



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O efeito antidepressivo do exercício físico em murganhos submetidos a uma dose neurotóxica de metanfetamina

Inês Roque Antunes Pita

---

2013





# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## O efeito antidepressivo do exercício físico em murganhos submetidos a uma dose neurotóxica de metanfetamina

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Carlos Fontes Ribeiro (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Frederico Pereira (Universidade de Coimbra)

Inês Roque Antunes Pita

2013



## Agradecimentos

Finda uma longa e enriquecedora etapa, é tempo de dizer obrigada àqueles que nela se cruzaram.

Ao Professor Doutor Carlos Albertos Fontes Ribeiro, agradeço a excelente oportunidade que me deu para fazer parte do seu grupo de trabalho, orientação, disponibilidade, confiança, simpatia, amabilidade e ensinamentos transmitidos do seu impressionante e infindável conhecimento científico.

Ao Professor Doutor Frederico Pereira, pela orientação, empenho, motivação e entusiasmo intermináveis, confiança, amizade, à-vontade, boa disposição, bom humor e muitos risos, que reinaram ao longo de todo este trabalho e que contribuíram para a sua realização.

À Professora Doutora Emília Duarte, pela disponibilização de meios e pertinentes sugestões que contribuíram para a realização deste trabalho.

Às colegas do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental - Catarina, Cláudia, Daniela, Sara e Tânia - pela amizade, companheirismo, espírito de entreatajuda e sessões de gargalhadas. Um obrigada, em especial, à doutoranda Sofia Viana, por toda a ajuda, dicas, disponibilidade e paciência no “embalo” dos nossos “bebés”, os *blots*. Que te sirva de treino para o que aí vem.

Às colegas e amigas de curso - Diana, Guida, Inêses, Joana, Mafalda, Marina, Raquel, Tânia e Tatiana -, por todos os momentos passados na vossa companhia. Obrigada por tudo, obrigada pela amizade. Levo-vos comigo p'rá vida!

Aos meus pais e irmão, pelo carinho, apoio, esforço, confiança e educação e por serem os mentores daquilo que hoje sou. Sem vocês seria muito mais difícil.

Aos meus avós e bisavó, por fazerem de mim a neta querida.

À restante família e amigos pelo carinho, amizade, paciência, alegria e por todos os instantes vividos que fazem com que tudo valha a pena.

# Índice

|   |      |
|---|------|
| Lista de tabelas .....  | viii |
| Lista de figuras.....   | ix   |
| Abreviaturas .....  | xi   |
| Resumo.....   | xiv  |
| Abstract .....  | xvi  |
| Capítulo I .....  | 1    |
| Introdução .....  | 1    |
| 1.  Abuso de drogas.....  | 3    |
| 1.1.  Estimulantes do tipo anfetamínico .....   | 4    |
| 1.1.1.  Epidemiologia do abuso de estimulantes do tipo anfetamínico.....                              | 5    |
| 1.1.2.  Metanfetamina: farmacocinética e efeitos farmacológicos .....                                 | 7    |
| 1.1.3.  Metanfetamina e as vias dopaminérgicas mesocorticolímbica e nigroestriada.....                | 9    |
| 1.1.3.1.  Vias .....  | 9    |
| 1.1.3.2.  Síntese e sinalização de dopamina.....  | 11   |
| 1.1.3.3.  Metanfetamina e dopamina.....   | 13   |
| 1.1.3.4.  Metanfetamina e neurotoxicidade: disrupção da homeostasia dopaminérgica e astroglíose ..... | 14   |
| 2.  Depressão.....  | 19   |
| 2.1.  Comportamento depressivo e/ou ansioso na fase de privação da metanfetamina.....                 | 20   |
| 2.2.  Envolvimento da via mesocortical na depressão e na ansiedade.....                               | 22   |
| 3.  Fatores neurotróficos – BDNF e GDNF.....  | 23   |
| 3.1.  Efeito neuroreparador de BDNF e GDNF .....  | 26   |
| 3.2.  As neurotrofinas na depressão e ansiedade .....   | 27   |
| 4.  Exercício físico .....  | 28   |
| 4.1.  Efeito antidepressivo/ansiolítico do exercício físico .....                                     | 29   |
| 4.2.  Efeito neuroreparador do exercício físico.....  | 30   |
| Capítulo II .....   | 33   |
| Objetivo.....   | 33   |
| 1.  Objetivo.....   | 35   |

|  |     |
|--|-----|
| 1. Animais .....   | 39  |
| 2. Neurotoxina utilizada .....   | 39  |
| 3. Treadmill.....  | 39  |
| 4. Desenho experimental .....  | 40  |
| 4.1. Adaptação ao <i>treadmill</i> .....   | 40  |
| 4.2. Administração de metanfetamina.....   | 41  |
| 4.3. Protocolo de exercício .....  | 42  |
| 5. Testes de comportamento .....   | 44  |
| 5.1. <i>Elevated plus-maze</i> .....   | 44  |
| 5.2. Tail suspension .....   | 45  |
| 6. Isolamento do córtex frontal .....  | 46  |
| 7. Quantificação da densidade de TH, GFAP, BDNF e GDNF por <i>Western Blotting</i> .....                         | 46  |
| 8. Análise estatística.....  | 48  |
| Capítulo IV .....  | 39  |
| Resultados .....   | 39  |
| 1. Alterações agudas comportamentais após administração de metanfetamina .....                                   | 51  |
| 2. Efeito da metanfetamina e/ou exercício físico crónico no comportamento do tipo ansioso em murganhos .....     | 52  |
| 3. Efeito da metanfetamina e/ou exercício físico crónico no comportamento do tipo depressivo em murganhos .....  | 53  |
| 4. Efeito da metanfetamina e/ou exercício físico crónico na densidade cortical de TH em murganhos.....           | 54  |
| 5. Efeito da metanfetamina e/ou exercício físico crónico na densidade cortical de GFAP em murganhos.....         | 56  |
| 6. Efeito da metanfetamina e/ou exercício físico crónico na densidade cortical de BDNF e GDNF em murganhos ..... | 57  |
| Capítulo V .....   | 519 |
| Discussão .....  | 519 |
| 1. Comportamento.....  | 61  |
| 2. Neurotoxicidade.....  | 62  |
| Capítulo VI .....  | 615 |
| Conclusão .....  | 617 |
| Capítulo VII .....   | 679 |

Bibliografia..... 671

## Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> – Consumo de drogas no ano de 2010, (UNODC).....   | 4  |
| <b>Tabela 2</b> – Grupos experimentais e quantidade de murganhos utilizados (n).....                         | 35 |
| <b>Tabela 3</b> – Anticorpos primários e secundários utilizados na análise por <i>Western Blotting</i> ..... | 43 |

## Lista de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Prevalência do consumo de estimulantes do tipo anfetamínico (excluindo o <i>ecstasy</i> ), em 2010.....   | 5  |
| <b>Figura 2</b> – Estrutura química da metanfetamina e da d-anfetamina.....   | 6  |
| <b>Figura 3</b> – Vias dopaminérgicas no cérebro humano: nigroestriada, mesocortical, mesolímbica e tuberoinfundibular (secção sagital).....  | 9  |
| <b>Figura 4</b> – Sinalização sináptica dopaminérgica.....  | 11 |
| <b>Figura 5</b> – Eventos nos terminais dopaminérgicos despoletados pela metanfetamina (METH).....  | 12 |
| <b>Figura 6</b> – Representação esquemática dos eventos celulares e moleculares envolvidos na degeneração dos terminais dopaminérgicos e apoptose neuronal induzidas pela metanfetamina (METH).....                   | 15 |
| <b>Figura 7</b> – Os quatro lobos do córtex cerebral: frontal, parietal, temporal e occipital.....  | 21 |
| <b>Figura 8</b> – Vias de sinalização de BDNF.....  | 24 |
| <b>Figura 9</b> – Vias de sinalização de GDNF.....  | 25 |
| <b>Figura 10</b> – Protocolo do período de adaptação dos murganhos ao <i>treadmill</i> .....  | 36 |
| <b>Figura 11</b> – Administração intraperitoneal de uma única dose de metanfetamina (30 mg/kg) num dos murganhos pertencentes ao grupo Meth (Sed ou Ex).....  | 37 |
| <b>Figura 12</b> – Protocolo de exercício físico para os respetivos grupos de exercício, Sal/Ex e Meth/Ex.....  | 38 |
| <b>Figura 13</b> – Corrida dos murganhos pertencentes ao grupo exercício no <i>treadmill</i> com uma esteira separada por uma divisória em acrílico, proporcionando dois corredores individualizados.....             | 38 |
| <b>Figura 14</b> – Evolução do peso dos murganhos ao longo de 62 dias.....  | 45 |
| <b>Figura 15</b> – Efeito de uma dose única de METH (30 mg/kg, i.p.) e/ou exercício físico crónico no comportamento do tipo ansiogénico [teste <i>elevated plus maze</i> (EPM)], 49 dias após a injeção com METH..... | 46 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 16</b> – Efeito de uma dose única de METH (30 mg/kg, i.p.) e/ou exercício físico crónico no comportamento do tipo depressivo (teste <i>tail suspension</i> )..... | 48 |
| <b>Figura 17</b> – Efeito da administração da METH (30 mg/kg, i.p.) e/ou exercício físico na densidade cortical da tirosina hidroxilase (TH).....                           | 49 |
| <b>Figura 18</b> – Efeito da administração da METH (30 mg/kg, i.p.) e/ou exercício físico na densidade cortical da proteína ácida fibrilar glial (GFAP).....                | 50 |
| <b>Figura 19</b> – Efeito da administração da METH (30 mg/kg, i.p.) e/ou exercício físico na densidade cortical do fator neurotrófico derivado cerebral (BDNF).....         | 51 |
| <b>Figura 20</b> – Efeito da administração da METH (30 mg/kg i.p.) e/ou exercício físico na densidade cortical do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF).....           | 52 |

## Abreviaturas

**3-MT** – 3-metoxitiramina

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

**5-HT** – transportador de serotonina

**6-OHDA** – 6-hidroxidopamina

**AADC** – Descarboxilase dos aminoácidos L-Aromáticos

**AC** – Adenil ciclase

**Akt** – proteína cinase B

**cAMP** – monofosfato cíclico de adenosina

**AMPT** –  $\alpha$ -metil-p-tirosina

**BCA** – Acido bicinconínico

**BDNF** – Fator neurotrófico derivado do cérebro

**BHE** – Barreira hematoencefálica

**COMT** – Catecol o-metiltransferase

**CREB** – Elemento de resposta à adenosina monofosfato cíclica

**DA** – Dopamina

**DAT** – Transportador de Dopamina

**DOC** – Deoxicolato de sódio

**DOPAC** - Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

**DP** - Doença de Parkinson

**DTT** – Ditiotreitól

**ECF** – Quimiofluorescência Melhorada

**EGTA** – Ácido etileno glicol tetracético

**EPM** – Elevated Plus Maze

**Ex** – Exercício

**FDA** – Food and Drug Administration

**GAPDH** – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

**GDNF** – Fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais

**GFAP** – Proteína glial fibrilar ácida

**GFR $\alpha$ 1** – Recetor  $\alpha$ 1 da família do GDNF

**HPA** – Eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal  
**HVA** – Ácido homovanílico  
**IGF-1** – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1  
**L-DOPA** – L-3,4 dihidroxifenolalanina  
**MAO** – Monoaminoxidase  
**matBDNF** – Fator neurotrófico derivado do cérebro maduro  
**MDMA** – 3,4-Metilenedioximetanfetamina  
**METH** – Metanfetamina  
**MPTP** – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
**mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro  
**NA** – Noradrenalina  
**NAc** – Núcleo accumbens  
**NET** – Transportador de noradrenalina  
**PBS-T** – Tampão fosfato salino - Tween 20  
**PI3K** – fosfatidil inositol 3-cinase  
**PKA** – Proteína cinase A  
**PMSF** – Fluoreto de fenilmetilsulfonil  
**PVDF** – difluoreto de polivinildieno  
**Ret** – Rearranjado durante a transfeção (*Rearranged during transfection*)  
**Sal** – Salinos  
**SDAH** – Síndrome do deficit de atenção com hiperatividade  
**SDS** – Dodecil sulfato de sódio  
**Sed** – Sedentários  
**SN** – Substância nigra  
**SNC** – Sistema Nervoso Central  
**SNpc** – Substância nigra pars compacta  
**TH** – Tirosina hidroxilase  
**TPH** – Triptofano hidroxilase  
**Trk B** – Recetor tirosina cinase B  
**UNODC** – United Nations Office on Drugs and Crime  
**VIH** – Vírus da imunodeficiência humana

**VMAT** – Transportador vesicular de dopamina

**VTA** – Área tegmental ventral



## Resumo

A metanfetamina (METH) é um psicoestimulante viciante, sendo atualmente a segunda substância ilícita mais consumida em todo o mundo, apenas ultrapassada pela canábis. Os psicoestimulantes interferem com a função dos transportadores das monoaminas dopamina (DA), serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA). Deste modo, levam ao aumento dos níveis cerebrais de DA, 5-HT e NA, podendo condicionar neurotoxicidade e astrogliose. Durante a fase de privação, a METH partilha muitas semelhanças comportamentais com a depressão, em humanos. Vários estudos demonstraram o efeito antidepressivo do exercício físico. Estes sustentam que o exercício foi efetivo no melhoramento dos sintomas de depressão.

Neste sentido, murganhos C57BL/6 foram submetidos a um programa de exercício físico (cinco dias de exercício por semana durante sete semanas) com início 24 h após a administração de uma dose única e elevada de metanfetamina (30 mg/kg, i.p.). Foram, então, avaliados a neurotoxicidade induzida pela METH, determinando a expressão de TH (tirosina hidroxilase – marcador da perda de neurónios dopaminérgicos), GFAP (proteína glial fibrilar ácida – marcador de astrócitos), BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) e GDNF (fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais), por *Western Blotting* e o comportamento do tipo depressivo e ansioso numa fase tardia de privação de METH (49 dias) através dos testes *tail suspension* e *elevated plus maze*, respetivamente.

Uma diminuição dos valores de TH corticais é sugestiva de que a METH produziu neurodegeneração dos terminais dopaminérgicos, constituindo um bom modelo para avaliar a neurotoxicidade cortical. Contudo, o exercício físico não promoveu regeneração dopaminérgica cortical. Curiosamente, a METH aumentou significativamente, o tempo de imobilização dos murganhos no teste *tail suspension*, aos 49 dias de privação, o qual foi reduzido pelo exercício.

Estes resultados fornecem novas evidências de que uma dose única, mas tóxica de METH induz um comportamento depressivo duradouro em murganhos, associado a uma disrupção persistente da neurotransmissão dopaminérgica cortical. Os efeitos antidepressivos do exercício físico observados sugerem que este possa ser uma putativa estratégia antidepressiva.

**Palavras-chave:** metanfetamina, neurotoxicidade, depressão, exercício físico, córtex, dopamina, murganho, antidepressivo.

## Abstract

Methamphetamine (METH) is an addictive psychostimulant that is currently the second most abused illicit substance in the world only behind cannabis. Psychostimulant drugs interfere with the function of monoamine transporters for dopamine (DA), serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA). Thereby, they lead to an increase of extracellular DA, 5-HT and NA levels in the brain, thus triggering neurotoxicity and astrogliosis. During withdrawal, METH share many behavioral commonalities with major depression in humans. Many studies have demonstrated the antidepressant effect of exercise intervention.

Herein, C57BL/6 mice were submitted to an exercise regimen (five days a week for seven weeks) starting 24 h post-single high dose of METH (30 mg/kg, i.p.). Then, we assessed the METH-induced neurotoxicity by determining the expression of TH (tyrosine hydroxylase - marker of dopaminergic neuron loss), GFAP (glial fibrillary acidic protein - marker for astrocytes), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) and GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) by Western Blotting and the depressive- and anxiety-like behaviour at late stage of METH withdrawal (49 days) by tail suspension and elevated plus maze tests, respectively.

A decrease in cortical TH levels suggests that METH induced dopaminergic terminals neurodegeneration, thus being a good model of cortical neurotoxicity. However, physical exercise failed to promote dopaminergic regeneration in cortex. Interestingly, METH significantly increased the time of immobilization in mice using the tail suspension test, after 49 days of withdrawal, which was reduced by exercise.

Taken together, these results provide new evidence of a long-lasting depressive-like behaviour in mice, associated with a permanent disruption of cortical dopaminergic transmission induced by a single-high dose of METH. The antidepressive effects of physical exercise observed suggests that this might be a putative antidepressant strategy.

**Keywords:** methamphetamine, neurotoxicity, depression, physical exercise, cortex, mice, antidepressant.



# **Capítulo I**

## **Introdução**



## 1. Abuso de drogas

O abuso de drogas é um importante problema de saúde pública e social, custando milhões de euros anualmente em cuidados de saúde dispendiosos, redução de produtividade e perda de vencimentos, entre outros prejuízos (Chabrawi et al., 2011; Justinova et al., 2009). Um dos aspetos mais relevantes associado às drogas de abuso é a ocorrência de mortes prematuras. Com efeito, a UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime) estima que tenham ocorrido entre 99 000 e 253 000 mortes em 2010, como resultado de abuso de drogas ilícitas, ou entre 22,0 e 55,9 milhões de mortes em cada milhão de pessoas, com idade entre os 15 e os 64 anos (tabela 1).

A viciação é, atualmente, considerada uma doença crónica do sistema nervoso central (SNC), e inclui uma compulsão para uso crónico de drogas (ex. opióides, canabinóides, psicoestimulantes, álcool, nicotina), apesar das consequências negativas e a ocorrência de sintomas de privação, que aumentam a vulnerabilidade do consumidor para a recaída (Koob et al., 1998). A viciação é, ainda, condicionada pela combinação de fatores farmacodinâmicos, genéticos e ambientais (Brink et al., 2003; Roberts et al., 1997).

As drogas de abuso são tomadas inicialmente em busca do prazer. De facto, o consumo repetido de uma droga deriva das suas ações neuroquímicas que produzem um reforço positivo, ou efeito de recompensa (Justinova et al., 2009). Isto é, um reforço positivo aumenta a probabilidade de um comportamento, pela presença (positividade) de uma recompensa (estímulo). O consumo continuado de drogas de abuso leva progressivamente a alterações neurobiológicas nos circuitos de recompensa do cérebro e aos comportamentos característicos da habituação: tolerância, sensibilização, dependência, privação e desejo.

O desenvolvimento da habituação envolve uma transição de comportamento normal e ou impulsivo para compulsivo, culminando na perda de controlo sobre o consumo (Kasanez et al., 2010). Esta transição no consumo é acompanhada por alterações induzidas pela droga na sinalização mediada pelas monoaminas [dopamina (DA), serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA)], na regulação de fatores de transcrição seletivos nos circuitos neuronais de recompensa, como a proteína de ligação ao elemento de resposta à adenosina monofosfato cíclica (CREB), bem como na expressão de fatores neurotrófico.

### 1.1. Estimulantes do tipo anfetamínico

A anfetamina (1-metil-2-fenetilamina; sintetizada pela primeira vez em 1887, na Universidade de Berlim, por Lazar Edeleanu) é o primeiro membro de um grupo de compostos que possuem estrutura e propriedades farmacológicas semelhantes e que são coletivamente designados por estimulantes do tipo anfetamínico ou anfetaminas (Cunha-Oliveira et al., 2013; Berman et al., 2008).

As anfetaminas, tal como a cocaína, são classificadas como drogas psicoestimulantes, visto que produzem os seguintes efeitos: sensação de bem-estar, euforia, aumento da energia e da acuidade mental, diminuição da fadiga e do sono.

A metanfetamina (METH) e o ecstasy, ou MDMA (3,4-Metilenedioximetanfetamina), são os derivados da anfetamina mais populares: a primeira representa a anfetamina mais potente e a segunda possui moderadas propriedades halucinogénicas (Cunha-Oliveira et al., 2013).

A partir de 1965, a organização norte-americana que regulamenta os alimentos e os fármacos (Food and Drug Administration, FDA) limitou a prescrição de anfetamina, metilfenidato e metanfetamina (METH) ao tratamento da narcolepsia, da síndrome de deficit de atenção e hiperatividade (SDAH) e da obesidade grave, as anfetaminas têm sido consumidas ilegalmente. Estes fármacos estão também autorizados para as mesmas indicações clínicas no Canadá e os Estados Unidos da América (Guerreiro & Carmo et al., 2011; Kish, 2008; Berman et al., 2008). Também em Portugal, a narcolepsia e a SDAH em crianças são as únicas indicações terapêuticas para a prescrição do metilfenidato (ritalina<sup>®</sup>, concerta<sup>®</sup> e rubifen<sup>®</sup>) (Prontuário Terapêutico, 2011). No entanto, as anfetaminas têm sido consumidas ilegalmente, no sentido de aumentar o estado de alerta, diminuir a fadiga, controlar o peso e obter sensações de intensa euforia (Cunha-Oliveira et al., 2013; Berman et al., 2008).

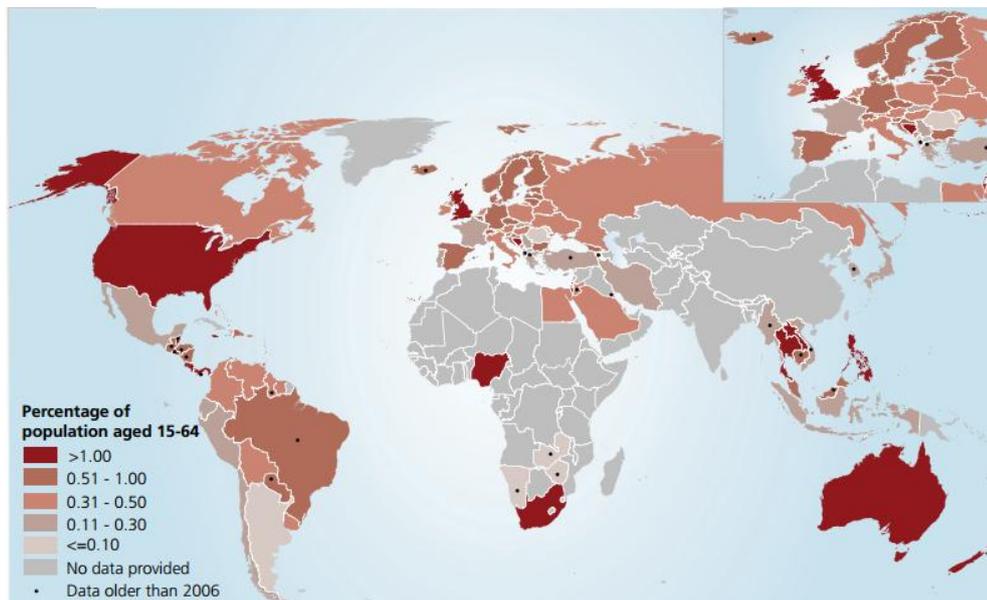
### 1.1.1. Epidemiologia do abuso de estimulantes do tipo anfetamínico

De acordo com o relatório mundial de droga de 2012 elaborado pela UNODC, as anfetaminas representam o segundo grupo de drogas de abuso mais consumidas pelos adultos jovens. De acordo com a tabela 1, estas são apenas ultrapassadas pela marijuana, com uma estimativa de prevalência de 0,3–1,2 % em 2010 (entre 14,3 milhões e 52,5 milhões de consumidores).

**Tabela 1** – Consumo de drogas no ano de 2010, (UNODC). Informação retirada de World Drug Report (2012).

|                                   | Prevalência (Porcentagem) |      | Número (Milhares) |         |
|-----------------------------------|---------------------------|------|-------------------|---------|
|                                   | Baixa                     | Alta | Baixo             | Alto    |
| Canábis                           | 2,6                       | 5,0  | 119 420           | 224 490 |
| Opióides (ópio)                   | 0,6                       | 0,8  | 26 380            | 36 120  |
| Opiáceos (ópio e heroína)         | 0,3                       | 0,5  | 12 980            | 20 990  |
| Cocaína                           | 0,3                       | 0,4  | 13 200            | 19 510  |
| Estimulantes do tipo anfetamínico | 0,3                       | 1,2  | 14 340            | 52 540  |
| <i>Ecstasy</i>                    | 0,2                       | 0,6  | 10 480            | 28 120  |
| Outras drogas ilícitas            | 3,4                       | 6,6  | 153 000           | 300 000 |

De acordo com este relatório da UNODC, Oceânia, América do Norte e América Central são as regiões com maior prevalência de abuso de estimulantes de tipo anfetamínico, tendo-se registado um aumento no Sudeste e Centro da Ásia, nos últimos anos (figura 1).



**Figura 1** – Prevalência do consumo de estimulantes do tipo anfetamínico (excluindo o *ecstasy*), em 2010. Imagem retirada de World Drug Report (2012).

Relativamente ao consumo em Portugal, de acordo com o inquérito anteriormente mencionado, as regiões do Algarve e de Lisboa e Vale do Tejo, apresentam as taxas mais elevadas de consumo de anfetaminas, tanto no consumo ao longo da vida, como nas taxas de continuidade. Segundo o Inquérito Nacional ao Consumo de Substâncias Psicoativas na População Portuguesa Geral, verificou-se um aumento de 0,4 % na prevalência do consumo de anfetaminas, de 2001 para 2007.

Relativamente à METH, estima-se que existam 25 milhões de consumidores em todo o mundo (Buxton & Dove, 2008). Este psicoestimulante é consumido sobretudo no contexto de clubes, *raves*, bares, concertos e festas (Kelly et al., 2006), com o intuito de manter altos níveis de energia ou de alterar o estado de consciência do consumidor.

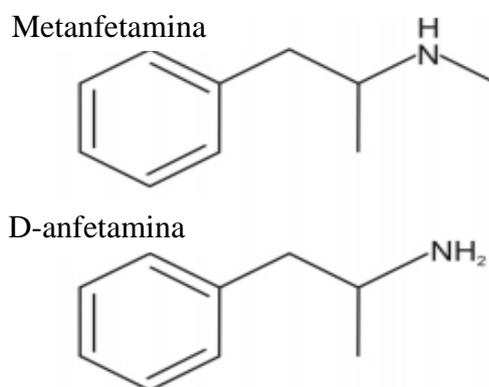
Em Portugal, à semelhança da tendência mundial, a METH é essencialmente utilizada pela população jovem. Porém, segundo Hunt et al. (2007), a população-alvo reúne um conjunto de características próprias, como pessoas desempregadas, solteiras ou divorciadas, de raça caucasiana e que residem maioritariamente em meios suburbanos e rurais. O sexo masculino continua a ser o seu maior consumidor.

Ao contrário da cocaína e heroína que são derivadas de plantas, a METH é preparada a partir de simples precursores químicos (Cho & Melega, 2002). A relativa facilidade com que os ingredientes primários podem ser adquiridos e convertidos no produto final, bem como o seu baixo preço (Sulzer et al., 2005), explicam porque se tornou numa epidemia à escala global (Barr et al., 2006).

### 1.1.2. Metanfetamina: farmacocinética e efeitos farmacológicos

Em 1893, o farmacologista japonês Nagayoshi Nagai foi o primeiro a sintetizar METH, a partir da efedrina, um medicamento muito usado no tratamento de problemas respiratórios (Guerreiro & Carmo et al., 2011; Weisheit & White, 2009). A sua utilização em massa teve início na Segunda Guerra Mundial, para manter a *performance* e resistência em combate dos soldados (Meredith et al., 2005). A dose terapêutica que deve ser administrada em crianças com SDAH é de 5 a 30 mg/dia (Kish, 2008). No entanto, a dose necessária para produzir o efeito de euforia, típico do consumo abusivo desta droga, é de 40 a 60 mg/dia.

O grupo metilo adicional da METH confere-lhe uma maior lipossolubilidade relativamente à anfetamina, que se traduz na maior facilidade de transporte através da barreira hematoencefálica (BHE), maior estabilidade contra a degradação enzimática pela monoamina oxidase (MAO) e, conseqüentemente, maior duração da ação (figura 2).



**Figura 2** – Estrutura química da metanfetamina e da d-anfetamina. Adaptado de Barr et al. (2006).

Os consumidores de METH iniciam a sua administração geralmente por via oral ou intranasal, podendo progredir para administração intravenosa e, ocasionalmente, poderá ser fumada.

Quando fumada ou injetada por via intravenosa, o efeito da droga é praticamente imediato, provocando um intenso prazer (*rush* ou *flash*) que dura apenas alguns minutos (Kish, 2008). Isto acontece porque, se fumada, a sua biodisponibilidade poderá alcançar os 90%, valor extremamente próximo dos 100% alcançados na injeção intravenosa (Schifano et al., 2007). Deste modo, estas duas vias de consumo permitem uma maior concentração da droga nos locais de ação a nível do SNC e, por este motivo, têm um maior potencial de dependência e aumentam o risco de overdose (McAvoy, 2009). À utilização intravenosa acrescenta-se ainda o perigo de transmissão de doenças infecto-contagiosas, como a hepatite C e o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Degenhardt et al., 2010).

Quando consumida por via intranasal ou oral, a METH provoca uma euforia menos imediata e não tão intensa como o *rush* que se obtém pelas vias intravenosa e inalatória. Por exemplo, após ingestão oral, a METH é rapidamente absorvida, devido à sua elevada lipossolubilidade, atingindo um pico plasmático de 0,01-2,5 mg/mL entre as 2,6 e 3,6 h (Cunha-Oliveira et al., 2013; Cho & Melega, 2002). Os seus efeitos agudos normalmente persistem durante 4 a 8 h, mas os efeitos residuais poderão durar até 12 h (Cunha-Oliveira et al., 2013; McAvoy, 2009). A eliminação urinária começa cerca de 3 h após a administração da droga, mas pode prolongar-se durante 4 a 7 dias, dependendo da dose, da via de administração e do pH da urina (Logan, 2002).

O efeito farmacológico das drogas de abuso depende do seu modo de administração, que afeta a sua biodisponibilidade (a proporção de droga absorvida na circulação sistémica), a extensão da sua distribuição pelos locais alvo e a sua biotransformação ou metabolismo, que ocorre, maioritariamente no fígado (Cunha-Oliveira et al., 2013).

A intensidade e o início dos efeitos psicotrópicos são determinados pela rapidez da chegada da droga ao SNC. Os consumidores aprendem a maximizar a sua biodisponibilidade, adaptando os métodos e vias de administração para otimizar a sua distribuição pelo cérebro.

Imediatamente após ser consumida, a METH provoca uma sensação de euforia, aumento de produtividade e energia, hipersexualidade e diminuição da ansiedade (Homer et al., 2008; Meredith et al., 2005). Estes efeitos podem durar várias horas devido ao tempo de

meia vida de eliminação da droga do organismo, que varia de 10 a 12 h (Schepers et al., 2003). O consumo de METH pode ainda condicionar agitação, taquicardia, hipertensão e hipertermia (Murray, 1998; Lynch & House, 1992). A ingestão de doses elevadas da droga pode causar consequências mais severas que colocam a vida do consumidor em risco, como hipertermia acima dos 41°C, falência renal e hepática, arritmias, enfarte, hemorragias ou acidentes vasculares cerebrais e convulsões (Darke et al., 2008).

### **1.1.3. Metanfetamina e as vias dopaminérgicas mesocorticolímbica e nigroestriada**

A METH estimula as vias dopaminérgicas mesocorticolímbica e nigroestriada. Este estimulante também modula adicionalmente a neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica. A METH condiciona, assim, o aumento dos teores extracelulares das monoaminas DA, 5-HT e NA (Justinova et al. 2009).

#### **1.1.3.1. Vias**

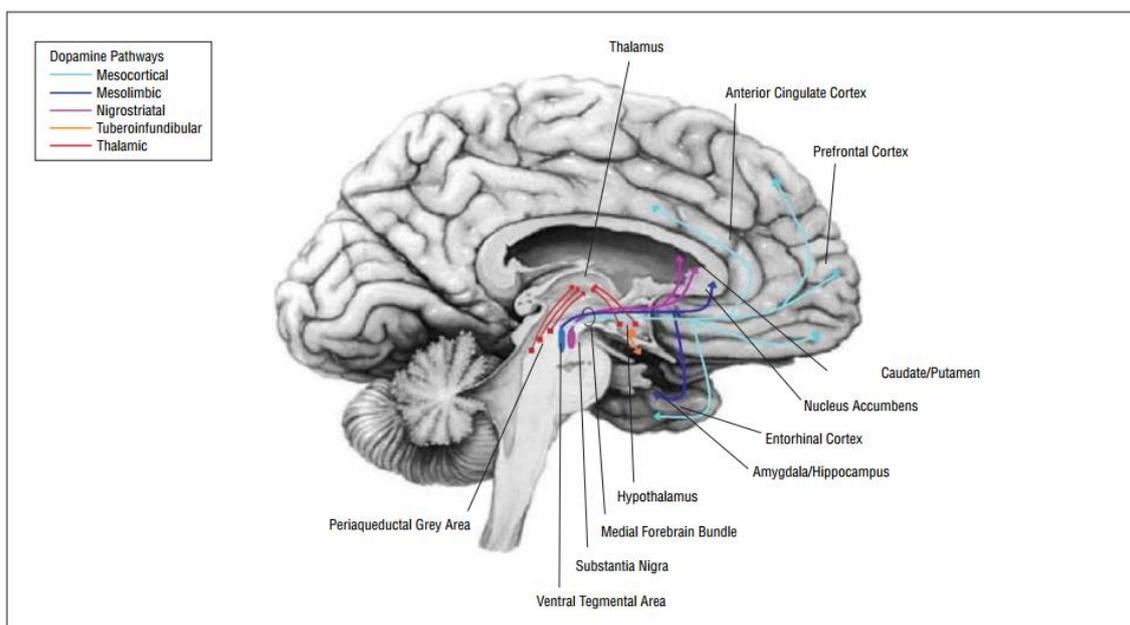
A maioria dos neurónios produtores de DA no cérebro está localizada em núcleos do tronco cerebral: a substância nigra pars compacta (SNpc) e a área tegmental ventral (VTA).

A via nigroestriada (figura 3) projeta-se desde a SNpc até ao estriado dorsal (núcleo caudado e putâmen) e tem um papel proeminente no planeamento motor e execução do movimento, apesar de também desempenhar um papel importante em funções como a cognição (Wise et al., 2009; McClure et al., 2003; Maharajan et al., 2001).

A via mesocortical (figura 3) inicia-se na VTA e projeta-se essencialmente para o córtex pré-frontal, giro cingulado e córtex orbitofrontal (Tzschentke, 2004). Crê-se que esta via seja importante para a concentração e funções executivas, como a memória de trabalho. Esta via é também relevante para o comportamento compulsivo e ausência de controlo num contexto de viciação (Volkow et al., 2001a).

A via mesolímbica (figura 3) também tem início na VTA, mas projeta-se para o estriado ventral [incluindo o núcleo accumbens (NAc)], núcleo da estria terminal, hipocampo, amígdala e septo. É particularmente importante para a motivação, o prazer e a recompensa.

A função pituitária anterior também está sob o controlo dopaminérgico. Com efeito, a via tuberoinfundibular (figura 3) inicia-se no núcleo arqueado do hipotálamo (região tuberal) e projeta-se para a sua eminência mediana (região infundibular), onde a libertação de DA inibe a secreção de prolactina (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). Esta via dopaminérgica poderá facilitar a transmissão de informação do tálamo para o neocórtex (parte cortical do sistema límbico), estriado e amígdala.



**Figura 3** – Vias dopaminérgicas no cérebro humano: nigroestriada, mesocortical, mesolímbica e tuberoinfundibular (secção sagital). Projeção dos vários sistemas dopaminérgicos para as respetivas regiões cerebrais. Imagem retirada de Szabo et al. (2004).

### 1.1.3.2. Síntese e sinalização de dopamina

A síntese de DA (figura 4) é feita a partir do aminoácido tirosina, que é convertido em L-3,4 dihidroxifenolalanina (L-DOPA), pela enzima tirosina hidroxilase (TH), sendo esta a etapa limitante da produção de DA (Dunlop & Nemeroff, 2007). A L-DOPA, por sua vez, é convertida em DA por uma descarboxilase não específica.

A DA é posteriormente armazenada em vesículas sinápticas, cuja entrada está dependente de um transportador existente na membrana – transportador vesicular de monoaminas (VMAT) (Estevinho & Fortunato, 2003).

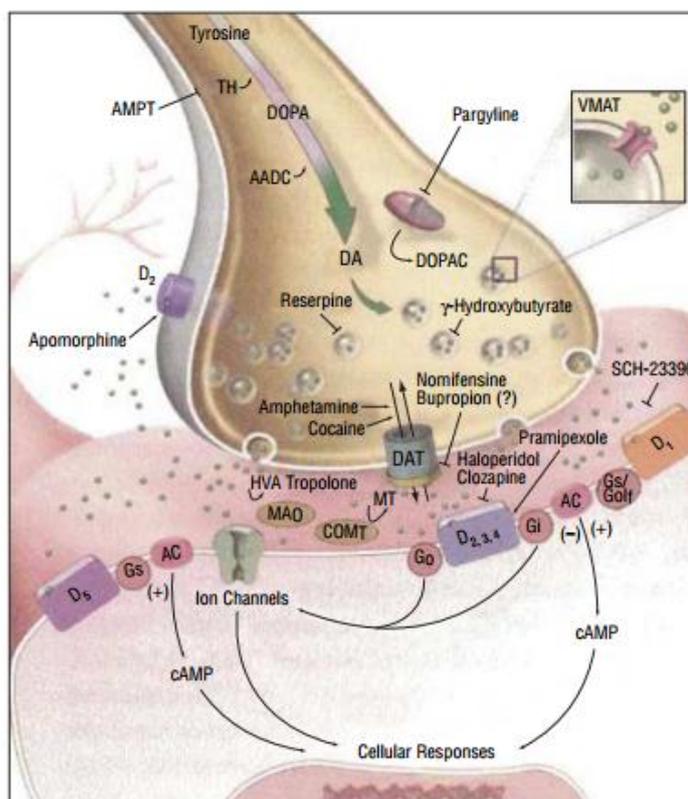
A libertação de DA envolve tipicamente excitação, provocada por um influxo de cálcio, para o espaço sináptico (Granner, 2000). A DA é removida do espaço extracelular, principalmente por recaptação para os terminais pré-sinápticos mediada pelo DAT (Szabo et al., 2004). No entanto, o córtex pré-frontal de humanos e roedores, possui baixa densidade de DAT nos axónios dopaminérgicos (Sesack et al. 1998). Consequentemente, a libertação sináptica de DA é menos regulada por recaptação pelos terminais, sendo a difusão extracelular desta monoamina relevante. Pós-sinápticamente, a DA é inativada pela catecol o-metiltransferase (COMT), existente essencialmente em células da glia. A enzima MAO (monoamina oxidase; localização pré- e pós-sináptica), juntamente com a COMT, originam os intermediários ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e 3-metoxitiramina (3-MT) antes de formar o produto final de excreção, o ácido homovanílico (HVA).

A DA é agonista dos recetores dopaminérgicos: a família D1, que compreende os subtipos D1 e D5 (excitatórios) e a família D2, que compreende os subtipos D2, D3 e D4 (inibitórios) (Dunlop & Nemeroff, 2007).

A ligação da DA aos recetores da família D1 ativa a enzima adenil ciclase (AC), aumentando assim a concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) (Mansour et al., 1998). Por sua vez, este segundo mensageiro aumenta a sinalização dependente da atividade da proteína cinase A (PKA), incluindo a ativação de fatores de transcrição que condicionam modificações persistentes na transmissão sináptica controlada pela DA (Giraul & Greengard, 2004).

A família de recetores D2, quando estimulada, leva a uma redução da atividade da AC. Para além de estarem expressos pós-sinápticamente, existem recetores D2 somatodendríticos

e pré-sinápticos que funcionam como autorreceptores: a ativação dos recetores D2 somatodendríticos provoca uma diminuição da estimulação celular e a ativação dos recetores D2 pré-sinápticos condiciona uma redução da quantidade de DA libertada por cada potencial de ação (Szabo et al., 2004). Está também descrita uma interação pós-sináptica entre os recetores D1 e D2 (Clark & White, 1987).



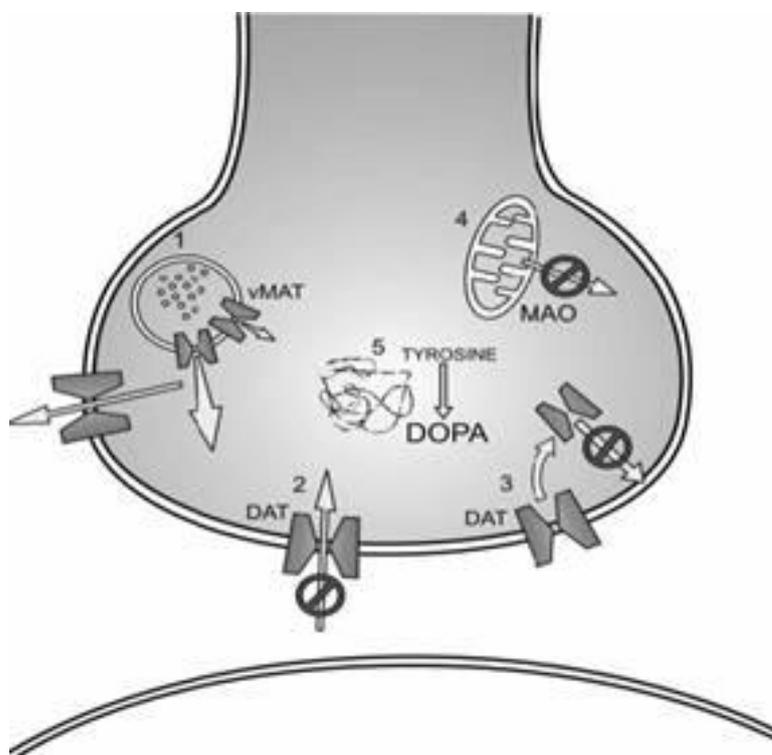
**Figura 4** – Sinalização sináptica dopaminérgica. AADC, Descarboxilase dos Aminoácidos L-Aromáticos; AMPT,  $\alpha$ -metil-p-tirosina; AC, adenil ciclase; cAMP, adenosina monofosfato cíclica; COMT, catecol o-metiltransferase; D1-D5, recetores de dopamina do 1 ao 5; DA, dopamina; DAT, transportador de dopamina; DOPA, 3,4-dihidroxifenilalanina; DOPAC, ácido dihidroxifenilacético acid; Gi, Go, e Gs, subunidades da proteína G; HVA, ácido homovanílico; MAO, monoamina oxidase; MT, 3-metoxitiramina; TH, tirosina hidroxilase; e VMAT, transportadores vesicular de monoaminas. Imagem retirada de Szabo et al (2004).

### 1.1.3.3. Metanfetamina e dopamina

A liberação de DA pode ser mediada por dois mecanismos distintos: liberação vesicular (dependente de cálcio) e liberação mediada pelo transportador DAT (Jones et al., 1998). A liberação de DA induzida por METH ocorre pelo segundo mecanismo: transporte reverso.

A METH entra nos terminais por difusão passiva, sendo transportada pelo VMAT para o interior das vesículas, dissipando o gradiente protónico imposto pela  $H^+$ -ATPase. Consequentemente, a METH induz depleção vesicular, favorecendo a acumulação de DA no citosol (figura 5). A inibição da enzima MAO pela METH também pode diminuir a degradação da catecolamina, contribuindo para a sua acumulação no citosol (Cunha-Oliveira et al., 2013).

Esta alteração do gradiente de DA desencadeia a inversão do DAT, favorecendo a liberação de DA (Justinova et al., 2009).



**Figura 5** – Eventos nos terminais dopaminérgicos despoletados pela metanfetamina (METH). 1) Redistribuição das catecolaminas das vesículas sinápticas para o citosol e transporte de neurotransmissores através da membrana citoplasmática; 2) Inibição da recaptação neuronal pela ocupação do transportador de dopamina (DAT) pela METH; 3) diminuição da expressão do DAT à superfície celular; 4) inibição da atividade da monoamina oxidase (MAO); 5) alteração da atividade e expressão da tirosina hidroxilase (TH). Imagem retirada de Barr et al. (2006).

A massiva libertação de monoaminas no cérebro, incluindo a DA, é responsável pelo comportamento característico observado em consumidores de METH: uma intensa estimulação psicomotora (Robinson & Becker, 1986). Eradiri & Starr (1999) observaram que, ratos exibiram hiperatividade locomotora minutos após o consumo de METH (5 mg/kg i.p.), com nítidos movimentos estereotipados, incluindo farejar o chão, movimentos verticais da cabeça e morder.

#### **1.1.3.4. Metanfetamina e neurotoxicidade: disrupção da homeostasia dopaminérgica e astrogliose**

O potencial para a neurotoxicidade mediada pela METH pode variar com a idade, com a exposição contínua à droga, ou até com o contexto comportamental da administração da droga (Berman et al., 2008).

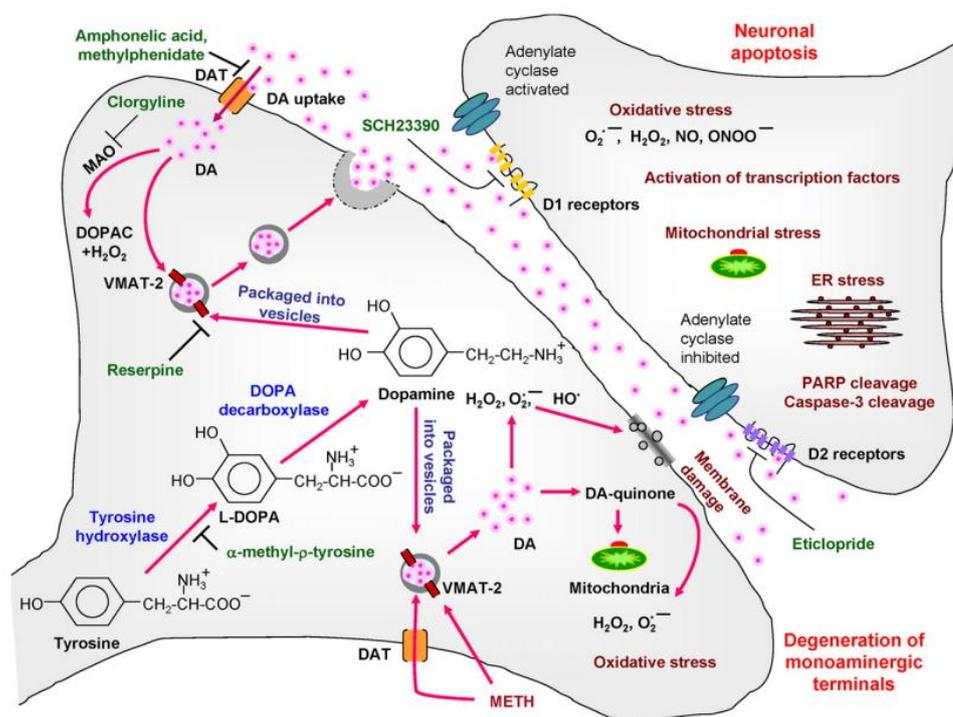
A toxicidade dopaminérgica (Stephans & Yamamoto, 1996; O'Dell et al., 1993) é inferida pelos défices nos marcadores fenotípicos para os terminais nervosos dopaminérgicos, incluindo a própria DA e as suas enzimas biossintéticas TH e descarboxilase dos aminoácidos L-aromáticos (AADC) e os transportadores DAT e VMAT-2 (figura 6).

A DA libertada no citosol devido à ação da METH, auto-oxida-se, formando quinonas e semiquinonas, potencialmente tóxicas para as células, além\* de espécies reativas de oxigénio (ROS), como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Melega et al., 2007; Cadet & Brannock, 1998). A subsequente formação de radicais hidroxilo através de

interações de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  com metais de transição, leva a stresse oxidativo, disfunção mitocondrial e dano peroxidativo para as membranas pré-sinápticas.

O envolvimento de DA endógena na neurotoxicidade da METH é suportado por evidências de que o inibidor da TH, a  $\alpha$ -metil-p-tirosina (AMPT), o qual bloqueia a síntese de DA, oferece proteção contra esta toxicidade (Axt et al., 1990; Gibb & Kogan, 1979; Hotchkiss & Gibb, 1980). Além disso, o papel da DA é suportado por observações de que o inibidor da MAO, a clorgilina, (Thomas et al., 2008; Kita et al., 1995) e o inibidor irreversível do transporte vesicular, a reserpina, (Kuhn et al., 2008; Thomas et al., 2008) os quais resultam num aumento dos níveis citoplasmáticos de DA, podem exacerbar a toxicidade induzida pela METH. Em suma, admite-se que estes eventos sejam parcialmente responsáveis pela disfunção dos terminais dopaminérgicos. A libertação de DA dos terminais também contribui para estes efeitos deletérios. De facto, o ácido anfonélico (inibidor do DAT), ao bloquear a libertação de DA induzida pela METH, pode prevenir o dano em axónios dopaminérgicos (Fumagalli et al., 1998; Marek et al., 1990).

Os efeitos tóxicos da libertação de DA podem ainda ocorrer pela ativação de recetores de DA: antagonistas destes recetores bloqueiam a degeneração dos terminais dopaminérgicos (O'Dell et al., 1993; Sonsalla et al., 1986). É relevante referir que interações da DA com recetores da família D1 na membrana pós-sinápticas, causam ativação de vários fatores de transcrição (ex. famílias AP-1, NF- $\kappa$ B ou AP-2, importantes na lesão neuronal, controlo da apoptose e de vias de sobrevivência) e subsequente sobre-regulação de cascatas apoptóticas em neurónios pós-sinápticos (Dalton et al., 1999; Poli et al., 2004). Estas cascatas podem ser parcialmente inibidas pelo antagonista dos recetores D1, SCH23390 (O'Dell et al., 1993; Sonsalla et al., 1986). Adicionalmente, a sulpirida (antagonista dos recetores da família D2), também bloqueia os efeitos tóxicos induzidos pela METH nos sistemas dopaminérgicos (Sonsalla et al., 1986). Um outro antagonista destes recetores D2, a eticloprida, também previne a depleção dos teores totais de DA.



**Figura 6** – Representação esquemática dos eventos celulares e moleculares envolvidos na degeneração dos terminais dopaminérgicos e apoptose neuronal induzidas pela metanfetamina (METH). A figura sumariza resultados de vários estudos que se debruçaram sobre o papel da dopamina (DA), nos mecanismos de toxicidade da METH. Imagem retirada de Krasnova & Cadet (2009).

Eisch et al. (1992) relataram que os terminais dopaminérgicos no estriado ventrolateral são mais visados do que os terminais no estriado dorsolateral, sendo o NAc largamente poupado. Apesar de doses agudas de METH produzirem lesões significativas nos terminais dopaminérgicos estriatais, os corpos celulares das células dopaminérgicas são essencialmente poupados (Sonsalla et al., 1992; Ricaurte et al., 1982). A neurotoxicidade imposta pela droga nos marcadores dopaminérgicos reverte após um período de tempo prolongado, com os níveis de DA a retomarem os valores basais em cerca de um ano (Cass, 2000; Harvey et al., 2000; Cass & Manning, 1999). Isto é sugestivo de que o dano nos terminais dopaminérgicos é duradouro, mas não permanente.

Fantegrossi et al. (2008) e Achat-Mendes et al. (2005) e Ladenheim et al. (2000) observaram depleções nos níveis de DA no córtex de murganhos, pelo menos até 17 dias após

administração de METH (5 ou 10 mg/kg, 4 injeções, a cada 2 h). Também em ratos, Armstrong & Noguchi (2004) e Stephans & Yamamoto (1996) registaram reduções de DA cortical, 3-4 dias após a injeção de METH (32 mg/kg, durante 5 dias, ou 7,5 mg/kg, 3 injeções, a cada 2 h, respetivamente). As alterações neuroquímicas foram sublinhadas por evidências neuroanatômicas da degeneração das fibras monoaminérgicas após tratamentos agudos com METH (Bowyer et al., 2008; Schmued & Bowyer, 1997).

Estudos de neuroimagem em humanos consumidores desta droga mostram diminuições nestes marcadores dopaminérgicos, bem como anomalias generalizadas na estrutura e função do córtex cerebral, em concordância com o que acontece em modelos animais (Sekine et al., 2006; Kim et al., 2006, London et al., 2005; Thompson et al., 2004; Volkow et al., 2001a,b,c; McCann et al., 1998). Com efeito, à semelhança do que foi observado em animais tratados com regimes agudos de METH, consumidores em privação exibiram diminuições duradouras na ligação ao DAT cortical e estriatal (Volkow et al., 2001b). Este efeito foi revertido 2 a 17 meses após a paragem do consumo. No entanto, alguns autores sugerem que persistem sequelas funcionais, mesmo após um longo período de abstinência.

Estudos de imagem e análises *post-mortem* corroboram que consumidores crónicos de METH exibem reduções nos níveis de marcadores terminais de neurónios dopaminérgicos (DA, TH e DAT), principalmente no estriado (Kish et al. 2009; Kitamura et al. 2007; Wilson et al. 1996). Em casos de consumo extremo, existe ainda uma diminuição da densidade de VMAT-2 nesta região (Kitamura et al., 2007).

Adicionalmente, Berman et al. (2008) descreveram anomalias estruturais do cérebro associadas ao consumo de METH, incluindo a diminuição de volume de matéria cinzenta cortical, que pode refletir padrões cerebrais que predispõem para à dependência pela substância. Por outro lado, o consumo desta droga pode induzir hipertrofia estriatal, que poderá refletir compensação pela toxicidade nos núcleos da base, ricos em DA. Berman et al. (2008) afirmaram ainda que existem também alterações na atividade cerebral associadas a um abuso crónico da droga: aumento anormal da atividade na amígdala, no estriado ventral e no córtex orbito-frontal lateral. Por outro lado, há uma diminuição da atividade no córtex pré-frontal medial e, especialmente, no córtex cingulado. A METH atua também nos terminais serotoninérgicos, ao nível do córtex pré-frontal (O'Dell et al., 2012), resultando numa depleção

de 5-HT, do transportador de 5-HT (5-HTT) e da triptofano hidroxilase (TPH) (Kish et al. 2009; Sekine et al. 2006; Hotchkiss et al. 1980). Estas depleções induzidas pela droga nos marcadores serotoninérgicos são suscetíveis de retomarem os valores basais de 5-HT em cerca de seis meses (Cass, 2000; Harvey et al., 2000; Cass & Manning, 1999).

O papel da glia na neurotoxicidade induzida pela METH tem sido foco de imensa atenção. A microglia exhibe proliferação e reativação (microgliose) em estados patológicos, tais como doenças neurodegenerativas, trauma e isquémia (Streit, 2002, 2005; Hanisch, 2002). Alguns estudos sugerem que a ativação da microglia está também envolvida na neurotoxicidade da METH. De facto, a atenuação da ativação da microglia reduziu a depleção de DA ou o défice de imunorreatividade do DAT, no estriado, causado pela administração de METH (5 mg/kg, 4 injeções, a cada 2 h) (Thomas & Kuhn, 2005; Thomas et al., 2004a, b; LaVoie et al., 2004).

De acordo com estudos *post mortem*, a ativação microglial em áreas que sofrem degeneração neuronal sugere que a proliferação glial pode também modular o processo neurotóxico produzido pelo consumo crónico da METH (Guilarte et al., 2003; LaVoie et al., 2004; Pubill et al., 2003; Thomas & Kuhn, 2005; Thomas et al., 2004a,b). Segundo Sekine et al. (2008), os níveis de ativação da microglia correlacionam-se inversamente com a duração da privação do consumo de METH em humanos.

Tem sido também investigado as alterações do fenótipo dos astrócitos, as células mais abundantes da glia, num contexto de neurotoxicidade induzida pela METH. Os astrócitos são elementos muito importantes na plasticidade sináptica, na integridade da BHE, no metabolismo e em estratégias antioxidantes (Parpura & Zorec, 2010; Perea & Araque, 2010; Correale & Villa, 2009; Gibbs et al., 2008; Li et al., 2005; Dringen, 2000). A proliferação e reativação dos astrócitos (astrogliose) é considerada um dos marcadores de neurotoxicidade (Ridet et al., 1997). Foi demonstrado que a administração de doses neurotóxicas de METH (10, 20, 30 ou 40 mg/kg, dose única; ou 10 mg/kg, 4 injeções, a cada 2 h (Bowyer et al., 2008; Pubill et al., 2003; Cappon et al., 2000; Fukumura et al., 1998; O'Callaghan & Miller, 1994) produziu um aumento na densidade estriatal da proteína glial fibrilar ácida (GFAP; uma proteína estrutural dos astrócitos, marcadora de astrogliose) pelo menos até 14 dias pós-tratamento. Destes autores, apenas O'Callaghan et al. (1994)

investigaram a astrogliose no córtex, observando um aumento dos níveis de GFAP, 14 dias após administração de METH (10 mg/kg, 4 injeções, a cada 2 h).

## 2. Depressão

A tristeza é uma emoção inerente à condição humana. Quando é experienciada de modo pervasivo, com um grau de intensidade e duração com interferência no funcionamento do indivíduo e dos que o rodeiam, poderá constituir a entidade clínica designada de depressão.

A síndrome depressiva inclui os seguintes sintomas: humor deprimido ou disfórico, perda de interesse e prazer (abulia e anedonia), alteração do sono, do apetite e do peso, agitação ou lentificação psicomotora, dificuldades de concentração, diminuição da energia, sentimentos de inutilidade, culpa e ideação suicida (APA, DSM-IV-TR, 2000).

A depressão é, assim, uma doença neuropsiquiátrica altamente incapacitante e a principal causa de suicídio no mundo. Apresenta uma elevada prevalência em toda a vida (12% a 50%), antecipando-se um incremento destes números nos próximos anos (Kessler et al., 2005; Blumenthal et al., 2007).

Estima-se que 31 a 42% dos casos de depressão sejam de origem hereditária (Dunlop & Nemeroff, 2007). Contudo a etiologia é complexa e mal conhecida, pressupondo-se uma interação de fatores genéticos, biológicos, ambientais e psicológicos. Assim, indivíduos vulneráveis e/ou expostos a determinados stressores endógenos e exógenos, poderão desenvolver uma disfunção emocional, cognitiva, comportamental e somática que se traduz no síndrome depressivo (Tsuang et al. 2004). O abuso de psicoestimulantes é também um fator de risco para a depressão.

Existem várias modalidades de tratamento, sendo o recurso a antidepressivos a mais utilizada, com taxas de resposta muitas vezes insatisfatórias. Apenas 50-70% dos doentes apresentam remissão completa dos sintomas, com necessidade de tratamento de longo prazo e subsequente exposição a efeitos secundários relevantes, designadamente gastrointestinais, hepáticos e sexuais. As abordagens psicoterapêuticas são importantes, mas insuficientes em monoterapia nos casos moderados a graves, estando a electroconvulsivoterapia reservada sobretudo às depressões resistentes, com boas taxas de resposta, mas com necessidade de

aplicações repetidas e alguns riscos, nomeadamente cognitivos (Berton & Nestler, 2006; Racagni & Popoli, 2008).

Face ao impacto que esta perturbação apresenta em todo o mundo, bem como aos inconvenientes terapêuticos supracitados, verifica-se a necessidade de um maior investimento na investigação de métodos alternativos de tratamento da depressão. O exercício físico, sendo capaz de aliviar os sintomas da depressão (APA, DSM-IV-TR, 2000), parece ser uma estratégia alternativa, não farmacológica, no tratamento da depressão.

### **2.1. Comportamento depressivo e/ou ansioso na fase de privação da metanfetamina**

Investigadores mostram que o abuso de substâncias e distúrbios de humor ocorrem, geralmente, em conjunto. A fase inicial da privação em consumidores crónicos, é caracterizada por sintomas psiquiátricos e somáticos e é frequentemente referida de *crash*, (APA, DSM-IV-TR, 2000). Por exemplo, a privação de psicoestimulantes, após consumo de elevadas doses, precipita uma condição com uma semelhança notável aos sintomas de depressão (Barr et al. 2002). De facto, os efeitos da privação de psicoestimulantes são sobreponíveis com os critérios de diagnóstico para a depressão (APA, DSM-IV-TR, 2000). Contudo, ao contrário da depressão, a maioria destes efeitos induzidos pelos psicoestimulantes são transitórios, enquanto na depressão esses sintomas persistem por meses (Barr et al. 2002).

A privação da METH após abuso crónico pode contribuir para distúrbios de humor, ansiedade, agressividade, isolamento social, psicose, défices de atenção e de memória na tomada de decisões (função executiva), disfunção psicomotora e um imenso desejo pela droga (Darke et al. 2008; Homer et al. 2008; Scott et al. 2007; Semple et al. 2005).

Estas alterações neuropatológicas são sublinhadas por alterações neuroquímicas nas vias dopaminérgicas, que persistem após a paragem do consumo (Zweben et al., 2004). Em modelos animais, a privação de METH induz alterações neuroquímicas no NAc (circuito de recompensa), levando a fenótipos depressivos em roedores, incluindo desespero, letargia,

anedonia (forte diminuição do interesse e prazer no desempenho de todas, ou quase todas, as atividades) e ansiedade (Di Chiara et al., 1999; Paulson et al., 1991).

Muito recentemente, Jang et al. (2013) verificaram um comportamento do tipo depressivo em ratos durante uma fase inicial de privação (4-7 dias), após consumo compulsivo de METH (0,05 mg/kg/autoadministração, 1 h ou 6 h, durante 13 sessões). Kitanaka et al. (2010) sugeriram que uma dose única e baixa de METH (1 mg/kg, i.p.) condicionou disforia 24 h após a administração deste psicoestimulante pela observação da diminuição da locomoção voluntária. Esta alteração de humor é característica da fase de privação aguda de METH.

Cryan et al. (2003) observaram um aumento na imobilização de murganhos 24 h após privação de METH (5 mg/kg/dia, durante 7 dias) no teste *tail suspension* sugerindo que há um comportamento do tipo-depressivo. Timár et al. (2003) reportaram uma redução da atividade locomotora espontânea em ratos 3 dias após tratamento com METH (10 mg/kg, 4 injeções subcutâneas, a cada 2 h). Contudo, este efeito foi transitório visto que 1, 2 e 4 semanas depois da administração de METH os animais revelaram um comportamento locomotor normal.

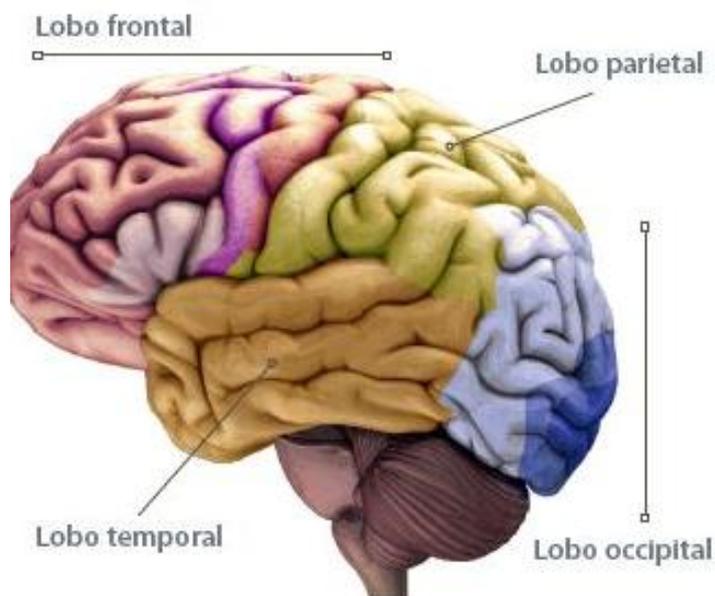
Pometlová et al. (2007) e Slamberova et al. (2010) demonstraram que doses baixas de METH (0,5, 1,0 e 1,5 mg/kg) produziram um efeito ansiogénico em ratos, observando uma diminuição das interações sociais dos animais em testes de comportamento social. Este efeito ansiogénico é consistente com os estudos prévios feitos por Biala & Kruk (2007) e Hayase et al. (2006). No entanto, estes autores usaram doses mais elevadas ou administrações repetidas da neurotoxina (2 mg/kg, ip, durante 9 dias e 15 mg/kg, i.p., respetivamente). Também Kitanaka et al. (2010) observaram um aumento da ansiedade em murganhos, na fase de privação, após injeção de METH (1,0 ou 2,5 mg/kg, i.p., 2 vezes por dia, durante 10 dias consecutivos). Num outro estudo de Hayase et al. (2005) o comportamento do tipo ansioso desapareceu 10 dias após a administração repetida de METH (4 mg/kg, i.p., durante 7 dias). Contudo, é escassa a informação sobre o comportamento ansioso/depressivo em períodos prolongados de abstinência.

Finalmente a privação de psicoestimulantes parece fornecer a base para o desenvolvimento de um modelo animal de sintomatologia ansiosa/depressiva, permitindo assim o rastreio de novas abordagens farmacológicas ou não farmacológicas.

## 2.2. Envolvimento da via mesocortical na depressão e na ansiedade

O córtex frontal (figura 7) está associado ao raciocínio, planeamento, discurso, movimento, emoções e resolução de problemas. Adicionalmente, esta região cerebral tem uma função executiva e integradora. De facto, esta região recebe informação visual altamente processada e informação auditiva a fim de orientar a decisão comportamental adequada às circunstâncias e exigências do meio (Mackay et al., 2010). De acordo com a literatura, a tristeza e a ansiedade, em indivíduos normais, aumenta a atividade em algumas áreas do córtex frontal (Goldwater et al., 2009). Isto é consistente com esta região cerebral ser essencial para a regulação dos estados de humor.

Casos familiares de depressão mostram anomalias no córtex frontal. Alguns estudos revelaram alterações das medidas volumétricas desta estrutura. Por exemplo, Elkis et al. (1996) verificaram uma redução na quantidade de tecido no córtex frontal de jovens que padeciam de depressão. Estudos *post mortem* apresentaram ainda uma diminuição no número de células da glia nesta região.



**Figura 7** – Os quatro lobos do córtex cerebral: frontal, parietal, temporal e occipital.

Imagem retirada de Shaw et al. (2012).

A motivação, a rapidez psicomotora, a concentração e a capacidade de sentir prazer são aptidões reguladas, em parte, pela DA e uma disfunção nos seus circuitos são características proeminentes de depressão. Foi demonstrado que indivíduos com depressão severa exibiram uma diminuição da concentração de metabolitos de DA, tanto no líquido cefalorraquidiano, como em regiões cerebrais que medeiam o humor e a motivação (Dunlop & Nemeroff, 2007).

A desregulação da libertação de DA poderá também contribuir para a patofisiologia da depressão. Estudos usando modelos animais de roedores comprovaram que uma diminuição da concentração de DA correlaciona-se com uma redução na tentativa de os animais conquistarem recompensas específicas (Neill et al. 2002; Salamone et al. 1999). Foi também sugerida que a depressão está associada a uma sobre-regulação compensatória dos recetores dopaminérgicos D2. Estas alterações na sinalização de DA podem estar subjacentes ao aumento das sensações de prazer experienciados por indivíduos deprimidos tratados com anfetamina comparados com a resposta de indivíduos controlo normais e com menor grau de severidade da doença. Deste modo, os primeiros agentes a serem usados para tratar a depressão foram psicoestimulantes (ex. cocaína ou anfetamina), pelo aumento que provocam na libertação de DA e bloqueio do transportador de DA (DAT), apesar de também atuarem nos neurónios serotoninérgicos e noradrenérgicos. Apesar desta relação entre a DA e a depressão, a maioria dos antidepressivos atua especialmente nos circuitos serotoninérgicos e noradrenérgicos (NIH, 2011).

Disfunções dopaminérgicas no sistema mesocortical estão também envolvidas na patofisiologia de distúrbios de ansiedade. O stresse agudo aumenta a libertação e o metabolismo de DA no córtex frontal (Thierry et al., 1998). Adicionalmente, uma ativação transitória da VTA parece despoletar a expressão de ansiedade e aversão durante a privação de múltiplas classes de drogas de abuso.

### **3. Fatores neurotróficos – BDNF e GDNF**

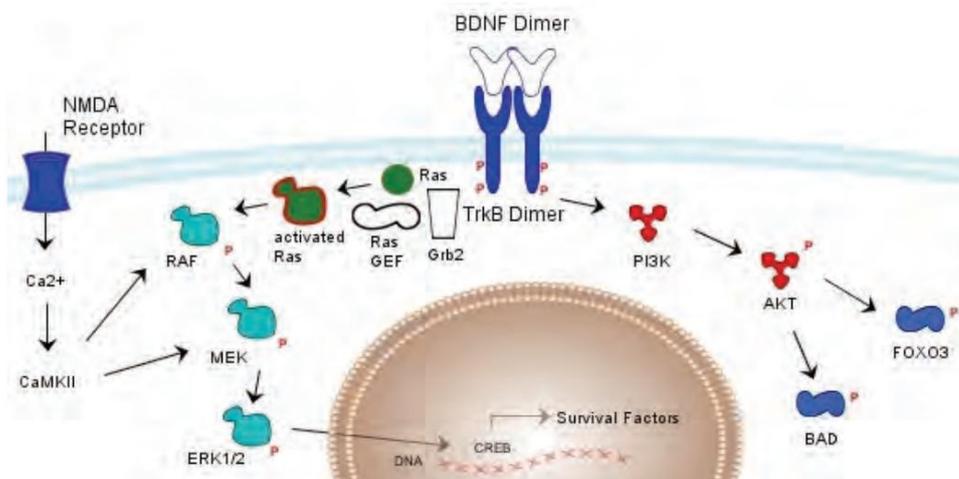
Os fatores neurotróficos são uma família de proteínas que promovem a diferenciação e sobrevivência de neurónios e participam na modulação da transmissão e plasticidade

sinápticas (Kermani et al., 2007). Estão ainda associadas à modulação das vias dopaminérgicas (Yacoubian et al. 2009; Saha et al., 2006).

Todas as neurotrofinas são sintetizadas primeiramente na forma de pré-pró-neurotrofinas. O mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) das neurotrofinas direciona a síntese da proteína nascente para o retículo endoplasmático, através da sequência sinal, para que esta siga a via secretora. A sequência sinal é clivada no retículo endoplasmático dando origem às pró-neurotrofinas, que espontaneamente formam dímeros através de ligações não covalentes. Estes dímeros na forma de pró-neurotrofinas podem ser clivados intracelularmente (antes de serem secretados) ou extracelularmente (depois de terem sido secretados) ou podem mesmo nunca virem a ser clivados (revisto em Lessmann et al., 2003). A clivagem das pró-neurotrofinas origina neurotrofinas designadas de maduras. Tanto as pró-neurotrofinas como as formas maduras das neurotrofinas atuam como moléculas sinalizadoras, contudo, com propriedades de sinalização distintas (Lee et al., 2001).

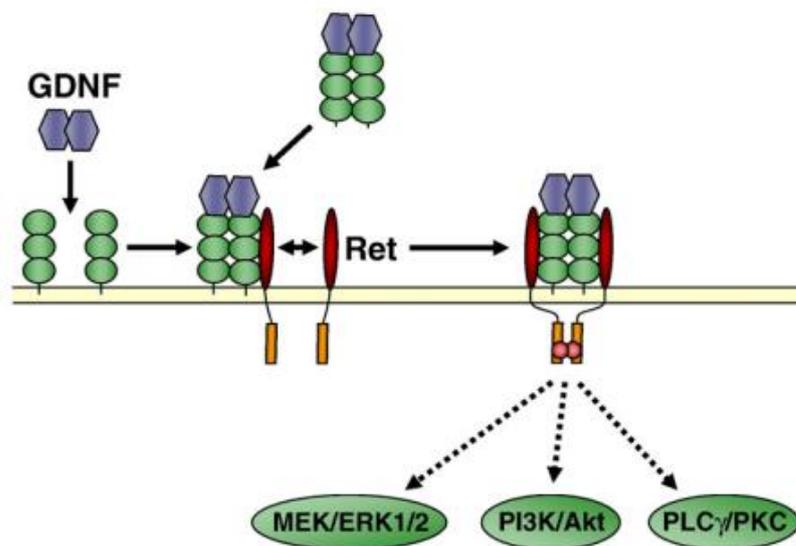
A relação entre os mecanismos de viciação, a neurotoxicidade produzida pela METH e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), bem como o fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF) tem sido alvo de estudo (Cass et al., 2006; LaVoie et al., 2004).

No caso do BDNF, este é sintetizado como uma isoforma precursora de 32 kDa (proBDNF) que origina por clivagem proteolítica uma isoforma madura de 14 kDa (matBDNF) ou uma isoforma truncada de 28 kDa (Mowla et al., 2001; Seidah et al., 1999). O matBDNF liga-se aos recetores tirosina cinase B (Trk B) e desencadeia uma série de vias de sinalização anti-apoptóticas e plasticidade neuronal, incluindo a via fosfatidilinositol 3-cinase/proteína cinase B (PI3K/Akt) (figura 8) (Patapoutian et al., 2001; Dechant et al., 2001). A ativação destas vias promove a fosforilação do promotor de morte associado a Bcl-xL/Bcl-2 (BAD), promovendo a inibição de vias apoptóticas (Nakagawa et al., 2004; Mandic et al., 2003). Por outro lado, o proBDNF tem afinidade para o recetor de neurotrofinas p75, provocando efeitos pró-apoptóticos e antiplasticidade.



**Figura 8** – Vias de sinalização de BDNF. BDNF ativa as vias AKT e ERK1/2. PI3K causa indiretamente a fosforilação de AKT que, por sua vez, fosforila e inibe proteínas apoptóticas (FOXO3 e BAD). ERK1/2 é fosforilada por uma cascata de cinases (RAF para MEK para ERK1/2) que é ativada pela RAS que, por sua vez, é ativada por RAS-GEF (modulada por Grb2), que está ligada a dímeros TrkB fosforilados. Esta via também pode ser fosforilada pela proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII). Figura retirada de Mitchell (2010).

O GDNF é um homodímero glicosilado, ligado por uma ponte dissulfeto, com 32-42 kDa, inicialmente sintetizado na forma de um precursor, o pré-pró-GDNF, que por clivagem proteolítica, dá origem a duas isoformas de pró-GDNF com ~16 kDa:  $\alpha$ -pró-GDNF ou  $\beta$ -pró-GDNF, que são armazenadas em vesículas (Matsushita et al., 1997). Alterações na concentração de cálcio intracelular resultam na secreção de  $\beta$ -pró-GDNF e clivagem do pró-domínio, originando GDNF maduro (Lonka-Nevalaita et al., 2010). O GDNF liga-se ao seu recetor, recetor  $\alpha 1$  da família do GDNF ( $GFR\alpha 1$ ), ativando o recetor Ret com atividade tirosina cinase (Ret – *rearranged during transfection*) por autofosforilação (Ugarte et al., 2003; Ho et al., 2002) (figura 9). Uma das vias de sinalização ativada é a PI3K/Akt. O seu efeito neuroprotetor é provavelmente mediado pela inibição da sinalização apoptótica (Ho et al., 2002).



**Figura 9** – Vias de sinalização de GDNF. A ligação de GDNF a GFR $\alpha$ 1 leva à ativação de Ret por autofosforilação de resíduos de tirosina (a vermelho). Por sua vez, Ret ativa várias vias de sinalização (a verde): MAPK (ERK1/2), PI3K e PLC $\gamma$ . Imagem retirada de Carnicella & Ron (2009).

### 3.1. Efeito neuroreparador de BDNF e GDNF

Chen et al. (2012) mostraram, pela primeira vez, que os níveis de BDNF no soro baixaram significativamente em consumidores de METH, durante as primeiras 3 semanas de privação. Adicionalmente, Kim et al. (2005) observaram que consumidores crônicos deste estimulante em abstinência, durante pelo menos um mês, apresentavam níveis de BDNF no plasma significativamente elevados. Em conjunto, os níveis de BDNF encontravam-se diminuídos inicialmente e aumentados após privação de METH, em humanos.

Também foi descrito que o BDNF aumenta no córtex cerebral e estriado, após lesão neuronal excitotóxica induzida por quinolinato (envolvido em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas), no estriado (Canals et al., 2001). Estes autores sugeriram que o aumento de BDNF representa uma adaptação neuroprotetora/neuroreparadora. O dano excitotóxico

induzido pela METH é um potencial mecanismo para o aumento da expressão de BDNF e TrkB., tendo possivelmente um envolvimento semelhante em caso de lesão neuronal.

Após tratamento com METH, ratos que sobreexpressaram mRNA de BDNF exibiram uma menor depleção de DA estriatal comparativamente com o grupo controlo (Dluzen, 2002, 2004; Joyce et al., 2004). Contudo um outro estudo sugeriu que a administração intraestriatal de BDNF, 24 h antes de uma injeção aguda de METH (5 mg/kg, 4 injeções, a cada 2 h), não preveniu a perda de DA no estriado (Cass et al., 2006).

Para além do BDNF, também o GDNF manteve a sobrevivência de neurónios catecolaminérgicos adultos em ratinhos (Pascual et al., 2008) e mostrou promover a sobrevivência e diferenciação de neurónios dopaminérgicos em cultura (Lin et al., 1993).

O GDNF apresentou um papel restaurador importante após lesão do sistema nigroestriatal (Beck et al., 1995). Com efeito, doses elevadas de GDNF protegeram neurónios dopaminérgicos adultos da substancia nigra (SN) contra a axotomia e toxicidade induzida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Estas neurotoxinas destroem seletivamente neurónios dopaminérgicos (e também noradrenérgicos no caso de 6-OHDA), causando sintomas permanentes da doença de Parkinson (DP) (Beck et al., 1995; Kearns & Gash, 1995; Tomac et al., 1995). A administração de GDNF no sistema nigroestriatal induziu a regeneração de neurónios dopaminérgicos, aumentou os níveis de DA, 5-HT e NA e melhorou o comportamento motor (Tomac et al., 1995).

É ainda relevante referir que Lui et al. (2012) demonstraram que os astrócitos exibem um mecanismo endógeno de autorreparação através da libertação de BDNF e/ou GDNF, durante uma fase muito inicial de Parkinsonismo, em ratos intoxicados com 6-OHDA.

### **3.2. As neurotrofinas na depressão e ansiedade**

A hipótese das neurotrofinas na depressão e ansiedade postula que uma redução dos fatores neurotróficos em estruturas límbicas induzida pelo stresse está diretamente envolvida na patofisiologia destas desordens psiquiátricas (Duman & Monteggia, 2006). Com efeito, estudos clínicos provaram que os níveis séricos de BDNF e de GDNF são significativamente mais baixos em pacientes com depressão, não tratados, do que em indivíduos saudáveis

(Gonul et al. 2005; Shimizu et al. 2003; Karege et al. 2002, 2005). A maioria dos estudos relata aumentos dos níveis de BDNF após o tratamento com antidepressivos (Brunoni et al. 2008). Com efeito, foi sugerido que a restauração do BDNF mediada pelos antidepressivos é responsável pelo alívio dos sintomas da doença (Duman & Monteggia, 2006). No entanto, estudos animais não demonstraram uma relação causal entre o declínio nos níveis de BDNF e GDNF e estados de humor ansiosos e depressivos.

#### 4. Exercício físico

O exercício físico tem vindo a ser crescentemente prescrito pois é considerado importante para o melhoramento da saúde pública (Peluso & Guerra de Andrade, 2005). Este tipo de atividade é relevante na prevenção e tratamento de diferentes tipos de doenças, tais como doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes *mellitus* e osteoporose, reduzindo o risco de mortalidade na população (Kokkinos et al., 2011; Lee et al., 2010).

Numerosos benefícios podem ser conferidos pelo exercício, especialmente em pessoas mais velhas. Estudos em humanos sugerem que o exercício pode ser útil na prevenção e no tratamento de doenças psiquiátricas, tais como depressão (Conn et al., 2010) e distúrbios de ansiedade (Dunn et al., 2010), melhorar a cognição a curto prazo, reduzir riscos de demência como a doença de Alzheimer (Cotman & Berchtold, 2002), de DP (Smith & Zigmond, 2003) e de outros tipos de doenças neurodegenerativas, bem como diminuir a perda progressiva de volume cerebral associado ao envelhecimento.

O exercício físico tem também vindo a ser crescentemente prescrito para o tratamento da viciação. Efetivamente, tem vindo a ser sugerido que a atividade física - desde atividades aeróbicas (por exemplo, andar de bicicleta) até atividades menos vigorosas (por exemplo, caminhada) - pode prevenir os hábitos tabágicos entre os jovens (Health et al., 2012; Audrain-McGovern et al., 2003; Escobedo et al., 1993). O exercício físico pode também diminuir do desejo de fumar, atenuar os sintomas de privação (Van Rensburg et al., 2009; Taylor et al., 2007) e proporcionar uma melhor gestão do stresse (Taylor et al., 2007). No entanto, o exercício físico pode comprometer a saúde mental, especialmente quando desempenhado de forma intensa.

#### 4.1. Efeito antidepressivo/ansiolítico do exercício físico

Foi na década de 80 do século passado que começaram a emergir registos dos efeitos benéficos do exercício físico na depressão (Ernst et al. 2006).

Estudos epidemiológicos de Kritz-Sliverstein et al. (2001), Strawbridge et al. (2002) e Motl et al. (2004) demonstraram que indivíduos jovens e idosos que pratiquem exercício apresentaram menores sintomas depressivos e são menos suscetíveis a desenvolver depressão. Por outro lado, o exercício físico regular está associado a uma baixa reatividade do sistema nervoso simpático (SNS) e do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) (Rimmele et al., 2007). O eixo HPA desempenha um papel crítico no desenvolvimento de respostas a stressores psicológicos e físicos (De Kloet et al., 2005). Deste modo, as alterações induzidas pelo exercício no eixo HPA modulam o stresse e a ansiedade em humanos.

Dimeo et al. (2001) avaliou a eficácia do exercício no tratamento de depressão moderada a severa. Nesse estudo, o exercício aliviou significativamente esta condição. Também Mather et al. (2002) avaliou os efeitos do exercício como um adjuvante à medicação antidepressiva. Singh et al. (2001) e Babyak et al. (2000) demonstraram que os efeitos antidepressivos do exercício se prolongavam para além do período de tratamento com benefícios até 6 (Babyak et al. 2000) e 21 meses (Singh et al. 2001) após a paragem do exercício. Por outro lado, as alterações de humor impostas pelo exercício parecem dissipar-se 4 h após o final deste (Thayer, 1997; Petruzzello & Landers, 1994). Consequentemente, se o objetivo for restabelecer e manter o bom humor em pessoas com depressão, então será necessário aumentar a frequência do exercício e/ou mantê-lo.

O exercício reduziu os sintomas depressivos *per se* ou, reduziu os efeitos secundários quando combinado com uma abordagem farmacológica (Trivedi et al., 2006).

Adicionalmente, Dunn et al. (2002, 2005) sublinharam que um programa de 12 semanas de exercício aeróbico funcionava como um tratamento efetivo para a depressão de severidade ligeira a moderada. É interessante registar que o exercício físico regular aumentou os níveis de monoaminas no cérebro, de forma semelhante aos efeitos de antidepressivos (Van Praag, 1982).

Os mecanismos subjacentes a esta atividade corretora destas doenças do humor não está inteiramente esclarecida. No entanto foi sugerido que o exercício físico provoca um

incremento do fluxo sanguíneo no córtex frontal (Colcombe et al. 2004), um aumento do volume do hipocampo (Erickson et al. 2011) e dos mediadores cerebrais tais como o BDNF. Russo-Neustadt et al. (2001) mostraram que a combinação de exercício físico com antidepressivos diminui o comportamento do tipo depressivo e aumentou os níveis de mRNA de BDNF num modelo animal de depressão.

Outro dos mecanismos implicados nos efeitos antidepressivos/ansiolíticos do exercício físico é a neurogênese. Com efeito, o exercício físico também aumenta a síntese de novos neurónios no cérebro adulto, aumentando assim a resistência a distúrbios psiquiátricos relacionados com o stresse (Babyak et al., 2000; Smits et al., 2008; Herring et al., 2010):

Muito recentemente, Greenwood et al. (2013) sugerem pela primeira vez que indivíduos que façam exercício físico forçado podem ainda assim beneficiar dos seus efeitos protetores contra distúrbios psiquiátricos relacionados com o stresse.

Apesar da quantidade de estudos que relacionam exercício físico e depressão e ansiedade ser ainda escassa, a literatura existente sugere que o exercício aeróbico está associado a maiores benefícios, que os efeitos antidepressivos do exercício podem ultrapassar o seu período de execução e que os benefícios terapêuticos em casos de distúrbios do tipo depressivo ou ansioso não são restritos aos sintomas da doença (Ernst et al. 2006).

Assim, o exercício físico parece ser uma ferramenta não farmacológica no auxílio na prevenção e tratamento de doenças psiquiátricas e na promoção de uma qualidade de vida mais satisfatória.

## **4.2. Efeito neuroreparador do exercício físico**

Tem sido sugerido que numerosos fatores contribuem para os efeitos neuroprotetores/neuroreparadores do exercício em relação a danos cerebrais (Griesbach et al., 2009; Devi & Kiran, 2004; Cotman & Berchtold, 2002; Gomez-Pinilla et al., 2002; Carro et al., 2000). Estes incluem a ativação de sistemas anti-inflamatórios, antioxidantes e neurotróficos no cérebro.

Grande parte da investigação atualmente feita baseia-se na relação entre o exercício físico, alterações na atividade cortical cerebral e na sua ligação a processos psico-fisiológicos

(Vogt et al., 2012). A atividade neuronal no SNC durante o exercício físico tem sido examinada em várias áreas cerebrais. Observou-se que, durante a corrida, há o aumento significativo das atividades dopaminérgicas e noradrenérgicas no estriado, da atividade dopaminérgica no NAc e da atividade serotoninérgica no hipocampo e córtex frontal (Kitaoka et al., 2010). Estudos recentes demonstraram que o exercício físico melhora a função cognitiva, neuroquímica e mitocondrial em modelos experimentais (Lin et al., 2012; Pietrelli et al., 2012; Aguiar et al., 2011; Elokda et al., 2010; Tuon et al., 2010; Bloomer et al., 2008; Dutra et al., 2012). Também foi sugerido que o exercício pode conferir efeitos neuroprotetores (Funk et al., 2011; Tajiri et al., 2010).

O exercício estimulou a recuperação funcional após lesões estriatais dopaminérgicas e modulou a neurotransmissão no sistema nigroestriatal (Tajiri et al., 2010; O'Dell et al., 2007, 2012; Dobrossy & Dunnett, 2003) em modelos animais. Há um corpo robusto de informação que sugere que o exercício atenua as alterações comportamentais e neurobiológicas em ratos tratados com 6-OHDA (Tajiri et al., 2010; Yoon et al., 2007; Tillerson et al., 2003) e melhora o controle e equilíbrio motor em pessoas com DP (Dibble, et al., 2009, Fisher, et al., 2008, Sasco, et al., 1992). No entanto, não tem sido estudado a putativa ação neuroregeneradora do exercício físico no córtex frontal.

Os mecanismos responsáveis por esta ação neuroprotectora/neuroreparadora ainda não são conhecidos. No entanto foi sugerido o envolvimento das neurotrofinas BDNF e GDNF. Por exemplo, Tajiri et al. (2010) revelou que o exercício exerceu efeitos neuroprotetores no sistema dopaminérgico e estimulou a migração neuronal, pelo menos parcialmente, através da sobre-regulação de BDNF e GDNF. Tuon et al. (2010), demonstraram que exercício modulou significativamente tanto a atividade de TH e sinucleína, como o conteúdo em BDNF no estriado de ratos com DP ou SDAH. Para além de aumentar os níveis de neurotrofinas, o exercício aumenta também os níveis de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e de fator de crescimento neural no cérebro, os quais ativam a via de PI3K-Akt (Carro et al., 2003; Cotman & Berchtold, 2002). Finalmente, o exercício físico está também associado à modulação da plasticidade sináptica (Gomez-Pinilla et al., 2008; Berchtold et al., 2007).



# **Capítulo II**

## **Objetivo**



## 1. Objetivo

Este estudo tem como principal objetivo testar a hipótese segundo a qual o exercício físico crónico consegue corrigir estados emocionais negativos bem como a disrupção dopaminérgica cortical induzidos por uma dose neurotóxica de metanfetamina. Em última análise, pretende-se propor o exercício físico como uma estratégia neurorreparadora, não farmacológica.



# **Capítulo III**

## **Materiais e Métodos**



## 1. Animais

Este projeto foi desenvolvido utilizando-se 32 murganhos C57BL/6 machos (10 semanas de idade; 22–26 g, Laboratórios Charles River, Barcelona, Espanha), divididos em 8 gaiolas (4/gaiola), e mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) em condições ambientais controladas (temperatura,  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ; humidade,  $50 \pm 10\%$ ; ciclo de luz, 12/12 horas), com ração e água fornecidas *ad libitum*. O seu peso foi monitorizado, semanalmente, no sentido de avaliar a evolução dos diferentes grupos experimentais.

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

## 2. Neurotoxina utilizada

Utilizou-se o cloridrato de metanfetamina para a execução deste trabalho experimental.

Foram pedidas as autorizações necessárias à FMUC e ao INFARMED Portugal (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.) para a sua aquisição à Life Science and High Technology Company Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## 3. Treadmill

Para a execução do exercício físico aeróbio foram utilizados dois *treadmills* - o modelo LE8700, serial number 2187/07 e o modelo LE8706, serial number 8589/04, Panlab, S.L., Barcelona - Espanha, ambos de 50 W, 110/120 V e 50/60 Hz.

Estes modelos, apropriados para ratos, foram redimensionados, através da separação de cada passadeira com acrílico transparente, diminuindo-se assim a largura de cada corredor. Deste modo, foi possível exercitar ao mesmo tempo 4 murganhos por esteira.

#### 4. Desenho experimental

Os 32 animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, havendo 8 animais por grupo: (1) grupo salino sedentário (Sal/Sed), (2) grupo METH sedentário (Meth/Sed), (3) grupo salino exercício (Sal/Ex) e (4) grupo METH exercício (Meth/Ex) (tabela 2). Os animais foram previamente identificados com riscas na cauda (tinta) e alojados nas respetivas gaiolas, tendo sido sujeitos a um período de adaptação de 2 semanas às condições controladas do biotério (mencionadas anteriormente). O peso dos murganhos foi registado semanalmente, com recurso a uma balança analítica (KERN CB 6 K1, Alemanha). No entanto, a pesagem foi feita diariamente na semana posterior à administração da neurotoxina.

**Tabela 2** – Grupos experimentais e quantidade de murganhos utilizados (n).

| Murganhos (n=32) |                                   |                   |                                    |
|------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| Exercício (n=16) |                                   | Sedentário (n=16) |                                    |
| METH (n=8)       | Salino (n=8) – controlo-exercício | METH (n=8)        | Salino (n=8) – controlo-sedentário |

##### 4.1. Adaptação ao *treadmill*

Após este período de adaptação, os murganhos pertencentes aos grupos do exercício (Sal/Ex e Meth/Ex) realizaram um plano de treino diário de adaptação ao *treadmill* e ao seu funcionamento com a duração de 2 semanas (5 dias/semana). O treino consistiu em quatro fases (figura 10), com um aumento progressivo do tempo total de cada sessão (de 20 min no início para 40 min na última semana) e da intensidade (velocidade máxima diária de 20 para 30 cm/s) até se atingirem os valores usados no protocolo de exercício.

| Período de Adaptação ao <i>Treadmill</i> |     |     |     |     |   |   |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tr1                                      | Tr1 | Tr2 | Tr2 | Tr2 | D | D | Tr3 | Tr3 | Tr3 | Tr4 | Tr4 |

**Protocolo:**

- **Tr1:** Velocidade – 20 cm/s; 20 min
- **Tr 2:** Velocidade – 20 cm/s – 5 min; 25 cm/s – 20 min; 20 cm/s – 5 min
- **Tr 3:** Velocidade – 20 cm/s – 5 min; 30 cm/s – 20 min; 20 cm/s – 5 min
- **Tr 4:** Velocidade – 20 cm/s – 5 min; 30 cm/s – 30 min; 20 cm/s – 5 min
- **D:** Descanso

**Figura 10** – Protocolo do período de adaptação dos murganhos ao *treadmill*. Tr, treino e D, descanso.

## 4.2. Administração de metanfetamina

Após a fase de treino, todos os murganhos foram de novo pesados e os seus pesos registados, no sentido de aferir exatamente a dose correta a administrar a cada um.

Aos grupos Sal/Sed e Sal/Ex foi administrada uma solução salina (NaCl 0,9%, 250µl), enquanto aos grupos Meth/Sed e Meth/Ex foi feita uma única administração i.p. de METH (3mg/ml) na dose 30mg/kg. Os animais foram administrados com uma única injeção intraperitoneal (i.p.) (figura 11). Pereira et al. (2012) demonstraram que esta dose de 30 mg/kg METH é neurotóxica, induzindo depleção da dopamina e dos seus metabolitos no estriado 3 dias após a administração. Isto é sugestivo de que esta dose elevada de METH produz disfunção dos terminais estriatais dopaminérgicos.



**Figura 11** – Administração intraperitoneal de uma única dose de metanfetamina (30 mg/kg) num dos murganhos pertencentes ao grupo Meth (Sed ou Ex).

Após a administração, os animais foram observados cuidadosamente às 0,5, 1 e 3 h subsequentes. Os animais que receberam esta neurotoxina estavam extremamente agitados, reproduzindo um dos efeitos descritos dos psicoestimulantes.

No dia seguinte, dois dos murganhos pertencentes ao grupo Meth/Ex encontravam-se mortos. A sua morte poder-se-á ter devido à hipertermia causada pela METH.

### 4.3. Protocolo de exercício

Vinte e quatro horas após a administração de METH e de NaCl, os grupos do exercício (Sal/Ex e Meth/Ex) foram submetidos a um protocolo de corrida diária (figura 12), 5 dias por semana, durante 7 semanas (49 dias), de acordo com a seguinte planificação: 1) 5 min de aquecimento a 20 cm/s; 2) 30 min de corrida a 30 cm/s; 3) 5 min de arrefecimento a 20 cm/s. A inclinação da esteira foi sempre nula. A estimulação da corrida foi feita por suaves toques manuais em vez da utilização de choques elétricos, de modo a minimizar o stresse causado

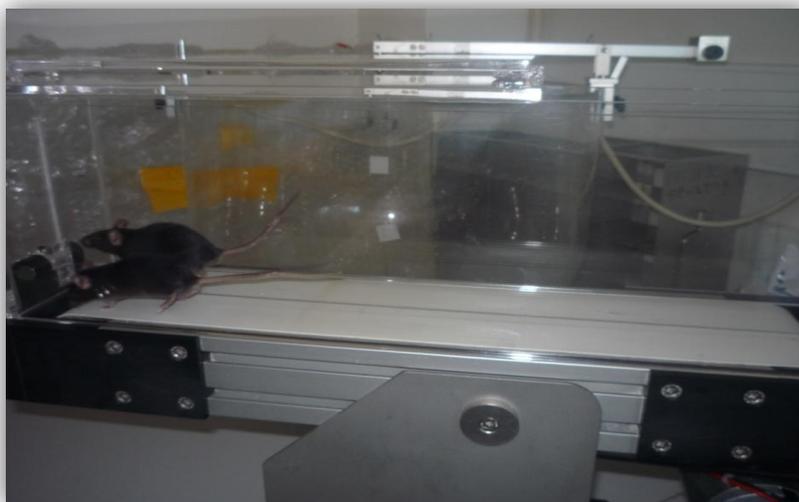
aos animais. O exercício foi sempre feito no mesmo período matinal (entre as 9h30 e as 12 h) (figura 13).

| Protocolo de exercício físico |    |    |    |    |   |   |    |    |    |    |    |   |   |    |    |    |    |    |   |   |  |
|-------------------------------|----|----|----|----|---|---|----|----|----|----|----|---|---|----|----|----|----|----|---|---|--|
| Ex                            | Ex | Ex | Ex | Ex | D | D | Ex | Ex | Ex | Ex | Ex | D | D | Ex | Ex | Ex | Ex | Ex | D | D |  |
| Ex                            | Ex | Ex | Ex | Ex | D | D | Ex | Ex | Ex | Ex | Ex | D | D | Ex | Ex | Ex | Ex | Ex | D | D |  |
| Ex                            | Ex | Ex | Ex | Ex | D | S |    |    |    |    |    |   |   |    |    |    |    |    |   |   |  |

**Protocolo:**

- **Ex:** Velocidade – 20cm/s – 5 min; 30 cm/s – 30 min; 20 cm/s – 5 min
- **D:** Descanso
- **S:** Sacrifício

**Figura 12** – Protocolo de exercício físico para os respetivos grupos de exercício, Sal/Ex e Meth/Ex. Ex, exercício; D, descanso e S, sacrifício.



**Figura 13** – Corrida dos murganhos pertencentes ao grupo exercício no *treadmill* com uma esteira separada por uma divisória em acrílico, proporcionando dois corredores individualizados.

Os animais dos grupos sedentários correram apenas uma vez por semana, durante 10 minutos à velocidade mínima de 5 cm/s, para uniformizar as condições de stress às quais os animais dos grupos do exercício estavam expostos. O barulho do motor do *treadmill*, a vibração, a textura do tapete rolante, a privação de água e comida e o frequente manuseamento dos animais são alguns dos fatores stressantes, propostos por Woods et al. (2003).

## 5. Testes de comportamento

Os testes de comportamento EPM e *tail suspension* foram realizados por esta ordem, para avaliar os estados emocionais dos murganhos, 49 dias após a administração de METH (30 mg/kg, i.p.) ou solução salina.

Ambos foram realizados no mesmo dia, entre as 9 e as 17 h, numa sala com som atenuado e luz de baixa intensidade (12 lx). Os murganhos foram transferidos 1 h antes do início dos testes, para se habituarem ao ambiente. O comportamento foi monitorizado por uma câmara de vídeo posicionada acima do aparelho e as imagens foram posteriormente analisadas com o sistema de monitorização de vídeo ANY Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA) por um experimentador experiente e que desconhecia o grupo experimental a que pertenciam os animais testados.

### 5.1. *Elevated plus-maze*

O teste EPM é o mais usado para avaliação dos efeitos ansiolíticos ou ansiogénicos de fármacos em murganhos (Lister, 1987). É usado, alternativamente, para testar subtipos individuais de desordens ansiogénicas (Hogg, 1996). Testes EPM podem ser ainda utilizados para compreender melhor as bases biológicas das emoções em relação à dor, viciação por drogas e síndrome de abstinência (Carobrez & Bertoglio, 2005; File, 1993). As vantagens deste teste são óbvias e numerosas: validade ecológica, economia, rapidez e simplicidade,

associadas ao facto de que não requer processos de treino envolvendo a privação de comida/bebida e choque elétrico (Pellow et al. 1985).

Este teste foi realizado num aparelho (LE 848 PANLAB, Barcelona, Espanha) feito de acrílico preto e colocado 55 cm acima do chão. Os quatro braços mediam 18 cm de comprimento e 6 cm de largura. Dois braços opostos eram rodeados por paredes opacas de cor cinzenta (15 cm de altura, braços fechados), enquanto os outros dois braços eram desprovidos de paredes (braços abertos). Cada animal foi colocado no centro do labirinto e observado durante um período de teste de 5 min. Um comportamento do tipo ansiogénico foi definido por uma diminuição da proporção de entradas no braço aberto divididas pelo total de entradas nos quatro braços e por uma diminuição do tempo despendido nos braços abertos relativamente ao tempo total despendido nos braços abertos e fechados. Sempre que um animal colocava as quatro patas num braço, registava-se uma entrada. O número total de entradas nos braços fechados foi utilizado como medida de atividade locomotora.

## 5.2. Tail suspension

O teste *tail suspension* tornou-se num dos testes mais usados para avaliar a atividade de fármacos com atividade antidepressiva em murganhos. Baseia-se no facto de que, animais incapazes de escapar ao stresse de curto-prazo imposto por estarem suspensos pela cauda, desenvolverão uma postura imóvel. A duração total da imobilidade induzida pelo teste *tail suspension* foi determinada neste trabalho tal como foi descrito anteriormente (Steru et al. 1985). Os murganhos, isolados visual e acusticamente, foram suspensos 50 cm acima do chão com fita adesiva colocada aproximadamente 1 cm da ponta da cauda. O tempo de imobilização foi registado durante um período de 5 minutos. Os murganhos apenas eram considerados imóveis quando se encontravam pendurados passivamente e sem movimento.

## 6. Isolamento do córtex frontal

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados, 48 h após o *terminus* do protocolo de exercício físico (no segundo dia de repouso) ou 49 dias após a administração de METH ou solução salina. Os cérebros foram rapidamente removidos e dissecados sobre gelo, tendo-se procedido ao isolamento do córtex frontal com base nas coordenadas descritas para o cérebro do murganho, segundo Paxinos e Franklin (2004). As amostras biológicas foram imediatamente congeladas em azoto líquido e guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior utilização. As áreas do hemisfério esquerdo foram usadas para determinar a densidade das proteínas GFAP, TH, BDNF e GDNF, por *Western Blotting*.

## 7. Quantificação da densidade de TH, GFAP, BDNF e GDNF por *Western Blotting*

Os hemisférios esquerdos do córtex frontal foram homogeneizados, em 400  $\mu\text{l}$  de tampão de lise RIPA (NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM pH=8.0; EGTA 5 mM; Triton X-100 1 %; deoxicolato de sódio (DOC) 0.5%; dodecil sulfato de sódio (SDS) 0.1 %) complementado com uma mistura de inibidores de proteases e de fosfatases (fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, ditiotretitol (DTT) 1 mM, quimostatina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , leupeptina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , antiparina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pepstatina A 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , fluoreto de sódio 50 mM e ortovanadato de sódio 1 mM (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal)). Esta mistura de inibidores de proteases e fosfatases foi adicionada ao tampão de lise imediatamente antes de o usar. O tecido foi homogeneizado por ultrassons (3 pulsos de 10 s), mergulhando as amostras em gelo entre cada pulso, de modo a evitar o sobreaquecimento do material biológico. Posteriormente, os lisados foram centrifugados a 13000 rpm (15493 x g), durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante (extrato total) foi recolhido e conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A concentração de proteína total foi determinada através do método do ácido bicinconínico (BCA - ThermoScientific®).

As amostras foram desnaturadas a  $95^{\circ}\text{C}$ , durante 5 minutos, em solução desnaturante 6x (Tris-HCl, 0,5M, pH 6,8; SDS 10% (m/v); glicerol 30% (v/v), DTT 0,6M, azul de bromofenol 0,01% (m/v)). As proteínas TH (60 kDa), GFAP (52 kDa), pró-BDNF (37 kDa) e

GDNF (42 kDa) foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida (190 V, 45 min) em condições desnaturantes, na presença de lauril sulfato de sódio (SDS), de acordo com Laemmli (1970). Os géis de separação foram preparados com 10 % de Bis acrilamida para TH, GFAP e GDNF e com 15 % de Bis acrilamida para BDNF. Na electroforese usou-se um tampão com Tris base 125 mM, glicina 100 mM e SDS 0,5 % (m/v), pH 8,3.

Seguidamente, as proteínas foram eletrotransferidas (120 V, 90 min para TH, GFAP e GDNF e 120 V, 60 min para BDNF) do gel de poliacrilamida para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF) (Immobilon PVDF transfer membranes 0.2  $\mu$ m, Millipore) previamente ativadas em metanol. A composição do tampão usado na electrotransferência foi a seguinte: CAPS 100 mM, metanol 20 % (v/v), pH 11. Depois da transferência, as membranas foram bloqueadas com soluções 5 % (m/v) de leite magro em PBS-T [tampão fosfato-salino com Tween-20 1% (v/v): NaCl 387 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM; pH 7,4] durante 2 h, sob agitação, à temperatura ambiente. Posteriormente as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (tabela 2) preparados numa solução 5 % (m/v) de leite magro em PBS-T, durante a noite, a 4°C.

Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas durante 60 min (4 x 15 min), com solução PBS-T, sob agitação e incubadas à temperatura ambiente, durante 1 h, com o respetivo anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (tabela 3) preparado em 5 % (m/v) de leite magro em PBS-T. Procedeu-se novamente à lavagem das membranas, nas mesmas condições referidas.

Após ter-se dado a reação com o substrato de quimioluminescência melhorada (ECF, Enhanced chemifluorescence – GE Healthcare Life Sciences), as membranas foram reveladas no detector *Fluorescent Image Analyzer Typhoon FLA 900* (GE Healthcare Bio-Sciences).

Para confirmar uma carga igual de proteína e transferência das amostras, as membranas foram reincubadas, durante a noite, com anticorpo anti-GAPDH ou anti- $\beta$ -tubulina. Os genes das proteínas GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e tubulina são *housekeeping genes*, isto é, são expressos constitutivamente sob condições normais ou patofisiológicas. A densidade relativa de cada banda foi normalizada em relação às de GAPDH e  $\beta$ -tubulina e quantificada em unidades arbitrárias pelo *software ImageQuant 5.0* (Molecular Dynamics). Cada *blot* foi repetido pelo menos duas vezes. Os resultados foram expressos como percentagens de controlo (SAL + SED) e apresentados como média  $\pm$  EPM.

**Tabela 3** – Anticorpos primários e secundários utilizados na análise por *Western Blot-ting*.

| Anticorpo           | Peso Molecular (kDa) | Quantidade de proteína (µg) | Diluição (µl) | Referência                        |
|---------------------|----------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------------|
| Mouse anti-GFAP     | 52                   | 5                           | 1:2000        | Millipore (IF03L)                 |
| Mouse anti-TH       | 60                   | 20                          | 1:2000        | Millipore (MAB318)                |
| Mouse anti-BDNF     | 37                   | 100                         | 1:200         | Sigma-Aldrich (B5050)             |
| Rabbit anti-GDNF    | 42                   | 50                          | 1:200         | Santa Cruz Biotechnology (sc-328) |
| Mouse anti-GAPDH    | 39                   | -                           | 1:2000        | Millipore (MAB374)                |
| Mouse anti-tubulina | 52                   | -                           | 1:2000        | Sigma-Aldrich (T6199)             |
| Goat anti-mouse     | -                    | -                           | 1:10000       | Sigma-Aldrich (B3582)             |
| Goat anti-rabbit    | -                    | -                           | 1:10000       | GF Healthcare (NIF1317)           |

## 8. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão (EPM). Na comparação entre os diferentes grupos utilizou-se o ANOVA seguido do teste de comparação múltipla *Post-hoc Newman Keuls*, em que \*, #  $p < 0,05$ , \*\*, ##  $p < 0,01$  e \*\*\*, ###  $p < 0,001$ . O símbolo \* refere-se à comparação dos grupos com os grupos controlo e # resulta da comparação entre os outros grupos.

As análises estatísticas foram realizadas usando o *software GraphPad Prism 5.0*.

# **Capítulo IV**

## **Resultados**



## 1. Alterações agudas comportamentais após administração de metanfetamina

Foram observadas alterações comportamentais logo após a administração da METH. Os animais revelaram bastante agitação psicomotora característica deste tipo de droga de abuso, tal como corridas e saltos. O seu comportamento foi monitorizado nas três horas subsequentes à injeção, durante as quais os murganhos apresentavam o pelo eriçado, edema e movimentos repetidos com a cabeça. O efeito da METH manteve-se pelo menos durante 24 h. Após este período, os murganhos retomaram o seu comportamento normal.

Os murganhos que foram administrados com solução salina também demonstraram agitação, como consequência da dor provocada pela injeção e do stress provocado pela sua manipulação. Na hora subsequente, estes animais já se encontravam em repouso.

De notar que, durante a prática da atividade física, os animais injetados com METH correram normalmente. É relevante acrescentar que estes murganhos estavam mais reativos ao toque.

O peso dos murganhos aumentou significativamente em todos os grupos ( $p < 0.05$ ) ao longo de 59 dias, menos no grupo METH/EX ( $p > 0.05$ ). No entanto, o peso dos animais não é significativamente diferente no último tempo avaliado ( $p > 0.05$ ) (figura 14).

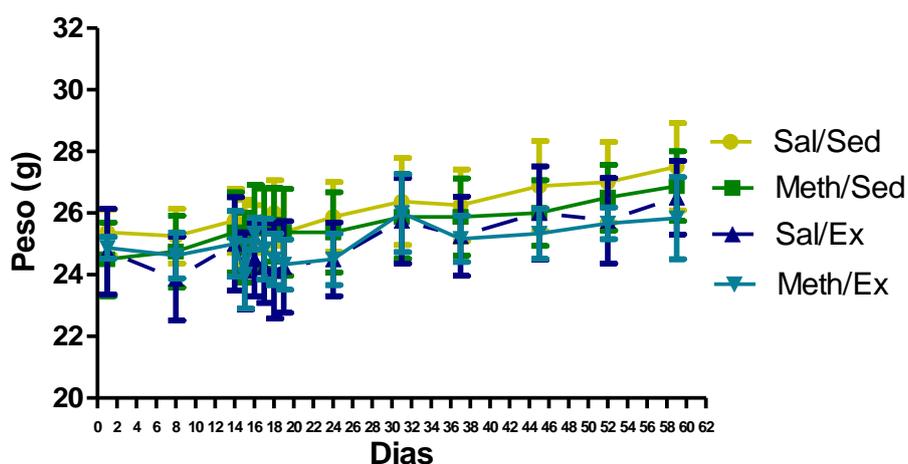
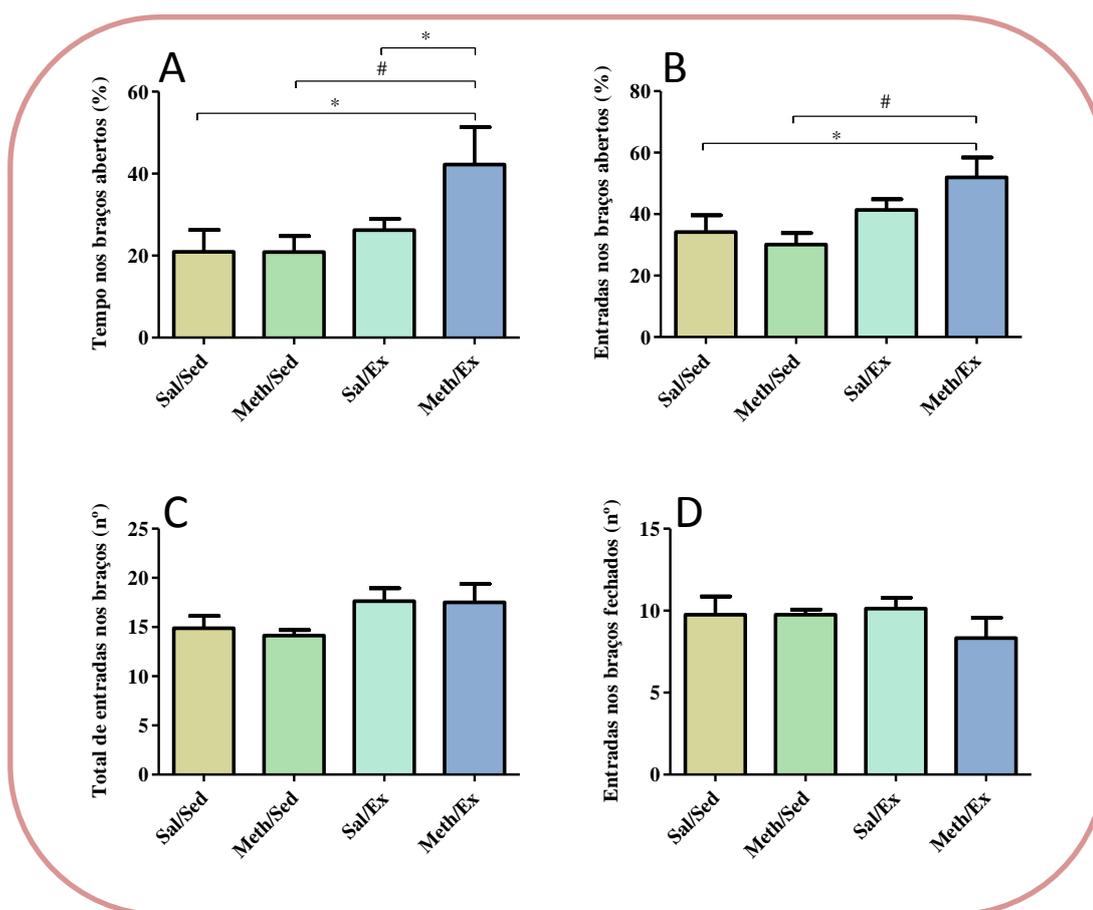


Figura 14 – Evolução do peso dos murganhos ao longo de 62 dias.

## 2. Efeito da metanfetamina e/ou exercício físico crónico no comportamento do tipo ansioso em murganhos

Quarenta e nove dias após a administração de METH (30 mg/kg, i.p.), os murganhos do grupo Meth/Ex revelaram um maior tempo bem como uma maior percentagem de entradas nos braços abertos em relação aos grupos Meth/Sed ( $p < 0,05$ ) e Sal/Sed ( $p < 0,05$ ) (figura 15 A e B). Adicionalmente, o grupo METH/Ex passou uma maior percentagem de tempo nos braços abertos do que o seu controlo que fez exercício ( $p < 0,05$ ) (figura 15 A). Não se registaram alterações significativas no total de entradas nos braços nem no número de entradas nos braços fechados, quando os grupos foram comparados ( $p > 0,05$ ) (figura 15 C e D).

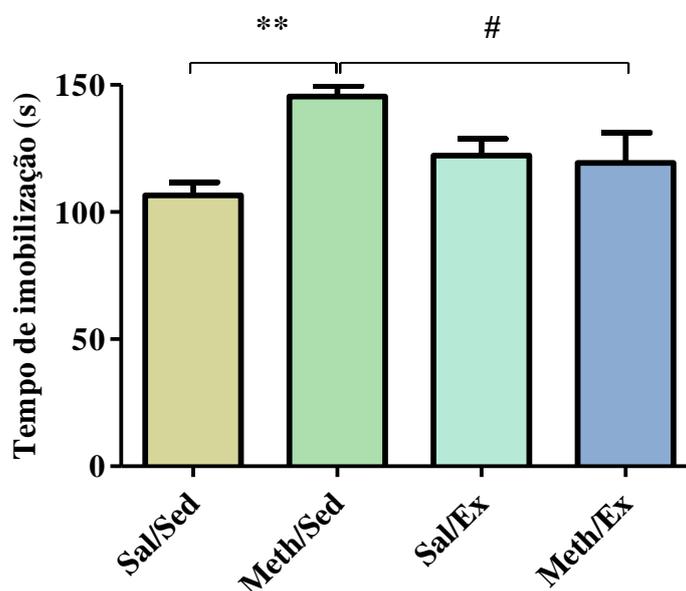


**Figura 15** – Efeito de uma dose única de METH (30 mg/kg, i.p.) e/ou exercício físico crónico no comportamento do tipo ansiogénico [teste *elevated plus maze* (EPM)], 49 dias após a

injeção com METH. A figura representa: (A) a % de entradas nos braços abertos do EPM, 49 dias após a injeção com METH ou SAL; (B) a % de tempo despendido nos braços abertos do EPM, 49 dias após a injeção com METH ou SAL; (C) o total de entradas nos braços do EPM, 49 dias após a injeção com METH ou SAL e (D) o número de entradas nos braços fechados, 49 dias após a injeção com METH ou SAL. Os resultados estão expressos em média (% Sal/Sed)  $\pm$  EPM com 6 a 8 animais por grupo. Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla *Post-hoc Newman Keuls*. \* $p < 0.05$ ; # $p < 0.05$ .

### **3. Efeito da metanfetamina e/ou exercício físico crónico no comportamento do tipo depressivo em murganhos**

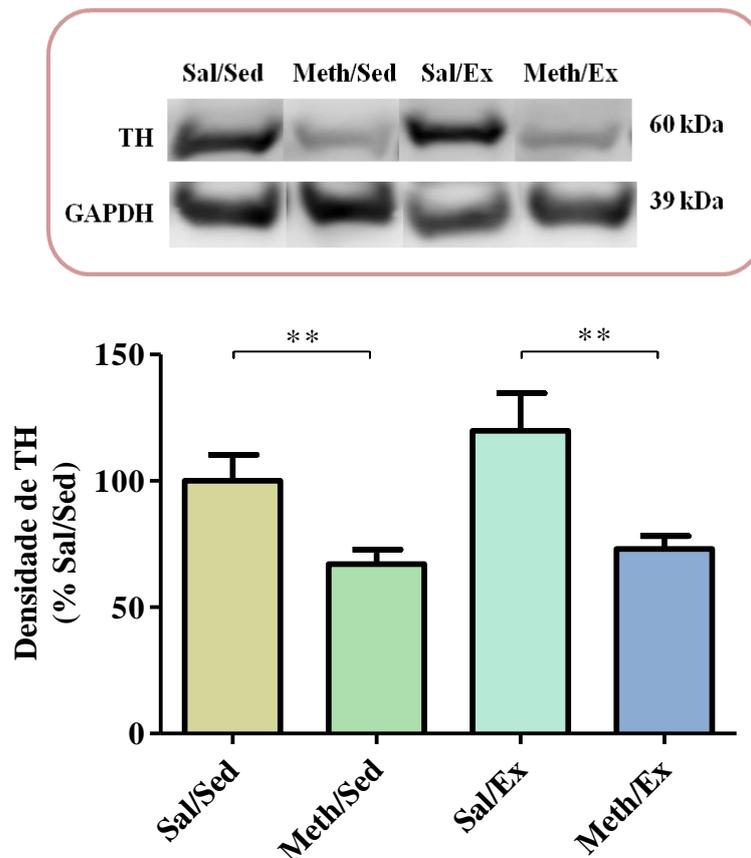
Registou-se no teste *tail suspension* um aumento do tempo de imobilização dos murganhos Meth/Sed, quando comparado com o tempo dos murganhos Sal/Sed ( $p < 0,01$ ), 49 dias após a administração da neurotoxina (figura 16). No entanto, o exercício físico crónico preveniu este comportamento tal como é evidenciado pelo tempo de imobilização dos murganhos Meth/Ex ser menor do que o tempo dos murganhos Meth/Sed ( $p < 0,05$ ). É relevante acrescentar que o exercício físico isoladamente não alterou de forma estatisticamente significativa o tempo de imobilização comportamental dos murganhos ( $p > 0.05$ ).



**Figura 16** – Efeito de uma dose única de METH (30 mg/kg, i.p.) e/ou exercício físico crónico no comportamento do tipo depressivo (teste *tail suspension*). A figura mostra o tempo de imobilização no teste *tail suspension*, 49 dias após a injeção com METH ou SAL. Os resultados estão expressos em média (% Sal/Sed)  $\pm$  EPM com 6 a 8 animais por grupo. Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla *Post-hoc Newman Keuls*. \*\* $p < 0.01$ ; # $p < 0.05$ .

#### 4. Efeito da metanfetamina e/ou exercício físico crónico na densidade cortical de TH em murganhos

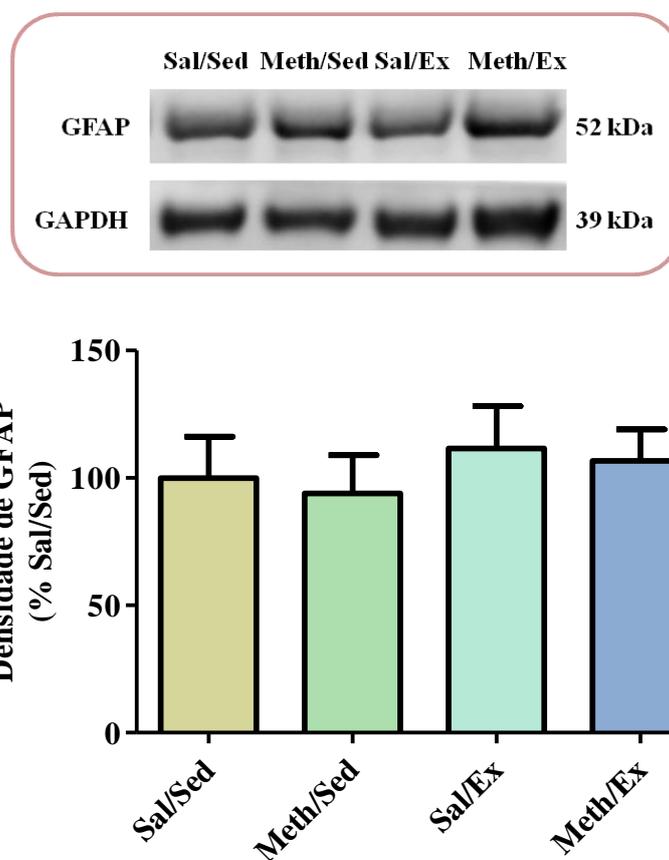
A administração de uma dose única de METH, quer em murganhos sedentários quer em murganhos submetidos a exercício crónico (Meth/Sed e Meth/Ex), produziu uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) na densidade cortical de TH, relativamente aos seus grupos controlo Sal/Sed e Sal/Ex, respetivamente (figura 17).



**Figura 17** – Efeito da administração da METH (30 mg/kg, i.p.) e/ou exercício físico na densidade cortical da tirosina hidroxilase (TH). Os animais controlo (Sal) foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi executado 49 dias após a intoxicação e 48h após o *terminus* do protocolo de exercício físico. Os níveis de TH foram *analizados* por *Western Blotting*. O GAPDH foi utilizado como controlo de *loading*. Os resultados são expressos em média (% Sal/Sed)  $\pm$  EPM (n=6). Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla *Post-hoc Newman Keuls*.\*\* p < 0.01.

### 5. Efeito da metanfetamina e/ou exercício físico crónico na densidade cortical de GFAP em murganhos

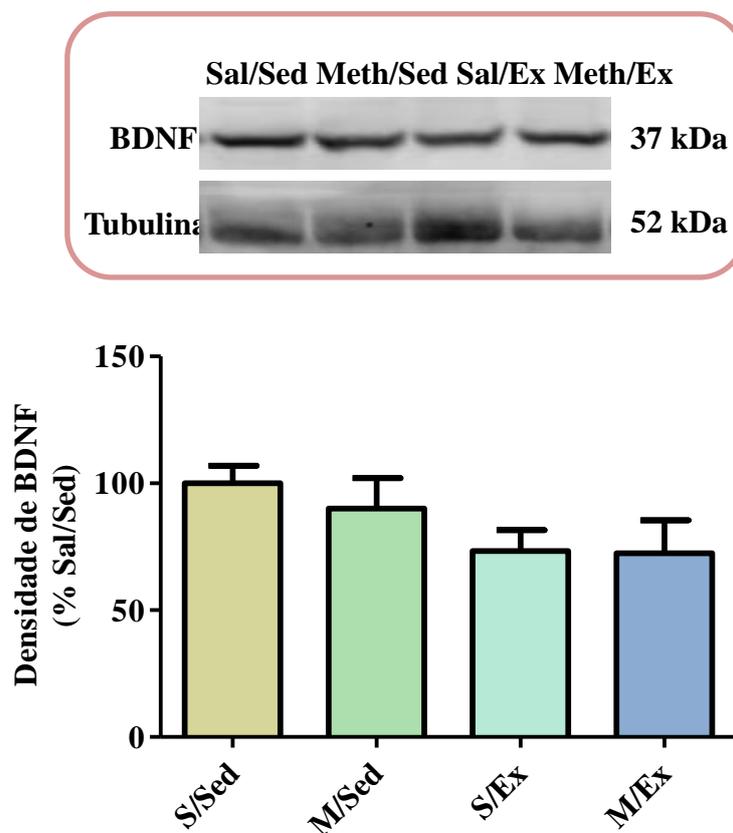
Nem a METH nem o exercício físico crónico nem a sua combinação produziram alterações estatisticamente significativas nos níveis de GFAP corticais relativamente aos grupos Sal/Sed, Meth/Sed ou Sal/Ex (figura 18).



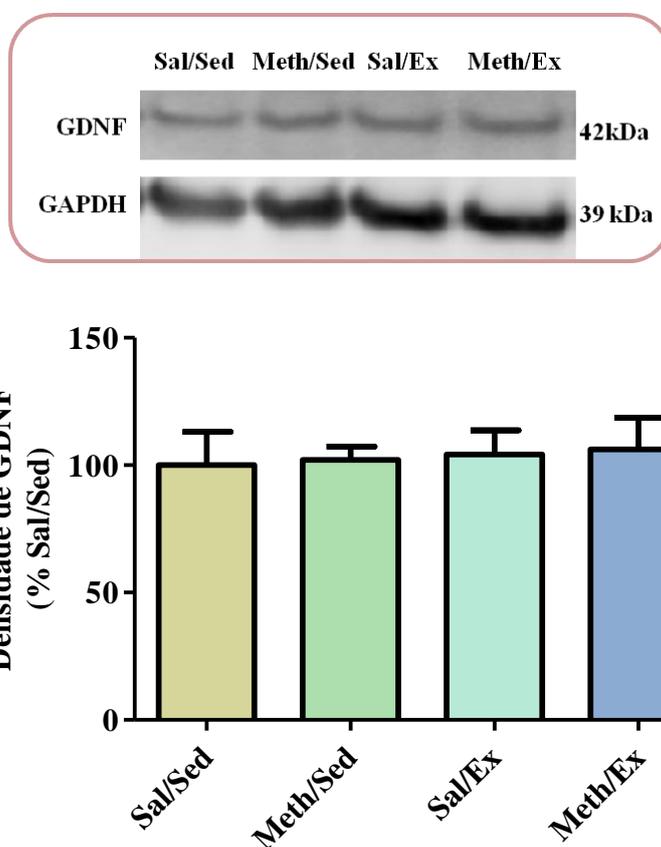
**Figura 18** – Efeito da administração da METH (30 mg/kg, i.p.) e/ou exercício físico na densidade cortical da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Os animais controlo (Sal) foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi executado 49 dias após a intoxicação e 48h após o *terminus* do protocolo de exercício físico. Os níveis de GFAP foram *analisados* por *Western Blotting*. O GAPDH foi utilizado como controlo de *loading*. Os resultados estão expressos pela média (% Sal/Sed)  $\pm$  EPM (n=6). Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla *Post-hoc Newman Keuls*.

## 6. Efeito da metanfetamina e/ou exercício físico crónico na densidade cortical de BDNF e GDNF em murganhos

Nem a METH nem o exercício físico crónico nem a sua combinação produziram alterações estatisticamente significativas nos níveis de BDNF e GDNF corticais relativamente aos grupos Sal/Sed, Meth/Sed ou Sal/Ex (figura 18 e 19).



**Figura 19** – Efeito da administração da METH (30 mg/kg, i.p.) e/ou exercício físico na densidade cortical do fator neurotrófico derivado cerebral (BDNF). Os animais controlo (Sal) foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi executado 49 dias após a administração da METH ou Sal e 48h após o *terminus* do protocolo de exercício físico. Os níveis de GDNF foram analisados por *Western Blotting*. A tubulina foi utilizada como controlo de *loading*. Os resultados estão expressos pela média (% Sal/Sed)  $\pm$  EPM (n=3). Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla *Post-hoc Newman Keuls*.



**Figura 20** – Efeito da administração da METH (30 mg/kg i.p.) e/ou exercício físico na densidade cortical do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF). Os animais controlo (Sal) foram injetados com NaCl 0,9%. O sacrifício dos animais foi executado 49 dias após a administração da METH ou Sal e 48h após o *terminus* do protocolo de exercício físico. Os níveis de GDNF foram analisados por *Western Blotting*. O GAPDH foi utilizado como controlo de *loading*. Os resultados estão expressos pela média (% Sal/Sed)  $\pm$  EPM (n=6). Utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla *Post-hoc Newman Keuls*.

# **Capítulo V**

## **Discussão**



## 1. Comportamento

Os modelos animais constituem a espinha dorsal dos estudos pré-clínicos sobre a neurobiologia da depressão e ansiedade. Estes modelos são também úteis na demanda de novos agentes terapêuticos (Griebel, 1995; Rodgers & Cole, 1994; File, 1992; Green & Hodges, 1991; Handley, 1991; Stephens & Andrews, 1991; Lister, 1990). Embora reconhecendo os seus aspetos subjetivos, a depressão e ansiedade em humanos são invariavelmente refletidas em distúrbios comportamentais evidentes, incluindo, por exemplo a evasão, o desespero, a irritabilidade e/ou hipervigilância (Eysenck, 1991; Marks, 1987; Beck & Emery, 2005). Quando observadas em animais, tais respostas sugerem (mas claro, não provam) um estado afetivo comum.

Estudos clínicos têm revelado a relevância dos sintomas de ansiedade e depressão em consumidores de METH em abstinência (Glasner-Edwards et al. 2009, 2010; Volkow et al. 2001; Zorick et al. 2010). De facto, o consumo de METH por adolescentes está associado a sintomas depressivos subsequentes (Brière et al. 2012) e a ansiedade é uma das queixas psiquiátricas mais proeminentes dos consumidores (Glasner-Edwards et al. 2010). Glasner-Edwards et al. (2009, 2010) sublinhou a importância de abordar estes estados emocionais negativos dos consumidores de METH durante o tratamento do abuso da substância.

Surpreendentemente, até à data, o perfil comportamental de roedores numa fase tardia à administração de uma dose neurotóxica e única de METH ainda não foi documentado.

Neste trabalho, caracterizou-se, em primeiro lugar, o impacto de uma dose neurotóxica e/ou exercício físico no estado emocional dos murganhos submetidos a METH pelos testes *tail suspension* e EPM. Observou-se pela primeira vez que a METH provocou um incremento na imobilização dos murganhos sedentários (Meth/Sed), 49 dias após a sua injeção, o que é indicativo de um comportamento do tipo depressivo a longo prazo. Isto é consistente com o facto de alguns utilizadores crónicos de METH exibirem um comportamento depressivo de forma persistente após alguns anos do fim do consumo (Rawson et al., 2002).

O exercício físico isoladamente não alterou o tempo de imobilização dos murganhos, mas corrigiu o seu aumento nos murganhos injetados com METH. Este resultado sugere que a prática do exercício físico é uma estratégia não farmacológica com potencial antidepressivo.

A ação ansiogénica da METH nos momentos iniciais de privação está bem caracterizada. Contudo não se conhece se esta alteração do humor é persistente.

Pelo uso do teste EPM, constatámos que nem a METH nem o exercício físico produziram um comportamento do tipo ansioso 49 dias após a injeção desta neurotoxina (e/ou 7 semanas de exercício). Consistentemente, estudos clínicos mostraram uma redução ao longo do tempo dos sintomas ansiosos e retardamento psicomotor, que recuperaram para valores normais no final da primeira semana de abstinência (McGregor et al. 2005). Adicionalmente, 49 dias após a administração da METH a função motora é normal, de acordo com os valores totais de entradas nos braços fechados. No entanto, registou-se um aumento da frequência de entradas bem como a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos pelos murganhos Meth/Ex relativamente aos restantes grupos experimentais, 49 dias após a injeção de METH. Isto sugere que os animais METH/Ex têm um comportamento menos ansioso do que os restantes grupos experimentais.

Articulando os dois testes de comportamento, podemos afirmar que a resposta adaptativa desencadeada pela METH foi potenciada pelo exercício físico, permitindo corrigir o comportamento do tipo depressivo e tornando os murganhos menos ansiosos.

## 2. Neurotoxicidade

Este comportamento do tipo depressivo persistente provavelmente é sublinhado por alterações neuroquímicas permanentes no córtex frontal. Apesar de terem sido descritas disfunções dopaminérgicas persistentes no estriado (Krasnova e Cadet, 2009), nada se sabe relativamente ao córtex frontal.

Neste trabalho, demonstramos que a METH impôs uma diminuição acentuada da densidade dos terminais dopaminérgicos corticais no grupo sedentário. Isto é consistente com a depleção de DA no córtex frontal que observámos no nosso laboratório (Pereira et al., 2013; resultados não publicados). Esta disfunção dopaminérgica seria concordante com as alterações comportamentais observadas. No entanto, apesar de estar descrito que o exercício físico tem propriedades reparadoras em sistemas dopaminérgicos (eg. sistema nigroestriado), esta estratégia aeróbica não conseguiu reverter a neurotoxicidade dopaminérgica imposta pela

METH. Isto é sugestivo de que a ação antidepressiva do exercício é independente da sinalização dopaminérgica. A disfunção glial também tem sido associada à depressão (Beumer et al. 2012; Kaster et al. 2012; McNally et al. 2008).

Modelos animais de neurotoxicidade induzida por METH revelaram a existência de reatividade de astrócitos e microglia (LaVoie et al. 2004; Thomas et al. 2004a,b; Guilarte et al. 2003; Bowyer et al. 1994; O'Callaghan & Miller, 1994). Recentemente, Friend & Keefe (2013) demonstraram a manutenção dos níveis elevados de GFAP no estriado de ratos, 32 dias após o tratamento com METH (10 mg/kg, 4 injeções subcutâneas com 2 h de intervalo). Estes resultados são consistentes com trabalhos anteriores que mostraram que os níveis de GFAP se mantiveram elevados até 21 dias de privação em murganhos expostos a METH (O'Callaghan & Miller, 1994) aos 30 dias em primatas expostos a METH (Harvey et al. 2000).

No entanto, além de desempenhar um papel neuroprotetor, os astrócitos ativados também podem ter um papel neurotóxico, dependendo da natureza e extensão dos danos, bem como do período temporal de permanência da manutenção do estímulo agressor (Benarroch, 2012, Miyatake et al., 2005, Giaume et al., 2002). Não há informação sobre a reatividade astrocítica a longo prazo no córtex frontal em murganhos expostos a doses neurotóxicas de METH.

No presente estudo, não há diferenças estatisticamente significativas entre os 4 grupos experimentais, 49 dias após a intoxicação com o psicoestimulante (e/ou 7 semanas de treino). Estes dados são sugestivos de que o comportamento do tipo depressivo é independente de processos inflamatórios.

Alterações em fatores neurotróficos corticais poderiam sublinhar o efeito depressivo da METH e paralelamente a ação antidepressiva do exercício físico. No entanto, apesar de ter sido descrito que a exposição a anfetaminas alterou a densidade dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF na via mesolímbica (Angelucci et al., 2007; Niwa et al., 2007; Grimm et al. 2003) no presente estudo não se observaram quaisquer alterações na densidade cortical de BDNF e GDNF em murganhos, 49 dias após o tratamento com uma dose única e elevada de METH (30 mg/kg).

Adicionalmente, o exercício físico *per se* também não revelou nenhum efeito estatisticamente significativo nestes fatores neurotróficos. Contudo, não se pode descartar a

hipótese de ter havido alterações precoces e transitórias destas neurotrofinas nos murganhos submetidos à METH. Aparentemente também não há umnexo de causalidade entre o efeito depressivo desta neurotoxina e alterações das neurotrofinas. Assim, não conseguimos identificar um substrato neuroquímico para as alterações do comportamento observadas neste trabalho.

# **Capítulo VI**

## **Conclusão**



---

## 1. Conclusão

Com este estudo foi possível demonstrar que o exercício físico crónico corrigiu o comportamento depressivo de murganhos submetidos a uma dose neurotóxica de METH. Este estudo é relevante porque permite propor o exercício físico como uma estratégia não farmacológica no tratamento do comportamento depressivo que acompanha a síndrome de privação de psicoestimulantes.



# **Capítulo VII**

## **Bibliografía**



- Achat-Mendes, C., Ali, S. F., & Itzhak, Y. (2005). Differential effects of amphetamines-induced neurotoxicity on appetitive and aversive Pavlovian conditioning in mice. *Neuropsychopharmacology*, 30(6), 1128-1137.
- Aguiar Jr, A. S., Castro, A. A., Moreira, E. L., Glaser, V., Santos, A. R., Tasca, C. I., Latini, A., & Prediger, R. D. (2011). Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mechanisms of ageing and development*, 132(11), 560-567.
- American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR*. American Psychiatric Publishing, Inc..
- Angelucci, F., Gruber, S. H., El Khoury, A., Tonali, P. A., & Mathé, A. A. (2007). Chronic amphetamine treatment reduces NGF and BDNF in the rat brain. *European Neuropsychopharmacology*, 17(12), 756-762.
- Armstrong, B. D., & Noguchi, K. K. (2004). The neurotoxic effects of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and methamphetamine on serotonin, dopamine, and GABA-ergic terminals: an in-vitro autoradiographic study in rats. *Neurotoxicology*, 25(6), 905-914.
- Audrain-McGovern, J., Rodriguez, D., & Moss, H. B. (2003). Smoking progression and physical activity. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 12(11), 1121-1129.
- Axt, K. J., Commins, D. L., Vosmer, G., & Seiden, L. S. (1990).  $\alpha$ -Methyl-p-tyrosine pretreatment partially prevents methamphetamine-induced endogenous neurotoxin formation. *Brain research*, 515(1), 269-276.
- Babyak, M., Blumenthal, J. A., Herman, S., Khatri, P., Doraiswamy, M., Moore, K., ... & Krishnan, K. R. (2000). Exercise treatment for major depression: maintenance of therapeutic benefit at 10 months. *Psychosomatic medicine*, 62(5), 633-638.

- Barr, A. M., Markou, A., & Phillips, A. G. (2002). A 'crash' course on psychostimulant withdrawal as a model of depression. *Trends in pharmacological sciences*, 23(10), 475-482.
- Barr, A. M., Panenka, W. J., MacEwan, G. W., Thornton, A. E., Lang, D. J., Honer, W. G., & Lecomte, T. (2006). The need for speed: an update on methamphetamine addiction. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 31(5), 301.
- Beck, K. D., Valverde, J., Alexi, T., Poulsen, K., Moffat, B., Vandlen, R., Rosenthal, A., & Hefti, F. (1995). Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain.
- Beck, A. T., Emery, G., & Greenberg, R. L. (2005). *Anxiety disorders and phobias: A cognitive perspective*. Basic Books.
- Benarroch, E. E. (2005). Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 80, No. 10, pp. 1326-1338). Elsevier.
- Ben-Jonathan, N., & Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine reviews*, 22(6), 724-763.
- Berman, S., O'Neill, J., Fears, S., Bartzokis, G., & London, E. D. (2008). Abuse of amphetamines and structural abnormalities in the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1141(1), 195-220.
- Berton, O., & Nestler, E. J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(2), 137-151.
- Biala, G., & Kruk, M. (2007). Amphetamine-induced anxiety-related behavior in animal models. *Pharmacological Reports*, 59(6), 636-644.

- Bloomer, R., Schilling, B., Karlage, R., Ledoux, M., Pfeiffer, R., & Callegari, J. (2008). Effect of resistance training on blood oxidative stress in Parkinson disease. *Medicine+ Science in Sports+ Exercise*, 40(8), 1385.
- Blumenthal, J. A., Babyak, M. A., Doraiswamy, P. M., Watkins, L., Hoffman, B. M., Barbour, K. A., Herman, S., Craighead, W. E., Brosse, A. L., Waugh, R., Hinderliter, A., & Sherwood, A. (2007). Exercise and pharmacotherapy in the treatment of major depressive disorder. *Psychosomatic medicine*, 69(7), 587-596.
- Bowyer, J. F., Davies, D. L., Schmued, L., Broening, H. W., Newport, G. D., Slikker, W., & Holson, R. R. (1994). Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268(3), 1571-1580.
- Bowyer, J. F., Thomas, M., Schmued, L. C., & Ali, S. F. (2008). Brain Region-Specific Neurodegenerative Profiles Showing the Relative Importance of Amphetamine Dose, Hyperthermia, Seizures, and the Blood-Brain Barrier. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139(1), 127-139.
- Brière, F. N., Fallu, J. S., Janosz, M., & Pagani, L. S. (2012). Prospective associations between meth/amphetamine (speed) and MDMA (ecstasy) use and depressive symptoms in secondary school students. *Journal of epidemiology and community health*, 66(11), 990-994.
- Brink, W., & van Ree, J. M. (2003). Pharmacological treatments for heroin and cocaine addiction. *European Neuropsychopharmacology*, 13(6), 476-487.
- Brunoni, A. R., Lopes, M., & Fregni, F. (2008). A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 11(8), 1169.
- Buxton, J. A., & Dove, N. A. (2008). The burden and management of crystal meth use. *Canadian Medical Association Journal*, 178(12), 1537-1539.

- Cadet, J. L., & Brannock, C. (1998). Invited Review Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry international*, 32(2), 117-131.
- Cappon, G. D., Pu, C., & Vorhees, C. V. (2000). Time-course of methamphetamine-induced neurotoxicity in rat caudate-putamen after single-dose treatment. *Brain research*, 863(1), 106-111.
- Carnicella, S., & Ron, D. (2009). GDNF—a potential target to treat addiction. *Pharmacology & therapeutics*, 122(1), 9-18.
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1193-1205.
- Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., & Torres-Aleman, I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *The Journal of Neuroscience*, 20(8), 2926-2933.
- Carro, E., Trejo, J. L., Nuñez, A., & Torres-Aleman, I. (2003). Brain repair and neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *Molecular neurobiology*, 27(2), 153-162.
- Cass, W. A., & Manning, M. W. (1999). Recovery of presynaptic dopaminergic functioning in rats treated with neurotoxic doses of methamphetamine. *The Journal of neuroscience*, 19(17), 7653-7660.
- Cass, W. A. (2000). Attenuation and recovery of evoked overflow of striatal serotonin in rats treated with neurotoxic doses of methamphetamine. *Journal of neurochemistry*, 74(3), 1079-1085.

- Cass, W. A., Peters, L. E., Harned, M. E., & Seroogy, K. B. (2006). Protection by GDNF and Other Trophic Factors Against the Dopamine-Depleting Effects of Neurotoxic Doses of Methamphetamine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1074(1), 272-281.
- Chen, P. H., Huang, M. C., Lai, Y. C., Chen, P. Y., & Liu, H. C. (2012). Serum brain-derived neurotrophic factor levels were reduced during methamphetamine early withdrawal. *Addiction Biology*.
- Cho, A. K., & Melega, W. P. (2001). Patterns of methamphetamine abuse and their consequences. *Journal of Addictive Diseases*, 21(1), 21-34.
- Clark, D., & White, F. J. (1987). Review: D1 dopamine receptor—the search for a function: a critical evaluation of the D1/D2 dopamine receptor classification and its functional implications. *Synapse*, 1(4), 347-388.
- Colombe, S. J., Kramer, A. F., Erickson, K. I., Scalf, P., McAuley, E., Cohen, N. J., ... & Elavsky, S. (2004). Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 3316-3321.
- Conn, V. S. (2010). Depressive symptom outcomes of physical activity interventions: meta-analysis findings. *Annals of behavioral Medicine*, 39(2), 128-138.
- Correale, J., & Villa, A. (2009). Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochemical research*, 34(12), 2067-2077.
- Cryan, J. F., Hoyer, D., & Markou, A. (2003). Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioral effects in rodents. *Biological psychiatry*, 54(1), 49-58.
- Cunha-Oliveira, T., Rego, A. C., Carvalho, F., & Oliveira, C. R. (2013). Chapter 17 –Medical Toxicology of Drugs of Abuse. *Principles of Addiction: Comprehensive Addictive Behaviors and Disorders*. Vol 1, 159–175.

- Dalton, T. P., Shertzer, H. G., & Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 67-101.
- Darke, S., Kaye, S., McKetin, R., & Duflou, J. (2008). Major physical and psychological harms of methamphetamine use. *Drug and alcohol review*, 27(3), 253-262.
- De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463-475
- Dechant, G. (2001). Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell and tissue research*, 305(2), 229-238.
- Degenhardt, L., Mathers, B., Guarinieri, M., Panda, S., Phillips, B., Strathdee, S. A., ... & Howard, J. (2010). Meth/amphetamine use and associated HIV: Implications for global policy and public health. *International Journal of Drug Policy*, 21(5), 347-358.
- Devi, S. A., & Kiran, T. R. (2004). Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary vitamin E in aging rat brain. *Neurobiology of aging*, 25(4), 501-508.
- Di Chiara, G., Loddo, P., & Tanda, G. (1999). Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biological Psychiatry*, 46(12), 1624-1633.
- Dibble, L. E., Addison, O., & Papa, E. (2009). The effects of exercise on balance in persons with Parkinson's disease: a systematic review across the disability spectrum. *Journal of Neurologic Physical Therapy*, 33(1), 14-26.
- Dimeo, F., Bauer, M., Varahram, I., Proest, G., & Halter, U. (2001). Benefits from aerobic exercise in patients with major depression: a pilot study. *British journal of sports medicine*, 35(2), 114-117.

- Dluzen, D. E., Anderson, L. I., McDermott, J. L., Kucera, J., & Walro, J. M. (2002). Striatal dopamine output is compromised within+/- BDNF mice. *Synapse*, 43(2), 112-117.
- Dluzen, D. E. (2004). The effect of gender and the neurotrophin, BDNF, upon methamphetamine-induced neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system in mice. *Neuroscience letters*, 359(3), 135-138.
- Döbrössy, M. D., & Dunnett, S. B. (2003). Motor training effects on recovery of function after striatal lesions and striatal grafts. *Experimental neurology*, 184(1), 274-284.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology*, 62(6), 649-671.
- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological psychiatry*, 59(12), 1116.
- Dunlop, B. W., & Nemeroff, C. B. (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Archives of General Psychiatry*, 64(3), 327.
- Dunn, A. L., Trivedi, M. H., Kampert, J. B., Clark, C. G., & Chambliss, H. O. (2002). The DOSE study: a clinical trial to examine efficacy and dose response of exercise as treatment for depression. *Controlled clinical trials*, 23(5), 584-603.
- Dunn, A. L., Trivedi, M. H., Kampert, J. B., Clark, C. G., & Chambliss, H. O. (2005). Exercise treatment for depression: efficacy and dose response. *American journal of preventive medicine*, 28(1), 1-8.
- Dunn, A. L. (2010). Review: exercise programmes reduce anxiety symptoms in sedentary patients with chronic illnesses. *Evid Based Ment Health*. 13, 95.

- 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.
- Eisch, A. J., Gaffney, M., Weihmuller, F. B., O'Dell, S. J., & Marshall, J. F. (1992). Striatal subregions are differentially vulnerable to the neurotoxic effects of methamphetamine. *Brain research*, 598(1), 321-326.
- Elkis, H., Friedman, L., Buckley, P. F., Lee, H. S., Lys, C., Kaufman, B., & Meltzer, H. Y. (1996). Increased prefrontal sulcal prominence in relatively young patients with unipolar major depression. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 67(2), 123-134.
- Elokda, A., DiFrancisco-Donoghue, J., Lamberg, E. M., & Werner, W. G. (2010). Effects of exercise induced oxidative stress on glutathione levels in Parkinson's disease on and off medication. *Journal of neurology*, 257(10), 1648-1653.
- Eradiri, O. L., & Starr, M. S. (1999). Striatal dopamine depletion and behavioural sensitization induced by methamphetamine and 3-nitropropionic acid. *European journal of pharmacology*, 386(2), 217-226.
- Erickson, K. I., Voss, M. W., Prakash, R. S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., ... & Kramer, A. F. (2011). Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3017-3022.
- Ernst, C., Olson, A. K., Pineda, J. P., Lam, R. W., & Christie, B. R. (2006). Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis?. *Journal of psychiatry & neuroscience*, 31(2), 84.
- Escobedo, L. G., Marcus, S. E., Holtzman, D., & Giovino, G. A. (1993). Sports participation, age at smoking initiation, and the risk of smoking among US high school students. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 269(11), 1391-1395.

- Estevinho, M., & Fortunato, J. (2003). Dopamina e Recetores. *Revista Portuguesa de Psicossomática*, 5 (1): 21-31.
- Eysenck, M. W. (1991). Cognitive factors in clinical psychology: Potential relevance to therapy. *New concepts in anxiety*, 418-433.
- Fantegrossi, W. E., Ciullo, J. R., Wakabayashi, K. T., De La Garza II, R., Traynor, J. R., & Woods, J. H. (2008). A comparison of the physiological, behavioral, neurochemical and microglial effects of methamphetamine and 3, 4-methylenedioxymethamphetamine in the mouse. *Neuroscience*, 151(2), 533-543.
- File, S. E. (1992). Behavioural detection of anxiolytic action. *Experimental approaches to anxiety and depression*, 25-44.
- File, S. E. (1993). The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 58(1), 199-202.
- Friend, D. M., & Keefe, K. A. (2013). Glial Reactivity in Resistance to Methamphetamine-Induced Neurotoxicity. *Journal of neurochemistry*.
- Fukumura, M., Cappon, G. D., Pu, C., Broening, H. W., & Vorhees, C. V. (1998). A single dose model of methamphetamine-induced neurotoxicity in rats: effects on neostriatal monoamines and glial fibrillary acidic protein. *Brain research*, 806(1), 1-7.
- Fumagalli, F., Gainetdinov, R. R., Valenzano, K. J., & Caron, M. G. (1998). Role of dopamine transporter in methamphetamine-induced neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *The Journal of neuroscience*, 18(13), 4861-4869.
- Funk, J. A., Gohlke, J., Kraft, A. D., McPherson, C. A., Collins, J. B., & Jean Harry, G. (2011). Voluntary exercise protects hippocampal neurons from trimethyltin injury: possible role of

---

interleukin-6 to modulate tumor necrosis factor receptor-mediated neurotoxicity. *Brain, behavior, and immunity*, 25(6), 1063-1077.

Giaume, C., Kirchoff, F., Matute, C., Reichenbach, A., & Verkhratsky, A. (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death & Differentiation*, 14(7), 1324-1335.

Gibb, J. W., & Kogan, F. J. (1979). Influence of dopamine synthesis on methamphetamine-induced changes in striatal and adrenal tyrosine hydroxylase activity. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 310(2), 185-187.

Gibbs, M. E., Hutchinson, D., & Hertz, L. (2008). Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(5), 927-944.

Girault, J. A., & Greengard, P. (2004). The neurobiology of dopamine signaling. *Archives of neurology*, 61(5), 641.

Glasner-Edwards, S., Marinelli-Casey, P., Hillhouse, M., Ang, A., Mooney, L. J., & Rawson, R. (2009). Depression among methamphetamine users: association with outcomes from the Methamphetamine Treatment Project at 3-year follow-up. *The Journal of nervous and mental disease*, 197(4), 225.

Glasner-Edwards, S., Mooney, L. J., Marinelli-Casey, P., Hillhouse, M., Ang, A., & Rawson, R. (2010). Anxiety Disorders among Methamphetamine Dependent Adults: Association with Post-Treatment Functioning. *The American Journal on Addictions*, 19(5), 385-390.

Goldwater, D. S., Pavlides, C., Hunter, R. G., Bloss, E. B., Hof, P. R., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2009). Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. *Neuroscience*, 164(2), 798-808.

- Gómez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R. R., Molteni, R., & Edgerton, V. R. (2002). Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *Journal of neurophysiology*, 88(5), 2187-2195.
- Gomez-Pinilla, F., Vaynman, S., & Ying, Z. (2008). Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *European Journal of Neuroscience*, 28(11), 2278-2287.
- Gonul, A. S., Akdeniz, F., Taneli, F., Donat, O., Eker, Ç., & Vahip, S. (2005). Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 255(6), 381-386.
- Granner D., Murray R., Mayes P., & Rowell V. (2000). Hormones of the Adrenal Cortex. *Harper Biochemistry*. 25th Edition. Standford: Appleton and Lang. 575-87.
- Green, S., & Hodges, H. (1991). Animal models of anxiety. Behavioural models in psychopharmacology: Theoretical, industrial and clinical perspectives. (pp. 21-49).
- Greenwood, B. N., Spence, K. G., Crevling, D. M., Clark, P. J., Craig, W. C., & Fleshner, M. (2013). Exercise-induced stress resistance is independent of exercise controllability and the medial prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience*.
- Griebel, G. (1995). 5-Hydroxytryptamine-in-teracting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacology and Therapeutics*. 65, 319-395.
- Griesbach, G. S., Hovda, D. A., & Gomez-Pinilla, F. (2009). Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. *Brain research*, 1288, 105-115.
- Grimm, J. W., Lu, L., Hayashi, T., Hope, B. T., Su, T. P., & Shaham, Y. (2003). Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine

---

system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *The Journal of neuroscience*, 23(3), 742-747.

Guerreiro, D. F., Carmo, A. L., da Silva, J. A., Navarro, R., & Góis, C. (2011). Club drugs: Um Novo Perfil de Abuso de Substâncias em Adolescentes e Jovens Adultos. *Acta Médica Portuguesa*, 24(5), 739-56.

Guilarte, T. R., Nihei, M. K., McGlothan, J. L., & Howard, A. S. (2003). Methamphetamine-induced deficits of brain monoaminergic neuronal markers: distal axotomy or neuronal plasticity. *Neuroscience*, 122(2), 499-513.

Handley, S. L. (1991). Serotonin in animal models of anxiety: the importance of stimulus and response. *Serotonin, sleep and mental disorder. Petersfield: Wrihston*, 89-115.

Hanisch, U. K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40(2), 140-155.

Harvey, D. C., Lacan, G., Tanious, S. P., & Melega, W. P. (2000). Recovery from methamphetamine induced long-term nigrostriatal dopaminergic deficits without substantia nigra cell loss. *Brain research*, 871(2), 259-270.

Hayase, T., Yamamoto, Y., & Yamamoto, K. (2005). Persistent anxiogenic effects of a single or repeated doses of cocaine and methamphetamine: interactions with endogenous cannabinoid receptor ligands. *Behavioural pharmacology*, 16(5-6), 395-404.

Hayase, T., Yamamoto, Y., & Yamamoto, K. (2006). Behavioral effects of ketamine and toxic interactions with psychostimulants. *BMC neuroscience*, 7(1), 25.

Heath, G. W., Parra, D. C., Sarmiento, O. L., Andersen, L. B., Owen, N., Goenka, S., ... & Brownson, R. C. (2012). Evidence-based intervention in physical activity: lessons from around the world. *The Lancet*.

- Herring, M. P., O'Connor, P. J., & Dishman, R. K. (2010). The effect of exercise training on anxiety symptoms among patients: a systematic review. *Archives of Internal Medicine*, 170(4), 321.
- Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T., Minturn, J. E., Ikegaki, N., Foster, P., ... & Brodeur, G. M. (2002). Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer research*, 62(22), 6462-6466.
- Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 21-30.
- Homer, B. D., Solomon, T. M., Moeller, R. W., Mascia, A., DeRaleau, L., & Halkitis, P. N. (2008). Methamphetamine abuse and impairment of social functioning: a review of the underlying neurophysiological causes and behavioral implications. *Psychological bulletin*, 134(2), 301.
- Hotchkiss, A. J., & Gibb, J. W. (1980). Long-term effects of multiple doses of methamphetamine on tryptophan hydroxylase and tyrosine hydroxylase activity in rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 214(2), 257-262.
- Hunt, D., Kuck, S., & Truitt, L. (2007). Methamphetamine Use: Lessons Learned. Library and Information Center.
- Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Wightman, R. M., & Caron, M. G. (1998). Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *The Journal of neuroscience*, 18(6), 1979-1986.
- Joyce, J. N., Renish, L., Osredkar, T., Walro, J. M., Kucera, J., & Dluzen, D. E. (2004). Methamphetamine-induced loss of striatal dopamine innervation in BDNF heterozygote mice does not further reduce D3 receptor concentrations. *Synapse*, 52(1), 11-19.
- Justinova, Z., Panlilio, L. V., & Goldberg, S. R. (2009). Drug addiction. In *Behavioral Neurobiology of the Endocannabinoid System* (pp. 309-346). Springer Berlin Heidelberg.

- Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G., & Aubry, J. M. (2002). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry research, 109*(2), 143-148.
- Karege, F., Bondolfi, G., Gervasoni, N., Schwald, M., Aubry, J. M., & Bertschy, G. (2005). Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biological psychiatry, 57*(9), 1068-1072.
- Kasanetz, F., Deroche-Gamonet, V., Berson, N., Balado, E., Lafourcade, M., Manzoni, O., & Piazza, P. V. (2010). Transition to addiction is associated with a persistent impairment in synaptic plasticity. *Science Signaling, 328*(5986), 1709.
- Kearns, C. M., & Gash, D. M. (1995). GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. *Brain research, 672*(1), 104-111.
- Kelly, B. C., & Wells, B. E. (2006). Prevalence and predictors of club drug use among club-going young adults in New York City. *Journal of Urban Health, 83*(5), 884-895.
- Kermani, P., & Hempstead, B. (2007). Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine, 17*(4), 140-143.
- Kessler, R. C., Chiu, W. T., Demler, O., & Walters, E. E. (2005). Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of general psychiatry, 62*(6), 617.
- Kim, S. U., & de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of neuroscience research, 81*(3), 302-313.

- Kim, S. J., Lyoo, I. K., Hwang, J., Chung, A., Hoon Sung, Y., Kim, J., ... & Renshaw, P. F. (2006). Prefrontal grey-matter changes in short-term and long-term abstinent methamphetamine abusers. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9(02), 221-228.
- Kish, S. J. (2008). Pharmacologic mechanisms of crystal meth. *Canadian Medical Association Journal*, 178(13), 1679-1682.
- Kish, S. J., Fitzmaurice, P. S., Boileau, I., Schmunk, G. A., Ang, L. C., Furukawa, Y., ... & Tong, J. (2009). Brain serotonin transporter in human methamphetamine users. *Psychopharmacology*, 202(4), 649-661.
- Kita, T., Wagner, G. C., Philbert, M. A., King, L. A., & Lowndes, H. E. (1995). Effects of pargyline and pyrogallol on the methamphetamine-induced dopamine depletion. *Molecular and chemical neuropathology*, 24(1), 31-41.
- Kitamura, O., Tokunaga, I., Gotohda, T., & Kubo, S. I. (2007). Immunohistochemical investigation of dopaminergic terminal markers and caspase-3 activation in the striatum of human methamphetamine users. *International journal of legal medicine*, 121(3), 163-168.
- Kitanaka, N., Kitanaka, J., Tatsuta, T., Tanaka, K. I., Watabe, K., Nishiyama, N., ... & Takemura, M. (2010). Withdrawal from fixed-dose injection of methamphetamine decreases cerebral levels of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and induces the expression of anxiety-related behavior in mice. *Neurochemical research*, 35(5), 749-760.
- Kitaoka, R., Fujikawa, T., Miyaki, T., Matsumura, S., Fushiki, T., & Inoue, K. (2010). Increased noradrenergic activity in the ventromedial hypothalamus during treadmill running in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 56(3), 185-190.
- Kokkinos, P., Sheriff, H., & Kheirbek, R. (2011). Physical inactivity and mortality risk. *Cardiology research and practice*, 2011.

- Koob, G. F., Sanna, P. P., & Bloom, F. E. (1998). Neuroscience of addiction. Review. *neuron*, 21, 461-476.
- Krasnova, I. N., & Cadet, J. L. (2009). Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Research Reviews*, 60(2), 379-407.
- Kritz-Silverstein, D., Barrett-Connor, E., & Corbeau, C. (2001). Cross-sectional and Prospective Study of Exercise and Depressed Mood in the Elderly The Rancho Bernardo Study. *American journal of epidemiology*, 153(6), 596-603.
- Kuhn, D. M., Francescutti-Verbeem, D. M., & Thomas, D. M. (2008). Dopamine Disposition in the Presynaptic Process Regulates the Severity of Methamphetamine-Induced Neurotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139(1), 118-126.
- Ladenheim, B., Krasnova, I. N., Deng, X., Oyler, J. M., Poletini, A., Moran, T. H., ... & Cadet, J. L. (2000). Methamphetamine-induced neurotoxicity is attenuated in transgenic mice with a null mutation for interleukin-6. *Molecular pharmacology*, 58(6), 1247-1256.
- LaVoie, M. J., Card, J. P., & Hastings, T. G. (2004). Microglial activation precedes dopamine terminal pathology in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Experimental neurology*, 187(1), 47-57.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., & Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294(5548), 1945-1948.
- Lee, D. C., Artero, E. G., Sui, X., & Blair, S. N. (2010). Review: Mortality trends in the general population: the importance of cardiorespiratory fitness. *Journal of Psychopharmacology*, 24(4 suppl), 27-35.
- Lessmann, V., Gottmann, K., & Malcangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in neurobiology*, 69(5), 341.

- Li, J., Ding, Y. H., Rafols, J. A., Lai, Q., McAllister II, J. P., & Ding, Y. (2005). Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neuroscience letters*, 386(3), 160-164.
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., & Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 260(5111), 1130-1132.
- Lin, T. W., Chen, S. J., Huang, T. Y., Chang, C. Y., Chuang, J. I., Wu, F. S., ... & Jen, C. J. (2012). Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance. *Neurobiology of learning and memory*, 97(1), 140-147.
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2), 180-185.
- Lister, R. G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics*, 46(3), 321-340.
- Logan, B. K. (2002). Methamphetamine-effects on human performance and behavior. *Forensic Science Review*, 14(1), 133-151.
- London, E. D., Berman, S. M., Voytek, B., Simon, S. L., Mandelkern, M. A., Monterosso, J., ... & Ling, W. (2005). Cerebral metabolic dysfunction and impaired vigilance in recently abstinent methamphetamine abusers. *Biological psychiatry*, 58(10), 770-778.
- Lonka-Nevalaita, L., Lume, M., Leppänen, S., Jokitalo, E., Peränen, J., and Saarma, M. (2010). Characterization of the intracellular localization, processing, and secretion of two glial cell linederived neurotrophic factor splice isoforms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 11403–13.

- Lui, N. P., Chen, L. W., Yung, W. H., Chan, Y. S., & Yung, K. K. L. (2012). Endogenous Repair by the Activation of Cell Survival Signalling Cascades during the Early Stages of Rat Parkinsonism. *PloS one*, 7(12), e51294.
- Lynch, J., & House, M. A. (1992). Cardiovascular effects of methamphetamine. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 6(2), 12-18.
- MacKay, W. A. (2010). *Neuro 101: neurophysiology without tears*. Sefalotek.
- Maharajan, P., Maharajan, V., Ravagnan, G., & Paino, G. (2001). The weaver mutant mouse: a model to study the ontogeny of dopamine transmission systems and their role in drug addiction. *Progress in neurobiology*, 64(3), 269-276.
- Mansour, A., Meador-Woodruff, J. H., Lopez, J. F., Watson, S. J., Schatzberg, A. F., & Nemeroff, C. B. (1998). Biochemical anatomy: insights into the cell biology and pharmacology of the dopamine and serotonin systems in the brain. *Textbook of Psychopharmacology. The American Psychiatric Press, Washington DC, London*, 55-73.
- Marek, G. J., Vosmer, G., & Seiden, L. S. (1990). Dopamine uptake inhibitors block long-term neurotoxic effects of methamphetamine upon dopaminergic neurons. *Brain research*, 513(2), 274-279.
- Marks, I. M. (1987). *Fears, phobias, and rituals: Panic, anxiety, and their disorders*. Oxford University Press on Demand.
- Mather, A. S., Rodriguez, C., Guthrie, M. F., McHARG, A. M., Reid, I. C., & McMURDO, M. E. (2002). Effects of exercise on depressive symptoms in older adults with poorly responsive depressive disorder Randomised controlled trial. *The British Journal of Psychiatry*, 180(5), 411-415.
- McAvoy, B. R. (2009). Methamphetamine—what primary care practitioners need to know. *Journal of Primary Health Care*, 1(3), 170-176.

- McCann, U. D., Wong, D. F., Yokoi, F., Villemagne, V., Dannals, R. F., & Ricaurte, G. A. (1998). Reduced striatal dopamine transporter density in abstinent methamphetamine and methcathinone users: evidence from positron emission tomography studies with [11C] WIN-35,428. *The Journal of neuroscience*, 18(20), 8417-8422.
- McClure, S. M., Berns, G. S., & Montague, P. R. (2003). Temporal prediction errors in a passive learning task activate human striatum. *Neuron*, 38(2), 339-346.
- McGregor, C., Srisurapanont, M., Jittiwutikarn, J., Laobhripatr, S., Wongtan, T., & White, J. M. (2005). The nature, time course and severity of methamphetamine withdrawal. *Addiction*, 100(9), 1320-1329.
- Melega, W. P., Lacan, G., Harvey, D. C., & Way, B. M. (2007). Methamphetamine increases basal ganglia iron to levels observed in aging. *Neuroreport*, 18(16), 1741-1745.
- Meredith, C. W., Jaffe, C., Ang-Lee, K., & Saxon, A. J. (2005). Implications of chronic methamphetamine use: a literature review. *Harvard review of psychiatry*, 13(3), 141-154.
- Mitchell, A. C. (2010). Neuroprotection by Physical Activity. *Vanderbilt reviews*. Volume 1, 76-81.
- Miyatake, M., Narita, M., Shibasaki, M., Nakamura, A., & Suzuki, T. (2005). Glutamatergic neurotransmission and protein kinase C play a role in neuron–glia communication during the development of methamphetamine-induced psychological dependence. *European Journal of Neuroscience*, 22(6), 1476-1488.
- Motl, R. W., Birnbaum, A. S., Kubik, M. Y., & Dishman, R. K. (2004). Naturally occurring changes in physical activity are inversely related to depressive symptoms during early adolescence. *Psychosomatic Medicine*, 66(3), 336-342.
- Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A. (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12660-12666.

- Murray, J. B. (1998). Psychophysiological aspects of amphetamine-methamphetamine abuse. *The Journal of psychology*, 132(2), 227-237.
- National Institutes of Health (NIH). (2011). Depression. *NIH Publication* No. 11-3561 Revised.
- Neill, D. B., Fenton, H., & Justice, J. B. (2002). Increase in accumbal dopaminergic transmission correlates with response cost not reward of hypothalamic stimulation. *Behavioural brain research*, 137(1), 129-138.
- Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., ... & Nabeshima, T. (2007). An Inducer for Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Protects Against Methamphetamine-Induced Rewarding Effects and Sensitization. *Biological psychiatry*, 61(7), 890-901.
- O'Callaghan, J. P., & Miller, D. B. (1994). Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270(2), 741-751.
- O'Dell, S. J., Weihmuller, F. B., & Marshall, J. F. (1993). Methamphetamine-Induced Dopamine Overflow and Injury to Striatal Dopamine Terminals: Attenuation by Dopamine D1 or D2 Antagonists. *Journal of neurochemistry*, 60(5), 1792-1799.
- O'Dell, S. J., Gross, N. B., Fricks, A. N., Casiano, B. D., Nguyen, T. B., & Marshall, J. F. (2007). Running wheel exercise enhances recovery from nigrostriatal dopamine injury without inducing neuroprotection. *Neuroscience*, 144(3), 1141.
- O'Dell, S. J., Galvez, B. A., Ball, A. J., & Marshall, J. F. (2012). Running wheel exercise ameliorates methamphetamine-induced damage to dopamine and serotonin terminals. *Synapse*, 66(1), 71-80.

- Parpura, V., & Zorec, R. (2010). Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes. *Brain research reviews*, 63(1), 83-92.
- Pascual, A., Hidalgo-Figueroa, M., Piruat, J. I., Pintado, C. O., Gómez-Díaz, R., & López-Barneo, J. (2008). Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat Neurosci*. 11(7), 755-61.
- Patapoutian, A., & Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current opinion in neurobiology*, 11(3), 272-280.
- Paulson, P. E., Camp, D. M., & Robinson, T. E. (1991). Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology*, 103(4), 480-492.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Gulf Professional Publishing.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14(3), 149-167.
- Peluso, M. A. M., & Andrade, L. H. S. G. D. (2005). Physical activity and mental health: the association between exercise and mood. *Clinics*, 60(1), 61-70.
- Perea, G., & Araque, A. (2010). GLIA modulates synaptic transmission. *Brain research reviews*, 63(1), 93.
- Petruzzello, S. J., & Landers, D. M. (1994). Varying the duration of acute exercise: Implications for changes in affect. *Anxiety, Stress and Coping*, 6(4), 301-310.

- Pietrelli, A., Lopez-Costa, J., Goni, R., Brusco, A., & Basso, N. (2012). Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. *Neuroscience*, 202, 252-266.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., & Chiarotto, E. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Current medicinal chemistry*, 11(9), 1163-1182.
- Pubill, D., Canudas, A. M., Pallàs, M., Camins, A., Camarasa, J., & Escubedo, E. (2003). Different glial response to methamphetamine-and methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 367(5), 490-499.
- Racagni, G., & Popoli, M. (2008). Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. *Dialogues in clinical neuroscience*, 10(4), 385.
- Rawson RA, Huber A, Brethen P, Obert J, Gulati V, Shoptaw S, Ling W (2002). Status of methamphetamine users 2-5 years after outpatient treatment. *J Addict Dis*. 21, 107–119.
- Ricaurte, G. A., Guillery, R. W., Seiden, L. S., Schuster, C. R., & Moore, R. Y. (1982). Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses of methylamphetamine in the rat brain. *Brain Research*, 235(1), 93-103.
- Ridet, J. L., Malhorta, S. K., Privat, A, Gage, F. H. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*. 23, 570-7.
- Rimmele, U., Zellweger, B. C., Marti, B., Seiler, R., Mohiyeddini, C., Ehlert, U., et al. (2007) Trained men show lower cortisol, heart rate and psychological responses to psychosocial stress compared with untrained men. *Psychoneuroendocrinology*. 32, 627–635.
- Roberts, A. J., & Koob, G. F. (1997). The neurobiology of addiction. *Alcohol Health and Research World*, 21(2), 101-106.

- Robinson, T. E., & Becker, J. B. (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Research Reviews*, 11(2), 157-198.
- Rodgers, R. J., & Cole, J. C. (1994). The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. *Ethology and psychopharmacology*, 9-44.
- Russo-Neustadt, A., Ha, T., Ramirez, R., & Kesslak, J. P. (2001). Physical activity-antidepressant treatment combination: Impact on brain-derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. *Behavioural brain research*.
- Saha, R. N., Liu, X., & Pahan, K. (2006). Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF- $\alpha$ : a case for the neuroprotective role of cytokine. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(3), 212-222.
- Salamone, J. D., Aberman, J. E., Sokolowski, J. D., & Cousins, M. S. (1999). Nucleus accumbens dopamine and rate of responding: Neurochemical and behavioral studies. *Psychobiology*.
- Sasco, A. J., Paffenbarger Jr, R. S., Gendre, I., & Wing, A. L. (1992). The role of physical exercise in the occurrence of Parkinson's disease. *Archives of neurology*, 49(4), 360.
- Schepers, R. J., Oyler, J. M., Joseph, R. E., Cone, E. J., Moolchan, E. T., & Huestis, M. A. (2003). Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clinical chemistry*, 49(1), 121-132.
- Schifano, F., Corkery, J., & Cuffolo, G. (2007). Smokable (ice, crystal meth) and non smokable amphetamine-type stimulants: clinical pharmacological and epidemiological issues, with special reference to the UK. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*.

- Schmued LC, Bowyer JF. 1997. Methamphetamine exposure can produce neuronal degeneration in mouse hippocampal remnants. *Brain Res* 759:135–140
- Scott, J. C., Woods, S. P., Matt, G. E., Meyer, R. A., Heaton, R. K., Atkinson, J. H., & Grant, I. (2007). Neurocognitive effects of methamphetamine: a critical review and meta-analysis. *Neuropsychology review*, 17(3), 275-297.
- Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, Mamarbachi AM, Benjannet S, Touré BB, Basak A, Munzer JS, Marcinkiewicz J, Zhong M, Barale JC, Lazure C, Murphy RA, Chrétien M, Marcinkiewicz M (1999)
- Sekine, Y., Ouchi, Y., Takei, N., Yoshikawa, E., Nakamura, K., Futatsubashi, M., ... & Mori, N. (2006). Brain serotonin transporter density and aggression in abstinent methamphetamine abusers. *Archives of General Psychiatry*, 63(1), 90.
- Semple, S. J., Grant, I., & Patterson, T. L. (2005). Negative self-perceptions and sexual risk behavior among heterosexual methamphetamine users. *Substance use & misuse*, 40(12), 1797-1810.
- Sesack, S. R., Hawrylak, V. A., Matus, C., Guido, M. A., & Levey, A. I. (1998). Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *The Journal of neuroscience*, 18(7), 2697-2708.
- Shaw, P., Malek, M., Watson, B., Sharp, W., Evans, A., & Greenstein, D. (2012). Development of cortical surface area and gyrification in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological psychiatry*, 72(3), 191-197.
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., ... & Iyo, M. (2003). Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological psychiatry*, 54(1), 70-75.

- Singh, N. A., Clements, K. M., & Singh, M. A. F. (2001). The Efficacy of Exercise as a Long-term Antidepressant in Elderly Subjects A Randomized, Controlled Trial. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(8), M497-M504.
- Šlamberová, R., Mikulecká, A., Pometlová, M., Schutová, B., Hrubá, L., & Deykun, K. (2010). The effect of methamphetamine on social interaction of adult male rats. *Behavioural brain research*, 214(2), 423-427.
- Smith, A. D., & Zigmond, M. J. (2003). Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism☆. *Experimental Neurology*, 184(1), 31-39.
- Smits, J. A., Berry, A. C., Rosenfield, D., Powers, M. B., Behar, E., & Otto, M. W. (2008). Reducing anxiety sensitivity with exercise. *Depression and anxiety*, 25(8), 689-699.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.
- Sonsalla, P. K., Gibb, J. W., & Hanson, G. R. (1986). Roles of D1 and D2 dopamine receptor subtypes in mediating the methamphetamine-induced changes in monoamine systems. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 238(3), 932-937.
- Sonsalla, P. K., Giovanni, A., SIEBER, B. A., Donne, K. D., & Manzano, L. (1992). Characteristics of Dopaminergic Neurotoxicity Produced by MPTP and Methamphetamine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 648(1), 229-238.
- Stephens, D. N., & Andrews, J. S. (1991). Screening for anxiolytic drugs. *Behavioural Models in Psychopharmacology*. CUP, Cambridge, 50-75.
- Stephans, S., & Yamamoto, B. (1996). Methamphetamine pretreatment and the vulnerability of the striatum to methamphetamine neurotoxicity. *Neuroscience*, 72(3), 593-600.

- Strawbridge, W. J., Deleger, S., Roberts, R. E., & Kaplan, G. A. (2002). Physical activity reduces the risk of subsequent depression for older adults. *American Journal of Epidemiology*, 156(4), 328-334.
- Streit, W. J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40(2), 133-139.
- Streit, W. J. (2005). Microglial cells. *Neuroglia*. p. 60-71.
- Sulzer, D., Sonders, M. S., Poulsen, N. W., & Galli, A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Progress in neurobiology*, 75(6), 406-433.
- Szabo, S. T., Gould, T.D., & Manji, H. K. (2004). Neurotransmitters, receptors, signal transduction, and secondmessengers in psychiatric disorders. The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology. 3rd Edition. Edited by Schatzberg, A. F., & Nemeroff, C. B. Washington, DC. American Psychiatric Publishing, pp 3-52.
- Tajiri, N., Yasuhara, T., Shingo, T., Kondo, A., Yuan, W., Kadota, T., ... & Date, I. (2010). Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain research*, 1310, 200-207.
- Taylor, A. H., Ussher, M. H., & Faulkner, G. (2007). The acute effects of exercise on cigarette cravings, withdrawal symptoms, affect and smoking behaviour: a systematic review. *Addiction*, 102(4), 534-543.
- Thayer, R. E. (1997). *The origin of everyday moods: Managing energy, tension, and stress*. Oxford University Press.
- Thierry, A. M., Pirot, S., Gioanni, Y., & Glowinski, J. (1998). Dopamine function in the prefrontal cortex. *Adv Pharmacol*. 42:717-20.

- Thomas, D. M., Walker, P. D., Benjamins, J. A., Geddes, T. J., & Kuhn, D. M. (2004a). Methamphetamine neurotoxicity in dopamine nerve endings of the striatum is associated with microglial activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(1), 1-7.
- Thomas, D. M., Dowgiert, J., Geddes, T. J., Francescutti-Verbeem, D., Liu, X., & Kuhn, D. M. (2004b). Microglial activation is a pharmacologically specific marker for the neurotoxic amphetamines. *Neuroscience letters*, 367(3), 349-354.
- Thomas, D. M., Francescutti-Verbeem, D. M., & Kuhn, D. M. (2008). The newly synthesized pool of dopamine determines the severity of methamphetamine-induced neurotoxicity. *Journal of neurochemistry*, 105(3), 605-616.
- Thomas, D. M., & Kuhn, D. M. (2005). Attenuated microglial activation mediates tolerance to the neurotoxic effects of methamphetamine. *Journal of neurochemistry*, 92(4), 790-797.
- Thompson, P. M., Hayashi, K. M., Simon, S. L., Geaga, J. A., Hong, M. S., Sui, Y., ... & London, E. D. (2004). Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. *The Journal of neuroscience*, 24(26), 6028-6036.
- Tillerson, J. L., Caudle, W. M., Reveron, M. E., & Miller, G. W. (2003). Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 119(3), 899-911.
- Timar, J., Gyarmati, S., Szabo, A., & Fürst, S. (2003). Behavioural changes in rats treated with a neurotoxic dose regimen of dextrorotatory amphetamine derivatives. *Behavioural pharmacology*, 14(3), 199-206.
- Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L. F., Ögren, S. O., Young, D., Hoffer, B. J., & Olson, L. (1995). Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo.

- Trivedi, M. H., Greer, T. L., Grannemann, B. D., Church, T. S., Galper, D. I., Sunderajan, P., ... & Carmody, T. J. (2006). TREAD: TRreatment with Exercise Augmentation for Depression: study rationale and design. *Clinical Trials*, 3(3), 291-305.
- Tsuang, M. T., Bar, J. L., Stone, W. S., & Faraone, S. V. (2004). Gene-environment interactions in mental disorders. *World Psychiatry*, 3(2), 73.
- Tuon, T., Valvassori, S. S., Lopes-Borges, J., Fries, G. R., Silva, L. A., Kapczinski, F., ... & Pinho, R. A. (2010). Effects of moderate exercise on cigarette smoke exposure-induced hippocampal oxidative stress values and neurological behaviors in mice. *Neuroscience letters*, 475(1), 16-19.
- Tzschentke, T. M. (2004). Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog Neurobio*. 63, 241-320.
- Ugarte, S. D., Lin, E., Klann, E., Zigmond, M. J., & Perez, R. G. (2003). Effects of GDNF on 6-OHDA-induced death in a dopaminergic cell line: Modulation by inhibitors of PI3 kinase and MEK. *Journal of neuroscience research*, 73(1), 105-112.
- UNODC, World Drug Report. (2012). United Nations publication, Sales No. E.12.XI.1.
- Van Praag, H. (1982). Neurotransmitters and CNS disease. *Lancet*12, 1259–1264.
- Vogt, T., Schneider, S., Abeln, V., Anneken, V., & Strüder, H. K. (2012). Exercise, mood and cognitive performance in intellectual disability—A neurophysiological approach. *Behavioural brain research*, 226(2), 473-480.
- Volkow, N. D., Chang, L., Wang, G. J., Fowler, J. S., Ding, Y. S., Sedler, M., ... & Pappas, N. (2001a). Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *American Journal of Psychiatry*, 158(12), 2015-2021.

- Volkow, N. D., Chang, L., Wang, G. J., Fowler, J. S., Franceschi, D., Sedler, M., ... & Logan, J. (2001b). Loss of dopamine transporters in methamphetamine abusers recovers with protracted abstinence. *The Journal of neuroscience*, 21(23), 9414-9418.
- Volkow, N. D., Chang, L., Wang, G. J., Fowler, J. S., Leonido-Yee, M., Franceschi, D., ... & Miller, E. N. (2001c). Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *American Journal of Psychiatry*, 158(3), 377-382.
- Weisheit, R., & White, W. L. (2009). *Methamphetamine: Its history, pharmacology, and treatment*. Hazelden Publishing.
- Wilson, J. M., Kalasinsky, K. S., Levey, A. I., Bergeron, C., Reiber, G., Anthony, R. M., ... & Kish, S. J. (1996). Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users. *Nature medicine*, 2(6), 699-703.
- Wise, R. A. (2009). Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends in neurosciences*, 32(10), 517-524.
- Woods, J. A., Ceddia, M. A., Zack, M. D., Lowder, T. W., & Lu, Q. (2003). Exercise training increases the naïve to memory T cell ratio in old mice. *Brain, behavior, and immunity*, 17(5), 384-392.
- Yacoubian, T. A., & Standaert, D. G. (2009). Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1792(7), 676-687.
- Yoon, M. C., Shin, M. S., Kim, T. S., Kim, B. K., Ko, I. G., Sung, Y. H., ... & Kim, C. J. (2007). Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. *Neuroscience letters*, 423(1), 12-17.

Zorick, T., Nestor, L., Miotto, K., Sugar, C., Helleman, G., Scanlon, G., ... & London, E. D. (2010). Withdrawal symptoms in abstinent methamphetamine-dependent subjects. *Addiction, 105*(10), 1809-1818.

Zweben, J. E., Cohen, J. B., Christian, D., Galloway, G. P., Salinardi, M., Parent, D., & Iguchi, M. (2004). Psychiatric symptoms in methamphetamine users. *The American Journal on Addictions, 13*(2), 181-190.

