, administrações de altas doses de metanfetamina levam à diminuição dos níveis cerebrais dos neurotransmissores dopaminérgicos e serotoninérgicos, bem como à redução da atividade das enzimas responsáveis pela sua síntese, tirosina hidroxilase (TH) e triptofano hidroxilase (TPH), respetivamente

(Logan, 2002). A longo prazo a MA causa destruição dos terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos pré-sinápticos, e pode causar morte neuronal, causando apoptose (Krasnova *et al.*, 2009).

A MA redistribui as monoaminas, das vesículas para o citosol, através da reversão da função da VMAT-2 e da disrupção do gradiente de pH. A função endógena do DAT, SERT e NAT é alterada, resultando na libertação de dopamina, noradrenalina e serotonina do citosol para as sinapses. Estas monoaminas ficam então disponíveis para estimular os recetores pós-sinápticos. Para além disso, a metanfetamina atenua o metabolismo das monoaminas inibindo a monoamina oxidase (Cruickshank *et al.*, 2009). Os circuitos dopaminérgicos principais do SNC incluem as vias mesolímbica, mesortical e nigroestriatal (Wise, 2004). As regiões noradrenérgicas de particular interesse são encéfalo basal, hipocampo e córtex pré-frontal, que está envolvido nos processos cognitivos.

Vários são os fatores que adicionam complexidade na compreensão dos efeitos dos neurotransmissores sobre as monoaminas: 1) a existência de múltiplos subtipos de recetores para a dopamina, noradrenalina e serotonina, com distintas afinidades, de efeitos dos segundos-mensageiros e diferente distribuição no SNC; 2) a comunicação das vias neuronais entre si; 3) existência de efeitos periféricos (Cruickshank *et al.*, 2009).

Os efeitos periféricos das anfetaminas são mais intensos com os *levo*-isómeros. Efeitos da MA mediados por α -recetores, incluem midríase, contração da bexiga, vasoconstrição coronária e dilatação do músculo bronquial. A ejeção cardíaca aumenta, bem como a pressão arterial e os níveis de glicose no sangue (Logan, 2002).

1.6.3. Farmacocinética da Metanfetamina

1.6.3.1. Vias de administração

A MA pode ser administrada sob diversas formas: ingestão oral (p.o.), injeção intravenosa (i.v.), inalação como vapor ou fumando-a sob a forma de cloridrato de metanfetamina (Carvalho *et al.*, 2012). A semi-vida no plasma é de aproximadamente 10h e os efeitos agudos podem persistir até 8h após uma única dose moderada (Cruickshank *et al.*, 2009).

Tal como acontece com a via intravenosa, fumando MA atinge-se rapidamente o início de ação. A concentração máxima é atingida entre 1h a 2,5h, contra 3h p.o. (Schepers *et al.*,

2003). Também a biodisponibilidade é significativamente maior para MA fumada quando comparada com a administração oral (Carvalho *et al.*, 2012).

1.6.3.2. Distribuição

A distribuição da MA é semelhante à da anfetamina e aparentemente não é influenciada pela via de administração. Num estudo realizado por Volkow (2010), ficou demonstrado que a MA se acumula em diversos órgãos, principalmente pulmões, fígado e em menor grau no cérebro e rins, apresentando, porém, variabilidade inter-individual (Volkow *et al.*, 2010).

1.6.3.3. Metabolização

A metanfetamina é amplamente metabolizada no fígado. A metabolização pode ocorrer via: 1) N-desmetilação para produzir anfetamina, catalisado pela CYP2D6; 2) hidroxilação aromática via citocromo P450 (CYP2D6), produzindo 4-hidroxi metanfetamina; 3) β -hidroxilação para produzir noradrenalina. Numerosos metabolitos são formados a partir destas vias, não contribuindo aparentemente para os efeitos clínicos. A anfetamina, vinda da metabolização de 30mg de MA, atinge níveis plasmáticos inferiores aos da droga ingerida. A metabolização não parece ser alterada com a dosagem (Cruickshank *et al.*, 2009).

1.6.3.4. Excreção

A semi-vida de anfetaminas é, em grande medida, dependente do pH da urina, uma vez que a excreção renal é a principal via de eliminação. Dado que estes fármacos são bases fracas quimicamente, a excreção renal aumenta com a acidificação da urina e diminui com a alcalinização da urina. Por esta razão, existe uma enorme variabilidade na semi-vida da eliminação das anfetaminas e, muitas vezes, os consumidores ingerem bicarbonato para prolongar o efeito da droga. A semi-vida da eliminação parece ser independente da via de administração (Carvalho *et al.*, 2012).

Aproximadamente 70% da dose de MA é excretada na urina dentro de 24 horas após a administração. A metanfetamina é principalmente excretada inalterada (até 50% da dose) e como 4-hidroxi metanfetamina (15%) e anfetamina (10%). A metanfetamina

tem uma semi-vida de eliminação de 25 h e acumula-se na urina com doses repetidas (Cruickshank *et al.*, 2009).

1.7. Neurotoxicidade

A exposição repetida a anfetaminas leva a danos dos axónios dopaminérgicos e serotoninérgicos. Estes mecanismos ainda não são bem compreendidos. No entanto, a seletividade do dano pode ser explicado pela oxidação da dopamina e serotonina citosólica em 6-hidroxi-dopamina e 5,6-dihidroxitriptamina, que podem oxidar proteínas e lípidos nos neurónios ricos em dopamina e serotonina. Os danos neuronais induzidos pelas anfetaminas localizam-se especialmente nos axónios e nos terminais.

A neurotoxicidade associada à MA no estriado está relacionada com sintomas psicóticos, défices de memória e da coordenação psicomotora. Os sintomas psicóticos encontram-se relacionados com a densidade diminuída do DAT no córtex frontal e com a redução da densidade da 5-HTT (Cruickshank *et al.*, 2009).

A neurotoxicidade causada pela metanfetamina pode dever-se a: 1) stress oxidativo (formação de espécies reativas ao oxigénio – ROS), 2) excitotoxicidade 3) disfunções mitocondriais e 4) hipertermia (Sharma *et al.*, 2007; Quinton *et al.*, 2006).

Pensa-se que o aumento excessivo de DA intracelular, provocado pela administração da MA, possa levar à formação de quinonas e espécies reativas ao oxigénio (Michel e Heffi, 1990).

A excitotoxicidade está relacionada com o glutamato, outro neurotransmissor cuja libertação excessiva está associada à morte neuronal. A excitotoxicidade é mediada pelos recetores ionotrópicos e metabotrópicos do glutamato que levam a um aumento dos níveis de Ca^{2+} no interior da célula. Este aumento dos níveis de Ca^{2+} traduz-se na formação de radicais livres e danos no ADN (ácido desoxirribonucleico) (Quinton *et al.*, 2006).

Descobriu-se que a MA causava disfunções mitocondriais, uma vez que inibidores da cadeia transportadora de eletrões na mitocôndria, provocavam aumento nos danos incitados pela MA, e que os substratos da metabolização da energia pareciam atenuar essa toxicidade causada pela MA (Quinton *et al.*, 2006).

Por outro lado pensa-se que a hipertermia está relacionada com a formação radicais livres, pois a hipertermia está associada ao stress oxidativo (Sharma *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 1997).

Outro fator importante relativamente à neurotoxicidade causada pela MA, é o facto de a administração da MA, causar neuroinflamação, tal como qualquer agente agressor ao SNC.

2. Sistema Nervoso

2.1. Breve descrição anatómica

O sistema nervoso divide-se em sistema nervoso central e sistema nervoso periférico. O sistema nervoso central consiste no encéfalo, tronco cerebral e na medula espinhal. Já o sistema nervoso periférico é constituído por nervos sensitivos e motores e sistema nervoso autónomo..

Ao longo desta dissertação vamos focar-nos primeiramente no encéfalo.

O encéfalo é o centro do controlo para as demais tarefas corporais. É constituído pelo tronco cerebral, o cerebelo, o diencéfalo ou cérebro intermédio e o cérebro hemisférico, ou telencéfalo.

O cérebro hemisférico encontra-se dividido em dois hemisférios. Cada hemisfério está dividido em lobos, designados pelos nomes dos ossos onde se situam. A substância cinzenta na superfície exterior do cérebro é o córtex e na profundidade do cérebro, encontram-se os núcleos da base. Entre os núcleos da base e o córtex encontra-se a substância branca, ou centro oval (Seeley *et al.*, 2003).

O córtex, camada que reveste o telencéfalo, apresenta uma estrutura complexa, em que os neurónios estão agrupados em camadas, num total de seis. Cada camada recebe aferências específicas ou dá origem a eferências específicas.

Um dos tipos de neurónio é o piramidal, pois apresenta-se com uma forma triangular (Mackay, 2011). As células piramidais têm dendritos espinhosos apicais e basais que se ramificam nos planos vertical e horizontal, respetivamente. São o neurónio de projeção do córtex (Wong-Riley, 2003). Outro tipo de neurónio é o granular

O córtex tem três pólos: córtex frontal, occipital e temporal (Wong-Riley, 2003). O córtex frontal divide-se em: 1) área motora primária ou córtex motor primário; 2) área pré-motora e 3) córtex pré-frontal. A área motora primária é responsável pela motricidade voluntária, enquanto que a área pré-motora tem como função integrar os atos motores. O

córtex pré-frontal tem como principais funções o planejamento e análise de ações futuras, estando envolvido com o comportamento (Seeley *et al.*, 2003).

O córtex recebe os *inputs* monoaminérgicos através de três vias: 1) via serotoninérgica dos núcleos da rafe na linha média do tronco cerebral; 2) via noradrenérgica do *locus coeruleus*; 3) via dopaminérgica da área ventral tegumental do mesencéfalo (Figura 4). Elas estão envolvidos na atenção, na excitação, no humor, na motivação e em outras funções cognitivas complexas (Wong-Riley, 2003)

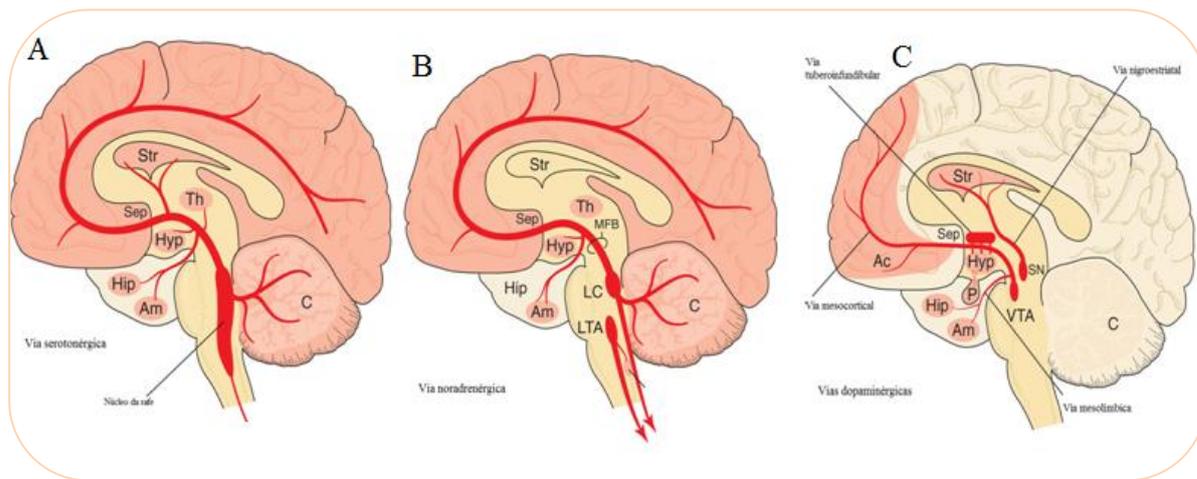


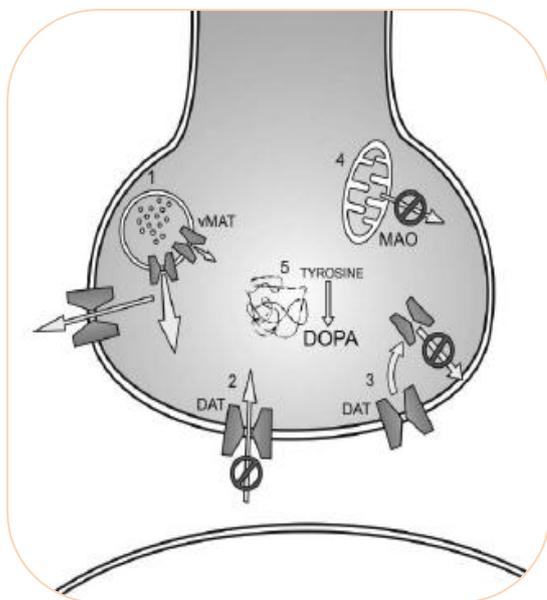
Figura 4. Vias monoaminérgicas: Via serotoninérgica (A), Via noradrenérgica (B) e Vias dopaminérgicas (C). (Modificado de Rang *et al.*, 2012)

2.2. Córtex Frontal – efeitos da metanfetamina

Como referido anteriormente, a metanfetamina é um estimulante do sistema nervoso central que atua mimetizando as monoaminas neurotransmissoras, tais como dopamina, serotonina e noradrenalina. A MA exerce múltiplos efeitos farmacológicos através de diferentes processos moleculares (Barr *et al.*, 2006). A metanfetamina, sendo um composto pertencente à classe das anfetaminas, não apresenta diferenças relativamente à liberação da dopamina no estriado, nas taxas de eliminação ou em qualquer outra propriedade farmacocinética, quando comparada à anfetamina. Porém, a anfetamina produz um aumento maior de liberação de DA no córtex frontal, comparativamente à metanfetamina, logo também causa diferenças na memória e na tolerância comportamental (Sulzer *et al.*, 2005).

Os mecanismos pelos quais a metanfetamina leva ao aumento das monoaminas são: 1) redistribuição das monoaminas das vesículas sinápticas para o citosol; 2) transporte reverso

através de transportadores de membrana plasmática; 3) bloqueio da atividade de transportadores de monoaminas; 4) diminuição dos transportadores de dopamina na superfície celular; 5) inibição da atividade da monoamina oxidase e 6) aumento da atividade e expressão da enzima tirosina hidroxilase (Figura 5) (Barr *et al.*, 2006).



A longo-prazo a MA causa depleções dos níveis de DA, bem como dos seus metabolitos, HVA e DOPAC, acompanhada por alterações que indicam degeneração da terminação neuronal, tal como astrogliose, caracterizada pelo aumento da expressão da GFAP. Também ocorre a diminuição dos níveis de TH e diminuição dos níveis estriatais de serotonina (Quinton *et al.*, 2006). Estes efeitos foram verificados em várias áreas cerebrais, tais como córtex frontal

Figura 5. Mecanismos através dos quais a metanfetamina induz o aumento das monoaminas (especialmente a DA). Redistribuição das monoaminas através das vesículas sinápticas para o citosol (1), bloqueio da atividade dos transportadores das monoaminas (2), diminuição da expressão de transportadores na superfície celular (3), inibição da atividade da MAO (4) e aumento da atividade e expressão da TH (5). (Travassos *et al.*, 2011; O’Callaghan e Miller 1994) e estriado (Pereira *et al.*, 2012; Kitamura *et al.*, 2010; Brennan *et al.*, 2010).

2.2.1. A dopamina

A dopamina é um neurotransmissor cuja distribuição é mais abundante no estriado porém, altas concentrações existem também no córtex frontal. Este neurotransmissor está relacionado com distúrbios cerebrais (esquizofrenia, doença de Parkinson e déficit de atenção), bem como com a dependência a drogas.

A dopamina é sintetizada a partir da conversão da tirosina para dopa, seguindo-se uma descarboxilação para formar dopamina. Após a libertação da DA dos terminais nervosos, ela é amplamente recuperada por um transportador de dopamina – DAT. A sua metabolização é feita através da monoamina oxidase, que a converte em ácido dihidroxifenilacético (DOPAC),

sendo este transformado em ácido homovanílico (HVA) pela catecol-O-metiltransferase (COMT).

As vias dopaminérgicas são: 1) via nigroestriatal, cuja função é o controlo motor; 2) via mesolímbica; 3) via mesocortical, que em conjunto com a via mesolímbica apresentam efeitos comportamentais; 4) via tuberoinfundibular, que tem como função controlo endócrino (Rang *et al.*, 2012)

2.2.2. A serotonina

A serotonina é um neurotransmissor que está envolvido em vários processos fisiológicos tais como, sono, apetite, termorregulação, perceção da dor. Para além dos processos fisiológicos, a 5-HT também está relacionada com a depressão, distúrbios obsessivo-compulsivos, esquizofrenia e abuso de drogas.

A serotonina é sintetizada a partir da conversão do triptofano pela enzima triptofano-hidroxilase em 5-hidroxitriptofano que posteriormente é descarboxilado. Após a sua libertação é recaptada para o neurónio através de um transportador. A sua metabolização é efetuada através da MAO, que a converte em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Rang *et al.*, 2012).

Desta forma, podemos dizer que a MA provoca alterações nos sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos. Essas alterações ocorrem em várias zonas cerebrais.

3. Neuroprotecção

A morte neuronal é uma das forças que moldam o desenvolvimento do sistema nervoso central. Os neurónios estabelecem contacto com os seus alvos e refinam-no durante toda a sua vida. Para alcançarem o objetivo de formarem e manterem a arquitetura funcional dos neurónios, a morte neuronal é cautelosamente regulada durante o desenvolvimento e estritamente mantida sob controlo nos sistemas adultos. Assim, os neurónios que não conseguem manter a maioria das suas conexões sinápticas, não apresentam qualquer vantagem em existirem e por isso são extintos. No sistema nervoso maturo a maioria dos neurónios são células pós-mitóticas e não são facilmente renováveis. Por esta razão, a morte celular nos sistemas nervosos centrais de adultos é um fenómeno bastante mais severo do que

na maioria dos tecidos: o número de neurónios num adulto é dependente da sobrevivência neuronal, e o seu declínio em idades mais avançadas é um evento de extrema importância.

Para além disso o aumento da morte neuronal decorrente de agressões é também um enorme fator de risco nos distúrbios neurodegenerativos e o envelhecimento é outro fator de risco que causa neurodegenerescência (Repici *et al.*, 2007).

O processo neurodegenerativo é caracterizado por uma perda progressiva funcional ou estrutural dos neurónios, levando à morte neuronal. Várias são as vias que levam à morte neuronal, no entanto as vias mais importantes são a necrose, apoptose e a autofagia de células mortas.

Lacovelli *et al* (2006), propuseram que a neurotoxicidade induzida pelas anfetaminas e os distúrbios degenerativos partilham uma série de passos nos seus mecanismos de ação envolvendo o sistema da ubiquitina-proteassoma.

Por exemplo a doença de Parkinson, uma doença neurodegenerativa, apresenta semelhanças com a neurotoxicidade induzida pela metanfetamina, tais como disfunção mitocondrial, excitotoxicidade, neuroinflamação e o stress oxidativo (Schapira e Jenner, 2011; Schapira, 2008; Tansey *et al.*, 2007). O envelhecimento parece estar relacionado com disfunções mitocondriais (Trifunovic *et al.*, 2004).

Podemos então inferir que as mitocôndrias estão intimamente relacionadas com a neurodegeneração.

As mitocôndrias são organelos celulares cuja função é a de converter oxigénio e nutrientes em ATP (adenosina trifosfato – energia) através da fosforilação oxidativa, para a célula. O tecido nervoso pode conter mais de mil mitocôndrias por ser metabolicamente ativo (Seeley *et al.*, 2003). A fosforilação oxidativa é um processo bastante importante à sobrevivência celular, no entanto causa espécies reativas ao oxigénio, logo stress oxidativo. Assim, a formação de ROS através da mitocôndria e a síntese de ATP, estão intimamente ligadas.

Desta forma o termo neuroproteção significa um conjunto de tratamentos cujo objetivo é proteger o tecido nervoso contra eventos celulares adversos induzidos pela redução do fornecimento de oxigénio, de glicose ou de ambos. Os neurónios apresentam uma enorme necessidade de energia par o desempenho das suas funções, no entanto a sua reserva de energia é limitada, pois praticamente que não armazenam substratos energéticos. A falência da energia celular ameaça a sobrevivência das células de três modos: 1) na ausência de reservas adequadas de energia, o metabolismo recorre à glicose anaeróbia, produzindo acidose láctica; 2) a falência de energia causa rutura do equilíbrio iónico, originando maiores concentrações

intracelulares de sódio, cloro e do íon cálcio; 3) as estruturas celulares sofrem um desarranjo devido ao consumo de ATP e aumento da concentração de Ca^{2+} (Sreedhar e Gadhinglajkar, 2003).

Eventos que levam à neurodegenerescência podem ser então travados com o auxílio de agentes neuroprotetores.

1.1. Agentes neuroprotetores farmacológicos

Conhecem-se aproximadamente oitenta categorias de agentes neuroprotetores. Alguns exemplos encontram-se na Tabela 2. Entre elas temos a proteína neuroprotetora de atividade dependente (ADNP), que é uma proteína essencial para o funcionamento cerebral. Providencia neuroproteção contra uma enorme variedade de agressões citotóxicas. Análogos da adenosina são também agentes neuroprotetores, uma vez que a adenosina é um neuromodulador inibitório. Considera-se que a adenosina seja a ligação entre a energia cerebral e a sinalização sináptica. Os anti depressores, que se pensa induzirem a neurogênese, são outra categoria de agentes neuroprotetores farmacológicos (Jain, 2011).

Tabela 2. Exemplos de agentes neuroprotetores (Adaptado de Jain 2011)

Categoria	Exemplos
Anti depressores	Todas as categorias
Agentes anti-inflamatórios	Ácido acetilsalicílico (aspirina); Nimesulida (inibidor COX-2); Antagonistas da Interleucina-1;
Inibidores de apoptose	Dopamina, noradrenalina; lítio; ácidos gordos ômega-3 (DHA);
Antioxidantes	Flavonoides, ácido ascórbico (vit. C), beta-caroteno;
Estimulantes do SNC	Modafinil
Terapia celular	Transplantes celulares: Células estaminais neuronais; células estaminais adultas;
Hormonas e recetores relacionados	Corticosteroides, estrogénios, insulina, progesterona
Inibidores da MAO-A e MAO-B	Lazabemida
Fatores neurotróficos	BDNF; FGF; AGF-1

Para além de agentes neuroprotetores de origem farmacológica, existem outros tipos de agentes neuroprotetores como é o caso da hipotermia e o exercício físico.

4. Exercício físico

O sedentarismo aumenta o risco de grande parte de doenças relacionadas com o envelhecimento, tais como doença cardiovascular, diabetes e cancro. Logo, a prática regular de exercício físico pode reduzir o risco dessas doenças (Mattson, 2000).

Jankowsky e Patterson (1999) mostraram que o aumento de alguns fatores neurotróficos, especialmente o fator neurotrófico derivado cerebral (BDNF), exercem benefícios na plasticidade sináptica e, por isso, facilitam a aprendizagem e memória. Sabe-se também que o exercício físico aumenta os níveis de BDNF (Ollif *et al.*, 1998; Radak *et al.*, 2006), logo beneficia a aprendizagem e memória.

Para além destes benefícios, o exercício físico regular aparenta diminuir os níveis de ROS (Radak *et al.*, 2006). Segundo Radak *et al.*, (2001) o exercício apresenta ainda, efeitos favoráveis na função cardiovascular, função cognitiva, no aumento do crescimento capilar, aumento das conexões dendríticas. Logo existe a sugestão de que o exercício físico poderá promover a função cerebral. O atraso no declínio cognitivo relacionado com a idade e a redução do risco de neurodegeneração são características favoráveis resultantes do exercício, que desempenha um importante papel na depressão (Cotman *et al.*, 2007).

4.1. Efeitos neuroprotetores do exercício físico

Há muito tempo que se sabe que a prática de exercício física é benéfica, pois resulta em diversas adaptações orgânicas, face à exigência metabólica durante o estado de atividade que está aumentada. Essas adaptações melhoram a saúde física e mental do praticante. A atividade física regular é considerada agente stressante e influencia diversos processos corporais através de mecanismos neuro-hormonais que são dependentes do tipo, intensidade, tempo de duração, nível de condicionamento e bio-individualidade (Ferreira *et al.*, 2001).

Mattson (2000) sugere que a prática de exercício físico, associada a outros fatores, como a restrição na dieta e a atividade mental, promovem a atividade neuronal e o stress celular, que levam à produção de fatores neurotróficos e proteínas de stress. Esta produção de fatores neurotróficos desencadeia a proliferação e sobrevivência das células estaminais

neuronal, que por sua vez, provoca resistência ao envelhecimento e a agressões, aumentando a plasticidade sináptica.

A formação de ROS é necessária a processos biológicos, no entanto torna-se potencialmente perigosa se atingir concentrações elevadas (Radak *et al.*, 2004). Estas espécies reativas ao oxigénio e danos oxidativos aos lípidos, proteínas e ADN, pensa-se estarem associados, ou serem causadores do envelhecimento e de várias doenças cerebrais (Mattson, 2002). Sabe-se, no entanto, que a atividade física pode, dependendo da intensidade e duração aumentar a formação de ROS, o que contraria a teoria de que o exercício físico protege contra a neurodegenerescência causada pelas ROS. Porém, Radak *et al.*, 2005 propõe que este efeito paradoxal, se deve ao facto de o exercício físico promover a formação de ROS a um nível que poderá causar danos significativos, mas toleráveis, que poderão por sua vez induzir adaptações benéficas que poderão proteger contra subseqüentes agressões.

Um outro mecanismo pelo qual se pensa que o exercício poderá ser neuroprotetor, deve-se ao facto de o exercício físico potenciar a síntese e libertação de neurotransmissores, como a DA (Meeusen *et al.*, 1997).

Em suma, a prática de exercício físico poderá ser neuroprotetora, na medida em que aumenta os níveis de fatores neurotróficos, aumenta a proliferação de células estaminais neuronais, aumenta os níveis de DA e induz alterações adaptativas relativamente à concentração de ROS.

4.2. Caracterização de modelos animais de exercício

As espécies mais frequentemente utilizadas em estudos de exercício são os ratos e os murganhos, por isso as modalidades de exercício aqui abordadas serão as utilizadas nestas duas espécies de roedores. Os tipos exercício utilizados nestas duas espécies são: a corrida em *treadmill*, a natação e corrida voluntária nas rodas.

A corrida em *treadmill*, consiste numa forma de exercício induzido, tal como a natação, estes tipos de exercício causam stress. Já a corrida voluntária em roda, tal como o nome indica é uma forma de exercício voluntário. A corrida em *treadmill* apresenta vantagens relativamente aos outros dois tipos de exercício (natação e corrida voluntária nas rodas), pois permite ao investigador controlar minuciosamente o nível de esforço e torná-lo uniforme para todos os animais em estudo. Para além disso, tanto a duração da sessão, como a intensidade de exercício podem ser manipuladas. Um grande inconveniente no uso desta modalidade de

exercício prende-se com o facto de os animais serem manipulados pelo investigador, causando stress e o uso de estímulos aversivos para os encorajar a correr. Por outro lado, também o preço do *treadmill* torna-se uma desvantagem, relativamente à natação que é a modalidade menos dispendiosa. Esta modalidade, requer a vigilância constante do investigador, assim como a natação.

A natação apresenta desvantagens, sendo que a principal prende-se com o facto de o investigador ter que estar sempre atento a comportamentos não-natatórios (flutuar), bem como a afogamentos, para além disso investigadores defendem que pela natação não existe consenso relativamente ao ponto de exaustão do animal.

Quanto à corrida voluntária em roda, a grande vantagem que apresenta é que o animal se exercita quando quer e à velocidade que escolher. Apresenta ainda a vantagem de que o investigador não necessita estar presente, caso exista um sistema de monitorização (Kregel *et al.*, 2006).

4.3. Impacto do exercício físico no córtex frontal

Como referido anteriormente, o exercício físico promove o aumento de fatores neurotróficos, especialmente o BDNF, que parece estar relacionado com a aprendizagem e memória (Ollif *et al.*, 1998; Radak *et al.*, 2006).

Após a prática de atividade física existe uma diminuição da atividade cortical frontal (Schneider *et al.*, 2013).

Kleim *et al.*, 2002 mostraram que após o exercício existe um aumento dos vasos sanguíneos que poderá induzir angiogénese no córtex motor.

Merino *et al.*, 2001, verificaram um aumento nos níveis de 5-HT com a prática de exercício intenso no córtex frontal.

II. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo identificar um possível efeito neuroprotetor sobre os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico corticais da prática de exercício físico em *treadmill*, recorrendo-se para o efeito a um modelo de neurotoxicidade, induzida pela administração de uma única injeção de metanfetamina (30mg/kg) em murganhos C57BL/6.

Com o intuito de atingir tal objetivo geral, foram elaborados os seguintes objetivos específicos, em animais com ou sem um programa de treino estruturado de exercício físico, sendo posteriormente tratados com metanfetamina:

- ❖ Avaliação da expressão de proteína glial fibrilar ácida - GFAP (marcador astrocitário) e da expressão da tirosina hidroxilase – TH (marcador de neurónios dopaminérgicos), recorrendo ao método *Western Blot*;

- ❖ Quantificação dos níveis da dopamina, e seus metabolitos, e da serotonina, através da técnica de HPLC-ED (*high performance liquid chromatography with electrochemical detection*);

Assim, e de acordo com o supracitado, o principal objetivo deste estudo foi delinear uma estratégia de proteção contra a neurotoxicidade através da prática do exercício físico em *treadmill*.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Neste estudo foram utilizados 24 murganhos machos, de estirpe C57BL/6, com 12 semanas, provenientes de Charles River Laboratories Inc. (Barcelona – Espanha). Esta estirpe foi selecionada relativamente a outras pois estes animais são facilmente manipuláveis e apresentam facilidade na adaptação ao treino em *treadmill* (De Lira *et al.*, 2008).

Também o facto de serem jovens foi relevante, pois sabe-se que ratinhos jovens apresentam um melhor desempenho físico comparativamente aos de mais idade (Pagala *et al.*, 1998).

Os animais foram divididos por 4 gaiolas e mantidos sob condições ambientais controladas no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Humidade, $50 \pm 10\%$; Temperatura $21 \pm 1^\circ\text{C}$; Ciclo de luz, 12/12horas – 8h às 20h). A água e a ração foram fornecidas *ad libitum*. Os murganhos passaram por um período de adaptação ao biotério, onde foram mantidos durante 3 dias, antes de se dar início ao procedimento experimental.

O processo experimental foi realizado em conformidade com as orientações da Comunidade Europeia (86/609/CEE), bem como, com as Normas Técnicas de Proteção dos Animais Utilizados para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos (Portaria nº 129/92, 6 de Julho). Foram efetuados todos os esforços para minimizar o sofrimento animal e para reduzir o número de animais utilizados.

2. *Treadmill* / Tapete rolante

Neste procedimento foram usados dois *treadmills* (modelos LE8700 e LE 8706, Panlab, s.l., Barcelona, Espanha) com algumas adaptações, uma vez que estes modelos são apropriados para ratos e não para murganhos. Assim, dividimos cada

corredor ao meio com uma placa de acrílico, o que tornou possível que onde originalmente corria um rato pudessem



Figura 6. *Treadmills* utilizados neste estudo (Fotografia obtida no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

correr dois murganhos. Os *treadmills* apresentavam assim 6 corredores, possibilitando todos

os animais do mesmo grupo correrem simultaneamente. A divisão dos corredores foi efetuada de forma a que os murganhos tivessem espaço suficiente para se movimentarem, sem tocarem nas paredes do *treadmill*.

3. Protocolo experimental

3.1.Divisão dos Animais

Os murganhos foram divididos aleatoriamente por quatro grupos: 1) Controlo - Salino + Sedentário (SAL + SED); 2) Metanfetamina + Sedentário (MA + SED); 3) Salino + Exercício (SAL + EX) e 4) Metanfetamina + Exercício (MA + EX).

3.2. Adaptação ao *treadmill*

Os murganhos pertencentes aos grupos do exercício (SAL + EX e MA + EX) passaram por um período de adaptação ao *treadmill*, cujo principal objetivo foi prepará-los para o protocolo de exercício. Porém, este período permitiu ainda minimizar o stress dos animais que poderia interferir com o desempenho do exercício. Desta forma os animais foram adaptados ao ambiente envolvente do *treadmill* (De Lira *et al.*, 2008).

Assim, durante duas semanas (cinco dias por semana), os murganhos foram sendo submetidos a treinos com dificuldade crescente até atingirem a velocidade e o tempo utilizado no protocolo de exercício.

Período de Treino/Adaptação ao Treadmill													
TR1	TR1	TR2	TR2	TR2	D	D	TR3	TR3	TR3	TR4	TR4	D	D

Legenda:

- Tr1: Velocidade – 20 cm/seg; 20 minutos
- Tr2: Velocidade – 20 cm/seg - 5 minutos; 25 cm/seg - 20 minutos; 20 cm/seg – 5 minutos
- Tr3: Velocidade – 20 cm/seg – 5 minutos; 30 cm/seg – 20 minutos; 20 cm/seg – 5 minutos
- Tr4: Velocidade – 20 cm/seg – 5 minutos; 30 cm/seg – 30 minutos; 20 cm/seg – 5 minutos
- D – Descanso;

Figura 7. Protocolo de adaptação ao *treadmill*.

De cada vez que os animais eram colocados no aparelho, o mesmo encontrava-se desligado. Apenas, após os animais estarem colocados no aparelho, o tapete rolante era ligado à velocidade mínima (5cm/seg). Desta forma, a velocidade iria aumentando gradualmente (cerca de 1cm/seg, por segundo) até atingirmos a velocidade pretendida. Também após os animais correrem o tempo pretendido a velocidade ia sendo diminuída gradualmente até à velocidade mínima do aparelho e só então o *treadmill* era desligado. Este procedimento evitava lesões, pois consistia num pequeno aquecimento antes do exercício/treino e num arrefecimento após o mesmo (Petzinger *et al.*, 2007, Gorton *et al.*, 2010).

3.3. Protocolo de Exercício

Após o período de adaptação ao *treadmill*, os animais dos grupos SAL + EX e MA + EX foram submetidos a cinco dias de exercício por semana durante oito semanas. O exercício foi feito no período das manhãs e sempre à mesma hora. Os animais foram colocados em número de seis (um grupo de cada vez) nos *treadmills*. Assim, os grupos do exercício foram submetidos a um treino diário, de acordo com o seguinte: 1) 5 minutos de aquecimento a 20cm/seg, 2) corrida durante 30 minutos a 30cm/seg, e 3) 5 minutos de arrefecimento a 20cm/seg. A inclinação do *treadmill* foi sempre 0%. Os murganhos foram estimulados manualmente. Os choques elétricos não foram usados como reforço negativo, pois estes teriam acrescentado stress, que não é normalmente associado com o exercício (Rosa *et al.*, 2008).

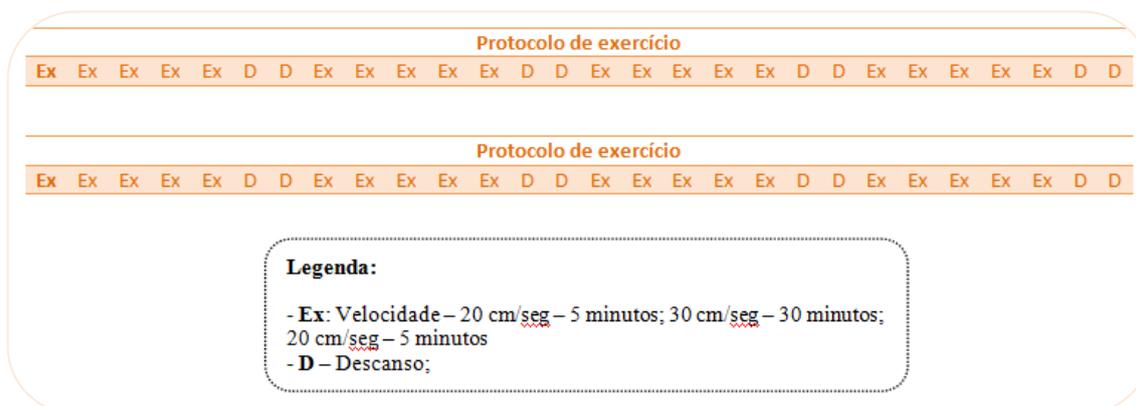


Figura 8. Protocolo de exercício para os animais dos grupos SAL + EX e MA + EX.

Os animais pertencentes aos grupos sedentários correram apenas uma vez por semana, durante 10 minutos à velocidade mínima. Desta forma os animais foram também,

manipulados, expostos ao barulho do motor, à vibração, à textura do tapete rolante e à privação de água e comida durante o período de corrida.

Após cada sessão de exercício os animais foram cuidadosamente inspecionados, com o objetivo de pesquisar algum tipo de lesão física subjacente ao exercício como, por exemplo, hemorragias, diarreias ou comportamentos anormais, que eventualmente pudessem interferir com os resultados. Nenhum animal foi excluído por causa destes problemas.

No fim do protocolo de exercício os animais repousaram um dia antes da administração do fármaco.

3.4. Administração da metanfetamina

Neste estudo o fármaco utilizado foi a metanfetamina. Foi-nos dada permissão para importar o clorohidrato de metanfetamina, que foi adquirido através da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), pelo INFARMED, Portugal (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.). Foi então preparada a solução de metanfetamina para administrar aos murganhos com uma concentração de 3mg/ml.

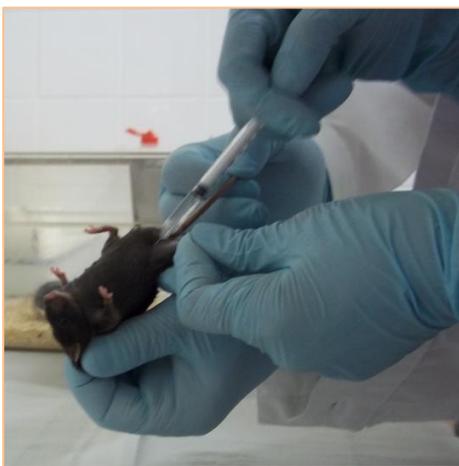


Figura 9. Administração intraperitoneal do fármaco (Fotografia obtida no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Os murganhos pertencentes aos grupos da metanfetamina (MA + EX e MA + SED) foram pesados e os seus pesos foram registados. Após pesagem, os animais foram administrados com uma única injeção intraperitoneal de metanfetamina (30mg/kg), pois sabe-se que esta dose é neurotóxica (Travassos *et al.*, 2011).

Relativamente aos animais dos grupos da solução salina (SAL + SED e MA + SED), seguiram o mesmo procedimento à exceção da administração do fármaco.

A estes grupos foram administrados 250µl de uma solução salina (NaCl 0,9%).

Após a injeção de todos os animais, os mesmos foram sendo observados às 0h, às 1h e às 3h após injeção.

3.5. Sacrifício dos animais e isolamento do córtex frontal

Três dias após a injeção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados. Os cérebros foram rapidamente removidos e dissecados em gelo. Procedeu-se ao isolamento do córtex frontal com base nas coordenadas descritas para o cérebro do murganho (Paxinos e Franklin, 2004). As amostras foram imediatamente congeladas em azoto líquido e guardadas a -80°C até serem usadas. As áreas do hemisfério esquerdo foram utilizadas para a avaliação da expressão das



Figura 10. Isolamento do córtex frontal (Fotografia tirada no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

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 –ED) (Travassos *et al.*, 2011).

4. Quantificação da expressão de TH e 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 foi homogeneizado em 400 μl 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 (1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mM ditiotretol (DTT), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ quimostatina, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antipaina, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatina A (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal)). A mistura de inibidores de proteases foi adicionada ao tampão de lise imediatamente antes de usar. O tecido foi homogeneizado por ultra-sons (3pulsos de 15segundos). 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°C . A concentração de proteína total foi determinada através do método de ácido bicinonínico (BCA - ThermoScientific®) (Smith *et al.*, 1985).

As amostras foram desnaturadas por fervura a 95°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 geles de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de lauril sulfato de sódio (SDS) de acordo com Laemmli (1970). Os geles de separação foram preparados com 10 % de Bis acrilamida. Na electroforese usou-se um tampão com Tris base 125 mM, glicina 100 mM e SDS 0,5 % (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 μm , Millipore*) previamente ativadas em metanol, por electrotransferência. A transferência ocorreu durante 90min a 110V, em gelo. A composição do tampão usado na electrotransferência foi a seguinte: CAPS



Figura 11. Electrotransferência (Fotografia tirada no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

100mM, pH 11; metanol 20 % (v/v). Depois da transferência, as membranas foram bloqueadas com soluções 5 % (m/v) de leite magro em PBS-T [(Tween 20 0,1 % em tampão fosfato (NaCl 136,8mM, KCl 2,6mM, Na₂HPO₄.2H₂O 12,7mM e KH₂PO₄ 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* -) 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°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 respetivo anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (Tabela 2) 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 detetor *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- β -tubulina ou anti-GAPDH para TH e GFAP, respectivamente.

A densidade relativa de cada banda foi normalizada contra o da β -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.

Tabela 3. Anticorpos primários e secundários utilizados na análise por *Western Blotting*

ANTICORPOS	PESO MOLECULAR (kDa)	LOADING (μ 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- β -Tubulin	55	-	1:20000	T7816	Sigma Life sciences
Goat anti-mouse	-	-	1:5000	A 3582	Sigma Life sciences

5. Determinação dos níveis de monoaminas e dos seus metabolitos por HPLC-ED

Para a quantificação dos níveis de DA, dos respetivos metabolitos – DOPAC e HVA e da 5-HT, 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 inclui uma bomba Gilson (modelo 307), um auto-injetor Gilson (modelo 234; *loop* 50 μ l), um detetor Gilson (modelo 142) e *software* v5.11.

Após o sacrifício dos animais e concluída a colheita da região cerebral em estudo – o córtex frontal- as amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,2 M. Os homogeneizados foram centrifugados (13.000 rpm durante 7 minutos, 4^o C) e filtrados com microfiltros 0,22 μ m Nylon (Spin-X® Centrifuge Tube Filter, Costar) a 10.000 rpm, durante 4 minutos (4^o C). Os pellets foram ressuspensos em NaOH 1M e utilizados para a quantificação da

proteína, por método BCA e leitura pelo método ELISA. Os sobrenadantes e os pellets foram armazenados a -80°C .



Figura 12. 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).

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), trietilamina (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 3.

Tabela 4. Tempos médios de retenção das monoaminas.

Monoaminas	Tempo médio de retenção (minutos)
DOPAC	6,69
DA	9,03
HVA	16,4
5-HT	25,3

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. Processamento dos dados e análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão da média (EPM) e a significância estatística foi avaliada pelo *one-way analyses of variance* (ANOVA) seguido pelo *post-hoc Bonferroni multiple comparison* (GraphPad Prism 5.00.288) e pelo teste *t*-

student não emparelhado em que *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ e ***, $p < 0.001$ e #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$ e ###, $p < 0.001$ comparando com o grupo controle (SAL + SED). .

IV. RESULTADOS

1. Níveis corticais de dopamina (DA), dos seus metabolitos (DOPAC, HVA) e expressão de TH

A figura 13 ilustra os teores de DA, DOPAC, HVA e TH do córtex frontal dos 4 grupos experimentais sacrificados três dias após a administração do fármaco em estudo, sequencialmente ao exercício físico.

A MA provocou uma depleção significativa de DA relativamente ao grupo controlo (SAL + SED) nos grupos sedentários. O exercício físico não preveniu esta diminuição dos teores totais corticais de DA. Com efeito, essa depleção é visível tanto no grupo MA + SED ($\approx 60\%$) como no grupo MA + EX ($\approx 75\%$). O exercício não provocou alterações nos teores de DA no grupo salino. De forma consistente, a MA também induziu depleções nos níveis corticais dos metabolitos da DA (DOPAC e HVA). Relativamente ao DOPAC houve depleção deste metabolito no córtex frontal nos grupos sedentário e submetidos a exercício injetados com metanfetamina (MA + SED e MA + EX; 30% e $\approx 50\%$, respectivamente), em relação ao grupo controlo (SAL + SED). O exercício físico produziu um aumento estatisticamente significativo dos teores totais no grupo SAL + EX, quando comparado com o controlo (SAL + SED, $\approx 27\%$). Finalmente, quanto aos níveis de HVA, também se observou uma diminuição estatisticamente significativa dos teores totais deste metabolito pós-sináptico nos dois grupos administrados com MA, relativamente ao controlo (SAL + SED): o grupo MA + SED apresentou uma depleção de $\approx 38\%$ e o grupo MA + EX apresentou uma depleção de $\approx 62\%$. O exercício físico não provocou alterações nos teores de HVA no grupo salino. O exercício físico não só não preveniu a ação neurotóxica da metanfetamina nos terminais dopaminérgicos como ainda potenciou esta ação deletéria. De facto os valores da DA e dos seus metabolitos no grupo MA + EX são significativamente menores do que os valores obtidos nos animais em repouso.

A MA provocou uma depleção significativa de tirosina hidroxilase (TH), relativamente ao grupo controlo (SAL + SED) nos grupos sedentários. O exercício físico não preveniu esta diminuição dos teores totais corticais de TH. Com efeito, esta subregulação é visível tanto no grupo MA + SED (28 %) como no grupo MA + EX (35%).

É interessante constatar que o exercício físico apresenta uma tendência para provocar a subregulação da TH ($p > 0,05$).

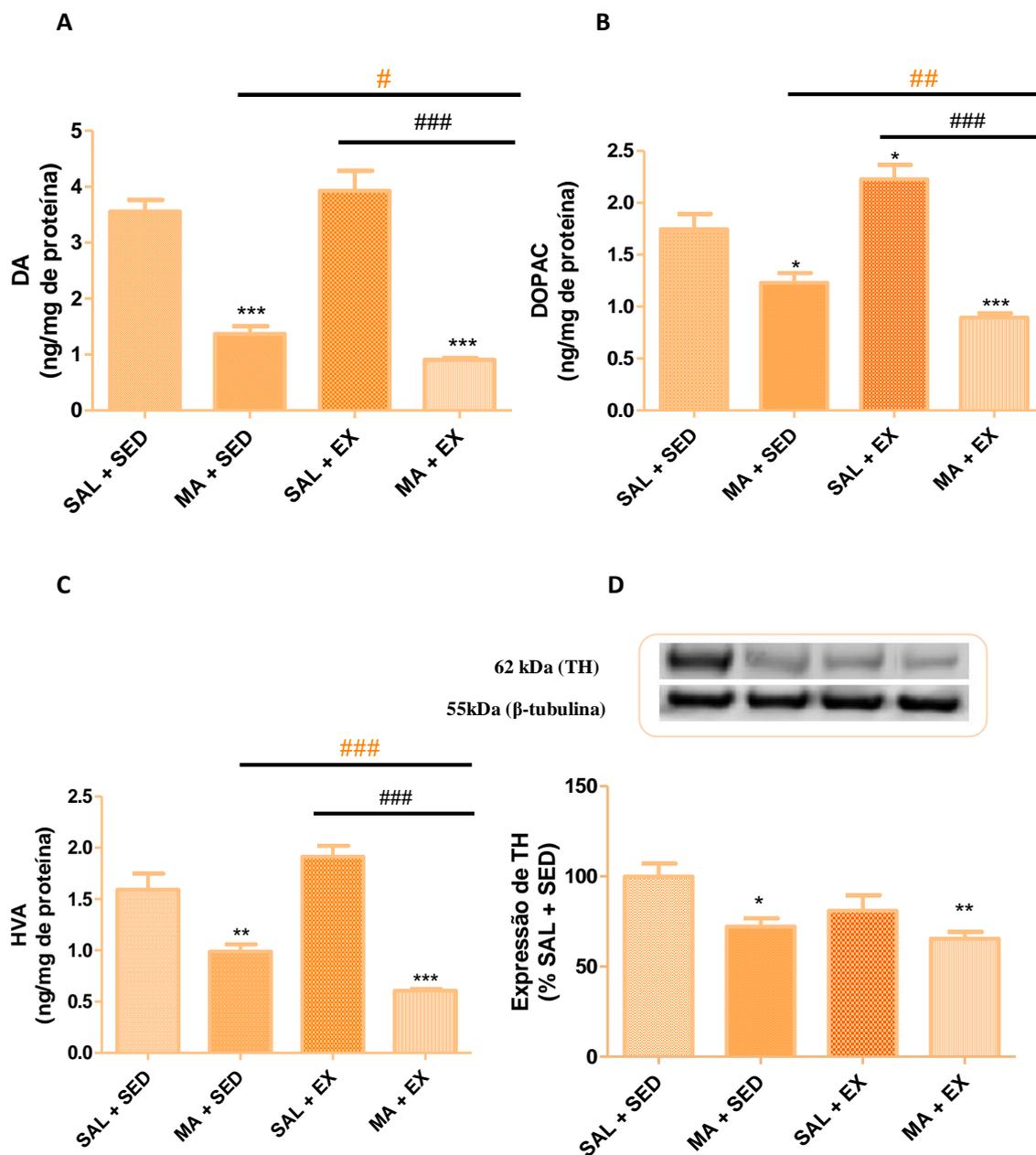


Figura 13 – Efeito da administração da MA (30mg/Kg) e/ou exercício físico nos níveis corticais, totais de DA (A), seus metabolitos, DOPAC (B) e HVA (C) e expressão de tirosina hidroxilase (TH) (D). Os animais controlo (SAL) foram injetados com NaCl 0,9%. Os animais foram sacrificados três dias após a administração de MA e 48horas 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 β-tubulina foi utilizada como controlo de *loading*. Os resultados são apresentados como a média (% SAL + SED) ±EPM (n=4-6). Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison*, em que *, p<0,05; **, p<0,01; ***,###, p<0,001 e o teste *t-student*, em que # ,p<0,05; ##, p<0,01 e ###, p<0,001.

2. Níveis corticais totais de 5-HT

A MA produziu depleção dos níveis totais de serotonina no córtex frontal nos grupos sedentário e submetido a exercício relativamente ao grupo controlo (SAL + SED) (Fig. 14). Verificou-se ainda um aumento significativamente estatístico dos níveis totais de 5-HT do grupo SAL + EX ($\approx 90\%$), relativamente ao grupo controlo (SAL + SED). Quando comparados os grupos do exercício (SAL + EX e MA + EX), verifica-se uma diminuição estatisticamente significativa dos níveis de 5-HT no grupo da MA ($\approx 65\%$) relativamente ao grupo injetado com soro fisiológico.

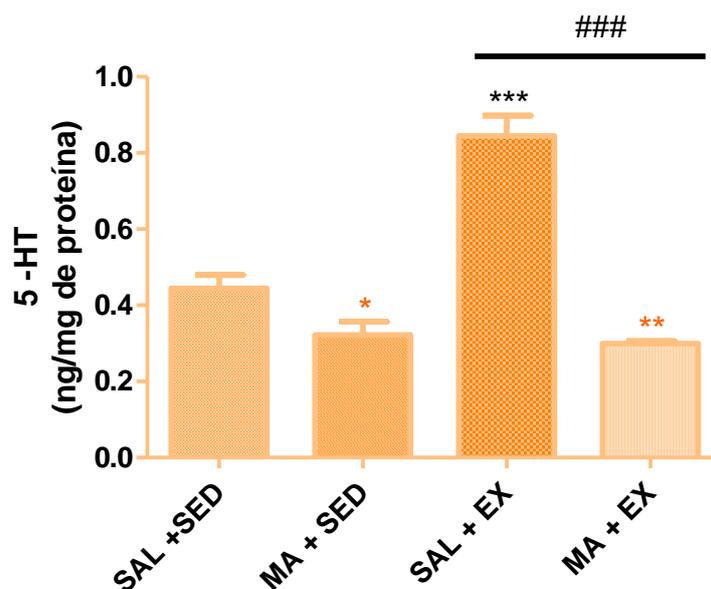


Figura 14. Efeito da administração da MA (30mg/Kg) e/ou exercício físico nos níveis corticais, totais de 5-HT. Os animais controlo (SAL) foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi executado três dias após a administração da MA e 48h após o *terminus* do protocolo de exercício. Os níveis de 5-HT foram determinados por HPLC. Os valores são apresentados com a média (% SAL + SED) \pm EPM (n=6). Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison*, em que ***,###, $p < 0,001$ e o teste *t-student*, em que *, $p < 0,05$ e **, $p < 0,01$.

3. Expressão da proteína GFAP

A MA, por si só, não produziu alterações nos níveis de GFAP no córtex frontal relativamente ao controlo. Porém, no grupo MA + EX existe um aumento significativo dos níveis desta proteína ($\approx 50\%$), quando comparado com os restantes grupos (animais injetados com soro fisiológico – SAL + SED e SAL + EX e animais sedentários injetados com MA - MA + SED) (Figura 13).

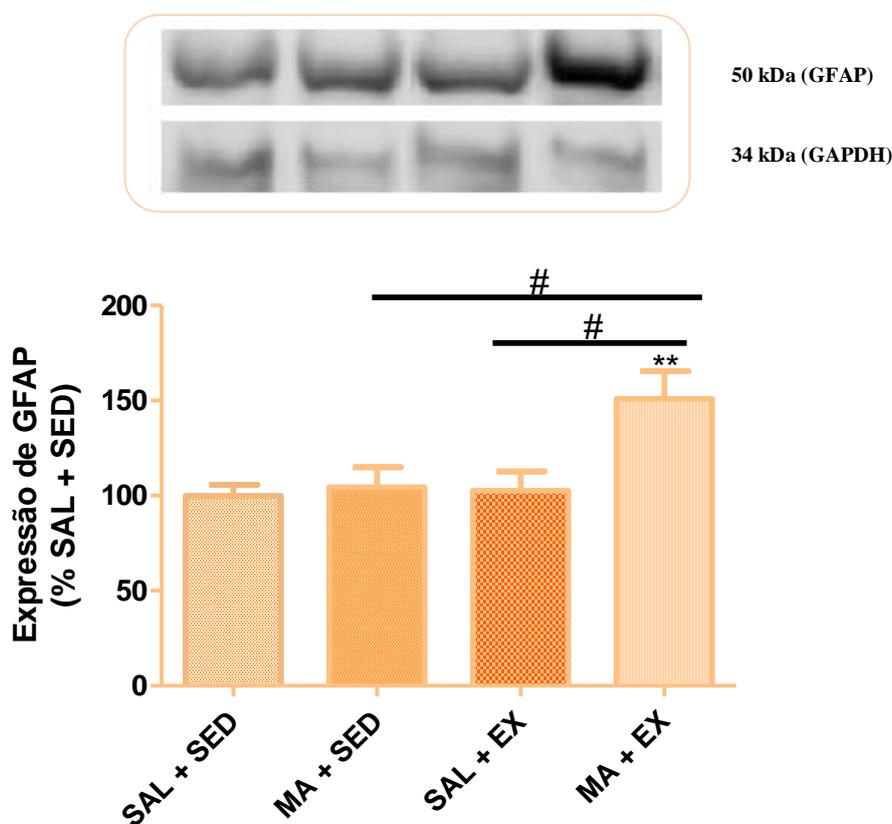


Figura 15. Efeito da administração da MA (30mg/Kg) e/ou exercício físico nos níveis corticais, de GFAP. Os animais controlo (SAL) foram injetados com NACl 0,9%. Os animais foram sacrificados ao terceiro dia após a administração do fármaco. Os níveis de GFAP (50kDa) foram analisados por *Western Blot*. O GAPDH (34kDa) foi utilizado como controlo de *loading*. As bandas representativas do GFAP e do GAPDH encontram-se em representadas cima e a quantificação dos resultados é apresentada em baixo. As barras verticais representam a média (% SAL + SED) \pm EPM n=6. A análise estatística foi feita pelo teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc Bonferroni multiple comparison*, em que #, $p < 0,05$ e **, $p < 0,01$.

V. DISCUSSÃO

A metanfetamina (MA, numa única administração de uma dose elevada ou administrações repetidas – 4 x), induz neurotoxicidade em regiões dopaminérgicas e serotoninérgicas como o córtex frontal e o estriado:, , a depleção a longo prazo de marcadores dopaminérgicos e serotoninérgicos são sugestivos dedegeneração dos terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos (Kitamura, et al 2010; LaVoie *et al.*, 2004).

Embora estes mecanismos não estejam ainda bem elucidados, pensa-se que o stress oxidativo associado à DA apresenta um papel preponderante na neurotoxicidade induzida pela MA. Por exemplo, foi sugerido que e a dopamina gera espécies reactivas de oxigénio bem como quinonas, marcadores de stress oxidativo (LaVoie, *et al.*, 2004). A excitotoxicidade, bem como a hipertermia também estarão implicadas nesta neuropatologia causada pela metanfetamina. No entanto, surgem provas recentes de que as células da glia também apresentam aqui um papel importante. Desta forma, a indução de neurotoxicidade pela MA não se foca apenas em eventos intra-neuronais, mas resulta de uma resposta multicelular (LaVoie *et al.*, 2004). Embora estes mecanismos não estejam ainda bem elucidados, pensa-se que o stress oxidativo associado à DA apresenta um papel preponderante na neurotoxicidade induzida pela MA. Por exemplo, foi sugerido que a dopamina gera espécies reativas de oxigénio bem como quinonas, marcadores de stress oxidativo (LaVoie, *et al.*, 2004). A excitotoxicidade, bem como a hipertermia também estarão implicadas nesta neuropatologia causada pela metanfetamina. No entanto, surgem provas recentes de que as células da glia também apresentam aqui um papel importante. Desta forma, a indução de neurotoxicidade pela MA não se foca apenas em eventos intra-neuronais, mas resulta de uma resposta multicelular (LaVoie *et al.*, 2004). Os astrócitos são sensíveis aos danos induzidos por neurotóxicos no SNC, desempenhando um papel crucial nos processos de lesão/reparação neuronal (Barres *et al.*, 2008). O nosso grupo bem como outros autores mostraram que um aumento dos níveis da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a proliferação de astrócitos reativos (sugestivos de astrogliose) são induzidos pela administração de uma dose neurotóxica de MA em roedores (Cappon *et al.*, 2000; Fukumura *et al.*, 1998; O’Callaghan e Miller, 1994; Pereira *et al.*, 2012; Pubill *et al.*, 2003).

Estudos anteriores demonstraram que a prática de exercício poderá ser usada como estratégia protetora de doenças neurodegenerativas, pois induz neurotrofinas, principalmente o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), que modulam a sobrevivência e plasticidade neuronal (Cechetti *et al.*, 2008). Por exemplo, O’Dell (2012) mostrou que a

diminuição dos níveis estriatais de TH e de DA induzida por MA, foi parcialmente prevenida/revertida com o exercício voluntário em ratos.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito neuroprotetor do exercício físico no sistema cortical dopaminérgico e serotoninérgico de murganhos submetidos a uma dose neurotóxica de metanfetamina. Desta forma, avaliou-se a homeostasia de dopamina (DA e seus metabolitos e expressão da TH), a astrogliose (expressão de GFAP), bem como o sistema serotoninérgico (5-HT) no córtex frontal de animais injetados com 30 mg/kg de metanfetamina e previamente submetidos a um protocolo de exercício físico.

Após a administração da MA, verificou-se que os murganhos apresentaram uma hiperatividade inicial seguida por uma fase de hipoatividade, quando comparados com os grupos salinos. Tal é consistente com a descrição apresentada por Grace *et al.*, (2010). Os animais injetados com MA também apresentaram comportamentos estereotipados, principalmente mastigar, circular e trepar. Estes comportamentos foram também observados por Atkins *et al.*, 2001.

A administração de MA em animais sedentários induziu depleção da DA e dos seus metabolitos (DOPAC e HVA), bem como uma diminuição dos valores da TH (Figura 13). Sabe-se que a diminuição destes marcadores dopaminérgicos reflecte degenerescência dos terminais dopaminérgicos. Este dano é um achado característico da neurotoxicidade induzida pela metanfetamina (Kelly *et al.*, 2012). Estes resultados, comprovam que uma única injeção de alta dose (30mg/kg) de MA, causa neurodegeneração dopaminérgica no córtex frontal sendo consistentes com os resultados de outros autores (Fantegrossi *et al.*, 2008; Bowyer *et al.*, 1994; O'Callaghan and Miller, 1994).

Também nos grupos submetidos a exercício verificámos que a MA produziu uma depleção dos níveis desta catecolamina e dos seus metabolitos, bem como da TH. Estes resultados levam-nos a anunciar que este protocolo de exercício não atuou como neuroprotetor. Aliás, pode inclusivamente afirmar-se que o exercício potenciou a ação neurotóxica da MA tal como evidenciado pelo facto dos valores de DA, DOPAC, HVA no grupo MA+EX serem mais baixos do que aqueles obtidos no grupo MA+SED. O facto de o exercício não ter sido neuroprotetor pode ter a ver com o facto de ter sido efetuado no período diurno. Com efeito, durante este período os animais estão menos activos. Adicionalmente o protocolo pode ainda ter sido de curta duração ou por ter sido induzido – fator indutor de stress.

A resposta ao stress, que se caracteriza por uma ativação aguda do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), é um fator crítico no treino físico,

condicionando o desenho de protocolos de exercício. Com efeito, a ativação crónica ou prolongada da resposta ao stress, pode adversamente afetar o bem-estar animal e confundir a interpretação das variáveis em estudo. A título de exemplo, a estimulação crónica e prolongada do sistema nervoso simpático e do eixo HPA, induz dano em algumas áreas cerebrais (Sapolsky *et al.*, 2000).

Embora a MA seja primariamente vista como uma neurotoxina da DA, este psicoestimulante também causa danos noutros perfis monoaminérgicos, nomeadamente a serotonina (Pereira *et al.*, 2012). No entanto, ainda não existe um consenso no que diz respeito aos estudos com roedores, ao nível das alterações serotoninérgicas. Por um lado, Fumagalli *et al.*, (1998) demonstraram uma depleção do nível de 5-HT tanto no estriado como no hipocampo de murganhos, por outro Grace *et al.*, (2010) não obtiveram depleções significativas nos níveis de 5-HT no neostriado de murganhos. Friedman *et al.*, (1998) mostraram depleções dos níveis da 5-HT no córtex frontal de ratos, enquanto que O'Callaghan e Miller (1994) mostraram depleções dos níveis desta indolamina no córtex frontal de murganhos. Como se observou na Figura 12, a MA provocou depleção dos níveis de 5-HT, nos grupos MA + SED e MA+EX, quando comparado com os controlos adinstrado com soro fisiológico. Tais resultados são consistentes com os resultados de O' Callaghan e Miller (1994). No entanto, é interessante realçar que o exercício físico aumentou cerca de 90% os níveis de 5-HT relativamente ao controlo (SAL+SED). Isto é consistente com a literatura que sugere que o exercício físico prolongado causa aumentos nos níveis desta monoamina no córtex frontal (Wilson e Marsden, 1994). Os astrócitos apresentam inúmeras funções tais como: 1) dão suporte aos neurónios; 2) ajudam na regulação da barreira hematoencefálica; 3) dão protecção aos neurónios; 4) promovem a plasticidade sináptica; 5) coordenam a actividade neuronal via comunicação directa com os neurónios e 6) são consideradas as células-tronco do cérebro. Assim, vários tipos de dano do SNC, levam a uma reacção glial com elevada expressão do GFAP (Middeldorp e Hol, 2011). Para além dos danos nos terminais dopaminérgicos, outra característica da neurotoxicidade induzida pela metanfetamina é a indução da astrogliose (Kelly *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012). Uma das áreas cerebrais onde a neurotoxicidade da metanfetamina é mais pronunciada é no estriado, porém também no córtex frontal estão documentados danos (Kelly *et al.*, 2012). No entanto, os astrócitos corticais aparentam ser mais resistentes à neurotoxicidade induzida pela MA (Lau *et al.*, 2000). Segundo Morgan *et al.*, (1997), perante lesões cerebrais o aumento da expressão do GFAP encontra-se relacionado com o stress oxidativo. Desta forma, não existiu um aumento nos níveis da expressão do GFAP no grupo MA + SED, o que pode ser

justificado com o facto de o córtex ser uma zona menos susceptível ao stress oxidativo (Lau *et al.*, 2000), logo a “agressão” causada pela metanfetamina, não ser suficiente para causar um aumento dos níveis corticais do GFAP, Por outro lado, o exercício em conjunto com a MA, levaram a um aumento de cerca de 50% dos níveis de GFAP em relação ao controlo. Este resultado leva-nos a inferir que o putativo stress oxidativo causado pelo exercício físico pode ter sensibilizado os astrócitos corticais à ação neurotóxica da MA (Figura 13) Importa referir que foi sugerido que exercício físico intenso ou não ajustado à condição física dos roedores pode produzir stress oxidativo cerebral (Rosa *et al.*, 2007).

Em suma o exercício físico não preveniu a ação neurotóxica da metanfetamina no córtex frontal. Assim, não atuou como agente neuroprotetor. As seguintes justificações podem ser aduzidas: o tipo de exercício escolhido, intensidade, tempo de treino e duração do protocolo não foram adequados à proteção.

VI. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível confirmar que uma dose única de metanfetamina causa neurotoxicidade no córtex frontal. Com efeito, a depleção dos níveis corticais de dopamina e dos seus metabolitos, a diminuição da expressão do TH e dos níveis de 5-HT em murganhos C57BL/6 injetados com 30mg/kg de metanfetamina, sugerem que houve degenerescência dos terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o protocolo de exercício selecionado não agiu como neuroprotetor, visto não ter prevenido a toxicidade nos terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos do córtex frontal. Adicionalmente, este estudo sugere que o protocolo de exercício utilizado potenciou a ação neurotóxica da metanfetamina no córtex (astroglíose e intensificação da depleção de DA e seus metabolitos provida pela MA).

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Jarrah M.D., 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, 359–363;

Atkins AL., Helms M.L., O'Toole L.A., Belknap J.K. (2001) Stereotypic behaviors in mice selectively bred for high and low methamphetamine-induced stereotypic chewing. *Psychopharmacology (Berl)*. 157(1):96-104;

Barr A.M., Panenka W.J., MacEvan G.W., Thornton A.E., Lang D.J., Honer W.G., Lecomte T. (2006) The need for speed: an update on methamphetamine addiction. *J Psychiatry Neurosci* 31(5):301-313;

Barres B.A. (2008) The mystery and magic of Glia: A perspective on their Roles in Health and Disease. *Neuron* 60:430-440;

Bowyer J.F., Davies D.L., Schmued L., Broening H.W., Newport G.D., Slikker Jr W. and Holson R.R. (1994) Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268, 1571–1580;

Brennan A.K., Colussi-Mas J., Carati C., Lea R.A., Fitzmaurice P.S., Schenk S. (2010) Methamphetamine self-administration and the effect of contingency on monoamine and metabolite tissue levels in the rat. *Brain Research* 1317:137-146;

Canesin R., Machado J.A.C., Oliveira A.C. (2008) Psicotrópicos: Revisão de Literatura. *Revista.inf.br*. [online]., ano VI - n. 1. ISSN 1679-7353;

Cappon GD, Pu C, Vorhees CV. (2000) Time-course of methamphetamine-induced neurotoxicity in rat caudate-putamen after single dose treatment. *Brain Res* 863:106–11;

Carvalho M, Carmo H, Costa VM, Capela JP, Pontes H, Remião F, Carvalho F, Bastos MD. (2012) Toxicity of amphetamines: an update. *Arch Toxicol.* 86:1167–123;

Cechetti F, Fochesatto C, Scopel D, Nardin P, Goncalves CA, et al. (2008) Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain Res* 1188: 182–188;

Cruickshank, C.C., Dyer, K.R. (2009) A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction*. 104:1085-1099;

Darke, S., Kaye, S., McKetin, R., Duflou, J., (2008). Major physical and psychological harms of methamphetamine use. *Drug Alcohol Rev.* 27, 253–262;

De Lira CA, Vancini RL, Ihara SS, da Silva AC, Abouafia J, Nouailhetas VL. (2008) Aerobic exercise affects C57BL/6 murine intestinal contractile function. *Eur J Appl Physiol* 103: 215-223;

Fantegrossi W.E., Ciullo, J. R., Wakabayashi, K. T., De La Garza II, R., Traynor, J. R., Woods J. H. (2008) A comparison of the physiological, behavioral, neurochemical and microglial effects of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in the mouse. *Neuroscience* 151, 533-543;

Ferreira S.E., Tufik S., Mello M. T. (2001) Neuroadaptação: uma proposta alternativa de atividade física para usuários de drogas em recuperação. *Rev. Bras. Ciên. e Mov.* 9 (1): 31-39;

Fleckenstein AE, Gibb JW, Hanson GR, Riddle EL, Volz TJ (2007). New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 47: 681-698;

Fonseca, A. (1997). *Psiquiatria e psicopatologia*. (2ª Ed.). Vol.1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian;

Friedman, S.D., Castañeda E., Hodge G.K., (1998) Long-Term Monoamine Depletion, Differential Recovery, and Subtle Behavioral Impairment Following Methamphetamine-Induced Neurotoxicity. *Pharmacol Biochem Behav* 61: 35- 44;

Fukumura M, Cappon GD, Pu C, Broening HW, Vorhees CV. (1998) A single dose of methamphetamine-induced neurotoxicity in rats: effects on neostriatal monoamines and glial fibrillary acidic protein. *Brain Res* 806:1–7;

Fumagalli F., Gainetdinov R.R., Valenzano K. J., Caron M.G. (1998) Role of Dopamine transporter in Methamphetamine-Induced Neurotoxicity: Evidence from mice lacking the transporter. *The Journal of Neuroscience* 18(13):4861-4869

Grace C. E., Schaefer T.L., Herring N.R., Graham D. L., Skelton M.R., *et al.*, (2010) Effect of a neurotoxic dose regimen of (+)-methamphetamine on behavior, plasma corticosterone, and brain monoamines in adult C57BL/6 mice. *Neurotoxicology and Teratology* 32:346-355

Gorton LM, Vuckovic MG, Vertelkina N, Petzinger GM, Jakowec MW, Wood RI (2010) Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse. *Behav Brain Res* 213: 253-262;

Homer, B.D., Solomon, T.M., Moeller, R.W., Mascia, A., DeRaleau, L., Halkitis, P.N., (2008) Methamphetamine abuse and impairment of social functioning: a review of the underlying neurophysiological causes and behavioral implications. *Psychol. Bull.* 134, 301–310;

Iversen, L. (2006), *Speed, Ecstasy, Ritalin: the science of amphetamines*, Oxford University Press, Oxford;

Jain K.K. (2011) *The handbook of neuroprotection* 1st ed. *Humana Press* (2):25-139;

Jones, S., Gainetdinov, R., Wightman, R., Caron, M., (1998) Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *The journal of neuroscience* 18(6): 1979-1986;

Kelly, K.A., Miller, D.B., Bowyer J.F., O’Callaghan J.P. (2012) Chronic exposure to corticosterone enhances the neuroinflammatory and neurotoxic responses to methamphetamine. *J. Neurochem.* 122, 995-1009;

Kitamura, O., Takeichi, T., Lu Wang, E., Tokunaga, I., Ishigami, A., Kubo, S., (2010) Microglial and astrocytic changes in the striatum of methamphetamine abusers. *Legal Medicine* 12:57–62;

Krasnova. I.N., Cadet J.L., (2009). Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Res Rev* 60(2):379-407;

Kregel K C, D L Allen, F W Booth, M R Fleshner, E J Henriksen, T I Musch, D S O' Leary, C M Parks, D C Poole, A W Ra'anana *et al.*, (2006) (Committee to develop an APS Resource book for the design of animal exercise protocols): Treadmill running in mice. In: Resource book for the design of animal exercise protocols, 43 - 48 . *The American Physiology Society*. Disponível em: <http://www.the-aps.org/mm/SciencesPolicy/Animal-Research/Publications/Animal-Exercise.Ptocols/book14824.pdf> (último acesso em 2012);

Lacovelli L., Fulceri F., De Blasi A., Nicolletti F., Ruggieri F., Fornai F. (2006) The neurotoxicity of amphetamines: Bridging drugs of abuse and neurodegenerative disorders. *Experimental Neurobiology* 201 (1):24-31;

Laemmli U. K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Vol.227, 680-685;

Lau JW, Senok S, Stadlin A. (2000) Methamphetamine-induced oxidative stress in cultured mouse astrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 914:146-56;

LaVoie M. J., Card J.P., Hastings T.G. (2004) Microglial activation precedes dopamine terminal pathology in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Experimental Neurology* 187:47-57;

Logan, B. K., (2002) Methamphetamine- effects on Human performance an behavior. *Forensic Sci Rev*. 14:133-151;

Macedo T (2000) Contributo das neurociências para a compreensão da toxicoddependência. *Toxicoddependências* 6, 3-16;

Mackay W. (2011) A neurofisiologia sem lágrimas. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian;

Mattson M. P. (2000) Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Research* 886:47-53;

Meredith, C.W., Jaffe, C., Ang-Lee, K., Saxon, A.J., (2005) Implications of chronic methamphetamine use: a literature review. *Harv. Rev. Psychiatry* 13, 141–154;

Michel P.P., Hefti F. (1990) Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res*; 26:428 - 435 .

Middeldorp J., Hol E.M. (2011) GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* 93:421-443;

Morgadinho M. T., Fontes C. R., Macedo T. R., (2004), Influence of the sample preparation method on the serotonin determination in plasma and platelets. *Biomed Chromatogr.* Vol.9, 739-744;

Morgan T. E., Rozovsky I., Goldsmith S. K., Stone D. J., Yoshira T., Finch C. E. (1997) Increased transcription of the astrocyte gene GFAP during middle-age is attenuated by food restriction: implications for the role of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 23(3):524-528;

NIDA Research Report Series, 2006. Methamphetamine Abuse and Addiction. NIH Publication number 06-4210;

O'Dell S.J., Galvez B.A., Marshall J.F. (2012) Running Wheel exercise ameliorates methamphetamine-induced damage to dopamine and serotonin terminals. *Synapse* 66:71-80;

O'Callaghan J. P. and Miller D. B. (1994) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 741–751;

OBID. Informações sobre drogas. Disponível em:
<http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/index.php> (último acesso 21012);

OMS. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/publications/en/> (último acesso em 2012);

Pagala MK, Ravindran K, Namba T, and Grob D. (1998) Skeletal muscle fatigue and physical endurance of young and old mice. *Muscle Nerve* 21: 1729–1739;

Paxinos, G.; Franklin, K. B. J. (2004). The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2th edition. Academic Press Limited, London, UK;

Pereira FC, *et al.*, Disruption of striatal glutamatergic/GABAergic homeostasis following acute methamphetamine in mice, *Neurotoxicol Teratol* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2012.07.005>;

Petzinger GM, Walsh JP, Akopian G, Hogg E, Abernathy A, Arevalo P, Turnquist P, Vucković M, Fisher BE, Togasaki DM, Jakowec MW. (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;

Poiars, C.A. (1999) Contribuição para uma análise histórica da droga. *Revista Toxicodependências* (1):3-12;

Pubill D, Canudas AM, Pallás M, Camins A, Camarasa J, Escubedo E. (2003) Different glial response to methamphetamine- and methylenedioxymethamphetamineinduced neurotoxicity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*;367:490–9;

Quiton M.S., Yamamoto B.K. (2006) Causes and Consequences of Methamphetamine and MDMA Toxicity. *The AAPS Journal* 8(2):E337-E347;

Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Flower R.J., Henderson G. (2012) Rang and Dale's Pharmacology – 7th ed. Elsevier Churchill Livingstone;

Repici M., Mariani J., Borsello T. (2007) Neuronal death and Neuroprotection: a review. *Neuroprotection Methods and Protocols – Methods in Molecular Biology* 399:1-14;

Richard, D. (1997). As drogas. Lisboa: Instituto Piaget;

Rosa EF, Freymüller E, Ihara SS, Aboulaflia J, Nouailhetas VL. (2008) Damaging effects of intense repetitive treadmill running on murine intestinal musculature. *J Appl Physiol* 104: 1410–1417;

Saavedra F. J. F. (2004) Actividade motora e toxicodependência – Estudo sobre o efeito de um programa específico de actividade física numa população toxicodependente. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. Volume I.

Sanchez, A. (1982) Drogas e drogados: o individuo, a família, a sociedade. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, Ltda;

Sapolsky R.M., (2000) The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry* 48, 755-765;

Schapira A.H. (2008) Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 7:97-109

Schapira A.H., Jenner P. (2011) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:1049-1055.

Schepers, R.J., Oyler, J.M., Joseph Jr., R.E., Cone, E.J., Moolchan, E.T., Huestis, M.A., (2003) Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clin. Chem.* 49, 121-132;

Seeley R.R., Stephens T.D., Tate P. (2006) Anatomia e Fisiologia 6ª ed. Lusociência;

Sharma H.S., Westman J., Alm P., Sjöquist P.O., Cervos-Navarro J., Nyberg F. (1997) Involvement of nitric oxide in the pathophysiology of acute heat stress in the rat. Influence of a new antioxidant compound H-290/51. *Ann N Y Acad Sci*; 813: 581-90.

Sharma H.S., Drieu K., Alm P., Westman J. (1999) Upregulation of neuronal nitric oxide synthase, edema and cell injury following heat stress are reduced by pretreatment with EGB-761 in the rat. *J Therm Biol* ; 24: 439-446.

Sharma H.S., Sjöquist P.O., Ali F.S. (2007) Drugs of Abuse-Induced Hyperthermia, Blood-Brain Barrier Dysfunction and Neurotoxicity: Neuroprotective Effects of a New Antioxidant Compound H-290/51; *Current Pharmaceutical Design*, 13, 1903-1923

Sreedhar R., Gadhinglajkar S.V. (2003) Pharmacological neuroprotection. *Indian J. Anaesthe* 47: 8-22;

Simões F., Silva A., (2007), Methamphetamine induces alterations on hippocampal NMDA and AMPA receptor subunit levels and impairs spatial working memory. *Neuroscience*. Vol.150; 433-441;

Smith, A. J.; Cawston, T. E.; Hazleman, B. L. (1985). A rapid and reproducible method for the analysis of immune complexes using affinity chromatography and *Western blotting*. *J. Immunol. Methods* 84: 125-134;

Sulzer D., Sonders M.S., Poulsen N.W., Galli A. (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Progress in Neurobiology* 75:406-433;

Tansey M.G., McCoy M.K., Frank-Cannon T.C. (2007) Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 208:1-25.

Travassos, A.S., Morgadinho, T., Gonçalves, J., Silva A.P., Ribeiro C.F., Pereira F.C. (2011) Metanfetamina e o ciclo do glutamato no cérebro de murganho. *Revista Toxicodependências*, Vol 17, nº2, 67-76;

Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J.N., Rovio A.T., Bruder C.E., Bohlooly Y.M., Gidlof S., Oldfors A., Wibom R., *et al.*, (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429:417-423.

UNODC. (2012) World Drug Report. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2012/WDR_2012_web_small.pdf (último acesso: 2012);

Volkow ND, Fowler JS, Wang G-J et al (2010) Distribution and pharmacokinetics of methamphetamine in the human body: clinical implications. *PLoS ONE* 5(12):e15269;

Wilson W., Marsden C. (1994) The effect of running on brain serotonin. In: Louilot A., Durkin T., Spampinato U., *et al.*, editors. Monitoring molecules in neuroscience. Gradignan: *Publi Typ* 223-224;

Wise R. A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5: 483–94;

Wong-Riley, M.T.T. (2003) Segredos em Neurociências. Porto Alegre: Artmed Editora;

Zhang L, Yokoi F, Parsons DS, Standaert DG, Li Y (2012) Alteration of Striatal Dopaminergic Neurotransmission in a Mouse Model of DYT11 Myoclonus- Dystonia. *PLoS ONE* 7(3): e33669. doi:10.1371/journal.pone.0033669.