

• C •

FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

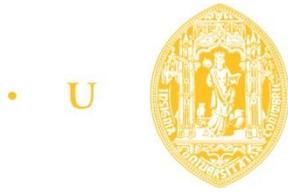
MESTRADO EM PATOLOGIA EXPERIMENTAL

**Exercício Físico: estratégia
Neuroprotectora num Modelo de
toxicidade estriatal induzida pela
Metanfetamina?**

Dissertação de Mestrado submetida por:

Ana Irene Saavedra Mateus Dias

Coimbra, Setembro 2012



• C •

FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO EM PATOLOGIA EXPERIMENTAL

**Exercício Físico: estratégia
Neuroprotectora num Modelo de
toxicidade estriatal induzida pela
Metanfetamina?**

ORIENTADOR:

Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro

CO-ORIENTADOR:

Professor Doutor Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira

Coimbra, Setembro 2012

Recomeça...
Se puderes sem angústia
E sem pressa
E os passos que deres
Nesse caminho duro
Do futuro,
Dá-os em liberdade.
Enquanto não alcances
Não descanses
De nenhum fruto queiras só metade

Miguel Torga

A quem me deixou cedo demais

... meus queridos avós

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, *Professor Doutor Fontes Ribeiro*, e Co-orientador, *Professor Doutor Frederico Pereira*, pelo seu inegável e precioso contributo e disponibilidade, permitindo desta forma o diálogo e a discussão construtiva, dando-me todo o apoio, estímulo e ajuda na elaboração desta Dissertação.

Ao *Professor Doutor Cabrita*, Coordenador do Mestrado em Patologia Experimental, que promoveu a possibilidade de realização deste trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos.

À *Sofia Viana*, pelo seu apoio incondicional, por ser uma amiga e profissional entusiasta, que me ensinou uma parte imprescindível deste trabalho. Obrigada pela paciência, dedicação e disponibilidade.

À *Sara*, pelo seu apoio e ajuda na execução de parte deste trabalho.

À *Sandra Correia*, pelo apoio que prestou ao cuidar dos animais de laboratório utilizados nesta investigação.

Aos meus colegas de Mestrado, *Ana Filipa, Hugo Freitas e Sheena Mendes*, pela partilha de sorrisos, desabafos, sugestões e críticas nesta nova experiência. Obrigada por tornarem estes dois anos menos complicados.

Aos meus pais, irmã e “mano” por todo o apoio, carinho, disponibilidade, paciência, compreensão e por sempre acreditarem em mim e me apoiarem. Sem vocês nada disto seria possível.

À restante família e amigos, pelo apoio, companheirismo e amizade ao longo deste percurso.

À *Fiona* e ao *Baltas*, por fazerem os meus dias ainda mais felizes e me fazerem sorrir até nos dias mais cinzentos.

A todos que de alguma forma estiveram presentes durante o meu percurso pessoal e profissional...

... o meu muito obrigado!

RESUMO

A Metanfetamina (MA) é uma droga psicostimulante ilícita consumida em todo o mundo, sendo a segunda droga mais consumida, logo a seguir ao cannabis.

Vários estudos mostraram que o consumo de MA provoca lesões neurodegenerativas no estriado, nos locais pré e pós-sinápticos. A exposição à MA leva à lesão de marcadores terminais dopaminérgicos, como a TH (tirosina hidroxilase), que implica depleção da DA e 5-HT, e aumento do marcador astrocitário GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida).

O propósito deste estudo foi demonstrar a influência do exercício físico na neuroprotecção do estriado, usando um modelo de toxicidade por MA, em murganhos de estirpe C57BL/6.

Os animais foram divididos em quatro grupos, dois com prática de exercício físico (MA+ Ex e SAL+Ex) e dois sedentários (MA+Sed e SAL+Sed). O exercício físico consistia na prática de corrida em “*Treadmill*” durante 8 semanas, 5 dias por semana, a uma velocidade de 30cm/s, durante 30 minutos (com 5 minutos de aquecimento e 5 minutos de arrefecimento a 20cm/s), sem inclinação. Os animais foram administrados intraperitonealmente com uma injeção única de MA (30mg/Kg) ou uma solução salina (NaCl 0,9%) e sacrificados, por decapitação, 72 horas depois. Os estriados foram dissecados em gelo e guardados a -80°C.

Foi feita a quantificação dos níveis de DA (e seus metabolitos) e 5-HT, através do método HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), e a determinação da expressão de TH (marcador da perda de neurónios dopaminérgicos) e GFAP (marcador astrocitário) através da técnica *Western Blotting*.

Foi verificado que a MA produziu neurodegenerescência dos terminais dopaminérgicos, através da diminuição dos valores estriatais da DA e seus metabolitos, bem como da enzima TH. O aumento dos níveis estriatais da proteína GFAP também sugere neurotoxicidade e o contributo da MA na neuroinflamação. No entanto, os grupos de exercício físico não mostraram alterações comparativamente com os grupos sedentários.

Em conclusão, os resultados sugerem que o exercício físico moderado não protegeu da neurodegenerescência produzida pela toxicidade por MA.

ABSTRACT

The Methamphetamine (MA) is a psychostimulant illicit drug, consumed worldwide and it is the second most consumed drug, immediately after cannabis.

Several studies have shown that consumption of MA causes neurodegenerative damages in the striatum, at pre-and postsynaptic sites. Exposure to MA leads to the injury of the dopaminergic terminals markers such as TH (tyrosine hydroxylase), which implies depletion of DA (dopamine) and 5-HT (serotonin), and increased the astrocyte marker, GFAP (glial fibrillary acidic protein).

The purpose of this study is to demonstrate the influence of exercise on the neuroprotection of striatum, using a model of MA toxicity, in mice of strain C57BL / 6.

The animals were divided into four groups, two with physical exercise (MA + Ex and SAL+Ex) and two sedentary (MA+Sed and SAL+Sed). The exercise training consisted of running on a treadmill, for 8 weeks, 5 days a week, at a velocity of 30cm/s, for 30 minutes (with 5 minutes warm-up and 5 minutes cooling, to 20 cm/s), without sloping. The animals were injected intraperitoneally with a single-dose of METH (30mg/Kg) or with saline solution (0.9% NaCl) and sacrificed by decapitation 72h post-treatment. Striata were dissected on ice and stored at - 80°.

It was made the quantification of the DA levels (and its metabolites) and 5-HT, through the HPLC (High Performance Liquid Chromatography) method, and the determination of the expression of TH (marker of dopaminergic neuron loss) and GFAP (astrocyte marker) using the Western Blotting technique.

It was found that METH produced neurodegeneration of the dopaminergic terminals, through the decreasing of the values of striatal DA and its metabolites as well as enzyme TH. The increased of striatal levels on GFAP protein, also suggests neurotoxicity, and the contribution of the MA in neuroinflammation. However, groups of physical exercise showed no changes compared to sedentary.

In conclusion, the results suggest that moderate exercise did not protect the neurodegeneration produced by MA toxicity.

SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT – serotonina

5-HTT (SERT) – transportador da serotonina

5-htp – 5-hidroxitriptofano

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

A – amígdala

ACh – acetilcolina

ADN – ácido desoxirribonucleico

AMP – anfetamina

ARG – arginina

BBB – barreira hemato-encefálica

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

Ca²⁺ - cálcio

cAMP – ciclo monofosfato adenosina

CIT – citrulina

CO₂ – dióxido de carbono

CO₂ – dióxido de carbono

DAT – transportador da dopamina

DOPA – dihidroxi-fenilalanina

DOPAC – ácido 3,4-dihidroxifenilacético

GABA – ácido γ -amino butírico

GDNF – fator neurotrófico derivado da glia

GFAP – proteína ácida fibrilar glial

GLU – glutamato

GPe – *globus pallidus* parte externa

GPi – *globus pallidus*, parte interna

H₂O₂ – peróxido de hidrogénio

HC – hipocampo

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

K⁻ - potássio

LSD – ácido lisérgico dietilamido

MA – metanfetamina

MAO – monoamina oxidase

MDMA – 3,4-metilenedioximetanfetamina

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MSN – *medium spiny neurons* (neurónios espinhosos médios - GABAérgicos de projeção)

NA – núcleo caudado do estriado

Na⁺ - sódio

NET – transportador da norepinefrina

NGF – fator de crescimento nervoso

NMDAr - recetor N-metil-D-aspartato

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintetase

NuA – núcleo *accumbens*

O₂ – oxigénio

O₂⁻ - superóxido

PFC – córtex pré-frontal

ROS – espécies reativas ao oxigénio

SERT (5-HTT) – transportador da serotonina

SN – sistema nervoso

SNA – Sistema Nervoso Autónomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNc – substância negra, parte compacta

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SNr – substância negra, parte reticulada

TH – tirosina hidroxilase

VMAT-2 – transportador vesicular monoaminérgico 2

VTA – área tegmental ventral

Sal – salino

Ex – exercício

Sed – sedentário

NaCl – cloreto de sódio

CLAP – quimostatina+leupeptina+antipaina+pepstatina

DTT – ditioneitol

BCA – ácido bicinconínico

BSA – albumina sérica bovina

NaOH – hidróxido de sódio

HVA – ácido homovanílico

5-HIAA – ácido 5-hidroxiindolacético

ECF – *Enhanced Chemifluorescence*

ÍNDICE GERAL

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO I - Introdução	2
1. Sistema Nervoso Central	2
1.1 Estriado	5
1.1.1 Neurónios do estriado.....	5
1.2 Neurotransmissão	7
1.2.1 Neurotransmissores	8
1.2.2 Vias dopaminérgicas	10
2. Metanfetamina.....	12
2.1 Farmacocinética e seus efeitos comportamentais.....	14
2.2 Efeitos neuroquímicos.....	16
2.3 Modelo Animal de Toxicidade por Metanfetamina	19
3. Exercício Físico.....	21
3.1 Neuroprotecção	21
3.2 Modelos Animais para exercício físico	23
CAPÍTULO II - Objetivos.....	26
CAPÍTULO III – Materiais e Métodos	28
1. Animais	28
1.1 Grupos de animais.....	28
2. Fármacos utilizados.....	29
3. Desenho experimental	30
3.1 Protocolo de exercício e injeção da droga.....	30
3.2 Sacrifício dos animais	31
4. Western blotting.....	32
4.1 Homogeneização de regiões cerebrais e preparação de lisados proteicos.....	32
4.2 Quantificação proteica – Método BCA	33
4.3 Desnaturação de lisados proteicos totais	33
4.4 Técnica de Western Blotting	33
5. HPLC.....	35

6. Análise estatística	37
CAPÍTULO IV – Resultados	39
1. Administração de Metanfetamina	39
2. Análise bioquímica.....	40
2.1 Níveis estriatais totais de Dopamina, seus metabolitos (DOPAC e HVA) e TH	40
2.2 Níveis estriatais totais de 5-HT	45
2.3 Expressão da proteína GFAP	46
CAPÍTULO V – Discussão	48
CAPÍTULO VI - Conclusão.....	52
CAPÍTULO VII - Bibliografia.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - SISTEMA NERVOSO CENTRAL	2
FIGURA 2 - SISTEMA MESOLÍMBICO COM ORIGEM NA VTA E PROJEÇÃO PARA NUA.	3
FIGURA 3 - GÂNGLIOS BASAIS	4
FIGURA 4 - VIA DIRETA E INDIRETA DOS CIRCUITOS DOS GÂNGLIOS BASAIS.....	6
FIGURA 5 - PREVALÊNCIA DE CONSUMO AO LONGO DA VIDA, POR TIPO DE DROGA	13
FIGURA 6 - TAXA DE CONTINUIDADE DO CONSUMO, POR TIPO DE DROGA	13
FIGURA 7 – METABOLISMO DA MA E AMP.	15
FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DA DOPAMINA E ANFETAMINAS	17
FIGURA 9 - MECANISMO DE NEUROTOXICIDADE PROVOCADO PELA MA.....	18
FIGURA 10 - PRÁTICA DE EXERCÍCIO FÍSICO (CORRIDA EM “TREADMILL”).....	30
FIGURA 11 - ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL	31
FIGURA 12 - DESENHO EXPERIMENTAL	31
FIGURA 13 - CRONOGRAMA TEMPORAL DO PROTOCOLO DE EXERCÍCIO	32
FIGURA 14 - SISTEMA DE ELETROFORESE UTILIZADO NESTE ESTUDO.....	34
FIGURA 15 - SISTEMA DE HPLC UTILIZADO NESTE ESTUDO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MONOAMINAS.....	36
FIGURA 16 - MURGANHOS	39
FIGURA 17 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MA (30MG/KG) E/OU EXERCÍCIO FÍSICO NOS NÍVEIS ESTRIATAIS, TOTAIS DE DA (A), SEUS METABOLITOS, DOPAC (B) E HVA (C) E EXPRESSÃO DE TIROSINA HIDROXILASE (TH) (D)	41
FIGURA 18 - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DOS PADRÕES	42
FIGURA 19 - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE CADA UMA DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS – DOPAC; HVA; 5-HT	43
FIGURA 20 - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE CADA UMA DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS – DOPAMINA	44
FIGURA 21 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MA (30MG/KG) E/OU EXERCÍCIO FÍSICO NOS NÍVEIS ESTRIATAIS, TOTAIS DE 5-HT.	45
FIGURA 22 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MA (30MG/KG) E/OU EXERCÍCIO FÍSICO NA EXPRESSÃO ESTRIATAL DA PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL (GFAP).....	46

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS UTILIZADOS NA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING.....	35
TABELA 2 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A ANÁLISE EM HPLC-ED.....	37

CAPÍTULO I: Introdução

CAPÍTULO I - Introdução

1. Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso pode ser dividido em sistema nervoso central (SNC), do qual fazem parte o encéfalo e a medula espinal, e sistema nervoso periférico (SNP), que consiste nos nervos, gânglios e terminações nervosas, com função sensorial, motora e autonómica. (Caldas e Nunes, 2010; WHO, 2004).

O SNC tem funções complexas, designadas de integração, pois recebe a informação através dos nervos sensoriais, integra-a e responde através dos nervos motores (Caldas e Nunes, 2010).

A região do cérebro que comunica com a medula espinal é designada de **rombencéfalo ou cérebro posterior**, e é constituída pelo mielencéfalo (medula alongada) e metencéfalo (ponte e cerebelo). É a medula que controla a respiração, a frequência cardíaca e o fluxo sanguíneo, sendo vital na sustentação da vida. Apresenta recetores para drogas opióides, como a heroína e a morfina, sendo essa a causa da depressão respiratória e morte em consumidores destas drogas. A ponte é um local de transmissão de sinais entre o córtex e o cerebelo, que está envolvido no movimento do corpo e coordenação (WHO, 2004).

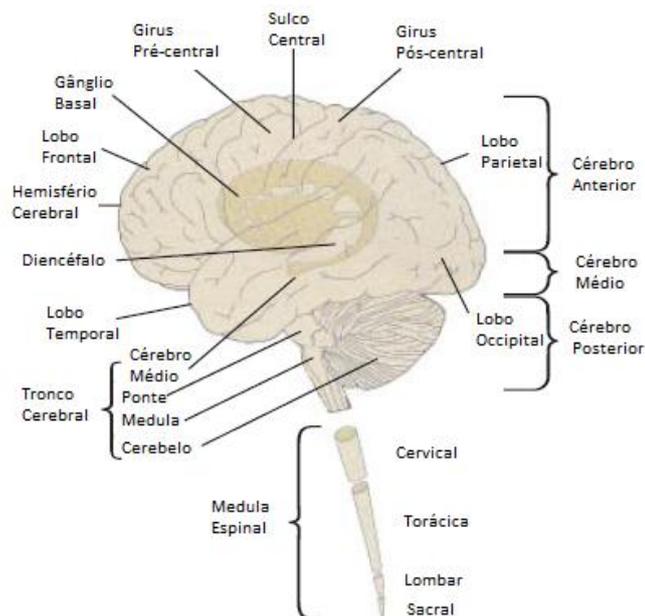


Figura 1 - Sistema Nervoso Central (Adaptado de WHO, 2004)

O **mesencéfalo ou cérebro médio** apresenta a área tegmental ventral (VTA), rica em neurónios dopaminérgicos, envolvida na sinalização de estímulos importantes tais como os associados à alimentação e reprodução; e a substância negra, também com projeções dopaminérgicas, mas envolvida na coordenação e execução dos movimentos do corpo. Algumas drogas psicoativas têm fortes poderes nesta área cerebral, contribuindo para o desenvolvimento da dependência, sendo o sistema mesolímbico dopaminérgico (projeção dopaminérgica de VTA para o núcleo accumbens (NuA)) o principal sistema implicado na produção da dependência por drogas psicoativas (WHO, 2004).

Os sintomas da doença de Parkinson estão relacionados com a degenerescência de neurónios na substância negra (WHO, 2004).

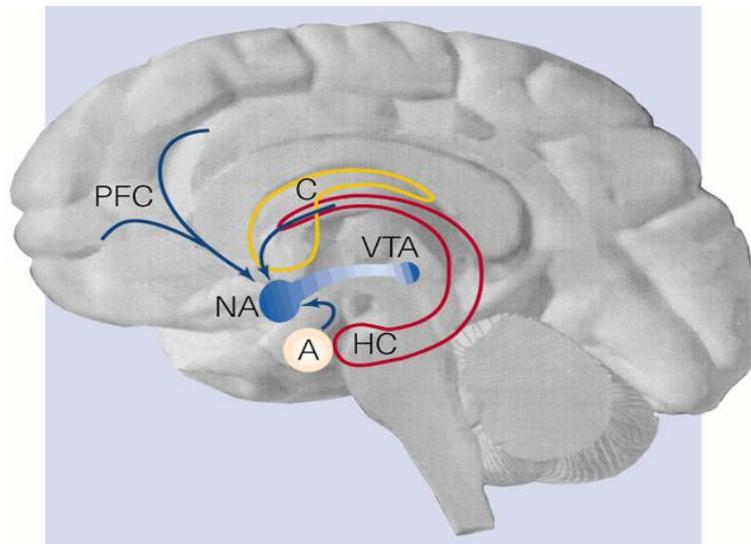


Figura 2 - Sistema mesolímbico com origem na VTA e projeção para NuA. O PFC (córtex pré-frontal), HC (hipocampo) e A (amígdala) enviam projeções excitatórias para o NA. C (núcleo caudado do estriado) (Robbins e Everitt, 1999)

O **prosencefalo, ou cérebro anterior**, é constituído pelo diencéfalo, onde se encontra o tálamo, o hipotálamo (envolvido nos sinais de regulação hormonal e funções básicas do corpo – balanço hídrico, temperatura, hormonas reprodutivas) e o lobo posterior da glândula pituitária; e telencéfalo (dois hemisférios cerebrais), com a sua porção externa (córtex) constituída por camadas de neurónios e organizada em circunvoluções e sulcos, aumentando a sua área de superfície e o número de neurónios que contém. Cada hemisfério está dividido em quatro lobos: frontal, parietal, temporal e occipital. O córtex está envolvido em diferentes aspetos da dependência de substâncias, desde os efeitos primários das drogas psicoativas (sensações e perceções) aos comportamentos complexos, pensamentos envolvidos no desejo pelas drogas e descontrolo no uso de substâncias (Caldas e Nunes, 2010; WHO, 2004).

Abaixo do córtex encontram-se os gânglios basais, envolvidos no comportamento voluntário motor e consistem em núcleo caudado, putamen, *globus pallidus* (segmentos interno e externo), núcleo subtalâmico e substância negra (parte compacta e parte reticulada) (Barker *et al.*, 2003; Kandel *et al.*, 2000). O núcleo caudado e o putamen juntos designam-se de estriado, e logo abaixo deste, encontra-se o núcleo *accumbens* (estriado ventral), uma área chave na dependência e motivação de substâncias (WHO, 2004). A sua informação é transmitida ao *globus pallidus* e substância negra, e estes dois núcleos, cujos corpos celulares são morfologicamente similares, dão origem à maior projeção de informação proveniente dos gânglios basais (Kandel *et al.*, 2000).

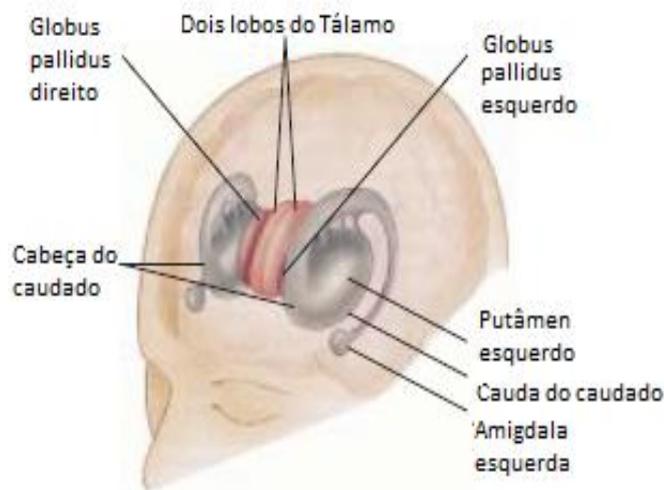


Figura 3 - Gânglios Basais (Adaptado de WHO, 2004)

Lesões a nível dos gânglios basais podem resultar em movimento diminuído ou excessivo, que estão associados com alterações cognitivas e distúrbios de comportamento, refletindo o papel principal destes núcleos nas diversas funções dos lobos frontais (Kandel *et al.*, 2000). Lesões neurológicas (doença de Parkinson e Huntington), e desordens psiquiátricas, como o comportamento obsessivo-compulsivo, estão associadas a uma disfunção nos circuitos neuronais que envolvem os gânglios basais (Kreitzer e Malenka, 2008).

O sistema límbico é constituído pelo hipocampo, com principal papel na memória, e pela amígdala, crítica na regulação emocional. Ambos recebem informações sensoriais de outras zonas do cérebro para ajudar a coordenar uma resposta emocional e comportamental apropriada, como resposta a um estímulo externo (WHO, 2004).

1.1 Estriado

O termo estriado (do Latim *striatus*=listrado) descreve dois núcleos cerebrais que partilham a mesma origem ontogénica nos primórdios do telencéfalo, o putamen (do Latim *putamen*=casca de noz ou concha) e o núcleo caudado (do Latim *cauda*=cauda) (Pauly *et al.*, 2012). No cérebro de ratos, estas duas estruturas não se encontram separadas como nos humanos, porque as fibras da cápsula interna estão distribuídas por todo o estriado (Pauly *et al.*, 2012).

A sua principal função é a de filtrar numerosos *inputs* corticais e aferentes subcorticais e é constituído pelo **estriado dorsal ou neostriado** (caudado e putamen), que está relacionado com as funções motoras voluntárias e está envolvido na iniciação, produção e sequenciação do comportamento motor e no desenvolvimento da adição; e pelo **estriado ventral** (núcleo *accumbens*) que está mais relacionado com a interface entre o sistema límbico e o sistema motor e tem um papel principal na motivação assim como no desenvolvimento e expressão da adição (David *et al.*, 2005). O núcleo *accumbens* encontra-se na porção ventrorostral, onde a cabeça do núcleo caudado e do putamen anterior se fundem. Devido à sua ligação dentro da via mesolímbica, o núcleo *accumbens* é considerado a interface entre os gânglios basais e o sistema límbico (Pauly *et al.*, 2012).

1.1.1 Neurónios do estriado

Os neurónios são células altamente especializadas, que variam muito dependendo da forma e tamanho, mas que apresentam uma estrutura base igual, com um corpo celular ou soma (com o núcleo, onde está o ADN), dendrites (recebem a informação), axónio (transmite a informação para o botão terminal) e botão terminal (encontra-se no final do axónio). Algumas substâncias psicoativas alteram a expressão do ADN, resultando em alterações na função neuronal, podem aumentar ou diminuir o número de dendrites e podem alterar a recaptção de neurotransmissores (por exemplo as anfetaminas na recaptção dos neurotransmissores dopamina e norepinefrina – prolongando a ação destes transmissores) (WHO, 2004).

O estriado é constituído por diferentes células neuronais, sendo cerca de 95% correspondentes aos **neurónios GABAérgicos de projeção** (MSN – *medium spiny neurons*), células com um corpo de tamanho médio (cerca de 10-15µm de diâmetro), longo

axónio e numerosas dendrites com espinhas densas. Estes neurónios libertam o neurotransmissor inibitório ácido γ -amino butírico (GABA), assim como diferentes neuropéptidos, como a encefalina, dinorfina e substância P (David *et al.*, 2005; Pauly *et al.*, 2012).

Consoante o seu local de projeção e expressão genética podemos dividir estes neurónios em dois subtipos diferentes: MSN estriato-palidal, enriquecidos pelos péptidos encefalina, expressam recetores D2 da dopamina e recetores A2A da adenosina, e correspondem à via indireta, pois projetam indiretamente através de vários auxiliares intermediários da parte externa do *globus pallidus* (GPe) e do núcleo subtalâmico para a substância negra, parte reticulada (SNr), e segmento interno do *globus pallidus* (GPi); e MSN estriato-negral, enriquecidos pelos péptidos dinorfina e substância P, expressam predominantemente recetores D1 da dopamina e recetores M4 muscarínicos, e correspondem à via direta, pois projetam diretamente do estriado para a substância negra, parte reticulada (SNr), e segmento interno do *globus pallidus* (GPi) (David *et al.*, 2005; Pauly *et al.*, 2012; Kreitzer e Malenka, 2008).

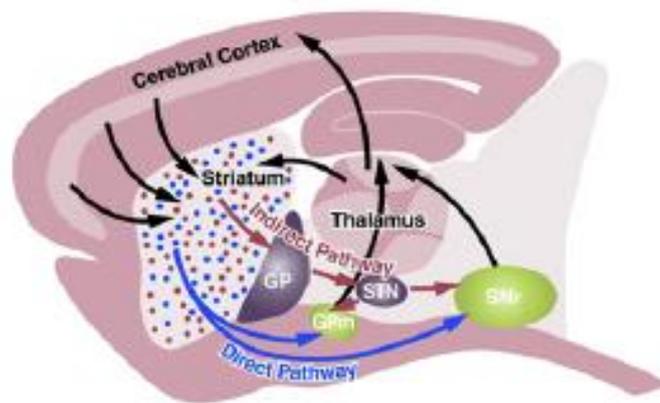


Figura 4 - Via direta e indireta dos circuitos dos gânglios basais. Vista sagital de um cérebro de rato – azul (via direta); vermelho (via indireta); GP – globus pallidus; STN – núcleo subtalâmico; GPe – parte média globus pallidus; SNr – parte reticulada da substância negra (Kreitzer e Malenka, 2008)

A dopamina tem diferentes efeitos nos neurónios estriatais consoante o local de projeção, ou seja, os MSNs podem ser ativados ou inibidos após libertação da dopamina. Quando a dopamina é libertada na substância negra parte compacta (SNc), os neurónios que expressam os recetores D1 da dopamina, são ativados e libertam GABA para a SNr,

enquanto os neurónios que expressam os recetores D2 da dopamina são inibidos (Pauly *et al.*, 2012).

Outro tipo de células neuronais são os **interneurónios**, com percentagem de 4%, dos quais 3% são interneurónios colinérgicos e 1% interneurónios GABAérgicos (podem ser divididos em três populações consoante o neuropeptídeo como co-transmissor – somatostatina, calretinina e parvalbumina) (Pauly *et al.*, 2012).

Os **astrócitos** são as células que existem em maior quantidade no SNC e que apresentam numerosas funções relacionadas com a homeostasia do potássio, captação de neurotransmissores, formação e função das sinapses, regulação da barreira hematoencefálica (BBB), mielinização dos axónios e desenvolvimento do sistema nervoso (Miljković *et al.*, 2011).

A sua forma assemelha-se a uma estrela e apresentam no seu citoplasma filamentos intermediários constituídos pela proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Miljković *et al.*, 2011). O GFAP é um marcador astrocitário, conhecido por ser induzido após lesão cerebral, ou durante a degenerescência do SNC, sendo mais expresso num cérebro envelhecido (Middeldorp, 2010).

1.2 Neurotransmissão

O potencial de ação corresponde a um pequeno impulso elétrico que viaja ao longo do axónio e permite ao neurónio comunicar com outro através da libertação de neurotransmissores (WHO, 2004).

Quando o neurónio se encontra em repouso, o seu interior apresenta mais cargas negativas que o seu exterior, devido à elevada concentração de iões sódio (Na^+) fora da célula, levando a uma concentração desproporcional de iões nos dois lados da membrana do neurónio. O Na^+ não entra dentro da célula devido à permeabilidade seletiva da membrana e devido à bomba sódio-potássio, que através de gasto de energia extrusa o sódio para fora da célula. O potencial de ação ocorre quando a informação proveniente de outros neurónios chega e altera o estado elétrico do neurónio, quando alcançado o limiar de excitação, com a abertura dos canais de sódio, permitindo a entrada deste para o interior do neurónio, causando uma súbita inversão da polaridade (despolarização). Seguidamente os canais de Na^+ fecham-se e os de potássio (K^+) abrem-se, dando origem à repolarização do neurónio (Caldas e Nunes, 2010).

É nas sinapses que ocorre a libertação e transmissão da informação, sendo que esta é constituída por uma parte pré-sináptica (pertencente ao neurónio que informa – botão terminal), uma parte pós-sináptica (pertencente ao neurónio que recebe) e uma fenda sináptica (espaço existente entre ambas). Na parte pré-sináptica existem vesículas sinápticas onde se encontram armazenados os neurotransmissores, que por sua vez serão enviados para o neurónio pós-sináptico, e se ligam aos recetores pós-sinápticos (complexos proteicos) (Caldas e Nunes, 2010). Algumas substâncias psicoativas ligam-se a estes recetores, interferindo com a função de transmissão normal (WHO, 2004).

Existem dois mecanismos básicos de sinapses químicas, um dá-se através da abertura dos canais iónicos pela ligação direta do neurotransmissor (ex. recetor GABA onde se ligam as benzodiazepinas e barbitúricos, promovendo a abertura do canal de Cl⁻), e o outro ocorre através de mensageiros secundários (ex. recetor com proteína G acoplada – recetor da dopamina – que pode estimular ou inibir a produção do monofosfato ciclíco da adenosina – cAMP) (WHO, 2004). Os recetores não têm só um papel imediato, reforçando os efeitos das substâncias psicoativas, mas também um papel no processo de tolerância e afastamento (ex. a tolerância das benzodiazepinas e barbitúricos desenvolver-se-á através de alterações na estrutura do recetor GABA-A) (WHO, 2004).

Com a chegada do potencial de ação, as vesículas sinápticas armazenadas aproximam-se da membrana pré-sináptica, fundem-se com ela e libertam o neurotransmissor na fenda sináptica. O neurotransmissor interage com os recetores da membrana pós-sináptica e liga-se a eles, alterando a sua permeabilidade e dando origem a alterações do estado elétrico do neurónio pós-sináptico. No final da neurotransmissão os neurotransmissores têm de ser removidos da fenda sináptica por degradação (através de enzimas) ou recaptação (Caldas e Nunes, 2010; WHO, 2004). No caso da anfetamina esta promove a inversão do mecanismo de captação assim, o neurotransmissor é libertado na fenda sináptica independentemente do potencial de ação (WHO, 2004).

1.2.1 Neurotransmissores

Os neurotransmissores são substâncias químicas sintetizadas no neurónio e libertadas em quantidade suficiente para produzir um efeito pós-sináptico. Produzem o mesmo efeito quer sejam libertadas de forma natural (endógena) ou como drogas (exógena), mimetizando a ação endógena (Kandel *et al.*, 2000, WHO, 2004).

Existem diferentes tipos de neurotransmissores, como a acetilcolina, os aminoácidos (GABA, glicina, glutamato, aspartato), as aminas (norepinefrina, epinefrina e dopamina – catecolaminas; serotonina; histamina) e os péptidos.

A **Acetilcolina** (ACh) é formada por uma única reação enzimática entre a colina e a forma ativa do acetato (Acetil CoA), catalisada por uma acetilcolina transferase. A colina não é sintetizada pelo tecido nervoso, sendo obtida através da dieta. É um transmissor usado pelos neurónios motores da medula espinal e libertado na junção neuromuscular vertebrada. A nível do SNA é transmissor de todos os neurónios pré-ganglionares e neurónios pós-ganglionares parassimpáticos e pós-ganglionar nas glândulas sudoríparas. É utilizado por numerosas sinapses de todo o cérebro. Existem inúmeros corpos celulares que sintetizam ACh a nível do núcleo basal que se projetam para o córtex cerebral (Kandel *et al.*, 2000). Tem um papel importante na aprendizagem e memória. Os neurónios que sintetizam e libertam ACh são chamados de neurónios colinérgicos. Os recetores da ACh podem ser divididos em dois subtipos, nicotínicos e muscarínicos, e estão implicados na dependência da nicotina e contribuem para os efeitos da cocaína e anfetamina (WHO, 2004).

Pertencentes ao grupo das **Aminas** estão as catecolaminas, a serotonina e a histamina. As catecolaminas (dopamina, norepinefrina/noradrenalina e epinefrina/adrenalina) são sintetizadas a partir do aminoácido essencial tirosina, que é em grande parte obtido através da dieta e uma pequena parte é sintetizado no fígado a partir da fenilalanina. A sua estrutura básica consiste num núcleo catecol (3,4-dihidroxibenzeno) (Golan *et al.*, 2009; Kandel *et al.*, 2000). A síntese das catecolaminas pode ser dividida em diferentes passos:

- 1- Conversão da L-tirosina em L-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH);
- 2- L-DOPA é descarboxilada dando origem à dopamina e CO₂;
- 3- A dopamina é convertida em norepinefrina, com a ação da enzima dopamina β-hidroxilase;
- 4- A norepinefrina é convertida em epinefrina (adrenalina), através da ação enzimática da feniletanolamina-N-metil transferase (Kandel *et al.*, 2000).

A dopamina pode promover inibição pós-sináptica, e está envolvida no movimento, aprendizagem e motivação, tendo também um papel importante na neurobiologia da dependência (WHO, 2004).

A norepinefrina está envolvida na resposta excitatória e ao *stress*. Algumas drogas psicoativas como a cocaína e a anfetamina, aumentam a sua concentração a nível da fenda sináptica (WHO, 2004).

A serotonina (5-HT) é uma indolamina derivada do aminoácido triptofano, e são necessárias duas enzimas para a sua síntese, a triptofano hidroxilase e a 5-hidroxitriptofano (5-htp) descarboxilase (Kandel *et al.*, 2000). É sintetizada a nível do cérebro médio com projeções para o córtex, hipotálamo e sistema límbico. Está envolvida na regulação do humor, excitação, impulsividade, agressão, apetite e ansiedade. A sua ação aumenta com drogas antidepressivas e está envolvida nas ações primárias de algumas drogas psicoativas como o ácido lisérgico dietilamido (LSD) e o ecstasy, e nos efeitos da cocaína, anfetamina, álcool e nicotina (WHO, 2004).

Os **aminoácidos** podem ser excitatórios (glutamato e aspartato) ou inibitórios (GABA e glicina). O glutamato, principal neurotransmissor do SNC, é produzido a partir do α -cetogluturato (intermediário do ciclo de ácido tricarboxílico) (Kandel *et al.*, 2000). Apresenta quatro diferentes subtipos de recetores, NMDA, AMPA, Kainato e recetores metabotrópicos. É importante na aprendizagem, tendo um papel fundamental no hipocampo (WHO, 2004). O GABA (ácido γ -aminobutírico) é sintetizado a partir da descarboxilação do glutamato e é o principal neurotransmissor inibitório do cérebro (Kandel *et al.*, 2000).

1.2.2 Vias dopaminérgicas

Os neurónios dopaminérgicos apresentam quatro vias axonais diferentes, a via negro-estriatal, com projeções provenientes da substância negra (parte compacta) para o estriado dorsal (caudado e putamen) (Park *et al.*, 2011); a via mesolímbica, com projeções da VTA para o estriado ventral (núcleo *accumbens*), tubérculo olfatório e partes do sistema límbico; a via mesocortical, com projeções da VTA para diferentes regiões do córtex frontal; e a via tubero-infundibular, com projeções provenientes das células do núcleo arqueado e periventricular do hipotálamo para a eminência mediana do hipotálamo (Vallone *et al.*, 2000).

A via negro-estriatal está envolvida no controle da postura e comportamento motor (Janhunen e Ahtee, 2007). A sua degenerescência está relacionada com a doença de Parkinson, caracterizada por alterações dos movimentos, como tremores, rigidez e acinesia (Vallone, 2000).

Pensa-se que uma função excessiva da dopamina, ao nível das vias mesolímbica e mesocortical, está na base dos delírios e alucinações da esquizofrenia. A cocaína e anfetamina, em doses altas, mimetizam algumas características da esquizofrenia (WHO, 2004)

2. Metanfetamina

A metanfetamina (MA) é uma substância ilícita, pertencente à classe das anfetaminas (AMPs). Classificada como droga de abuso psicostimulante, é já considerada um problema de saúde pública internacional, com 15-16 milhões de consumidores em todo o mundo (Krasnova e Cadet, 2009; Silva e Tavares, 1999). É a segunda droga mais consumida no mundo, a seguir ao cannabis (Krasnova e Cadet, 2009).

A primeira AMP a ser sintetizada foi em 1887, pelo químico Lazar Edeleanu, para ser utilizada na terapêutica de diversas patologias, como a esquizofrenia. Em 1932 a AMP foi introduzida no mercado como Benzedrina, em forma inalatória (Sulzer *et al.*, 2005).

Foi utilizada por militares na Guerra Civil Espanhola, para aumentar a concentração, e por pilotos na Segunda Guerra Mundial, para diminuir o estado de fadiga ao longo das missões (Karch, 2007). A MA foi sintetizada pela primeira vez pelo farmacologista japonês Nagayoshi Nagai, e em 1941 foi vendida aos japoneses com a marca registada de *Philopon* e *Sedrin*. No final da Segunda Guerra Mundial a procura por metanfetaminas aumentou significativamente, dando-se início à “Primeira Epidemia” (1945-1957) de abuso de MA no Japão. Em 1950 foram implementadas estritas leis para ajudar a resolver o problema do consumo excessivo de MA. A “Segunda Epidemia” surge em 1970, com a utilização excessiva por operários, estudantes e domésticas. Atualmente, o consumo de metanfetaminas no Japão continua a ser um problema grave, sendo esta a droga mais popular nos últimos 10 anos (Karch, 2007).

No ano de 2007 foi feito em Portugal um inquérito relativo ao consumo de substâncias psicoativas na população em geral, e concluiu-se que a substância ilícita mais consumida foi a cannabis, seguida da cocaína e do ecstasy, com prevalências de consumo bastante inferiores à primeira. A anfetamina surge com baixa prevalência em Portugal no ano de 2007 no entanto, ganhou maior visibilidade entre 2001 e 2007 (figura 5). Contrariamente ao sucedido com as restantes substâncias ilícitas, a anfetamina registou uma subida das taxas de continuidade do consumo (proporção de indivíduos que tendo consumido uma dada substância ao longo da vida, declararam ter consumido essa mesma substância no último ano) entre 2001 e 2007 (figura 6) (Instituto da Droga e da Toxicodependência, 2011).

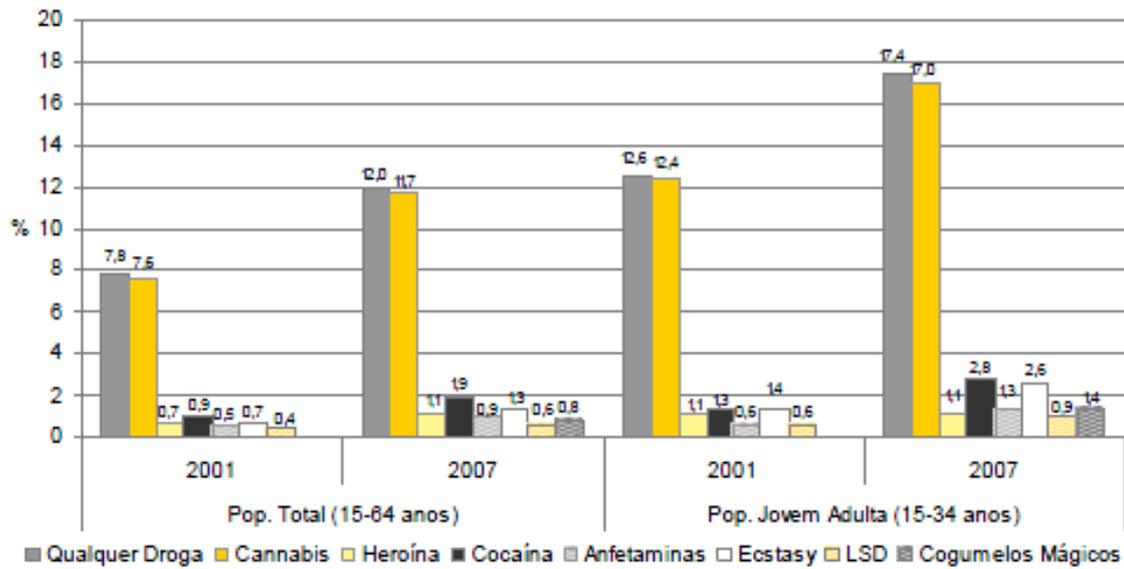


Figura 5 - Prevalência de Consumo ao Longo da Vida, por Tipo de Droga; População Geral, Portugal – Total (15-64 anos) e Jovem Adulta (15-34 anos), (Adaptado de Instituto da Droga e da Toxicod dependência, 2011)

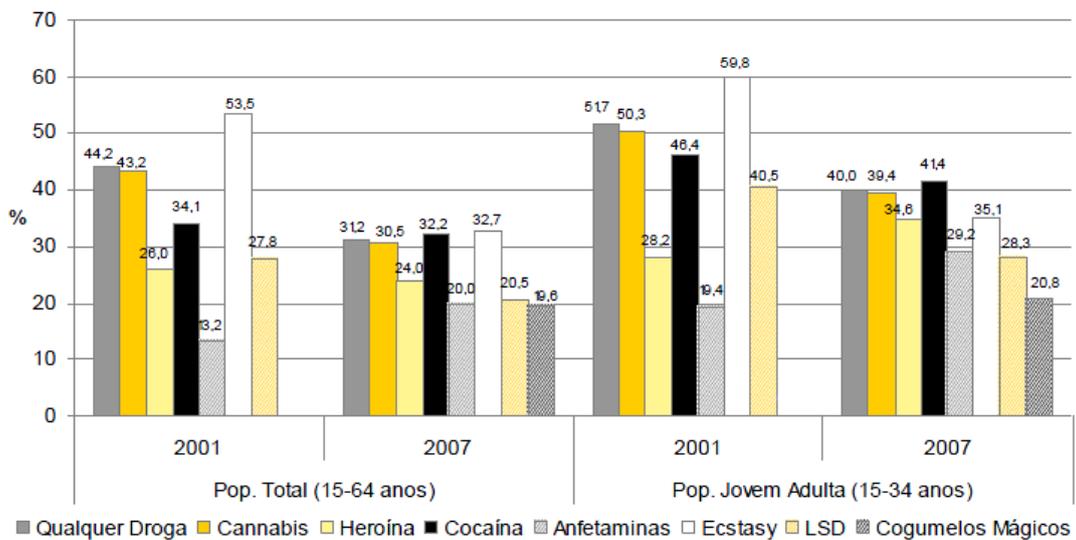


Figura 6 - Taxa de Continuidade do Consumo, por Tipo de Droga; População Geral, Portugal – Total (15-64 anos) e Jovem Adulta (15-34 anos) (Adaptado de Instituto da Droga e da Toxicod dependência, 2011)

Atualmente, alguns psicostimulantes são utilizados a nível terapêutico, como a anfetamina, usada na narcolepsia, e o metilfenidato (Ritalin®) no tratamento de crianças com falta de atenção por hiperatividade (Siegel *et al.*, 2006).

2.1 Farmacocinética e seus efeitos comportamentais

O consumo de análogos de anfetamina tem aumentado significativamente, especialmente sob a forma de metanfetamina (MA, “ice”) e 3,4-metilenedioximetanfetamina (MDMA, “ecstasy”) (Silva e Tavares, 1999), estando associado, mesmo em utilizadores esporádicos, a um aumento das patologias psiquiátricas (psicose, depressão e ansiedade) (Scott *et al.*, 2012). O seu consumo a longo prazo provoca lesões em várias regiões cerebrais, como o estriado, córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior e amígdala, contribuindo para inúmeros défices cognitivos, observados em consumidores de MA (Salo *et al.*, 2011).

Estas substâncias são altamente lipofílicas, atravessando facilmente os tecidos, incluindo a barreira hemato-encefálica, e causam efeitos rapidamente após administração endovenosa. A administração por via oral e endovenosa são as preferidas para a metanfetamina, sendo que os cristais da metanfetamina são solúveis em água, álcool, clorofórmio e fréon, facilitando a sua administração pela via endovenosa (Silva e Tavares, 1999).

A MA é distribuída para diferentes órgãos no corpo humano, sendo os rins e o pulmão, aqueles que apresentam maior concentração, seguidos do estômago, pâncreas, fígado e baço. Surgem em menor concentração no cérebro e coração (Volkow *et al.*, 2010).

O tempo de semivida desta droga no humano varia consoante a via de administração, onde estudos provaram que na via intravenosa e oral corresponde a aproximadamente 9h, com um pico máximo antes dos primeiros quinze minutos para a via intravenosa, e 180 minutos na oral; na via respiratória (fumar) corresponde a 12 horas de semivida, com aproximadamente um pico aos 18 minutos; e na via intranasal corresponde a cerca de 11 horas de semivida, com um pico antes dos primeiros quinze minutos (Cruickshank e Dyer, 2009). Apresentam uma semivida longa, pois para serem eliminadas do plasma necessitam de enzimas de distribuição e atividade limitadas (Silva e Tavares, 1999). Estudos feitos em ratos demonstraram que nesta espécie, o tempo de semivida, numa administração intravenosa, era de 70 minutos (Cho *et al.*, 2001)

A metabolização da MA ocorre sobretudo a nível do fígado e apresenta diferentes etapas. A MA pode ser convertida em AMP através de uma N-demetilação, catalisada pelo citocromo P450 2D6, ou convertida em 4-hidroximetanfetamina através de uma hidroxilação aromática, via também citocromo P450 2D6 (figura 7) (Cruickshank e Dyer, 2009). A anfetamina é metabolizada pela hidroxilação do anel benzeno para a forma 4-

hidroxianfetamina, seguida pela hidroxilação do β -carbono para a forma 4-hidroxinorefedrina, tendo estas duas formas atividade biológica, juntamente com a norefedrina. A AMP é também metabolizada em fenilacetona, que após oxidação dá origem ao ácido benzoico, que é conjugado formando o ácido hipúrico (Musshoff, 2000).

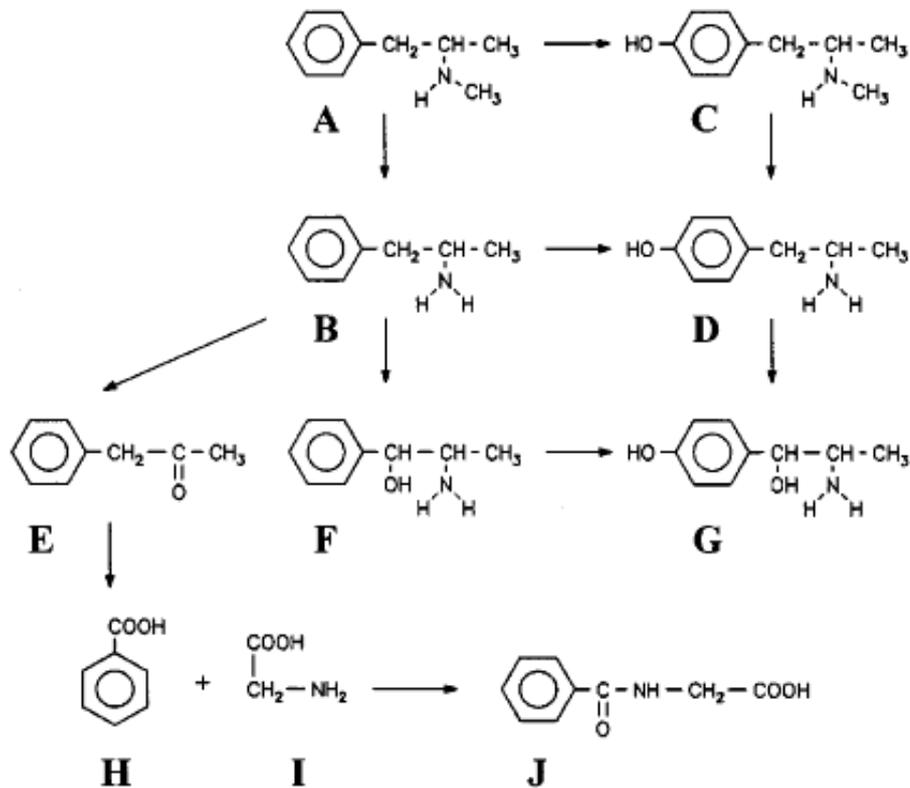


Figura 7 – Metabolismo da MA e AMP. (A) MA, (B) AMP, (C) 4-hidroximetanfetamina, (D) 4-hidroxianfetamina, (E) fenilacetona (fenil-2-propanona), (F) norefedrina, (G) 4-hidroxinorefedrina, (H) ácido benzoico, (I) glicina, (J) ácido hipúrico (Musshoff, 2000)

Aproximadamente 70% da dosagem de MA é excretada pela urina em 24 horas. 20-25% da metanfetamina é eliminada perdendo o grupo metilo ligado ao azoto terminal, formando vários derivados da anfetamina e efedrina, que sofrem desaminação, hidroxilação e conjugação; entre 30-50% é excretada pelo rim na sua forma original, ao longo de vários dias, sendo mais eficaz se a urina for ácida, e outros metabolitos, como a 4-hidroximetanfetamina, norefedrina e 4-hidroxinorefedrina são também eliminados pelo rim (Cruickshank e Dyer, 2000; Silva e Tavares, 1999).

Uma intoxicação aguda por metanfetaminas resulta numa estimulação intensa do sistema nervoso, provocando midríase, hipertensão, taquicardia, diaforese e hipertermia (Karch, 2007).

Imediatamente após o consumo, os consumidores experimentam uma sensação de euforia, aumento da atividade, hipersexualidade, bem-estar geral, diminuição da ansiedade,

cansaço e apetite, que pode durar até 10-12 horas (Krasnova e Cadet, 2009). O efeito de alerta e anorexia provocado pelo consumo da MA está relacionado com a libertação da norepinefrina nos neurónios noradrenérgicos, e os efeitos do estímulo locomotor, estão relacionados com a libertação da dopamina, nos terminais dopaminérgicos (sobretudo no neostriado) (Logan, 2002). Doses elevadas produzem atividade motora repetitiva (comportamentos estereotipados), e doses muito elevadas podem provocar convulsões, hipertermia, coma e morte (Siegel *et al.*, 2006). Distúrbios da perceção e comportamentos psicóticos, causados por elevadas doses de MA, estão relacionados com a libertação da dopamina no sistema mesolímbico e da 5-hidroxitriptamina (serotonina) nos neurónios triptaminérgicos (Logan, 2002).

Um consumo repetitivo desta droga resulta em graves consequências fisiológicas e neurológicas, como perda de peso, perda muscular, necrose periodontal, lesões cerebrais e comprometimento da atenção, memória e execução de funções (Marshall e O 'Dell, 2012).

2.2 Efeitos neuroquímicos

A MA é uma droga simpaticomimética, que mimetiza os transmissores endógenos no sistema nervoso simpático, através da interação com os seus recetores (Logan, 2002). A interação dos estimulantes psicomotores com os transportadores da dopamina (DAT), serotonina (SERT), norepinefrina (NET) e vesicular monoaminérgico 2 (VMAT-2), promovem o aumento extracelular dos neurotransmissores monoaminérgicos (Siegel *et al.*, 2006).

As anfetaminas aumentam os níveis de dopamina no cérebro devido ao aumento da sua libertação ou bloqueio da sua recaptção, sendo neste caso necessário doses mais elevadas de anfetamina para a produção deste efeito (Karch, 2007).

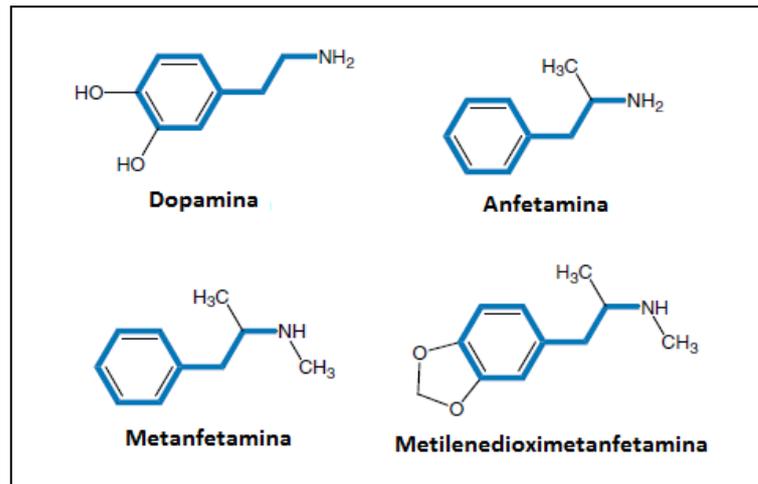


Figura 8 - Estrutura química da Dopamina e Anfetaminas (Adaptado de Fleckenstein et al., 2007)

O efeito tóxico da MA ($C_{10}H_{15}N$) está relacionado com a similaridade na estrutura química com a dopamina (figura 8), permitindo a entrada desta droga nos neurónios dopaminérgicos, via DAT e difusão passiva. Dentro destes, a MA entra em vesículas sinápticas através do VMAT-2, causando libertação da dopamina para o citoplasma via alterações no balanço do pH (figura 9, nº1) (Krasnova e Cadet, 2009).

No citoplasma a dopamina sofre auto-oxidação para a forma tóxica dopamina-quinona, com formação de radicais superóxido e peróxido de hidrogénio, que, por sua vez, interagem com metais de transição dando origem a radicais hidroxilo, conduzindo ao *stress* oxidativo, disfunções mitocondriais e lesão peroxidativa das membranas pré-sinápticas (figura 9, nº2) (Krasnova e Cadet, 2009).

Alguma dopamina é transportada para o espaço extracelular, onde também sofre auto-oxidação produzindo espécies reativas ao oxigénio (ROS) (figura 9, nº3) (Marshall e O'Dell, 2012).

O aumento dos níveis das monoaminas no citosol deve-se também à inibição da monoamina oxidase (MAO) e à estimulação da tirosina hidroxilase (TH) (Siegel *et al.*, 2006).

Elevadas concentrações intracelulares de dopamina e metanfetamina podem inibir a cadeia transportadora de eletrões na mitocôndria, contribuindo para a perda de eletrões de elevada energia, com conseqüente aumento na produção de superóxido (ver figura 9, nº4) (Marshall e O'Dell, 2012).

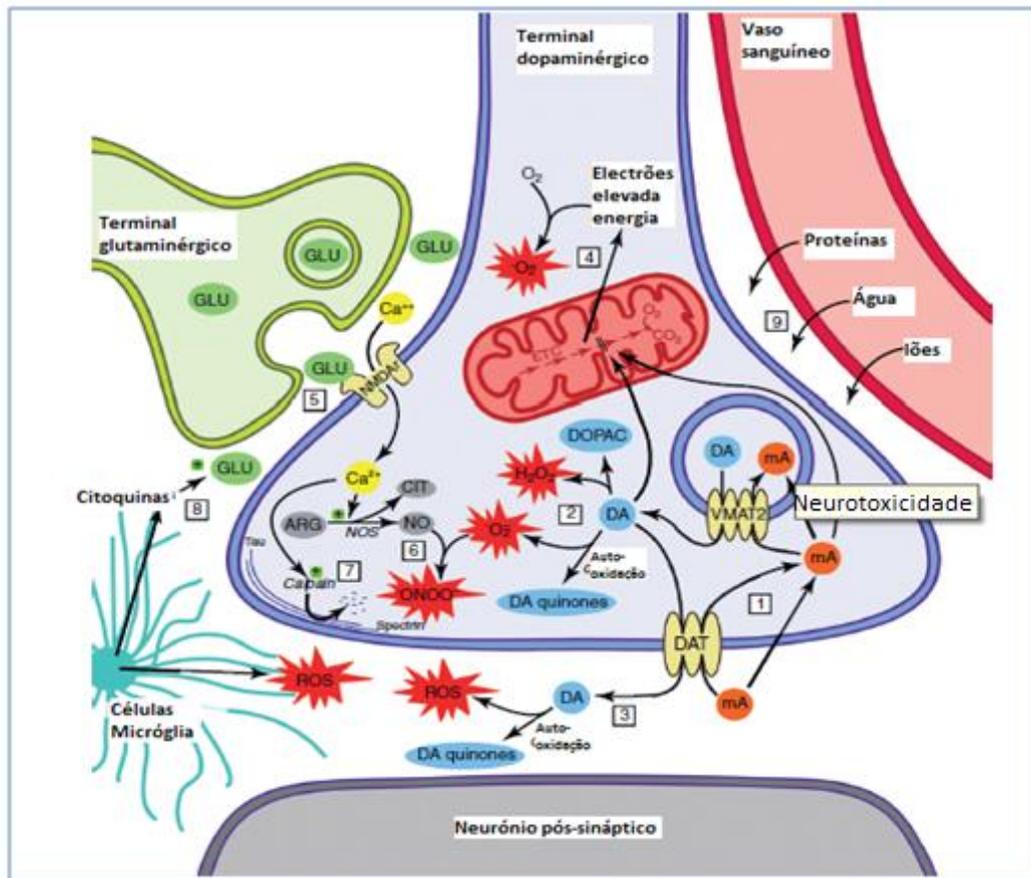


Figura 9 - Mecanismo de neurotoxicidade provocado pela MA. mA – metanfetamina; DAT – transportador da dopamina; VMAT – 2 – transportador vesicular monoaminérgico – 2; DOPAC – ácido 3,4-dihidroxifenilacético; H₂O₂ – peróxido de hidrogénio; O₂⁻ – superóxido; O₂ – oxigénio; CO₂ – dióxido de carbono; GLU – glutamato; Ca²⁺ – cálcio; NMDAR - recetor N-metil-D-aspartato; ARG – arginina; NOS – óxido nítrico sintetase; NO – óxido nítrico; CIT – citrulina; ROS – espécies reativas ao oxigénio. (Adaptado de Marshall, 2012)

A MA induz um aumento na libertação do glutamato (GLU), que estimula os recetores NMDA dos terminais dopaminérgicos, aumentando o Ca²⁺ a nível intracelular (figura 9, nº5). O Ca²⁺, por sua vez, aumenta a estimulação da síntese do óxido nítrico, com conseqüente aumento da sua produção, que combinado com o superóxido dá origem ao peroxinitrito, uma forma altamente tóxica (figura 9, nº6). Por outro lado, os elevados níveis intracelulares de Ca²⁺ estimulam as enzimas proteolíticas, como a Calpaína, que quebram a estrutura das proteínas, como a Espectrina e Tau, lesionando a integridade terminal (figura 9, nº7) (Marshall e O'Dell, 2012).

Estudos em animais sugerem que a repetida exposição a elevadas doses de psicostimulantes produzem a longo termo uma diminuição dos marcadores da integridade dos terminais nervosos dopaminérgicos e serotoninérgicos, sugerindo neurodegeneração por radicais livres e *stress* oxidativo (Siegel *et al.*, 2006).

A MA induz também uma resposta inflamatória, estimulando a micróglia para a libertação de ROS e citocinas, que por sua vez, contribuem para o aumento extracelular dos níveis de GLU (figura 9, nº8) (Marshall e O'Dell, 2012). A ativação microglial e astrogliar e a produção de citocinas e quimoquinas ocorrem em conjunto com a lesão dos terminais dopaminérgicos do estriado após indução com MAs, sugerindo a sua neurotoxicidade e o seu contributo na neuroinflamação (Kelly *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que a administração crónica de corticosteroides aumenta a resposta neuroinflamatória aquando de uma dose neurotóxica de MA, evidenciado o efeito pró-inflamatório associado à neurotoxicidade aumentada (Kelly *et al.*, 2012). Como o uso de níveis crónicos de corticosteroides está associado ao elevado *stress* fisiológico, o estudo sugere que o *stress* fisiológico sensibiliza a resposta neuroinflamatória e neurotóxica por Metanfetamina (Kelly *et al.*, 2012).

Devido à produção de ROS, hipertermia, e à ativação de metaloproteases MMP-2 e MMP-9 (que alteram a integridade) provocada pela MA, a barreira hemato-encefálica sofre rutura, permitindo a saída de proteínas, seguida de água e iões, provocando edema cerebral e outras alterações da neurotransmissão (figura 9, nº9) (Marshall e O'Dell, 2012).

Estudos de neuroimagem mostraram que a metanfetamina provoca alterações neurodegenerativas no cérebro, como diminuição persistente dos níveis dos transportadores de dopamina (DAT) no córtex orbitofrontal, córtex pré-frontal dorsolateral e no caudado-putamen; diminuição da densidade dos transportadores da serotonina (5-HTT) no cérebro médio, caudado, putamen, hipotálamo, tálamo, e córtex orbitofrontal, temporal e cingulado; anomalias no metabolismo da glicose nas áreas subcorticais e corticais do cérebro; ativação microglial proeminente (Krasnova e Cadet, 2009).

2.3 Modelo Animal de Toxicidade por Metanfetamina

A utilização de animais no estudo dos efeitos da MA é essencial na investigação, pois só assim é possível a obtenção de um isolamento na exposição à MA sem outras variáveis, como a farmacologia, genética e ambiental, que afetam o cérebro e a cognição (Marshall e O'Dell, 2012).

Estudos revelaram que dosagens repetidas de MA em murganhos produzem perda de dopamina no estriado e córtex, diminuição das ligações do DAT e dos níveis de DAT no estriado e bulbo olfatório, assim como diminuição dos níveis do TH.

Vários estudos demonstraram que os murganhos, após administração de metanfetaminas, apresentavam uma marcada depleção da dopamina e do transportador da dopamina (DAT), mas não tinham alterações a nível da 5-HT e do transportador da 5-HT no estriado, amígdala, córtex frontal e hipocampo, sugerindo uma neurotoxicidade seletiva nos terminais dopaminérgicos (Anderson e Itzhak, 2006; Marques *et al.*, 2008). No entanto, outro estudo demonstrou que murganhos C57BL/6J e C57BL/129sVj mostraram depleção dos níveis de 5-HT no estriado e hipocampo (Krasnova e Cadet, 2009).

Os murganhos podem ainda apresentar morte neuronal no estriado, córtex frontal e parietal, hipocampo e bulbo olfatório, através de processos semelhantes à apoptose neuronal. A administração de MA provoca também astrocitose reativa e microgliose (Krasnova e Cadet, 2009).

3. Exercício Físico

Nos primórdios da história da humanidade o Homem tinha necessidade de desenvolver as suas capacidades físicas para a sua sobrevivência e sustentação. Atualmente, e após a revolução industrial, o Homem deixou de precisar tanto das suas capacidades físicas, adotando um estilo de vida mais sedentário.

O sedentarismo é um fator determinante no desenvolvimento das doenças degenerativas, sendo por isso fundamental a promoção de estilos de vida mais saudáveis, com atividade física regular.

O exercício é uma atividade multifatorial que afecta diversos órgãos e tecidos, não só contribuindo para uma vida mais saudável e melhoria na qualidade de vida, como a sua ausência pode favorecer o aparecimento de problemas de saúde crónicos. Problemas como obesidade, associada a diabetes, hipertensão, doença cardiovascular e doença músculo-esquelética, bem como outras patologias (depressão, etc..) poderiam ser minimizadas com a prática regular de exercício físico (Kregel *et al.*, 2006; Speelman *et al.*, 2011).

Alguns sintomas de doenças associadas a demência e à doença de Parkinson, podem ser melhorados com a prática de exercício físico (Marques *et al.*, 2008; Speelman *et al.*, 2011).

Vários estudos sugerem que o exercício físico também melhora a performance motora (Petzinger *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2011; Speelman *et al.*, 2011), bem como a função cognitiva (Speelman *et al.*, 2011).

3.1 Neuroprotecção

Estudos sugerem que o exercício físico crónico pode apresentar influencias neuroprotectoras, por estimulação do crescimento e desenvolvimento de novas células e protegendo contra lesão isquémica neuronal na formação hipocampal ou lesão neurotóxica no neostriado (Marques *et al.*, 2008).

A neuroplasticidade cerebral é um mecanismo fundamental para a aprendizagem, memória e cognição em geral. Estudos sugerem que o exercício físico promove esta neuroplasticidade, induzindo a expressão de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento nervoso (NGF) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Ahlskog, 2011; Smith e Zigmond, 2003).

As neurotrofinas, as citocinas do SN, são a ligação que existe entre o SN e o sistema imunitário, promovendo a sobrevivência e manutenção neuronal durante e depois de uma lesão. Alguns estudos feitos com modelos animais de lesão isquêmica aguda, axotomia cervical e lesão de neurónios motores, provaram que as neurotrofinas preveniam e diminuía a morte neuronal e os processos degenerativos, através de alterações na plasticidade cerebral (González-Torres e Armendáriz-Borunda, 2005).

Estudos sugerem que o BDNF, *in vitro*, modula a plasticidade cerebral, aumentando o crescimento neuronal e a função sináptica, e promove a sobrevivência de vários neurónios afetados por condições neurodegenerativas (Ahlskog, 2011; Smith e Zigmond, 2003). Este efeito pode durar várias semanas após o exercício (Bayod *et al.*, 2011). O aumento do BDNF após exercício pode ser a chave para a utilização do exercício na implementação de uma terapia para recuperação de lesão cerebral (Arida *et al.*, 2011). Lau *et al.* (2011) verificaram que o exercício físico aumenta os níveis endógenos de BDNF na substância negra e de GDNF no estriado, havendo desta forma atividade neurotrófica nos neurónios negroestriatais, num modelo de doença de Parkinson crónico.

Outros estudos demonstraram que o exercício moderado a intenso, em *treadmill*, aumentava os níveis do fator de crescimento nervoso (NGF) no hipocampo e suprimia a apoptose (Chae e Kim, 2009). O NGF e o BDNF imunomodulam a interação da micróglia local com as células do sistema imunitário, previnem o processo inflamatório e regulam a libertação de citocinas pró-inflamatórias (González-Torres e Armendáriz-Borunda, 2005).

Wu *et al.* (2011), ao estudar o efeito do exercício na proteção dos neurónios dopaminérgicos da substância negra após degenerescência inflamatória induzida, concluíram que após 4 semanas de exercício houve proteção dos neurónios dopaminérgicos na substância negra, parte compacta, contra a agressão inflamatória. Este efeito não era devido a alterações na resposta inflamatória mas devido à via de sinalização do BDNF.

A atividade física envolve a síntese e libertação de dopamina nos gânglios basais (Fontes-Ribeiro *et al.*, 2010). Estudos sugerem que o exercício físico, para além de ter efeitos benéficos a nível cardiovascular, muscular e endócrino, influencia a neurotransmissão central, com aumentos das concentrações cerebrais de DA e noradrenalina (NA), sugerindo síntese e metabolismo destes transmissores, bem como, aumento estriatal do recetor D₂ após exercício, indicando uma possível diminuição da libertação estriatal de dopamina (Meeusen *et al.*, 1997). Outro estudo, utilizando a técnica da microdiálise e exercício em *treadmill*, sugere que no exercício crónico há uma menor

recaptação da dopamina após administração de AMP, por alterações a nível do transportador da dopamina, considerando que o exercício físico pode ter efeitos duradouros a nível da transcrição de genes e na produção de fatores neurotróficos (Marques *et al.*, 2008).

Smith *et al* (2011), provaram nos seus estudos que o exercício em *treadmill* levou a um aumento da expressão estriatal de TH e de DAT no murganho, e resgate parcial de neurónios dopaminérgicos na SNc, talvez devido à formação ou migração de neurónios dopaminérgicos, sugerindo desta forma que doentes com doença de Parkinson com sintomatologia inicial podem recuperar parcialmente neurónios dopaminérgicos e atrasar a progressão da doença com exercício físico regular.

Por outro lado, estudos sugerem que o exercício físico aumenta a expressão da proteína GFAP no estriado dorsal em ratos lesionados por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), a qual provoca lesão a nível dos terminais dopaminérgicos estriatais, axónios negro-estriatais dopaminérgicos e corpos celulares dopaminérgicos na substância negra. Este artigo sugere que o mecanismo pelo qual o exercício físico exerce os seus efeitos benéficos sobre o SNC pode estar relacionado com a influência direta ou indireta do exercício sobre os astrócitos (Dutra *et al.*, 2012).

Gerecke *et al* (2010), num estudo feito em murganhos, demonstraram que o exercício físico não restritivo e voluntário, durante 1 a 2 meses, não produzia qualquer efeito nos neurónios dopaminérgicos da SNc; no entanto, murganhos com 3 meses de exercício apresentavam algum tipo de proteção, concluindo assim que o tempo é crucial para haver proteção dos neurónios dopaminérgicos contra a morte causada por intoxicação aguda por MPTP.

Os mecanismos exatos pelos quais o exercício desencadeia respostas benéficas sobre o SNC continuam a ser alvo de pesquisas.

3.2 Modelos Animais para exercício físico

A utilização de animais para alguns estudos sobre o exercício é fundamental na medida em que o estudo com humanos nem sempre é viável, desejável, praticável e ético, sendo por vezes necessário um estudo ao longo de uma vida, ou com aplicação de técnicas invasivas. Por outro lado, alguns estudos feitos com animais são necessários para entender a biologia animal, bem como melhorar a sua saúde (Kregel *et al.*, 2006).

Para o estudo da plasticidade cerebral são utilizados diferentes modelos de indução de exercício físico em animais, como natação, roda de corrida (exercício voluntário), corrida em “*treadmill*”, escalada e levantamento de peso, sendo os três primeiros os mais utilizados (Arida *et al.*, 2011). O ambiente enriquecido é também utilizado por investigadores para o mesmo tipo de estudo, permitindo que haja interação social e oferta de estímulos sensoriais, cognitivos e do sistema motor do cérebro (Arida *et al.*, 2011).

A corrida em “*treadmill*” tem sido bastante utilizada nas últimas quatro décadas para estudos comportamentais, fisiológicos, bioquímicos e, mais recentemente, em estudos sobre as respostas moleculares ao stress no exercício agudo, e ao treino físico crónico (Kregel *et al.*, 2006). É utilizada com frequência devido à sua simplicidade, eficácia, facilidade em treinar vários animais ao mesmo tempo, e relevância para realizar exercício aeróbico e anaeróbico. No entanto, este tipo de exercício pode provocar algum stress nos animais, existindo, por isso, formas de minimizar o stress, como realizar o exercício na fase escura do ciclo circadiano, usar estímulos manuais em vez de choque elétrico e fazer as fases de aquecimento e arrefecimento com o exercício (Arida *et al.*, 2011). Por outro lado, este tipo de exercício oferece vantagens relativamente ao exercício voluntário e natação, na medida em que é possível controlar a intensidade, duração e frequência do exercício (Arida *et al.*, 2011).

CAPÍTULO II: Objetivos

CAPÍTULO II - Objetivos

Este trabalho experimental teve como objetivo primordial o estudo do efeito neuroprotetor do exercício na toxicidade provocada pela Metanfetamina no estriado, recorrendo-se a um modelo de toxicidade por Metanfetamina, em murganhos C57BL/6.

Foram desenvolvidas diferentes tarefas, no sentido da obtenção destes objetivos:

- ✓ Determinação da neuroprotecção através da leitura da expressão da tirosina hidroxilase (TH – marcador da síntese da L-DOPA e, assim, da dopamina) e do GFAP (marcador de astrócitos), através da técnica experimental “*Western Blotting*”.
- ✓ Determinação dos níveis de dopamina, e seus respetivos metabolitos, e serotonina, através de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) com deteção eletroquímica.

CAPÍTULO III: Material e Métodos

CAPÍTULO III – Materiais e Métodos

1. Animais

Neste estudo, foram utilizados 24 murganhos machos, de estirpe C57BL/6, com 12 semanas de idade, provenientes de Charles River Laboratories Inc. (Barcelona – Espanha). Foram mantidos, com um n=6 por gaiola, em condições de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), humidade e ciclos de luz (12/12h – 8h às 20h) controlados, com água e comida *ad libitum*, no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Estudos sugerem que os machos C57BL/6J apresentam maiores depleções de dopamina no estriado que as fêmeas da mesma estirpe (Yu e Liao, 2000). Por outro lado, o mesmo estudo conclui que a espécie C57BL/6J apresentou 1,4 a 2,2 vezes mais depleção dopaminérgica que a espécie BALB/c.

Os animais sofreram um período de adaptação ao biotério, onde foram mantidos, por um período de 3 dias, antes de se dar início ao procedimento experimental.

Após exercício, os animais foram cuidadosamente inspecionados, com o objetivo de pesquisar algum tipo de lesão física subjacente ao exercício, por exemplo, hemorragias, diarreias ou comportamentos anormais, que eventualmente pudessem interferir com os resultados.

Foram feitos todos os esforços para minimizar o sofrimento animal, bem como o número de animais utilizados. Todos os procedimentos experimentais obedeceram às regras impostas pelas Normas Técnicas de Proteção dos Animais Utilizados para fins Experimentais e Outros Fins Científicos (Portaria nº 129/92 de 6 de Julho), bem como às normas da Convenção Europeia do Bem-estar Animal (Portaria nº 1005/92).

1.1 Grupos de animais

Neste trabalho experimental foram utilizados quatro grupos de animais:

- Grupo Sal + Ex – n=6 de murganhos Salino + Exercício
 - Grupo Sal + Sed – n=6 de murganhos Salino + Sedentário
 - Grupo MA + Ex – n=6 de murganhos Metanfetamina + Exercício
 - Grupo MA + Sed – n=6 de murganhos Metanfetamina + Sedentário
- } Controlo
} Estudo

Grupos Sedentários: durante 8 semanas os animais não fizeram exercício físico no “*treadmill*” e receberam uma injeção única de Metanfetamina (estudo) ou Salino (controlo), 72 horas antes do sacrifício.

Grupos Exercício: durante 8 semanas os animais fizeram exercício físico no “*treadmill*” e receberam uma injeção única de Metanfetamina (estudo) ou Salino (controlo), 72 horas antes do sacrifício.

2. Fármacos utilizados

Neste trabalho experimental utilizou-se o fármaco Metanfetamina - HCl que foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), pelo INFARMED de Portugal (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde).

A solução de Metanfetamina (30mg/Kg – 3mg/ml) foi reconstituída no dia da injeção com uma solução salina de NaCl 0,9% (10,4mg de Metanfetamina por 3,46ml de solução salina (NaCl)).

A Metanfetamina produz défices profundos nos sistemas, dopaminérgico e serotoninérgico. Estudos demonstraram que uma dose única de 30mg/Kg de Metanfetamina em murganhos, induzia degenerescência dos neurónios estriatais às 72h, com défices nos marcadores dopaminérgicos terminais do estriado (TH – diminuição de 80% e DAT) e aumentos do marcador GFAP nos astrócitos estriatais (Zhu *et al.*, 2005). Outro estudo sugere que a mesma dose de Metanfetamina produz neurotoxicidade, após uma semana da injeção, com redução dos níveis de dopamina, DOPAC e HVA, para respectivamente 80, 45 e 62% (Fumagalli *et al.*, 1998). Pereira *et al* (2012), demonstrou que uma dose única de MA (30mg/Kg), que mimetiza uma overdose em humanos, é um bom modelo para estudar a toxicidade provocada pela MA, com alterações nos níveis estriatais dopaminérgicos e enfraquecimento locomotor, bem como alterações na homeostase do GLU e GABA subjacente a astrogliose.

3. Desenho experimental

3.1 Protocolo de exercício e injeção da droga

Os grupos de exercício foram submetidos a uma prática de exercício regular em “*Treadmill*” (modelo le8706 e le8700 adaptados, Panlab, S. L., Barcelona - Espanha), 5 dias por semana com 2 dias de descanso (figura 10). O exercício consistia numa prática de 40min/dia (dos quais, 5 min para aquecimento e 5 min de arrefecimento), a uma velocidade de 30cm/s, sem inclinação.



Figura 10 - Prática de exercício físico (corrida em “treadmill”) (Fotografia tirada no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Estudos confirmam que o exercício em “*treadmill*”, durante 4 semanas a uma velocidade de 18m/min, 40min/dia, sem inclinação, 5 dias por semana, diminui os marcadores de lesão cerebral, como GFAP, S100 β (proteína de ligação do cálcio), NSE (enolase específica do neurónio), no estriado de murganhos com Parkinsonismo crónico, explicando o papel benéfico do exercício em pacientes com doença de Parkinson (Al-Jarrah e Jamous, 2011).

Os grupos sedentários foram submetidos às mesmas condições físicas e ambientais dos grupos de exercício (“*Treadmill*”, ruído do motor, manipulação, vibração, privação de água e comida), uma vez por semana a uma velocidade mínima no “*Treadmill*” (5cm/s, 10 minutos).

Os animais dos dois grupos salinos (Sal) receberam uma injeção intraperitoneal única de 250 μ l de NaCl 0,9%, 3 dias antes do sacrifício.

Os animais dos dois grupos de Metanfetamina (MA) receberam uma injeção única, intraperitoneal, de solução de metanfetamina, 3 dias antes do sacrifício, sendo que o volume administrado dependia do peso de cada murganho (peso x 10 μ l de solução com 10,4mg de MA+ 3,46ml NaCl 0,9%) (figura 11). Os animais foram observados durante cerca de 3 horas após administração.



Figura 11 - Administração intraperitoneal (Fotografia tirada no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

3.2 Sacrifício dos animais

Três dias após a injeção (de MA ou salino), todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os cérebros foram removidos, sendo o estriado dissecado e congelado em azoto líquido. Todos os estriados foram guardados a -80°C para posterior análise em *Western Blotting* (hemisfério esquerdo) e HPLC (hemisfério direito).

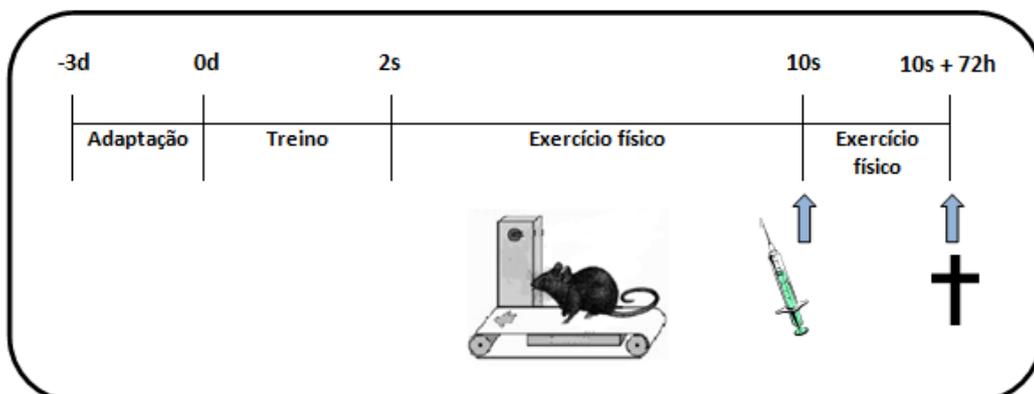


Figura 12 - Desenho experimental (d-dias; s-semanas; h-horas)

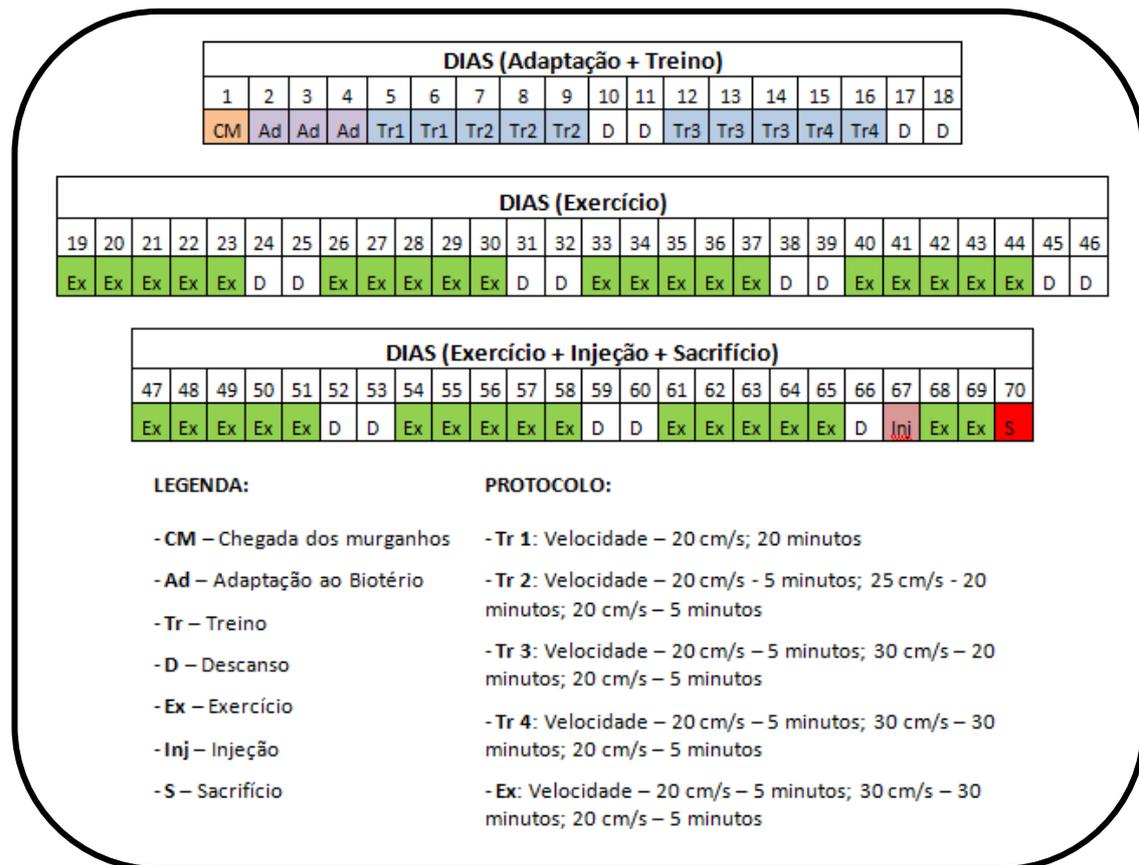


Figura 13 - Cronograma temporal do protocolo de exercício

4. Western blotting

Os níveis proteicos de TH (tirosina hidroxilase) e GFAP (proteína glial fibrilar ácida) do estriado dos murganhos foram quantificados através da técnica experimental “Western Blotting”, descrita por Simões *et al.*, 2008.

4.1 Homogeneização de regiões cerebrais e preparação de lisados proteicos

Às amostras de estriado (hemisfério esquerdo) foram adicionados 200µl de tampão de lise RIPA (150mM NaCl; 50 mM Tris HCl pH=8,0; 5mM EGTA; 1% Triton X-100; 0,5% DOC; 0,1% SDS) suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (1mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF); 1mM ditiotretitol (DTT); 1µg/ml quimostatina; 1µg/ml leupeptina; 1µg/ml antipaina; 5µg/ml de pepstatina A – CLAP), tendo sido posteriormente sonicadas (homogeneização por ultra-sons – 3 pulsos, 15 segundos) e centrifugadas a 13 000 rpm (815 493 G), durante 15 minutos a 4°C.

Recolheram-se os sobrenadantes (extrato total) e armazenaram-se os lisados proteicos a - 80°C até posterior utilização.

4.2 Quantificação proteica – Método BCA

A quantidade de proteína total presente na amostra foi determinada usando o método de BCA (ácido bicinconínico). Utilizou-se como padrão a BSA (albumina sérica bovina).

Numa placa multiwell de ELISA de 96 poços, adicionou-se em duplicado:

- 25 µl de cada padrão + 25 µl de tampão de lise RIPA
- 25 µl de cada amostra proteica diluída + 25 µl de água milliQ
- 200 µl de reagente BCA por poço

Colocou-se a placa numa incubadora a 37°, durante 30 minutos, de seguida mediu-se a absorvância (A 570nm) no leitor de ELISA e fez-se uma reta de calibração.

4.3 Desnaturação de lisados proteicos totais

A partir da reta de calibração, calculou-se a concentração de proteína das amostras em estudo. As amostras foram desnaturadas por adição de uma solução desnaturante 6X (10% (m/v) SDS (dodecil sulfato de sódio); 0,6 M DTT; 0,01% (m/v) azul de bromofenol; 0,5M Tris-HCl a pH 6,8 e 30% (v/v) glicerol), seguidas de aquecimento a 95°C durante 5 minutos.

4.4 Técnica de Western Blotting

Preparou-se o sistema de eletroforese, com a preparação de geles a 10% de Bis acrilamida, de 15 poços (para 12 amostras por gel, na quantidade de 3µg para TH e 10µg para GFAP) e uma solução tampão constituída por 125mM Tris-base, 100mM Glicina e 0,5% SDS a um pH 8,3.

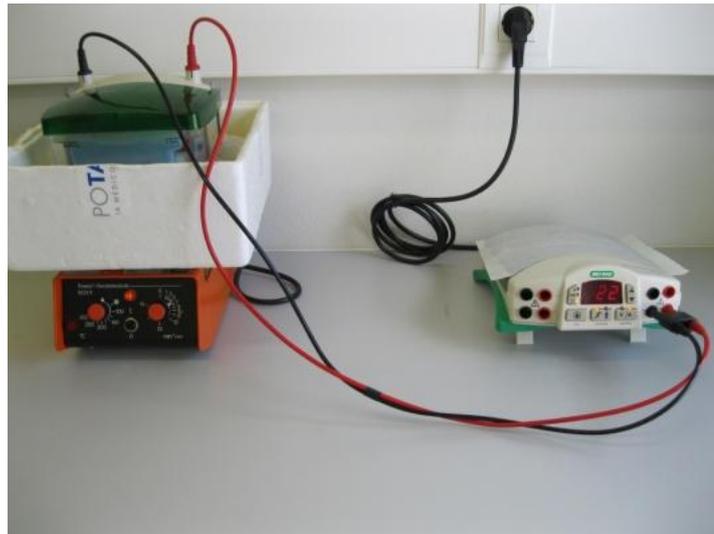


Figura 14 - Sistema de eletroforese utilizado neste estudo (Fotografia tirada no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Após eletroforese (a 190V durante 60 min), as proteínas foram transferidas por electrotransferência (a 110V durante 90 min), para uma membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF – *Immobilon PVDF transfer membranes 0.45 μ m*, Millipore), previamente ativada por imersão em metanol durante 5 seg., seguido de incubação em água durante 5 min e por último, em tampão de electrotransferência (CAPS 100mM a pH 11, metanol 20%) durante 15 min.

Após electrotransferência, procedeu-se ao bloqueio da membrana numa solução de BSA a 1% em PBS-T (tampão fosfato com 0,1% tween-20), para a quantificação de GFAP, e numa solução de leite magro a 5% em PBS-T para a quantificação de TH, durante cerca de 60 minutos, sob agitação à temperatura ambiente.

As membranas foram incubadas durante a noite com os anticorpos primários (ver tabela) diluídos numa solução de leite magro a 5% (m/v) em PBS-T, a 4°C.

Após incubação, as membranas foram lavadas numa solução de PBS-T, sob agitação, durante cerca de 60 minutos (6 lavagens de 10 minutos cada). Seguidamente foram incubadas no anticorpo secundário, diluído numa solução de leite magro a 5% em PBS-T, à temperatura ambiente, durante cerca de 60 minutos. Após esse tempo foram feitos novos ciclos de lavagem de 10 minutos cada, durante 60 minutos, com PBS-T, seguida de revelação por reação com quimiofluorescência, através do uso do reagente ECF (*Enhanced Chemifluorescence* – GE Healthcare Life sciences).

Tabela 1 - Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de Western Blotting

Anticorpos	Peso Molecular (KDa)	Loading (µg)	Diluição	Referência	Companhia
Mouse anti-GFAP	50	10	1:1000	IF03L	Millipore
Mouse anti-TH	59-63	3	1:2000	MAB 318	Millipore
Mouse anti-GAPDH	40	-	1:2000	Ab 9484	Abcam
Mouse anti-β-Tubulina	55	-	1:5000	T 7816	Sigma Life Science
Goat anti-mouse	-	-	1:5000	A 3582	Sigma Life Science

A revelação foi feita no detector *Fluorescent Image Analyzer Typhoon FLA 900* (GE Healthcare Bio-sciences), e a quantificação das bandas foram obtidas através do uso do *software ImageQuant 5,0 (Molecular Dynamics)*.

Após revelação as membranas foram reincubadas com os anti-corpos anti-GAPDH (para o GFAP) e anti-β-Tubulina (para o TH), para controlo de *loading*.

5. HPLC

A quantificação dos níveis de Dopamina (DA) e seus metabolitos (DOPAC e HVA), e Serotonina (5-HT) foi determinada utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa com deteção eletroquímica (HPLC-ED, amperométrica) (Pereira *et al.*, 2012).

O sistema de HPLC utilizado incluiu uma bomba Gilson (modelo 307), um auto-injector Gilson (modelo 234; loop 50µl), um detector Gilson (modelo 142) e *software UniPoint v5.11*.



Figura 15 - Sistema de HPLC utilizado neste estudo para quantificação de monoaminas (Fotografia tirada no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

As amostras de estriado (hemisfério direito) foram descongeladas, sonicadas em 250 μ l ácido perclórico 0,2M arrefecido em gelo (três pulsos de 10 segundos) e centrifugadas a 13 000 rpm, 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em tubos de polipropileno de centrifugação com microfiltros de 0,22 μ m Nylon (Spin-X®Centrifuge Tube Filter, Costar®), a 10 000 rpm, 10 minutos a 4°C, e armazenado a -80°C para posterior análise. Os pellets foram ressuspensos em NaOH 1M e armazenados a -80°C para posterior quantificação da proteína usando o método de BCA (ácido bicinconínico - Thermoscientific®).

Para a separação e quantificação das monoaminas, utilizou-se uma coluna ODS 2 Waters Spherisorb® (4,6 x 250 mm Analytical Cartridge; tamanho da partícula: 5 μ m).

A fase móvel, desgaseificada e filtrada, foi constituída como mostra a tabela e ajustada a um pH 4,5 com NaOH 5M.

Tabela 2 - Condições experimentais para a análise em HPLC-ED

Fase Móvel	- Acetato de sódio trihidratado (0,1M) - Ácido cítrico monohidratado (0,1M) - Octilsulfato de sódio (0,5 mM) - EDTA (0,15 mM) - Trietilamina (1 mM) - Metanol (10%)
Fluxo	1 ml/minuto
Sensibilidade	2 nA/V

Os tempos de retenção para a DA, DOPAC, HVA e 5-HT foram respectivamente, 9.03, 6.64, 16.40 e 25.30 min. A concentração das monoaminas em cada amostra foi calculada tendo como referência curvas padrão de cada monoamina, sendo os resultados apresentados em ng/mg de proteína.

6. Análise estatística

Todos os resultados estão expressos como média \pm EPM e a significância estatística foi avaliada utilizando-se o ANOVA seguido do teste *Post-hoc Bonferroni multiple comparison* ou teste *t-Student* não emparelhado (GraphPad Prism 5.00.288), em que * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Sal+Sed.

CAPÍTULO IV: Resultados

CAPÍTULO IV – Resultados

1. Administração de Metanfetamina

Após administração intraperitoneal de Metanfetamina (cerca de 10 minutos depois), os murganhos apresentaram alterações físicas e comportamentais, como o pêlo eriçado, comportamentos estereotipados (atividade motora repetitiva) e aumento da atividade locomotora.

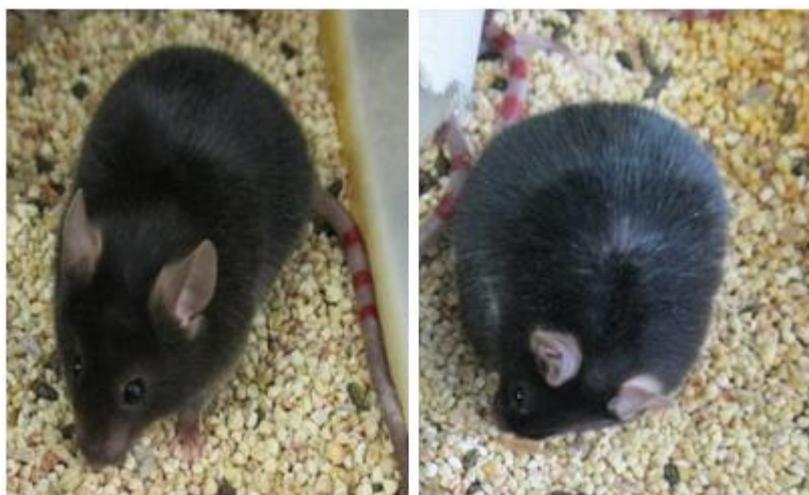


Figura 16 - Murganhos (esquerda – em estado normal; direita – sob o efeito da Metanfetamina, com comportamento estereotipado e pelo eriçado) (Fotografia tirada no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Passadas 24 horas, os animais já se encontravam totalmente recuperados, apresentando os mesmos comportamentos e características físicas do grupo controlo. No “*treadmill*” não mostraram qualquer alteração na capacidade de corrida, comparativamente com o grupo controlo (Sal + Ex).

Nenhum animal morreu ou mostrou algum tipo de complicação, após administração de Metanfetamina.

2. Análise bioquímica

2.1 Níveis estriatais totais de Dopamina, seus metabolitos (DOPAC e HVA) e TH

A Metanfetamina produziu uma depleção dos níveis estriatais dopaminérgicos ($\approx 34\%$ para o grupo sedentário e $\approx 32\%$ para o grupo exercício) comparativamente com o grupo controlo (Sal + Sed). O mesmo se verifica quando se compara ambos os grupos de exercício, havendo uma depleção de $\approx 37\%$ no grupo MA comparativamente com o grupo Sal. (figura 17, A e 20). Os metabolitos da dopamina apresentam a mesma tendência da dopamina, com depleções no DOPAC de $\approx 21\%$ no grupo sedentário e $\approx 27\%$ no grupo exercício, comparativamente com o grupo controlo (Sal + Sed), e depleção de $\approx 33\%$ no grupo (MA + Ex) quando comparado com o controlo (Sal + Ex) (figura 17, B e 19); no HVA observa-se uma depleção de $\approx 20\%$ no grupo sedentário e $\approx 24\%$ no grupo de exercício, comparativamente com o controlo (Sal + Sed) e depleção de $\approx 24\%$ no grupo (MA + Ex), quando comparado com o controlo (Sal + Ex) (figura 17, C e 19).

Relativamente à expressão estriatal da proteína tirosina hidroxilase (TH) observa-se uma mesma tendência comparativamente com a dopamina e seus metabolitos, com uma depleção de $\approx 42\%$ no grupo sedentário e $\approx 47\%$ no grupo exercício, comparativamente com o grupo controlo (Sal + Sed), e uma depleção de $\approx 33\%$ no grupo (MA + Ex) quando comparado com o controlo do exercício (Sal + Ex) (figura 17, D).

As figuras 18-20 ilustram cromatogramas representativos dos padrões utilizados bem como das amostras.

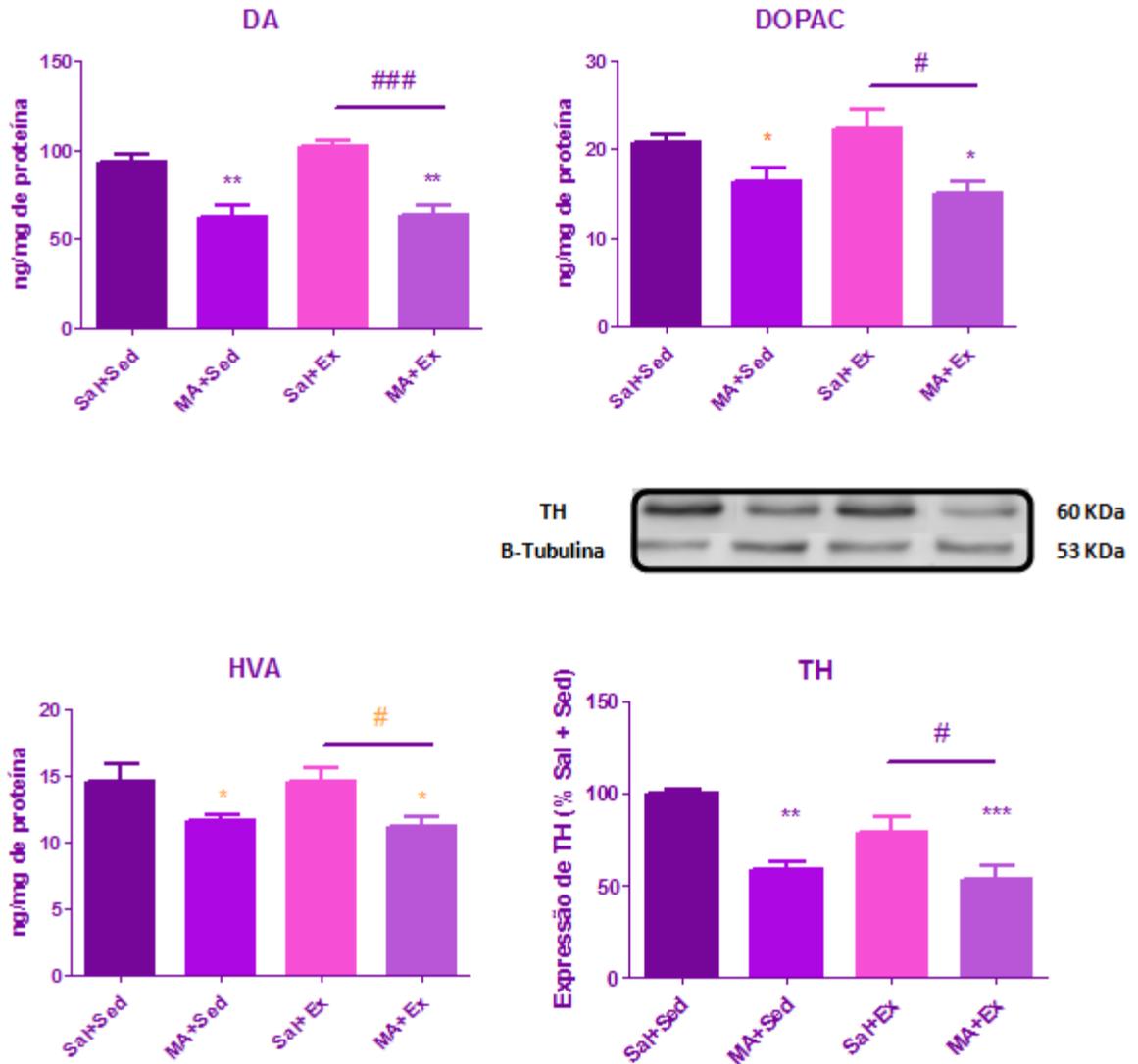


Figura 17 - Efeito da administração da MA (30mg/Kg) e/ou exercício físico nos níveis estriatais, totais de DA (A), seus metabolitos, DOPAC (B) e HVA (C) e expressão de tirosina hidroxilase (TH) (D). Os animais controlo (Sal) foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi 72h após administração de Metanfetamina (MA) e Salino (Sal). 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 valores são representados pela média \pm 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 teste *Student's t*, em que *,# <0,05. *traduz a análise estatística vs grupo Sal+Sed

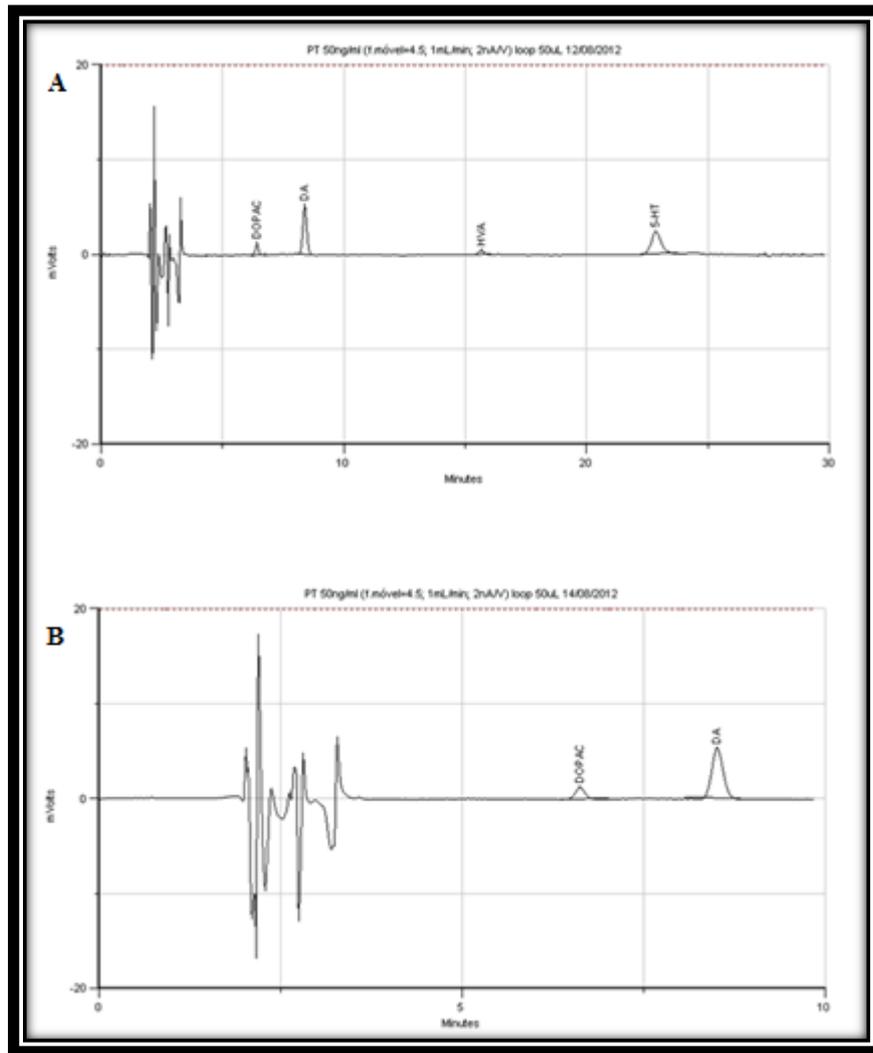


Figura 18 - Cromatogramas representativos dos padrões (A – para DOPAC, HVA, 5-HT; B – para DA)

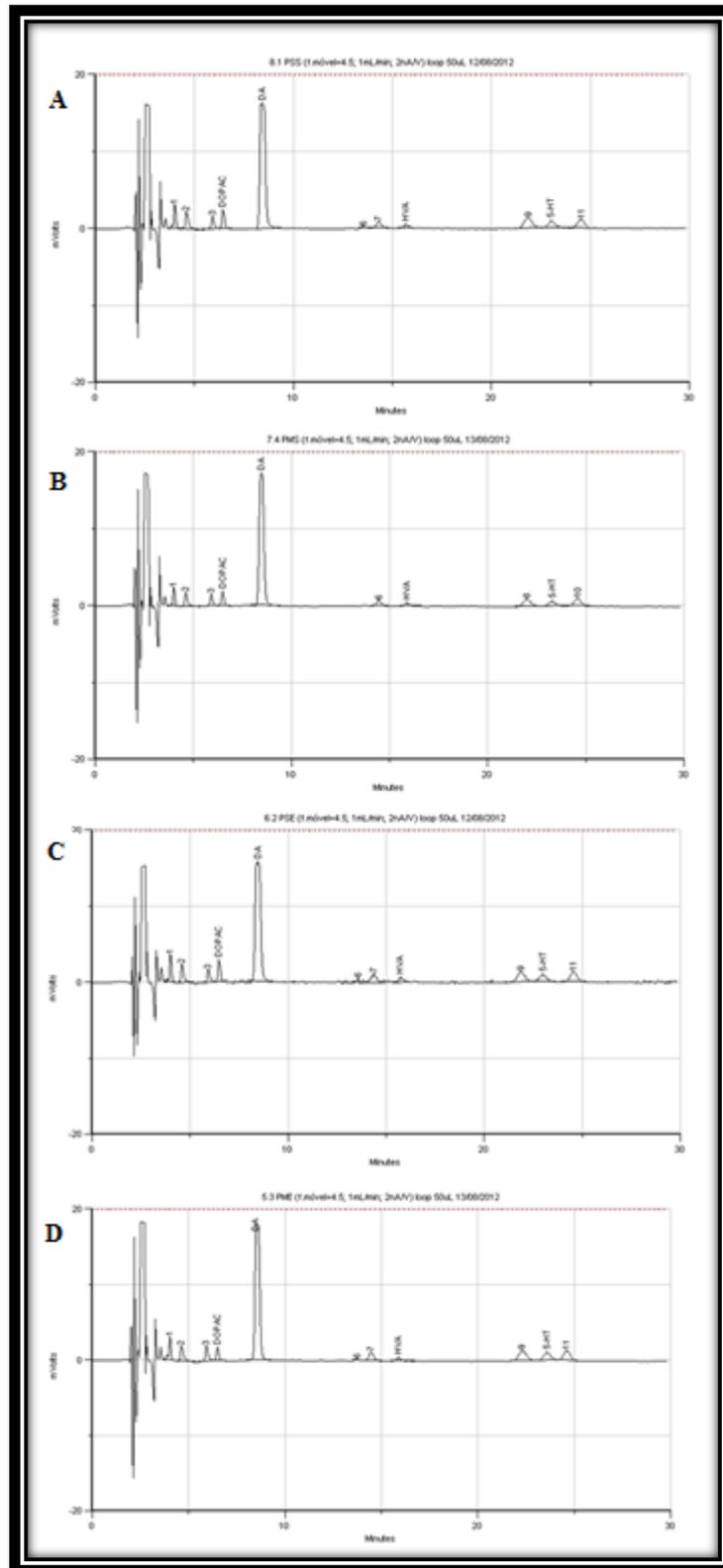


Figura 19 - Cromatogramas representativos de cada uma das condições experimentais – DOPAC; HVA; 5-HT (A – Sal+Sed; B – MA+Sed; C – Sal+Ex; D – MA+Ex)

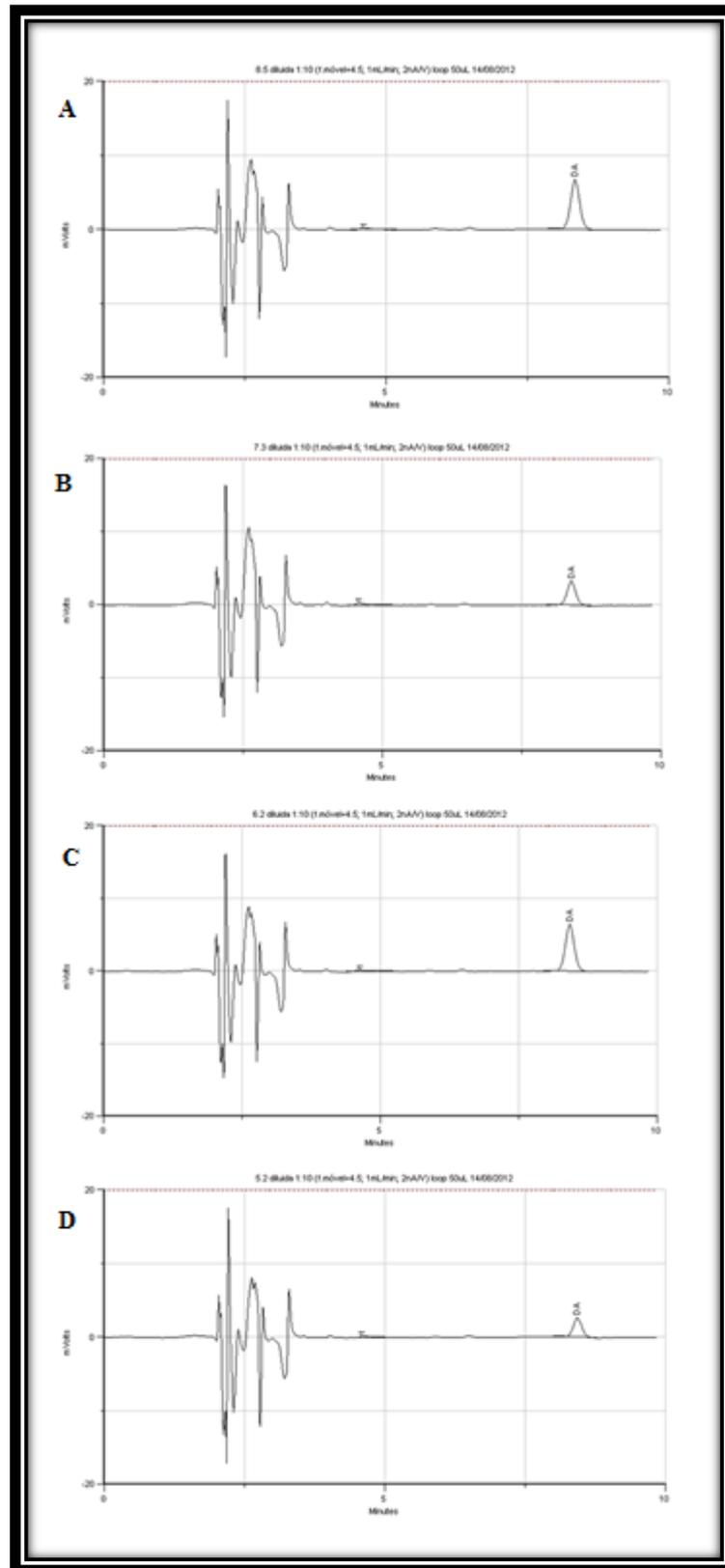


Figura 20 - Cromatogramas representativos de cada uma das condições experimentais – Dopamina (A – Sal+Sed; B – MA+Sed; C – Sal+Ex; D – MA+Ex)

2.2 Níveis estriatais totais de 5-HT

A metanfetamina não alterou os valores totais estriatais de serotonina no grupo sedentário em comparação com o grupo controlo (Sal + Sed). No entanto, ambos os grupos de exercício apresentam um aumento significativo desta monoamina ($\approx 49\%$ Sal + Ex, $\approx 39\%$ MA + Ex), comparativamente com o grupo controlo (Sal + Sed). Adicionalmente, o grupo MA + Ex apresenta valores de 5-HT tendencialmente mais elevados do que o grupo MA + Sed ($\approx 22\%$; $p=0,0543$; t-student).

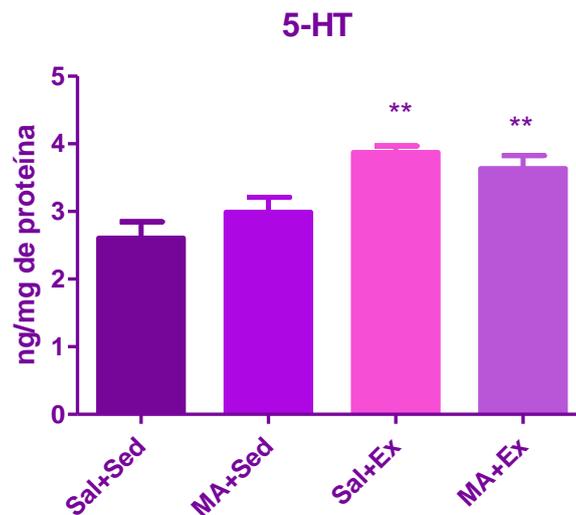


Figura 21 - Efeito da administração da MA (30mg/Kg) e/ou exercício físico nos níveis estriatais, totais de 5-HT. Os animais controlo (Sal) foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi 72h após administração de Metanfetamina (MA) e Salino (Sal). Os níveis de 5-HT foram determinados por HPLC. Os valores são representados pela média \pm EPM (n=6). Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison*, em que ** $p<0,01$. *traduz a análise estatística vs.grupo Sal+Sed

2.3 Expressão da proteína GFAP

Relativamente ao marcador astrocitário, a MA produziu um significativo aumento da proteína GFAP no estriado ($\approx 251\%$ no grupo Sed, e $\approx 271\%$ no grupo Ex), comparativamente com o grupo controlo (Sal + Sed), e um aumento de $\approx 188\%$ no grupo MA + Ex, quando comparado com o grupo controlo do exercício (Sal + Ex). Não existe diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos da MA (MA + Sed e MA + Ex).

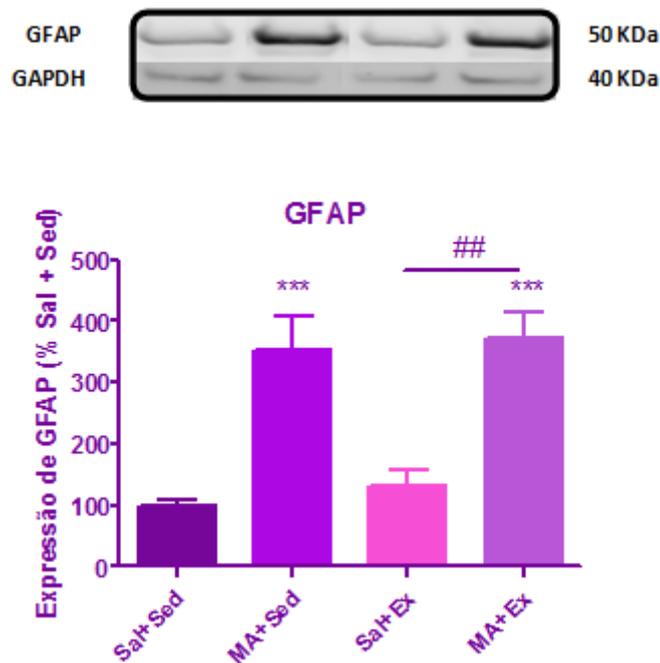


Figura 22 - Efeito da administração da MA (30mg/Kg) e/ou exercício físico na expressão estriatal da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Os animais controlo (Sal) foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi 72h após administração de Metanfetamina (MA) e Salino (Sal). Os níveis de GFAP foram analisados por *Western Blot*. O GAPDH foi utilizado como controlo de *loading*. Os valores são representados pela média (% controlo) \pm EPM (n=6). Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison*, em que ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. *traduz a análise estatística vs.grupo Sal+Sed

CAPÍTULO V: Discussão

CAPÍTULO V – Discussão

Esta investigação teve como principal objetivo avaliar o efeito neuroprotector do exercício crónico, no estriado, num modelo de neurotoxicidade por MA, induzido em murganhos de estirpe C57BL/6.

A Metanfetamina produz défices profundos nos sistemas dopaminérgicos bem como alterações gliais em várias regiões dos circuitos dopaminérgicos que incluem o córtex frontal e o estriado em roedores (Pereira *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2012; Krasnova e Cadet, 2009).

Dos vários modelos de toxicidade por MA (Krasnova e Cadet, 2009) escolhemos um modelo de administração única, via intraperitoneal, com uma dosagem de 30mg/Kg, mimetizando uma overdose em humanos. A administração desta dose elevada provoca degenerescência dos terminais dopaminérgicos, acompanhada por astrogliose no estriado, 72 h após a administração deste fármaco (Pereira *et al.*, 2012).

Nas primeiras horas subsequentes à administração da MA, os animais foram observados e apresentaram alterações comportamentais, como comportamentos estereotipados, aumento da atividade locomotora, bem como piloereção que é sugestiva de uma resposta autonómica desencadeada por este psicoestimulante.

Os comportamentos estereotipados que surgem após administração de MA, são considerados inúteis e repetitivos, ocorrendo em detrimento de outros comportamentos. Em roedores, caracterizam-se por movimentos da cabeça e membros anteriores, comportamentos orais (mastigação repetitiva), andar em círculos e cheirar (Atkins *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram haver comportamentos estereotipados, bem como aumento da atividade locomotora, imediatamente após administração da MA. O mecanismo dopaminérgico parece ser o responsável por estes aumentos na locomoção e comportamento estereotipado (Praputpittaya *et al.*, 2005, Randrup e Minkvad, 1967).

Passadas 24 h, os animais já não apresentavam alterações no comportamento, nem dificuldades na execução da corrida no “*treadmill*”.

Após 72 horas da administração única de MA (30mg/Kg) observou-se uma depleção dos níveis estriatais de dopamina e seus metabolitos (DOPAC e HVA), bem como diminuição da expressão da proteína TH. Estes resultados são consistentes com

outros estudos já efetuados, e sugerem neurodegenerescência dos terminais dopaminérgicos (Fumagalli *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2005).

Relativamente à 5-HT, não houve qualquer alteração entre os grupos administrados com MA e os respectivos salinos, sendo também consistente com outros autores (Pereira *et al.*, 2012). A serotonina, assim como o BDNF, regulam a plasticidade sináptica, neurogênese e a sobrevivência neuronal de um cérebro adulto. Um comprometimento da sinalização da 5-HT e do BDNF parece estar relacionado com a depressão, ansiedade e na patogénese de algumas doenças neurodegenerativas (Mattson *et al.*, 2004). Parece não haver consenso no que diz respeito à toxicidade da MA no sistema serotoninérgico, havendo divergências nos resultados de diferentes autores. Fumagalli *et al.*, (1998) observaram uma depleção nos níveis de 5-HT, enquanto Grace *et al.*, (2010) não apresentaram nenhuma diferença significativa.

Observou-se também um aumento marcado na expressão da proteína GFAP, nos animais submetidos à toxicidade induzida por MA, quando comparados com os salinos, consistente com a existência de astrogliose. O GFAP é um marcador clássico de astrogliose, expressa nos astrócitos do SNC (Al-Jarrah e Jamous, 2011) e surge em consequência de alterações patológicas. A sua expressão é acompanhada de hipertrofia e hiperplasia celular (Röhl *et al.*, 2007).

Não se observaram diferenças relativamente aos níveis de dopamina, seus metabolitos e expressão do TH, entre os grupos submetidos à neurotoxina que não praticaram exercício físico e que o fizeram regularmente. Estes resultados sugerem que este protocolo de exercício, considerado exercício regular moderado, parece ter sido ineficaz na prevenção da neurotoxicidade dopaminérgica estriatal induzida por MA. Por outro lado, a expressão do GFAP também não apresentou alterações entre os grupos de exercício e os sedentários que foram administrados com metanfetamina. Isto permite-nos concluir que o exercício não preveniu a astrogliose produzida pela MA.

É importante considerar que foi utilizado um protocolo de exercício forçado e não espontâneo, o que pode representar um factor indutor de stress. Por outro lado, o exercício físico foi realizado no período diurno, sendo mais stressante para os roedores, que se encontram mais ativos no período noturno.

Com efeito, alguns investigadores reportaram que a corrida em *treadmill* pode induzir sintomas de stress crónico, como hipertrofia da glândula adrenal, aumento dos níveis basais de corticosteroides ou imunossupressão (Arida *et al.*, 2011). A estimulação

crónica do SNC e a correspondente resposta hipotalâmica-pituitária-adrenal aumentam a rigidez vascular, diminuindo a resistência vascular, suprime o sistema imunitário, induz úlceras e provoca lesões em diferentes áreas cerebrais (Kregel, *et al.*, 2006). No entanto, o presente trabalho não sugere que o programa de exercício físico levado a cabo seja neurotóxico para o estriado visto que não produziu gliose. Contudo o putativo stress associado a este programa de exercício pode ter eliminado a sua eventual ação benéfica sobre os terminais dopaminérgicos. Por exemplo, Kelly *et al.* (2012) sugeriram que stress fisiológico sustentado pode sensibilizar o estriado à resposta inflamatória e neurotóxica produzida pela metanfetamina

Outro ponto, que contraria o putativo impacto neurotóxico no estriado da tipologia de exercício implementada neste estudo, tem a ver com os valores da serotonina observados. Com efeito, verificou-se que esta apresenta um aumento significativo nos animais que praticaram exercício físico. Pensa-se que o exercício, uma dieta restritiva e drogas antidepressivas, aumentam a sinalização da 5-HT e do BDNF, protegem a função cerebral e promovem um envelhecimento saudável (Mattson *et al.*, 2004). Os nossos resultados são consistentes com o facto de o exercício físico aumentar os níveis estriatais da serotonina e seu metabolito (5-HIAA) (Bailey *et al.*, 1993). Este estudo demonstra claramente que apesar do exercício físico aumentar a síntese de serotonina no estriado não consegue prevenir a degenerescência dos terminais dopaminérgicos nem a consequente astrogliose. É fundamental a realização de mais estudos para esclarecer o mecanismo pelo qual o exercício físico tem este impacto positivo nos terminais serotoninérgicos estriatais. É também relevante esclarecer o seu significado fisiológico.

CAPÍTULO VI: Conclusão

CAPÍTULO VI - Conclusão

Neste estudo utilizou-se uma administração única de MA para produzir neurodegenerescência dopaminérgica negroestriatal, que foi constatada com a depleção estriatal da DA e dos seus metabolitos (DOPAC e HVA), bem como pela diminuição da expressão da proteína TH e do aumento da expressão da proteína GFAP.

Relativamente ao exercício físico, este estudo sugere que este não previne a neurotoxicidade dopaminérgica estriatal, nem a astrogliose induzida pela MA. Por outro lado, com base nos resultados obtidos acerca da 5-HT, pode-se concluir, que o exercício físico aumenta os níveis estriatais desta monoamina.

CAPÍTULO VII: Bibliografia

CAPÍTULO VII - Bibliografia

- ✓ Ahlskog, J.E., 2011. Does vigorous exercise have a neuroprotective effect in Parkinson disease? *Neurology* 77(3): 288 – 294.
- ✓ 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
- ✓ Anderson, K. L., Itzhak, Y., 2006. Methamphetamine-Induced Selective Dopaminergic Neurotoxicity Is Accompanied by an Increase in Striatal Nitrate in the Mouse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074: 225-233
- ✓ Arida, R. M., Scorza, F.A., Gomes da Silva, S., Cyaneiros, R.M., Cavalheiro, E.A., 2011. Exercise Paradigms to Study Brain Injury Recovery in Rodents. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 90(2): 1 – 14.
- ✓ Atkins, A. L., 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* 157:96 – 104.
- ✓ Bailey, S.P., Davis, J.M., Ahlborn, E.N., 1993. Neuroendocrine and substrate responses to altered brain 5-HT activity during prolonged exercise to fatigue. *J. Appl. Physiol.* 74(6):3006-3012.
- ✓ Barker, R. A., Barasi, S., Neal, M. J., 2003. Compêndio de neurociência.
- ✓ Bayod, S., del Valle, J., Canudas, A. M., Lalanza, J. F., Sanchez-Roige, S., Camins, A., Escorihuela, R. M., Pallàs, M., 2011. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol* 111(5): 1380 – 1390.

- ✓ Caldas, A. C., Nunes, V. N., 2010. 5 Introdução às Neurociências. Universidade Católica Editora Unipessoal. Pp:23-32
- ✓ Chae, C-H., Kim, H-T., 2009. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochemistry International* 55: 208 – 213.
- ✓ Cho, A. K., Melega, W. P., Kuczenski, R., Segal, D. S., 2001. Relevance of Pharmacokinetic Parameters in Animal Models of Methamphetamine Abuse. *SYNAPSE* 39: 161 – 166
- ✓ Cruickshank, C.C., Dyer, K. R., 2009. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction*, 104: 1085-1099
- ✓ David, H. N., Ansseau, M., Abbraini, J. H., 2005. Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of “intact” animals. *Brain Research Reviews*. 50: 336-360;
- ✓ Dutra, M.F., Jaeger, M., Ilha, J., Kalil-Gaspar, P.I., Marcuzzo, S., Achaval, M., 2012. Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Neurological Sciences* 33(5):1137-1144.
- ✓ Fleckenstein, A., Volz, T. J., Riddle, E. L., Gibb, J. W., Hanson, G. R., 2007. New Insights into the Mechanism of Action of Amphetamines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47:681-698.
- ✓ Fontes-Ribeiro, C. A., Marques, E., Pereira, F. C., Silva, A. P., Macedo, T. R. A., 2010. May Exercise Prevent Addiction. *Curr Neuropharmacol.* 9(1): 45 – 48.

- ✓ 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. *J. Neurosci.* 18(13): 4861 – 4869
- ✓ Gerecke, K. M., Jiao, Y., Pani, A., Pagala, V., Smeyne, R. J., 2010. Exercise protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Brain Research* 1341: 72 – 83.
- ✓ Golan, D. E., Tashjian, A. H., Armstrong, E. J., Armstrong, A. W., 2009. Princípios de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso. *Princípios de Farmacologia: a base Fisiopatológica da Farmacoterapia.* 2ª ed. Pp: 82 – 97.
- ✓ González-Torres, L. C., Armendáriz-Borunda, J., 2005. Aspectos inmunológicos en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurociencia* 10(3): 168 – 174.
- ✓ Grace, C. E., Schaefer, T. L., Herring, N. R., Graham, D. L., Skelton, M. R., Gudelsky, G. A., Williams, M. T., Vorhees, C. V., 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.
- ✓ Instituto da Droga e da Toxicodependência (I.D.T.), 2011. Relatório Anual 2010 - A Situação do País em Matéria de Drogas e Toxicodependências.
- ✓ Janhunen, S., Ahtee, L., 2007. Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: Implications for drug development. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31:287-314.
- ✓ Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., et al., 2000. The Basal Ganglia. *Principles of Neural Science.* 4th Edition. McGraw-Hill. pp: 854-867

- ✓ Karch, S. B., 2007. Chapter 1 – The Dopamine Transporter and Addiction; Chapter 4 – Neurochemical and Neurobehavioral consequences of Methamphetamine Abuse. *Neurochemistry of Abused Drugs*. Pp: 1-4, 53-66
- ✓ 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.
- ✓ Krasnova, I. N., Cadet, J. L., 2009. Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Research Reviews* 60(2): 379-407.
- ✓ Kregel, K. C., Allen, D. L., Booth, F.W., Fleshner, M.R., Henriksen, E.J., Musch, T.I., O`Leary, D.S., Parks, C.M., Poole, D.C., Ra`anan, A.W., Sheriff, D.D., Sturek, M.S., Toth, L.A., 2006. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols.
- ✓ Kreitzer, A. C., Malenka, R. C., 2008. Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron* 60: 543 – 554.
- ✓ Lau, Y-S., Patki, G., Das.Panja, K., Le, W-D., Ahmad, S.O., 2011. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson`s disease with moderate neurodegeneration. *European Journal of Neuroscience*, 33: 1264 – 1274.
- ✓ Logan, B. K., 2002. Methamphetamine – Effects on Human Performance and Behavior. *Forensic Science Review* Vol. 14 N° 1/2 pp. 133-151
- ✓ Marques, E., Vasconcelos, F.,Rolo, M. R., Pereira, F.C., Silva, A. P., Macedo, T. R., Ribeiro, C. E., 2008. Influence of Chronic Exercise on the Amphetamine-Induced Dopamine Release and Neurodegeneration in the Striatum of the Rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1139:222-231.

- ✓ Marshall, J. F., O'Dell, S. J., 2012. Methamphetamine influences on brain and behavior: unsafe at any speed. *Trends in Neurosciences* 918: 1-10
- ✓ Mattson, M. P., Maudsley, S., Martin, B., 2004. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *TRENDS in Neurosciences* 27(10): 589 – 594.
- ✓ Meeusen, R., De Meirleir, K., 1995. Exercise and Brain Neurotransmission. *Sports Med* 20(3): 160 – 188.
- ✓ Meeusen, R., Smolders, I., Sarre, S., De Meirleir, K., Keizer, H., Serneels, M., Ebinger, G., Michotte, Y., 1997. *Acta Physiol Scand* 159: 335 – 341.
- ✓ Middeldorp, J., Hol, E. M., 2010. GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93, pp. 421-443.
- ✓ Miljković, D., Timotijević, G., Stojković, M. M., 2011. Astrocytes in the tempest of multiple sclerosis. *FEBS Letters* 585, pp. 3781-3788.
- ✓ Musshoff, F., 2000. Illegal or Legitimate Use? Precursor Compounds to Amphetamine and Methamphetamine. *Drug Metabolism Reviews* 32(1), pp. 15-44
- ✓ Park, S.W., Shen, X., Tien, L.-T., Roman, R., Ma, T., 2011. Methamphetamine-induced changes in the striatal dopamine pathway in μ -opioid receptor knockout mice. *Journal of Biomedical Science*, 18:83.
- ✓ Pauly, M.-C., Piroth, T., Döbrössy, M., Nikkhah, G., 2012. Restoration of the striatal circuitry: from developmental aspects toward clinical applications. *Frontiers in Cellular Neurosciences*. Vol. 6, Art. 16, pp: 1-14;

- ✓ Pereira, F. C., Cunha-Oliveira, T., Viana, S. D., Travassos, A. S., Nunes, S., Silva, C., Prediger, R. D., Rego, A. C., Ali, S. F., Fontes-Ribeiro, C. A., 2012. Disruption of striatal glutamatergic/GABAergic homeostasis following acute methamphetamine in mice. *Neurotoxicol Teratol* 34(5):522-529.
- ✓ Pereira, F. C., Lourenço, E. S., Borges, F., Morgadinho, T., Fontes-Ribeiro, C., Macedo, T. R., Ali, S. F., 2006. Single or Multiple Injections of Methamphetamine Increased Dopamine Turnover but Did Not Decrease Tyrosine Hydroxylase Levels or Cleave Caspase-3 in Caudate-Putamen. *Synapse* 60: 185-193.
- ✓ Petzinger, G. M., Walsh, J. P., Akopian, G., Hogg, E., Abernathy, A., Arevalo, P., Turnquist, P., Vucković, M., Fisher, B. E., Togasaki, D. M., Jakowec, M. W., 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. *The Journal of Neuroscience*, 27(20): 5291-5300.
- ✓ Praputpittaya, C., Krisanasap, J., Sribanditmongkol, P., 2005. Correlations Between Locomotor Activity and Stereotyped Behavior, but not Alpha-1 EEG Power Spectrum, in Methamphetamine-Treated Rats. *Thai Journal of Physiological Sciences* 18(3): 41 – 53.
- ✓ Randrip, A., Minkvad, I., 1967. Stereotyped Activities Produced by Amphetamine in Several Animal Species and Man. *Psychopharmacologia* 11:300 – 310.
- ✓ Robbins, T. W., Everitt, B. J., 1999. Drug addiction: bad habits add up. *Nature*, Vol. 398 6728), p. 567
- ✓ Röhl, C., Lucius, R., Sievers, J., 2007. The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Research* 1129: 43 – 52.

- ✓ Salo, R., Gabay, S., Fassbender, C., Henik, A., 2011. Distributed attentional deficits in chronic methamphetamine abusers: Evidence from the Attentional Network Task (ANT). *Brain and Cognition* 77: 446 – 452
- ✓ Scott, L. A., Roxburgh, A., Bruno, R., Matthews, A., Bums, L, 2012. The impact of comorbid cannabis and methamphetamine use on mental health among regular ecstasy users. *Addictive Behaviors* 37: 1058-1062.
- ✓ Siegel, G. J., Albers, R. W., Brady, S. T., Price, D. L., 2006. Addiction. *Basic Neurochemistry – Molecular, cellular and Medical Aspects*. Part VIII, Chapter 56; pp: 911 – 926.
- ✓ Silva, J. G., Tavares, M. A., 1999. “Ice” e “Ecstasy”: Os estimulantes do final do milénio. Perspectivas Clínica e Experimental. *Revista Portuguesa de Psicossomática*. Vol.1, Nº 002, pp: 31-58
- ✓ Simões, P. F., Silva, A. P., Pereira, F. C., Marques, E., Milhazes, N., Borges, F., Ribeiro, C.P., Macedo, T. R., 2008. Methamphetamine Changes NMDA and AMPA Glutamate Receptor Subunit Levels in the Rat Striatum and Frontal Cortex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1139: 232 – 241.
- ✓ Smith, A. D., Zigmond, M. J., 2003. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Experimental Neurology* 184: 31 – 39.
- ✓ Smith, B. A., Goldberg, N. R. S., Meshul, C. K., 2011. Effects of treadmill exercise on behavioral recovery and neural changes in the substantia nigra and striatum of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse. *Brain Research* 1386: 70-80.

- ✓ Speelman, A. D., van de Warrenburg, B. P., van Nimwegen, M., Petzinger, G. M., Munneke, M., Bloem, B. R., 2011. How might physical activity benefit patients with Parkinson disease? *Nat. Rev. Neurol.* 7:528-534.
- ✓ 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.
- ✓ Vallone, D., Picetti, R., Borrelli, E., 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24: 125-132.
- ✓ Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G-J, Shumay, E., Telang, F., Thanos, P. K., Alexoff, D., 2010. Distribution and Pharmacokinetics of Methamphetamine in the Human Body: Clinical Implications. *Plos One* Vol. 5 N° 12, pp. 1-6
- ✓ World Health Organization (WHO), 2004. Neuroscience of psychoactive substance use and dependence. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. Geneva. 2: 19-25;
- ✓ Wu, S.-Y., Wang, T.-F., Yu, L., Jen, C. J., Chuang, J.-I., Wu, F.-S., Wu, C.-W., Kuo, Y.-M., 2011. Running exercise protects the substantia nigra dopaminergic neurons against inflammation-induced degeneration via the activation of BDNF signaling pathway. *Brain, Behavior, and Immunity* 25: 135 – 146.
- ✓ Yu, L., Liao, P.-C., 2000. Sexual differences and estrous cycle in methamphetamine-induced dopamine and serotonin depletions in the striatum of mice. *J Neural Transm* 107: 419 – 427.

- ✓ Zhu, J. P. Q., Xu, W., Angulo, J. A., 2005. Disparity in the temporal appearance of methamphetamine-induced apoptosis and depletion of dopamine terminal markers in the striatum of mice. *Brain Research* 1049: 171 – 181.

- ✓ Zhu, J. P. Q., Xu, W., Angulo, J. A., 2006. Methamphetamine-Induced Cell Death: Selective Vulnerability in Neuronal Subpopulations of the Striatum in Mice. *Neuroscience* 140(2): 607-622