

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Vinícia Garzella Metz

**ESTUDO DOS FATORES NEUROQUÍMICOS ASSOCIADOS AO
EFEITO DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE PARÂMETROS DE RECAÍDA
EM RATOS EXPOSTOS À ANFETAMINA**

Santa Maria, RS
2018

Vinícia Garzella Metz

**ESTUDO DOS FATORES NEUROQUÍMICOS ASSOCIADOS AO EFEITO DO
ÓLEO DE PEIXE SOBRE PARÂMETROS DE RECAÍDA EM RATOS EXPOSTOS À
ANFETAMINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a Dr^a Camila Simonetti Pase
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marilise Escobar Bürger

Santa Maria, RS
2018

Metz, Vinícia Garzella
ESTUDO DOS FATORES NEUROQUÍMICOS ASSOCIADOS AO EFEITO
DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE PARÂMETROS DE RECAÍDA EM RATOS
EXPOSTOS À ANFETAMINA / Vinícia Garzella Metz.- 2018.
73 p.; 30 cm

Orientadora: Camila Simonetti Pase
Coorientadora: Marilise Escobar Bürger
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Adição 2. Anfetamina 3. Óleo de peixe 4. Ômega-3 I.
Pase, Camila Simonetti II. Bürger, Marilise Escobar III.
Título.

Vinícia Garzella Metz

**ESTUDO DOS FATORES NEUROQUÍMICOS ASSOCIADOS AO EFEITO DO
ÓLEO DE PEIXE SOBRE PARÂMETROS DE RECAÍDA EM RATOS EXPOSTOS À
ANFETAMINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 03 de agosto de 2018:

Camila Simonetti Pase, Dra. (UNIPAMPA)
(Presidente/Orientador)

Marilise Escobar Bürger, Dra. (UFSM)
(Presidente/Co-Orientador)

Cristiani Folharini Bortolatto, Dra. (UFPEL)

Mauro Schneider de Oliveira, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

2018

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada especialmente aos meus pais, Volmir e Iara.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo que tem me presenteado nessa vida. Por me mostrar a cada dia que sou forte e capaz. Por seu meu ponto de equilíbrio. Sou infinitamente grata por tudo.

Mãe e Pai, vocês são o meu inabalável alicerce. Minha gratidão pela confiança, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas, por serem meus maiores incentivadores e pelo amor imensurável que existe entre nós.

Enzo, meu irmão, obrigada por ser meu companheiro de vida, pelo teu amor bondoso e por zelar sempre pela nossa família. Eu sei que um dia você vai duvidar dos seus sonhos. Eu também duvidei. Saiba que duvidar não é sinal de fraqueza. Então, quando pensar em desistir, sonhe de novo. E, se eu for motivo de alguma coisa na sua vida, que seja motivo para você não desistir do que ama e almeja.

Família, ter vocês é saber que existo no plural. Entremeadas de amor, gostos parecidos, manias que compartilho e diferenças que respeito, vocês me fazem crescer. Vó Loni e Vó Irene, Tios e Tias e meus Primos definitivamente “irmãos”, vocês fazem a vida valer a pena. Especialmente a Letícia, sou grata por dividir a vida contigo desde que nasci, mas especialmente pelos últimos anos, sempre me amparando, disposta a me ouvir e me estender a mão nos momentos difíceis. Diante de tanta opinião distinta e tantos pontos de vista, encontramos juntas uma maneira comum de ver a vida. Gratidão!

Aos anjos mais bonitos do meu céu, obrigada por serem luz no meu caminho.

Meu agradecimento especial a minha orientadora Professora Camila Simonetti Pase por acreditar na minha capacidade e nas minhas idéias, por não medir esforços para me auxiliar, e acima de tudo pela amizade construída. Minha gratidão a minha co-orientadora Professora Marilise Escobar Bürger por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa ainda na iniciação científica, me capacitando e compartilhando tanto conhecimento.

Hecson, Karine e Vel, sou grata especialmente a vocês por todos os ensinamentos, as opiniões trocadas, as sempre bem vindas sugestões, a parceria e a amizade estabelecida. Caren e Raquel, por serem incansáveis incentivadoras. Grata também aos demais colegas: Geisa, Maikel, Lívia, Laura, Higor, Gerson, Domenika e tantos outros que passaram pelo grupo nestes últimos anos, pela oportunidade de aprender sempre com vocês. Vocês todos tornam o fardo mais leve e fazem o trabalho acontecer.

Aos grandes amigos que a vida me presenteou: Natália, Camila, Suelen, Susana, Vinícius, Francieli, Nadine, Juliana, Aline, Luís Gustavo, Verônica, Matheus, Jonatan, o meu

muito obrigada. Obrigada por serem meus parceiros para todas as horas... Por ouvirem e compartilharem comigo a saga do mestrado, por compreenderem muitas vezes as minhas ausências, tranquilizarem as minhas inquietações e também por estarem sempre prontos para afogar as mágoas junto comigo. Sou privilegiada por ter vocês sempre por perto.

Aos animais utilizados, meios para a realização deste trabalho, todo o meu respeito e agradecimento.

A Universidade Federal de Santa Maria e o Programa de Pós Graduação em Farmacologia pela minha formação. A CAPES e a FAPERGS pelo suporte para realização deste trabalho.

A secretária do Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Zeli de Carvalho, pela disposição, atenção dedicada e por toda ajuda nos procedimentos burocráticos envolvidos.

A todos os que de alguma maneira fizeram parte desse caminho e torceram por mim... Dedico essa conquista a vocês!

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

(Mário Quintana)

RESUMO

ESTUDO DOS FATORES NEUROQUÍMICOS ASSOCIADOS AO EFEITO DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE PARÂMETROS DE RECAÍDA EM RATOS EXPOSTOS À ANFETAMINA

AUTORA: Vinícia Garzella Metz
ORIENTADORA: Camila Simonetti Pase
CO-ORIENTADORA: Marilise Escobar Bürger

Drogas psicoestimulantes são amplamente utilizadas em todo o mundo. Dentre elas, destacam-se as anfetaminas, as quais além de serem empregadas clinicamente, têm sido utilizadas como drogas recreativas. Atualmente, seu uso indiscriminado com fins recreacionais gera inúmeras preocupações devido a sua alta capacidade de desenvolver tolerância, reforço positivo, dependência e recaídas. O uso de drogas anfetamínicas também é capaz de desencadear processos oxidativos e danos celulares, principalmente em áreas cerebrais ricas em dopamina. Deste modo, a busca por alternativas que possam favorecer o tratamento de drogadição e reduzir os índices de recaída tornam-se imprescindíveis, considerando os prejuízos ocasionados por esse transtorno ao indivíduo, à família e à sociedade. O consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI n-3) têm mostrado influências benéficas na prevenção e tratamento de diversas doenças que afetam o sistema nervoso central. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do óleo de peixe (OP), rico em AGPI-3, sobre parâmetros comportamentais de recaída, bem como seus efeitos sobre marcadores bioquímicos e moleculares em ratos previamente condicionados à preferência por anfetamina (ANF). Ratos Wistar foram separados em dois grupos experimentais: ANF (4 mg/kg, i.p.) e Veículo (solução salina - 0,9% NaCl, i.p.) e submetidos ao protocolo de preferência condicionada de lugar (PCL) por 14 dias. Após o teste de PCL, a metade de cada grupo experimental foi tratada oralmente com OP (3g/kg, p.o.) ou água (grupo Controle) durante 14 dias por sonda esofágica. Após o período de tratamento/extinção à ANF, os animais que foram previamente condicionados com o fármaco foram re-expostos à ANF/Veículo por mais 3 dias e na sequência foi novamente realizado o teste de PCL. Um dia após o final das avaliações comportamentais, os animais foram eutanasiados e o córtex pré-frontal (CPF) foi coletado para análises bioquímicas e moleculares. Os resultados encontrados mostram que o tratamento com OP reduziu o comportamento de recaída induzido pelo recondicionamento com ANF. O OP, rico em AGPI n-3, aumentou a incorporação de DHA nas membranas neuronais do CPF. Além disso, o tratamento com OP foi capaz de proteger o SNC contra os efeitos tóxicos da ANF, modulando os marcadores da cascata dopaminérgica (DAT, TH, VMAT2, D1R e D2R). Ainda, o FO reduziu os danos oxidativos induzidos pela ANF na mesma região cerebral. Em resumo, esse estudo fornece evidências de que um tratamento experimental com AGPI n-3 é capaz de alterar a neurotransmissão do sistema dopaminérgico, revertendo os efeitos neurotóxicos provocados pelo uso de ANF. Dessa maneira, este nutracêutico pode ser uma estratégia alternativa para auxiliar no tratamento de um importante problema de saúde pública.

Palavras-chave: Ácidos graxos n-3. Drogas psicoestimulantes. Preferência condicionada de lugar. Sistema dopaminérgico. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

STUDY OF NEUROCHEMICAL FACTORS ASSOCIATED TO THE EFFECT OF FISH OIL ON RELAPSE PARAMETERS IN RATS EXPOSED TO AMPHETAMINE

AUTHOR: Vinícia Garzella Metz
ADVISOR: Camila Simonetti Pase
CO-ADVISER: Marilise Escobar Bürger

Psychostimulant drugs are widely used all over the world. Among them, amphetamines are prominent which beyond to being used clinically have been used as recreational drugs. Currently, its indiscriminate use with recreational purposes raises many concerns due to its high ability to develop tolerance, positive reinforcement, addiction and relapse. The use of amphetamine drugs is also able to trigger oxidative processes and cellular damage, especially in brain areas rich in dopamine. Thus, the search for alternatives that may favor the treatment of drug addiction and reduce relapse rates become essential, considering the damages caused by this disorder to the individual, family and society. The consumption of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA n-3) has shown beneficial influences in the prevention and treatment of various diseases affecting the central nervous system (CNS). The aim of this study was to evaluate the influence of fish oil (FO), rich in PUFA- n3, on behavioral parameters of relapse, as well as its effects on biochemical and molecular markers in rats previously conditioned to amphetamine (AMPH) preference. Wistar rats were separated in two experimental groups: AMPH (4 mg / kg, i.p.) and Vehicle (saline solution - 0.9% NaCl, i.p.) and submitted to the conditioned place preference (CPP) protocol for 14 days. After the CPP test, half of each experimental group was treated orally with FO (3g / kg, p.o.) or water (Control group) for 14 days by gavage. After the treatment/extinction period to the AMPH, the animals that were previously conditioned with the drug were re-exposed to the AMPH/Vehicle for another 3 days and in the sequence the CPP test was again performed. One day after the end of the behavioral evaluations, the animals were euthanized and the prefrontal cortex (PFC) was collected for biochemical and molecular analysis. The results show that treatment with FO reduced the relapse behavior induced by re-conditioning with AMPH. FO, rich in PUFA n-3, increased the incorporation of DHA into the neural membranes of the PFC. In addition, FO treatment was able to protect the CNS against the toxic effects of AMPH by modulating the dopaminergic cascade markers (DAT, TH, VMAT2, D1R and D2R). Furthermore, FO reduced oxidative damage induced by AMPH in the same brain region. In summary, this study provides evidence that an experimental treatment with PUFA n-3 is capable of altering the neurotransmission of the dopaminergic system, reversing the neurotoxic effects caused by the use of AMPH. Thus, this nutraceutical may be an alternative strategy to assist in the treatment of an important public health problem.

Keywords: n-3 Fatty acids. Psychostimulant drugs. Conditioned place preference. Dopaminergic system. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DESENVOLVIMENTO

Figura 1 – Estrutura química da anfetamina	19
Figura 2 – Vias dopaminérgicas cerebrais: (a) Via nigroestriatal, (b) Via mesolímbica, (c) Via mesocortical, (d) Via tuberoinfundibular e (e) Via de múltiplos locais, ainda com função não elucidada.....	21
Figura 3 – Principais representantes dos AGPI n-3 e n-6	24
Figura 4 – Via metabólica dos ácidos graxos essenciais de cadeia longa.....	26

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Figure 1 - Experimental design	46
Figure 2 - Drug preference behavior induced by amphetamine observed in CPP paradigm before 14 days of FO treatment, and after FO treatment followed by re-conditioning with AMPH	47
Figure 3 - Protein carbonyls and reactive species levels performed in prefrontal cortex of rats exposed to AMPH. Subsequently, animals were treated with FO during 14 days, followed by re-conditioning with AMPH	48
Figure 4 - Prefrontal cortex D1R and D2R immunoreactivity of rats exposed to AMPH. Subsequently, animals were treated with FO during 14 days, followed by re-conditioning with AMPH	49
Figure 5 - Prefrontal cortex DAT, TH and VMAT-2 immunoreactivity of rats exposed to AMPH. Subsequently, animals were treated with FO during 14 days, followed by re-conditioning with AMPH.....	50

LISTA DE TABELAS

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Table 1 – Fatty acids composition in the prefrontal cortex of rats conditioned with amphetamine and treated with fish oil (% of total fatty acids identified).....	51
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5 Hidroxitriptamina (serotonina)
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
AA	Ácido Araquidônico
AG	Ácido Graxo
AGPI	Ácidos Graxos Poli-Insaturados
AGPI n-3	Ácidos Graxos Poli-Insaturados Ômega-3
AGPI n-6	Ácidos Graxos Poli-Insaturados Ômega-6
ALA	Ácido Alfa-Linolênico
ANF	Anfetamina
ATV	Área Tegmental Ventral
CAT	Catalase
COMT	Catecol-O-Metil-Transferase
CPF	Córtex Pré-Frontal
D1R	Receptor de Dopamina D1
D2R	Receptor de Dopamina D2
D3R	Receptor de Dopamina D3
D4R	Receptor de Dopamina D4
D5R	Receptor de Dopamina D5
DA	Dopamina
DAT	Transportador de Dopamina
DHA	Ácido Docosahexaenoico
EO	Estresse Oxidativo
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
ER	Espécies Reativas
LA	Ácido Linoleico
LC-AGPI	Ácidos Graxos Poli-Insaturados de Cadeia Longa
MAO	Monoamina oxidase
MDMA	3,4 - Metilendioximetanfetamina
NA	Noradrenalina
NAT	Transportador de Noradrenalina
NE	Norepinefrina
PCL	Preferência Condicionada de Lugar
PKA	Proteína Quinase A
SERT	Transportador de Serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TH	Tirosina Hidroxilase
VMAT2	Transportador Vesicular de Monoaminas 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	DESENVOLVIMENTO	17
2.1	ADICÃO.....	17
2.2	RECAÍDA	17
2.3	DROGAS PSICOESTIMULANTES	18
2.4	ANFETAMINA E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	19
2.5	VIA MESOLÍMBICA DOPAMINÉRGICA	21
2.6	ESTRESSE OXIDATIVO	22
2.7	ÁCIDOS GRAXOS	23
2.8	ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS	23
2.9	ÁCIDOS GRAXOS E SISTEMA NERVOSO CENTRAL	27
2.10	MODELO ANIMAL EM ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO DE ADICÃO	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MANUSCRITO CIENTÍFICO	31
5	CONCLUSÃO	59
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO: Carta de aprovação do CEUA	72

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada em seções dispostas da seguinte forma: Introdução, Desenvolvimento, Objetivos, Manuscrito Científico, Conclusão e Referências. No item **INTRODUÇÃO** e **DESENVOLVIMENTO** encontram-se considerações iniciais sobre o tema desenvolvido nesta dissertação. Os itens **Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências** encontram-se inseridos no próprio manuscrito na seção **MANUSCRITO CIENTÍFICO** e representam a íntegra deste estudo.

Ao fim, encontra-se o item **CONCLUSÃO**, no qual há comentários gerais dos resultados contidos neste estudo. As **REFERÊNCIAS** dizem respeito somente às citações apresentadas no item **INTRODUÇÃO** e **DESENVOLVIMENTO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

A adição é considerada uma doença, reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008), caracterizada pelo uso abusivo de substâncias com comportamento de uso compulsivo, apesar das consequências negativas envolvidas e com alta tendência à recaída após interrupção do uso (KATZUNG et al. 2012; STAHL, 2014). A relação entre o homem e a drogadição pode ser acompanhada durante a história da humanidade, passando de um uso ritualístico na antiguidade para o consumo na modernidade, visando a busca de prazer e a atenuação imediata de desconfortos físicos, psíquicos ou até mesmo de pressão social (BARROS et al.2008). Atualmente, o uso indiscriminado de drogas lícitas e ilícitas apresenta um crescimento progressivo no mundo todo (UNODC, 2017), o que evidencia a adição como um grave problema de saúde pública capaz de causar prejuízos fisiológicos e psicológicos ao usuário, além de causar expressivos prejuízos monetários para a sociedade em geral (POTENZA et al. 2011; VOLKOW BALER e GOLDSTEIN, 2011). Dessa forma, a adição tem sido objeto de intensa pesquisa científica, visando a elucidação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nesse distúrbio e o desenvolvimento de novas medidas de prevenção e tratamento.

A via dopaminérgica mesolímbica, também conhecida como via final do reforço e da recompensa no cérebro, tem sido evidenciada como o principal alvo das drogas de abuso (KATZUNG et al. 2012; STAHL, 2014). Essa via tem origem na área tegmental ventral (ATV) que faz projeções para o *nucleus accumbens*, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (CPF) (FELTENSTEIN e SEE, 2008). De um modo geral, as drogas aditivas atuam ativando essa via e desencadeando diversas consequências neurobiológicas, conforme a fase envolvida (intoxicação, fissura, dependência, abstinência ou recaída) (GOLDSTEIN e VOLKOW, 2002).

Psicoestimulantes como as anfetaminas são utilizados com fins terapêuticos, entretanto, possuem potencial de abuso dependendo do contexto do seu emprego (WESTOVER, NAKONEZKY e HALEY, 2008). Na clínica médica, as anfetaminas e seus derivados são utilizados para o tratamento do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), da narcolepsia e da obesidade mórbida (BERMAN et al.2009; CLEGG-KRAYNOK, MCBEAN e MONTGOMERY-DOWNS, 2011). Por outro lado, outros derivados anfetamínicos, como o 3,4, metilenedioximetanfetamina (MDMA), a metanfetamina e a *d*-anfetamina, são amplamente utilizados com caráter abusivo (WESTOVER, NAKONEZKY e HALEY, 2008), sendo que estes, juntos, aparecem em

segundo lugar como droga mais utilizada mundialmente, de acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas, publicado recentemente em 2017 (UNODC, 2017). As anfetaminas e seus correlatos agem por inibir a recaptação vesicular de dopamina (DA) e norepinefrina (NE) e por aumentar a sua liberação neuronal (ROBERTSON, MATTHIES e GALLI, 2009), sendo que, o seu uso recreativo é devido aos seus efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), que incluem euforia, aumento da energia, necessidade reduzida de sono, aumento da autoconfiança e alerta (PHILLIPS, EPSTEIN e PRESTON, 2014). Por conseguinte, devido a todo impacto negativo decorrente da utilização destas substâncias sobre o indivíduo e a sociedade, torna-se importante o desenvolvimento de alternativas que possam contribuir para o tratamento da adição e em especial, da recaída.

Diversos estudos têm evidenciado propriedades neuroprotetoras dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (AGPI n-3) (DENIS et al. 2015; GOMES et al. 2017; PRIOR e GALDUROZ, 2012). Dessa maneira, os AGPI n-3 têm sido vistos como potenciais formas de tratamento para uma variedade de distúrbios que afetam o SNC (FREEMAN et al. 2006; JICHA e MARKESBERY, 2010; LOGAN, 2003; PALACIOS-PELAEZ, LUKIW e BAZAN, 2010). Como são componentes importantes dos fosfolipídios das membranas celulares neuronais, exercem um papel fundamental sobre a manutenção da fluidez e da flexibilidade dessas, afetando a atividade de proteínas, como enzimas, transportadores e receptores (FOSTER, HARDY e ALANY, 2010; GOMES et al. 2017). O ácido alfa-linolênico (ALA, 18: 3 n-3) e seus derivados, o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20: 5 n-3) e ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6n-3) fazem parte da família AGPI n-3 (BARCELÓ-COBLIJN e MURPHY, 2009) e uma vez que esses ácidos graxos não podem ser sintetizados por mamíferos, devem ser adquiridos através da dieta, sendo encontrados em grandes quantidades em peixes marinhos e óleos de algumas sementes (IXTAINA et al. 2011; ZARARSIZ et al. 2006).

Sabe-se que os AGPI n-3 são capazes de afetar a neurotransmissão dopaminérgica (ZIMMER et al. 1999), a qual notoriamente desempenha um papel crucial nos mecanismos de recompensa (KATZUNG et al. 2012; STAHL, 2014). Além disso, ensaios clínicos revelaram que alterações nos níveis de AGPI n-3 podem influenciar a vulnerabilidade a distúrbios afetivos, comportamentos de agressividade e sintomas de ansiedade, assim como a dependência de drogas (BUYDENS-BRANCHEY et al. 2003a; 2003b; BUYDENS-BRANCHEY e BRANCHEY, 2008; BUYDENS-BRANCHEY, BRANCHEY e HIBBELN, 2008).

Sendo assim, elucidar os efeitos e possíveis mecanismos envolvidos em um tratamento experimental com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, na prevenção da recaída por anfetamina (ANF) é de extrema relevância, visto que poderá resultar em uma estratégia alternativa para o tratamento de um importante problema de saúde pública.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 ADIÇÃO

A adição é um grave problema de saúde pública (POTENZA et al. 2011) com causas e consequências fisiológicas, psicológicas e sociais (NESTLER e AGHAJANIAN, 1997). Caracterizada pela procura compulsiva à droga, com perda do controle em limitar seu uso, a adição acarreta quadros de disforia, ansiedade e irritabilidade em situações as quais o uso da substância é impossibilitado (KOOB e LE MOAL, 1997; 2008).

Estima-se que 5% da população adulta mundial, ou seja, 250 milhões de pessoas usaram drogas pelo menos uma vez em 2015. Ainda, mais preocupante é o fato de que cerca de 29,5 milhões destes indivíduos desenvolveram distúrbios relacionados ao uso de drogas (UNODC, 2017). A adição é um distúrbio psiquiátrico que envolve uma grande quantia em gastos públicos, como elevados custos médico-hospitalares, perda da produtividade do indivíduo dependente, além de altos custos sociais relacionados à criminalidade (MCLELLAN, 2017; UNODC, 2014).

Considerada uma doença, a adição requer tratamento, porém, seja ele psicológico e/ou farmacológico, é frequentemente seguido de recaídas ou reincidências. Sabe-se que a ocorrência de recaída está relacionada a prejuízos neuropsiquiátricos que envolvem instabilidade emocional, depressão, anedonia, impulsividade, agressividade, déficit de atenção, entre outros (MAJEWSKA, 1996; PAU, LEE e CHAN, 2002). Apesar da intensa pesquisa e dos avanços científicos, os tratamentos farmacológicos até então desenvolvidos são bastante limitados e pouco eficazes (VALLOF et al. 2016), o que reforça a importância da pesquisa científica nesse sentido, considerando todos os impactos desse gravíssimo problema de saúde pública.

2.2 RECAÍDA

Após um longo período de abstinência e/ou tratamento, a recaída pode ser desencadeada pela presença da droga em si, por pistas ambientais associadas à droga ou até mesmo pelo estresse (SHAHAN e HOPE, 2005). A recaída ao uso de drogas é o fator clínico mais difícil de ser controlado durante o tratamento da adição. Devido a sua complexidade, os modelos de tratamentos devem abranger diferentes tipos de intervenções, incluindo estratégias

distintas para abordar o problema, considerando os elementos sociais, psicológicos e biológicos envolvidos (KAPLAN e OUDEYER, 2007).

Sabe-se que durante a adição ocorrem diversas neuroadaptações cerebrais, entretanto, os mecanismos neurobiológicos envolvidos nestes processos ainda não estão totalmente esclarecidos. O uso agudo da droga provoca alterações de membrana e também citoplasmáticas, as quais geralmente são locais e passageiras. Entretanto, elas desencadeiam a ativação de fatores de transcrição da função gênica celular, os quais resultam em mudanças morfológicas e funcionais duradouras (KOOB, SANNA e BLOOM, 1998). Por sua vez, o uso crônico também é capaz de afetar importantes fatores de transcrição desencadeando alterações da expressão gênica de proteínas envolvidas na transdução de sinal e/ou neurotransmissão, podendo assim levar a modificações do funcionamento das células cerebrais alvos da droga e em respostas neuronais alteradas (CARLEZON, DUMAN e NESTLER, 2005). Acredita-se que essas adaptações moleculares e celulares de longa duração contribuam para a compulsão pela droga e também para as recaídas, mesmo muito tempo após a interrupção do uso da substância (CHOU e NARASIMNHAN, 2005).

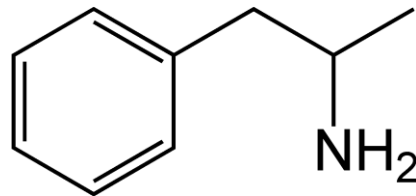
2.3 DROGAS PSICOESTIMULANTES

Drogas psicoestimulantes têm sido amplamente utilizadas em todo mundo (UNODC, 2017) e o seu uso está relacionado aos efeitos por essas proporcionados. Em geral, os psicoestimulantes apresentam como efeitos principais o aumento da vigília, redução da sensação de fadiga e ainda alguns proporcionam melhora na cognição a curto prazo. Esses efeitos são observados em caso de administrações agudas e em doses baixas a moderadas. Doses elevadas ou longos períodos de uso desencadeiam sintomas como excitação e euforia, podendo provocar até episódios psicóticos, com a ocorrência de alucinações e delírios (BOUTREL e KOOB, 2004; KUMAR, 2008; QU et al. 2008; RANG et al. 2016; VOLKOW et al. 2009). Ainda, o uso de psicoestimulantes promove sintomas físicos como inquietação, tremores, inibição da motilidade gastrointestinal, taquicardia, hipertensão, sendo que em casos mais graves é capaz de levar a insuficiência cardíaca, acidente vascular encefálico e convulsões (STAHL, 2014; CARVALHO et al. 2012). São exemplos de fármacos psicoestimulantes a ANF e a cocaína (STAHL, 2014).

2.4 ANFETAMINA E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A ANF é uma amina simpaticomimética que exerce poderosas ações estimulantes sobre o SNC. (HILAL-DANDA e BRUNTON, 2015). Em sua estrutura química (Figura 1) apresenta um anel benzênico com uma cadeia lateral de hidrocarbonetos e um grupamento amino possuindo um grupamento alfa-metil. Outros psicoestimulantes do tipo anfetamínicos também compartilham essa estrutura básica.

Figura 1 - Estrutura química da Anfetamina.



Fonte: (SITTE e FRESSMUTH, 2015).

Drogas psicoestimulantes como as anfetaminas constituem uma entidade terapêutica em determinados casos, entretanto, também são passíveis de abuso, dependendo do contexto do seu emprego (LILE, ROSS e NADER, 2005; WESTOVER, NAKONEZKY e HALEY, 2008). Dentre as anfetaminas de uso lícito com prescrição médica estão os anorexígenos anfetamínicos, como a anfepramona e o femproporex, e os derivados anfetamínicos utilizados no tratamento do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), como o metilfenidato e a lisdexanfetamina (BERMAN et al. 2009; CLEGG-KRAYNOK, MC BEAN e MONTGOMERY-DOWNS, 2011). Por outro lado, as ANF como a *3,4-metilenodioximetanfetamina* (MDMA), popularmente conhecida como êcstasy, a *d*-anfetamina e a metanfetamina são de uso ilícito e apenas utilizadas com propósito de abuso (HOWARD et al. 2010; TIEGES et al. 2009). Segundo o último Relatório Mundial sobre Drogas, publicado em 2017, estima-se que 37 milhões de indivíduos tenham feito o uso de anfetaminas lícitas indevidamente ou ilícitas no ano de 2015 (UNODC, 2017).

Absorvidas rapidamente no trato gastrointestinal e pela mucosa nasal, as anfetaminas penetram livremente pela barreira sangue/cérebro, o que explica seus efeitos acentuados sobre o SNC (RANG et al. 2016). A administração oral de doses clinicamente apropriadas de ANF

promove um bloqueio dos transportadores de dopamina (DAT), transportadores de noradrenalina (NAT) e transportadores de serotonina (SERT). A droga atua como um inibidor competitivo e um pseudosubstrato desses transportadores, se ligando ao mesmo sítio das monoaminas. Em decorrência disso ocorre uma inibição da recaptação de dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) (KUCZENSKI et al. 1995; STAHL, 2014; SULZER, 2011). A ANF tem isômeros, o destrógiro (*d*) e o levógiro (*l*). O isômero *d* é mais potente que o isômero *l* para ligação ao DAT, no entanto, ambos têm potência de ação equivalente para ligação ao NAT. Dessa forma, os sais mistos de *d,l*-anfetamina possuem ação consideravelmente maior sobre o DAT do que sobre o NAT (STAHL, 2014).

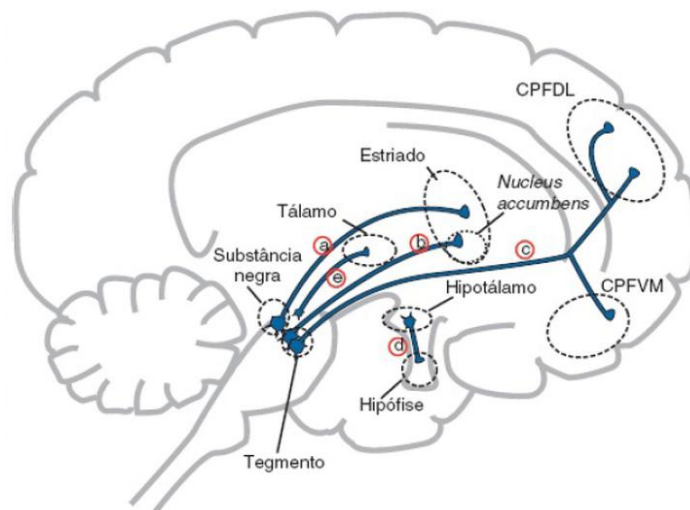
Quando utilizada em altas doses, como no caso do uso abusivo, a ANF desencadeia outros efeitos. Além de competir com as monoaminas devido a sua semelhança estrutural e atuar como substrato para os seus transportadores, a ANF entra no neurônio pré-sináptico (CAO et al. 2016). Ou seja, após a inibição competitiva do DAT, a ANF é transportada para o terminal dopaminérgico pré-sináptico onde pode atuar como inibidor competitivo do transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), o que acarreta na liberação de DA das vesículas para o citoplasma, elevando assim as concentrações citoplasmáticas de DA. Ainda, a ANF atenua a degradação das monoaminas por inibir a atividade da enzima monoamina oxidase (MAO), reduzindo o metabolismo citosólico da DA e aumentando ainda mais suas concentrações no citoplasma (CAO et al. 2016; STAHL, 2014; SULZER, 2011). Uma vez liberada, essa DA pode se acumular no citoplasma do neurônio pré-sináptico e sofrer auto-oxidação (HERMIDA-AMEIJEIRAS, 2004), além de promover a abertura dos canais pré-sinápticos e de inverter a direção do DAT, liberando mais DA na sinapse (CAO et al. 2016). Quaisquer dessas ações não estão relacionadas a nenhuma ação terapêutica da ANF, e na verdade corroboram para os efeitos de reforço, recompensa e euforia, e consequentemente para o abuso de drogas (TEIXEIRA-GOMES et al. 2015; CAO et al. 2016).

O aumento das monoaminas provocado pela ANF desencadeia diversas consequências, devido ao fato de os neurônios dopaminérgicos serem encontrados em várias áreas cerebrais (WISE, 2004; CAO et al. 2016). Acredita-se que o uso destas substâncias pode provocar neuroadaptações no sistema mesolímbico-mesocortical, o qual está intimamente relacionado a mecanismos de recompensa, contribuindo assim para a dependência (HOOKS et al. 1993; ROBINSON e BERRIDGE, 1993).

2.5 VIA MESOLÍMBICA DOPAMINÉRGICA

As substâncias psicoativas que acarretam dependência são conhecidas por ativarem a via mesolímbica dopaminérgica, também conhecida como via de recompensa (RANG et al. 2016), provocando a liberação de DA de uma forma mais explosiva e prazerosa do que a liberação ocorrida naturalmente no estriado ventral ou *nucleus accumbens*, região denominada como “centro da recompensa ou centro do prazer hedônico” (STAHL, 2014). Essa via tem origem na ATV, localizada na extremidade do tronco cerebral, projetando-se até o *nucleus accumbens*, amígdala, hipocampo e CPF (Figura 2) (FELTSTEIN e SEE, 2008).

Figura 2 - Vias dopaminérgicas cerebrais: (a) Via nigroestriatal, (b) Via mesolímbica, (c) Via mesocortical, (d) Via tuberoinfundibular e (e) Via de múltiplos locais, ainda com função não elucidada.



Fonte: (STHAL, 2014).

Como diferentes circuitos cerebrais estão envolvidos, as consequências neurobiológicas podem ser distintas em cada fase envolvida na adição (intoxicação, fissura, dependência e abstinência), visto que as alterações que ocorrem nos níveis de monoaminas são responsáveis por diversos efeitos que acometem desde a cognição até o comportamento motor (GOLDSTEIN e VOLKOW, 2002; WISE, 2004).

Seguramente a DA é um neurotransmissor importante envolvido na adição (BAIK, 2013). Sua síntese dá-se a partir do aminoácido tirosina, que uma vez conduzido para dentro do terminal dopaminérgico através do transportador de tirosina é convertido à DA, por meio da ação de várias enzimas. Dessas, a mais importante e também a enzima limitante do

processo é a tirosina hidroxilase (TH). Após sua síntese, a DA é estocada em vesículas pelo VMAT2, até a sua liberação na sinapse durante a neurotransmissão. A DA liberada pode ser transportada novamente para dentro do neurônio pré-sináptico através do DAT, onde poderá ser armazenada nas vesículas sinápticas para futuro uso ou ainda dentro do terminal pré-sináptico, poderá ser degradada pela MAO. Extracelularmente, a DA poderá ser destruída através da enzima catecol-O-metil-transferase (COMT) (RANG et al. 2016).

São os receptores pré-sinápticos dopaminérgicos tipo D2 (D2R) os responsáveis pelo feedback negativo nos terminais pré-sinápticos. Por outro lado, os receptores pós-sinápticos dopaminérgicos tipo D1R, D2R, D3R, D4R e D5R regulam a neurotransmissão cada qual com distintas ações. Expressos em diferentes quantidades em diversas áreas cerebrais, esses receptores são transmembrana e acoplados a proteína G. Os D1R e D5R ligam-se a Gs e subsequentemente estimulam a adenilatociclase e ativam a proteína quinase A (PKA). Os demais receptores, D2R, D3R e D4R são acoplados a proteína Gi e, por conseguinte, ativam canais de potássio, além de inibir os canais de cálcio e a adenilatociclase (RANG et al. 2016).

A exposição crônica as drogas anfetamínicas é capaz de causar um efeito molecular duradouro e adaptações celulares no sistema dopaminérgico, o que pode contribuir para o uso compulsivo e descontrolado. Em vista disso, o sistema dopaminérgico é um alvo importante e uma estratégia para o desenvolvimento de tratamentos para a adição (CAO et al. 2016).

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

Sabidamente, o uso de ANF resulta em níveis elevados de DA nas sinapses, os quais são uma fonte para a produção de espécies reativas (ER) no cérebro (SULZER et al. 2005). As ER podem ser definidas como átomos ou moléculas de alta instabilidade que rapidamente reagem podendo provocar danos a proteínas, lipídios e ao DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A DA pode ser metabolizada através da desaminação oxidativa, catalizada pela MAO, ou pela sua auto-oxidação, resultando na geração de ER como o ânion superóxido (O_2^-), peroxinitrito ($ONOO^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido dihidroxifenilacético ou ainda pode sofrer hidroxilação enzimática na presença do íon ferro (Fe^{2+}) e H_2O_2 , acarretando na formação do metabólito tóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (CHIUEH et al. 1992; HERMIDA-AMEIJEIRAS et al. 2004; CAO et al. 2016).

O excesso de ER é combatido pelo organismo através de um sistema de defesas antioxidantes que atuam na inativação ou detoxificação desses compostos. Quando a produção de ER é exacerbada e excede a capacidade das defesas antioxidantes endógenas

como a glutathiona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (CADET et al. 2007; YAMAMOTO e RAUDESNIKY, 2008), instala-se um quadro denominado estresse oxidativo (EO). O EO geralmente é resultante da prevalência da geração de ER em detrimento da sua degradação ou inativação através das defesas antioxidantes (BERK et al., 2011).

Acredita-se que o estresse oxidativo originado a partir da desregulação dos níveis de dopamina é responsável por uma considerável parte dos efeitos deletérios causados pela ANF (TOBOREK et al. 2013). Essa hipótese é sustentada por diversos estudos que evidenciam o envolvimento do EO na adição por ANF (DIAS et al. 2016; SEGAT et al. 2014; 2016; 2017; STEINKELLNER et al. 2011; TUNG et al. 2017; YAMAMOTO e RAUDENSKY, 2008).

2.7 ÁCIDOS GRAXOS

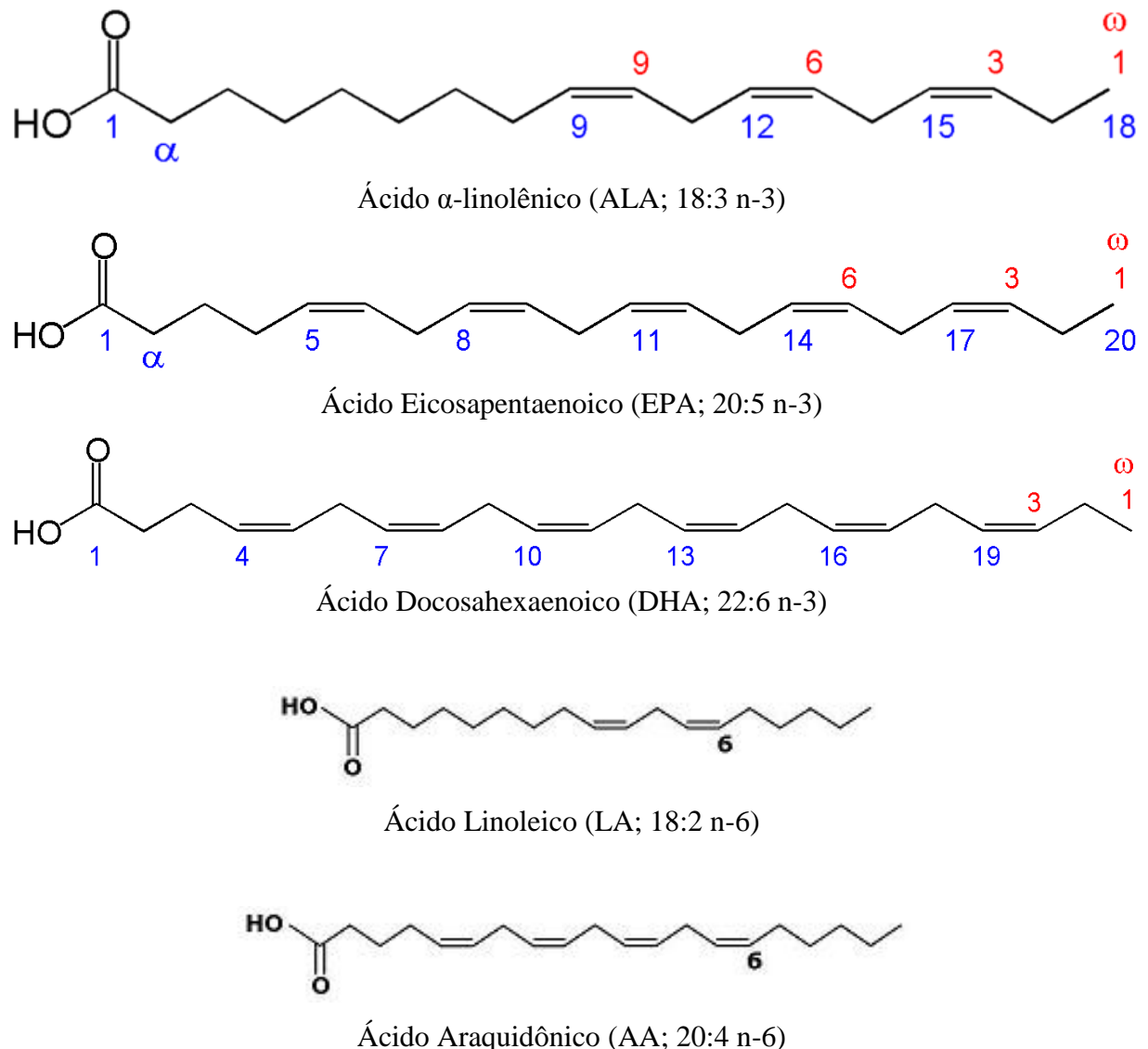
Os ácidos graxos (AG) e seus derivados, como os triacilgliceróis e os fosfolípidos são exemplos de lipídios. Eles são biomoléculas compostas por carbono, hidrogênio e oxigênio, fisicamente caracterizadas por serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos (AMABIS e MARTHO, 2004). Possuem função de reserva energética e compõem membranas celulares, além de exercerem um papel fundamental na sinalização celular e de serem precursores de moléculas bioativas como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (ALBERTS et al. 2004; COOPER e HAUSMAN, 2007; RIEMER et al. 2009)

Os AG são classificados de acordo com as ligações moleculares presentes em sua cadeia carbonada. A ausência de dupla ligação caracteriza os AG saturados. Por outro lado, a presença de apenas uma dupla ligação determina os AG monoinsaturados e a ocorrência de mais de uma dupla ligação designa os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) (BOTHAM e MAYES, 2007). Os AGPI são importantes constituintes de membranas celulares e a presença de múltiplas duplas ligações de carbono em sua cadeia dificultam a interação molecular, proporcionando característica líquida a esses AG à temperatura ambiente. Essa é uma relevante propriedade física requerida para a manutenção da flexibilidade da bicamada lipídica das membranas celulares (CHALON, 2006; HULBERT, RANA e COUTURE, 2005; INNIS, 2007).

2.8 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

Conforme a posição da primeira insaturação, os AGPI podem ser classificados como, por exemplo, AGPI n-3 e AGPI n-6, cuja insaturação encontra-se no terceiro e sexto carbono, respectivamente, enumerado a partir do grupo metil terminal (MIRNIKJOO et al. 2001). Os principais AGPI encontrados na natureza são o ácido α -linolênico (ALA, 18:3 n-3) e o ácido linoleico (LA 18:2 n-6), precursores dos ácidos graxos de cadeia longa (LC-AGPI) das famílias ômega-3 e ômega-6, respectivamente. O ALA é precursor do ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) e eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3), considerados os principais AGPI n-3. O LA dá origem ao ácido araquidônico (AA, 20:4 n-6) da família AGPI n-6. (CARRIE et al. 2000; INNIS, 2007; SU et al. 2003) (Figura 3).

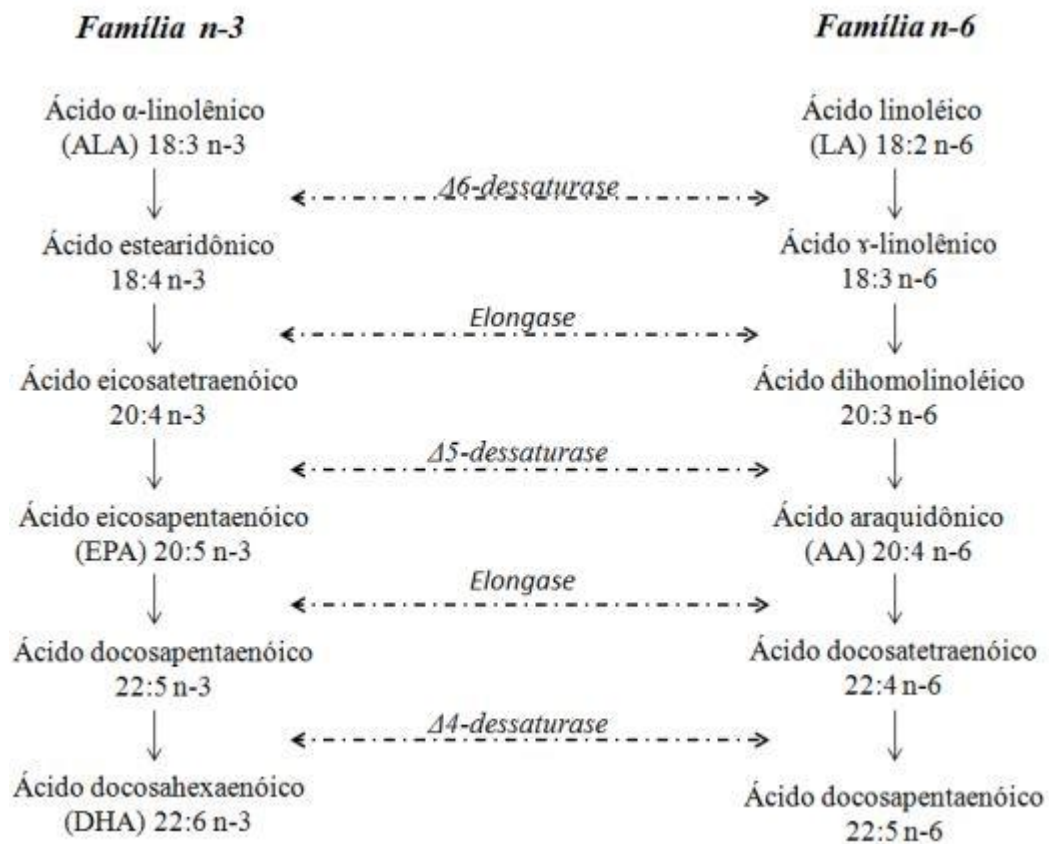
Figura 3 – Principais representantes dos AGPI n-3 e n-6



O ALA e o LA são considerados AG essenciais devido ao fato de não poderem ser sintetizados e interconvertidos pelo organismo de mamíferos, visto que estes não possuem as enzimas Δ^{12} dessaturase e Δ^{15} dessaturase (enzimas envolvidas na síntese dos LC-AGPI), devendo, portanto, serem obtidos unicamente através da dieta alimentar (BOURRE, 2004; OKEN e BELFORT, 2010). Os AGPI n-3 podem ser encontrados na carne de peixes marinhos (sardinha, salmão e truta), óleos e demais produtos derivados de pescado, nozes e em menores quantidades em óleos vegetais (chia, canola e linhaça) (IXTAINA et al. 2011; SOCCOL, HEIDMANN e OETTERER, 2003; WAINWRIGHT, 1992), enquanto que os AGPI n-6 estão presentes em grande quantidade na maioria dos tipos de óleos vegetais (soja, girassol e milho) (MCCUSTER e GRANT-KELS, 2010).

As séries n-3 e n-6 dependem das mesmas enzimas para a produção de seus derivados de cadeia longa (MCCUSKER e GRANT-KELS, 2010; SALEM et al. 1999). São duas vias distintas as responsáveis pela produção dos AGPI n-3 e AGPI n-6 de cadeia longa (Figura 3) a partir dos AG de cadeia curta ALA e LA, sendo que os componentes destas duas classes não são interconvertíveis. Dessa maneira, por meio de várias etapas de síntese: dessaturação (adição de dupla ligação), alongação (adição de duas unidades de carbono), dessaturação e parcial peroxissomal β -oxidação, o AA, um AGPI n-6 de cadeia longa, é produzido a partir do LA, um AGPI n-6 de cadeia curta. Semelhantemente o DHA e o EPA, ambos AGPI n-3 de cadeia de longa, são originados pelo mesmo processo descrito anteriormente, a partir do ALA, um AGPI n-3 de cadeia curta (SALEM et al. 1999). Cerca de 5% a 10% do ALA pode ser convertido em EPA e 1% em DHA (ANDERSON e MA, 2009; JUMP, 2002; SARSILMAZ et al. 2003), contudo, ambos também podem ser obtidos através dos alimentos (BURR, 2000). Embora o ALA seja precursor para a síntese de EPA e DHA, a conversão EPA a DHA é ineficiente (GRIMSGAARD et al. 1997). Pelo contrário, a retroconversão de DHA a EPA é possível (BROSSARD et al. 1996). No todo, a taxa de conversão de EPA e DHA a partir de ALA é baixa (ANDERSON e MA, 2009) e varia entre indivíduos (JUMP, 2002), além de ser mais limitada em homens jovens do que em mulheres jovens (BURDGE, JONES e WOOTTON, 2002, SMIT et al. 2003). Sendo assim, para atingir os níveis adequados de EPA e DHA, estes precisam ser obtidos a partir de suplementação e/ou da dieta.

Figura 4 – Via metabólica dos ácidos graxos essenciais de cadeia longa



Fonte: (Adaptado de LAURITZEN et al., 2001)

Os AGPI n-3 e n-6 de cadeia curta, ALA e LA, como já mencionado anteriormente, competem pelas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento de cadeia para a produção de seus derivados de cadeia longa. Embora essas enzimas tenham maior afinidade pelos AGPI n-3, a conversão do ALA é fortemente influenciada pelos níveis de LA da dieta, sendo que dietas com elevado teor de AGPI n-6 podem reduzir a conversão de AGPI n-3 em até 40% (EMKEN, ADLOF e GULLEY, 1994). Em virtude da prevalência de AGPI n-6 e da deficiência de AGPI n-3 em sua composição, atualmente a dieta ocidental apresenta uma elevada relação n-6/n-3 (DAS, 2006). Tal fato pode estar relacionado à prevalência de diversas patologias como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, além de desordens e doenças que afetam o SNC (SIMOPOULOS, 2003; VIOLA e VIOLA, 2009). Tendo em vista isso, é importante que os AGPI n-3 e n-6 estejam presentes em uma proporção correta na dieta.

2.9 ÁCIDOS GRAXOS E O SNC

O encéfalo humano é em sua estrutura composta por cerca de 60% de lipídios (SINCLAIR et al. 2007), sendo o DHA o principal componente dos fosfolipídios das membranas neuronais, compreendendo aproximadamente 17% do total de AG nesses tecidos (HORROCKS e FAROOQUI, 2004). Logo, o DHA é um dos grandes responsáveis pela fluidez necessária para a execução de funções celulares dependentes de membranas como síntese de fosfolipídios (SALEM et al. 2001), cascatas de sinalização, atividades de proteínas enzimáticas, bem como de receptores de membrana, além de transição e expressão gênica (BOURRE, 2004; CALDER, 2006; CALDERON e KIM, 2004; HASHIMOTO et al. 2006; HORROCKS e FAROOQUI, 2004; LANE e BAILEY, 2005; STILLWELL et al. 2005; WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008).

Estudos têm mostrado que uma baixa disponibilidade desse AG pode interferir no crescimento neuronal (AHMAD, MORIGUCHI e SALEM, 2002; CALDERON e KIM, 2004), sendo capaz até mesmo de afetar a liberação de neurotransmissores (ZIMMER et al. 2002; CHALON, 2006). Estudos com animais também mostram que a deficiência de AGPI n-3 influencia a função dopaminérgica em áreas como o córtex frontal (ZIMMER et al. 2000) e que mudanças no comportamento devido a suplementação desses AG são em parte associadas a modificações na neurotransmissão monoaminérgica (CHALON, 2006; DU BOIS, DENG e HUANG, 2005; OHARA, 2007).

Atualmente é bastante aceito que os AGPI n-3 possuem um valoroso papel em diversas vias neurais e que sua deficiência pode estar relacionada com o desenvolvimento de muitos distúrbios psiquiátricos, como depressão, transtorno bipolar, transtorno de ansiedade e esquizofrenia (HORROBIN, 1998; KESHAVAN, ANDERSON e PETTEGREW, 1994; ROSS, 2009; WURTMAN, O'ROURKE e WURTMAN, 1989). Por outro lado, a suplementação adequada de AGPI n-3 apresentou efeitos benéficos no tratamento de transtornos psiquiátricos, como transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (RICHARDSON e PURI, 2002), transtorno bipolar (FREEMAN et al. 2006), depressão (LOGAN, 2003) e doenças neurodegenerativas (JICHA e MARKESBERY, 2010; PALACIOS-PELAEZ, LUKIW e BAZAN, 2010), do mesmo modo que em doenças relacionadas ao estresse oxidativo (BARCELOS et al. 2010; 2011). A respeito dos demais distúrbios psiquiátricos, incluindo transtornos por uso de substâncias, os dados até o presente momento ainda são escassos e inconclusivos (BOZZATELLO et al. 2016). O que se sabe até então é que a suplementação com DHA é capaz de reverter determinadas alterações

provocadas pelo uso de drogas (CANSEV, 2016; CHANG et al. 2015; DYALL e MICHAEL-TITUS, 2008; ECKERT, LIPKA e MULLER, 2013; LIU et al. 2008), além de se mostrar suficiente para diminuir o estresse, ansiedade e agressividade, comportamentos constantemente associados a quadros de recaída (BUYDENS-BRANCHEY et al. 2003b; BUYDENS-BRANCHEY e BRANCHEY, 2008; KUHN et al. 2015).

2.10 MODELO ANIMAL EM ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO DE ADIÇÃO

Diversos estudos têm utilizado roedores em modelos animais a fim de explorar os processos envolvidos na adição e esclarecer efeitos comportamentais, neuroquímicos e fisiológicos (ARES-SANTOS et al. 2012; MOREIRA-SILVA et al. 2014), dentre eles, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (ANTONIAZZI et al. 2014a; 2014b; DIAS et al. 2017; KUHN et al. 2015; MILANESI et al. 2017; ROVERSI et al. 2016; SEGAT et al. 2014; 2016; 2017; VEY et al. 2015). A exposição repetida à ANF tem sido empregada como um modelo animal experimental de alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por psicoestimulantes em ratos (CAMP, DE JONGHE e ROBINSON, 1997; FREY, 2006; KAUER-SANTÁNNA et al. 2007). Nesse sentido, a preferência condicionada de lugar (PCL) é um modelo comumente utilizado para compreender fenômenos como o reforço e a recaída por drogas (CRUZ, MARIN e PLANETA, 2008; KUHN et al. 2013).

A PCL é um paradigma clássico fundamentado no condicionamento estímulo-ambiente e que envolve a exposição passiva à substância (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006; TZSCHENTKE, 2007). O teste de PCL utiliza contextos ambientais distintos e originalmente neutros, que após serem apresentados repetidamente na presença de uma substância com potencial abusivo, por meio da associação contexto ambiental-droga, adquirem propriedades de reforço, instaurando a PCL pela droga (EVERITT e ROBBINS, 2005). Esse modelo apresenta semelhança com o condicionamento clássico pavloviano (TZSCHENTKE, 1998), que consiste na ideia de que um estímulo condicionado é um estímulo previamente neutro que, após tornar-se associado com o estímulo incondicionado, desencadeia uma resposta incondicionada. É inerente que outras espécies animais, assim como os seres humanos, tenham preferência por alguns lugares sobre os outros, e isso pode ser devido a características sensoriais particulares do local ou pode ser adquirido como consequência de eventos associados a tais locais (HUSTON et al. 2013). Os diferentes fenômenos envolvidos na adição são fatores intensamente influenciados por sugestões ambientais, servindo de base para o paradigma de PCL, onde o animal relaciona as pistas

ambientais (do lugar) com os efeitos hedônicos da droga (MCCORVY et al. 2011). Portanto, o aparato de PCL é uma ferramenta útil para a avaliação de efeitos comportamentais implicados na exposição a drogas de abuso.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do tratamento com OP, rico em AGPI n-3, sobre parâmetros de recaída à droga, assim como, seus efeitos bioquímicos e moleculares em ratos previamente condicionados e re-expostos à ANF.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a influência do tratamento com OP sobre parâmetros comportamentais de recaída após re-condicionamento à ANF;
- Examinar o perfil de AG no CPF de ratos expostos à ANF, submetidos ao tratamento com OP e re-expostos à ANF.
- Analisar marcadores do *status* oxidativo no CPF de ratos expostos à ANF, tratados com OP e re-expostos à droga;
- Avaliar marcadores moleculares dopaminérgicos envolvidos na drogadição no CPF de ratos expostos à ANF e submetidos ao tratamento com OP, com posterior re-exposição à droga.

4 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscrito científico, o qual encontra-se aqui estruturado sob o título: “Omega-3 decreases D1 and D2 receptors expression in the prefrontal cortex and prevents amphetamine-induced conditioned place preference in rats”. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências, encontram-se inseridos no próprio manuscrito.

**OMEGA-3 DECREASES D1 AND D2 RECEPTORS EXPRESSION IN THE
PREFRONTAL CORTEX AND PREVENTS AMPHETAMINE-INDUCED
CONDITIONED PLACE PREFERENCE IN RATS**

Vinícia Garzella Metz^a, Hecson Jesser Segat^b, Verônica Tironi Dias^a, Raquel Cristine Silva Barcelos^a, Luana Haselein Maurer^c, Jéssica Stiebe^d, Tatiana Emanuelli^c, Marilise Escobar Bürger^{a*}, Camila Simonetti Pase^{ae*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia - Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica - Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos - Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

^dDepartamento de Tecnologia e Ciências dos Alimentos - Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

^eUniversidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, RS, Brasil.

***Corresponding author:**

Camila Simonetti Pase, M.Sc; Ph.D.
Universidade Federal do Pampa
97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil
Tel. +55-55-3413-4321
E-mail: camilapase@gmail.com

Marilise E. Bürger M.Sc; Ph.D.
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
97105-900, Santa Maria, RS, Brazil
Tel. +55-55-3220-8676
E-mail: marilise.burger@ufsm.br

Abstract

Amphetamine (AMPH) abuse is a serious public health problem due to the high addictive potential of this drug, whose use is related to severe brain neurotoxicity and memory impairments. So far, therapies for psychostimulant addiction have had limited efficacy. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) have shown beneficial influences on the prevention and treatment of several diseases that affect the central nervous system. Here, we assessed the influence of fish oil (FO), which is rich in n-3 PUFA, on withdrawal and relapse symptoms following re-exposure to AMPH. Male *Wistar* rats received d,l-AMPH or vehicle in the conditioned place preference (CPP) paradigm for 14 days. Then, half of each experimental group was treated with FO (3g/kg, p.o.) for 14 days. Subsequently, animals were re-exposed to AMPH-CPP for three additional days, in order to assess relapse behavior. Our findings have evidenced that FO prevented relapse induced by AMPH-reconditioning. While FO prevented AMPH-induced oxidative damages in the prefrontal cortex, molecular assays allowed us to observe that it was also able to modulate dopaminergic cascade markers (DAT, TH, VMAT-2, D1R and D2R) in the same brain area, thus preventing AMPH-induced molecular changes. To the most of our knowledge, this is the first study to show a natural alternative tool which is able to prevent psychostimulant relapse following drug withdrawal. This non-invasive and healthy nutraceutical may be considered as an adjuvant treatment in detoxification clinics.

Keywords: Addiction. Amphetamine. Conditioned place preference. Fish oil. Dopamine. Prefrontal cortex.

1 Introduction

Addiction to psychostimulants, a common cause of mortality and morbidity, is a relevant health problem for both society and individuals [1]. Amphetamine-like psychostimulants, including 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methamphetamine (METH) and D-amphetamine, are the second most commonly used drugs worldwide with a significant potential for abuse and addiction. It is estimated that in 2015, 37 million people made use of these substances, according to the World Drug Report [2]. The typical recreational use of amphetamines (AMPH) is due to their effects on the central nervous system (CNS), which includes euphoria, reduced need for sleep, increased energy, increased self-confidence and alertness [3]. AMPH and its correlates inhibit vesicular reuptake of dopamine (DA) and norepinephrine (NE) and increase their neuronal release [4].

DA is an important neurotransmitter involved in reward [5], since altered dopaminergic neurotransmission is a pivotal mechanism underlying addiction [6]. Notably, the mesolimbic dopaminergic pathway, which is originated in the ventral tegmental area and projected to the nucleus accumbens, amygdala, hippocampus and prefrontal cortex (PFC) [7], is involved in the rewarding effects of psychostimulants such as AMPH [8]. It is well established that D1 receptors are involved in addiction development, whereas D2 receptors are implicated in reinforcement symptoms [9]. The presence of a considerable number of neurons expressing both D1 and D2 receptors in the frontal cortex [10] gives support to the importance of this brain area in the dopaminergic reward system [6].

Addiction to psychostimulant drugs is a chronic and relapsing disease frequently related to the development of neuropsychiatric conditions including impulsivity, aggressiveness, anecdote, depression and emotional instability [11], whose pharmacological treatments are limited [12]. Studies have evidenced beneficial influences of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) on the CNS [13, 14]. In fact, n-3 PUFA are components that play a crucial role in maintaining the fluidity and flexibility of neuronal cell membranes and affecting the activity of proteins such as enzymes, transporters and receptors [14, 15]. Alpha-linolenic acid (ALA, 18:3 n-3) and its derivatives, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3) are part of the n3-PUFA [16]. As these fatty acids cannot be synthesized by mammals, they need to be acquired through diet and are vastly found in marine fishes and some oil seeds [17].

Adequate supplementation of n-3 PUFA has shown beneficial effects for the treatment of psychiatric disorders such as attention deficit hyperactivity disorder [18], bipolar disorder [19], depression [20], neurodegenerative diseases [21, 22], as well as diseases related to oxidative stress [23, 24]. Moreover, clinical trials have reported that deficient levels of n3-PUFA may be related to a higher vulnerability to affective disorders, aggressiveness and drug addiction [25-27]. On the other hand, n-3 PUFA supplementation seems to be related to decreased irritation and anxiety symptoms, in addition to fewer relapses in substance abusers [28].

Studies involving psychostimulant addiction have employed animal models such as the conditioned place preference (CPP) paradigm, which allows to assess both drug reward and relapse [29-36]. In this sense, the current study has been performed to assess the influences of fish oil, which is rich in n-3 PUFA, on behavioral parameters related to AMPH addiction, as well as its biochemical and molecular repercussions in the dopaminergic brain areas following drug withdrawal and re-exposure.

2 Materials and Methods

2.1 Animals and experimental procedure

Male *Wistar* rats (150-200 g body weight) were used in the procedures. Groups of three (± 1) animals were kept in Plexiglas cages with free access to food and water in a room with controlled temperature (22–23 °C) on a 12 h-light/dark cycle with lights on at 7 a.m. The procedures with animals were approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-9373231116), which is affiliated to the National Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA), following international norms of care and animal maintenance. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

After acclimatization, animals (n=24) were designated into two experimental groups: vehicle (saline – 0.9% NaCl solution, i.p., n=12) and amphetamine (AMPH, 4 mg/kg, i.p., n=12), and submitted to the conditioned place preference (CPP) paradigm. Following AMPH-CPP conditioning, one half of each experimental group was treated orally with fish oil (FO, 3.0 g/kg of body weight; Herbarium[®], Colombo, PR, Brazil) [23, 24, 32, 37, 38] or water (considered control) by gavage for 14 days. Subsequently, animals that were previously conditioned with the drug were re-exposed to the AMPH-CPP paradigm after additional AMPH/vehicle conditioning. The FO treatment was maintained during drug reconditioning.

One day after the CPP test, animals were anesthetized and exposed to exsanguination. Brains were removed, and the prefrontal cortex was used for biochemical and molecular analysis.

2.2 Drugs and solution

D,l-AMPH (Merck, Germany) ($4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}/\text{kg}$), dissolved in saline (NaCl 0.9%; AMPH-vehicle) was used [29, 32-35].

2.3 Behavioral assessments

2.3.1 Conditioned place preference (CPP)

The CPP paradigm is an animal model used to assess the hedonic reinforcement effects of addictive drugs. It consists of a box with two compartments of equal size ($45 \times 45 \times 50 \text{ cm}$) with equivalent intensity of light and different visual stimuli: one with white floor and striped walls, and the other with striped floor and smooth white walls. Both compartments were accessible through a central compartment ($18 \times 36 \times 50 \text{ cm}$) separated by manual guillotine doors. The apparatus was cleaned with alcohol 20% using a wet sponge and paper towels before the introduction of each animal.

Initially, animals were kept for 15 minutes (min) in each compartment for habituation, except the neutral compartment. One day after habituation, rats performed the pre-test, which consists of letting the animal freely choose one of the compartments for 15 min, being discarded rats that showed strong unconditioned aversion (less than 25% of the session time) or preference (more than 75% of the session time) for any compartment [39]. On the following 14 days, animals were conditioned with AMPH for 25 min in the compartment they spent the shortest time in the pre-test, and with vehicle (0.9% NaCl) in the paired compartment, with an interval of 4 h between each administration. Vehicle-treated groups received two daily injections of NaCl solution in both compartments of the CPP in alternated turns. After this conditioning phase, all rats were submitted to the test for 15 min., without drug/vehicle administration. Time spent in the drug-paired compartment was interpreted as preference, whereas time spent away from that environment was interpreted as aversion [32-35]. Following the tests, animals received fish oil treatment for 14 days. After the treatment period, rats from the same experimental groups were reconditioned with AMPH or vehicle in the CPP apparatus for 3 days, followed by an additional test of drug preference. Relapse symptoms were quantified by the higher time spent in the drug-paired environment in this second drug exposure [31, 33-35].

2.4 Tissue preparation

After behavioral assessments, all animals were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg body weight, i.p.) and euthanized by decapitation. Brains were immediately removed and cut coronally at the caudal border of the olfactory bulb. The prefrontal cortex was dissected according to Paxinos and Watson [40], and homogenized in the adequate buffer according to each *ex vivo* assay.

2.5 Fatty acids (FA) profile in the prefrontal cortex

Fat was extracted from tissue samples using chloroform and methanol as described by Bligh and Dyer [41] and used for determination of the FA profile. To prevent lipid oxidation during and after extraction, 0.02% butyl hydroxy toluene was added to the chloroform used. FA composition was determined by gas chromatography. Fat was saponified in methanolic KOH solution and then esterified in methanolic H₂SO₄ solution [42]. Methylated fatty acids were analyzed using an Agilent Technologies gas chromatograph (HP 6890 N) equipped with a capillary column DB-23 (60 m x 0.25 mm x 0.25 μm) and flame ionization detector. The temperature of the injector port was set at 280 °C and the carrier gas was nitrogen (0.9 mL/min). After injection (1 mL, split ratio 50:1), the oven temperature was held at 160 °C for 1 min, then increased to 240 °C at 4 °C/min and held at this temperature for 9 min. Standard FA methyl esters (37-component FAME Mix C 22:5n3 and PUFA no. 2 from Sigma, Saint Louis, MO, USA; and C 22:5n-6 from NuChek Prep. Inc. Elysian, MN, USA) were diluted in n-hexane and run under the same conditions, and the subsequent retention times were used to identify the FA, which were expressed as a percentage of the total FA content.

2.6 Biochemical analysis

2.6.1 Protein carbonyl (PC) determination

Damage to proteins was assessed in the PFC by the method of Yan et al. [43] with some alterations. Soluble protein was mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH; 10 mM in 2 M HCl) or HCl (2 M) and incubated at room temperature for 1 h. Denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, with 3% sodium dodecyl sulfate), ethanol (99.8%) and hexane (99.5%) were added, being mixed by shaking and centrifuged. The protein isolated from the interface was washed twice with ethyl acetate/ ethanol 1:1 (v/v) and suspended in

denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a spectrophotometer against the corresponding HCl sample (blank). Results were expressed as nmol carbonyl/g tissue.

2.6.2 Reactive species (RS) levels

RS levels were measured using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) [44]. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was determined at 488 nm for excitation and 525 nm for emission. An aliquot of 10 μ M of DCHF-DA in ethanol was added to the supernatants, and the fluorescence intensity from DCF was measured for 300s and expressed as a percentage of control group. The protein content was normalized by quantification according to Lowry et al. [45].

2.7 Molecular assays

The prefrontal cortex tissue was homogenized with lysis buffer. Homogenates were then centrifuged [46], supernatants were collected, and total protein concentration was determined according to the MicroBCA procedure (Pierce, IL, USA), using bovine serum albumin (BSA) as standard. Briefly, protein samples were separated by electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel, and electrotransferred to a PVDF membrane. Non-specific binding sites were blocked overnight in Tris-buffered saline (TBS) at 4°C, with 2% BSA and 0.1% Tween-20. Membranes were rinsed in buffer (0.05% Tween-20 in TBS) and then incubated with primary antibodies: anti-actin (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-dopamine transporter (DAT) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-dopamine receptor D1 (D1R) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-dopamine receptor D2 (D2R) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-tyrosine hydroxylase (TH) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-vesicular monoamine transporter 2 (VMAT-2) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, CA), followed by anti-goat or anti-rabbit (1:40.000; Santa Cruz Biotechnology, CA) IgG horseradish peroxidase conjugate. Immunocomplexes were visualized by chemiluminescence using Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore, USA). Film signals were digitally scanned and then quantified using the ImageJ software. Actin was used as an internal control and data were standardized according to its values.

2.8 Statistical analysis

Power analysis for sample size calculation was performed to determine the balance between number of subjects, size of observed effect and required alpha value. From this assessment, we calculated achieved power using G*Power (3.1) and assumed a high effect

size ($f=0.5$) for all analyses. Sample size of $n=6$ animals per group was sufficient to detect a difference between assessments with 80% of power and 0.05 of significance levels. The CPP data before FO treatment were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Newman–Keuls test. For other analysis, two-way ANOVA followed by Newman–Keuls were used (Software package Statistic 8.0 for Windows). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant for all comparisons made. GraphPad Prism® (version 5.01) was used for figures.

3 Results

3.1 Preference for amphetamine (AMPH) in conditioned place preference (CPP) is shown in Figure 2

The Newman–Keuls test showed that AMPH-conditioned animals remained longer in the drug-conditioned compartment in comparison to vehicle group, which showed no place preference ($P < 0.001$).

Two-way ANOVA of AMPH reconditioning following FO treatment revealed a main effect of treatment and treatment x drug interaction [$F(1,20) = 4.24$, $P < 0.05$; $F(1,20) = 5.45$, $P < 0.05$, respectively]. Post-hoc comparisons showed that FO treatment was able to prevent AMPH preference after reconditioning.

3.2 Fatty acids composition quantified in the PFC is shown in Table 1

Two-way ANOVA of fatty acids composition quantified in the PFC revealed main effect of treatment [$F(1,20) = 11.90$, $P < 0.001$; $F(1,20) = 24.00$, $P < 0.001$; $F(1,20) = 13.72$, $P < 0.001$; $F(1,20) = 40.32$, $P < 0.001$] on 22:5 n-3, 22:6 n-3 (DHA), Σ n-3 PUFA and n-6/n-3 FA ratio, respectively. Post-hoc comparisons indicated that FO treatment in vehicle-injected group was able to increase 22:5 n-3 by 291%, 22:6 n-3 (DHA) by 14.37%, Σ n-3 PUFA by 14.55% and decrease n-6/n-3 FA ratio by 13.95% in comparison to C group. Similarly, FO treatment in the AMPH-exposed group also increased 22:5 n-3 by 300%, 22:6 n-3 (DHA) by 8.02%, Σ n-3 PUFA by 9.76%; and decreased n-6/n-3 FA ratio by 14.17% in comparison to C group.

3.3 Oxidative status estimated by protein carbonyl (PC) and reactive species (RS) levels in the PFC are shown in Figure 3

Two-way ANOVA of PC levels revealed a significant main effect of drug [$F(1,20) = 3.91, P < 0.05$] and a significant drug x treatment interaction [$F(1,20) = 20.02, P < 0.001$].

Post-hoc test revealed that while AMPH-conditioned rats showed increased PC levels in the PFC in relation to vehicle group, FO treatment prevented this. In fact, among FO-treated groups, both vehicle and AMPH-reconditioned animals showed similar levels of PC in this brain area (Fig. 3A). No differences of RS levels were observed in the PFC of experimental groups (Fig. 3B).

3.4 Immunoreactivity of dopaminergic targets in the PFC are shown in Figures 4 and 5

Two-way ANOVA revealed a main effect of treatment, drug, and treatment x drug interaction [$F(1,20) = 15.02, P < 0.001$; $F(1,20) = 551.28, P < 0.001$; $F(1,20) = 148.56, P < 0.001$, respectively] on D1R levels, as well as a significant main effect of treatment, drug, and treatment x drug interaction [$F(1,20) = 18.47, P < 0.001$; $F(1,20) = 72.09, P < 0.001$; $F(1,20) = 17.15, P < 0.001$, respectively] on D2R levels.

Post-hoc test showed that AMPH exposure was able to increase the immunoreactivity of both D1R and D2R in the PFC. Inversely, while FO *per se* decreased the immunoreactivity of both D1R and D2R, this treatment was also able to decrease D1R levels in AMPH-exposed rats, thus preventing the increase of AMPH-induced D2R immunoreactivity (Fig. 4A, 4B).

Two-way ANOVA revealed a main effect of drug [$F(1,20) = 9.66, P < 0.05$; $F(1,20) = 19.26, P < 0.001$] on DAT and TH, respectively, as well as a significant main effect of drug and treatment [$F(1,20) = 265.03, P < 0.001$; $F(1,20) = 95.12, P < 0.001$, respectively], on VMAT-2 levels. Post-hoc test showed that FO *per se* was able to increase VMAT-2 (Fig. 5C), but not DAT and TH (Fig. 5A, 5B). Inversely, AMPH exposure was able to reduce DAT, TH and VMAT-2 (Fig. 5A, 5B, 5C) levels, yet the immunoreactivity of this last transporter was partially preserved by FO treatment (Fig. 5C).

4 Discussion

Despite significant advances in behavioral and pharmacological treatments, addiction to psychostimulants remains a public health problem which is difficult to solve. In this sense, our research group has studied alternatives that may contribute to attenuate this disabling disease [29, 32-35]. Here, we assessed the beneficial influence of FO on behavioral and molecular parameters following withdrawal and re-exposure to AMPH. This study shows that behavioral and cellular effects of AMPH can be reduced with n-3 PUFA treatment. Our

findings have shown that after the AMPH-CPP establishment, FO treatment reduced relapse behavior, which was observed after AMPH reconditioning. As expected, FO, which is rich in n-3 PUFA, increased DHA incorporation in neuronal membranes of the PFC. In addition, FO treatment was able to provide evident protection against AMPH-induced neurotoxic effects. In fact, the neuroprotective role of FO was observed in the PFC, where the increase of D1R and D2R, as well as the decrease of VMAT-2 immunoreactivity were inhibited when induced by amphetamine. FO also reduced AMPH-induced oxidative damages in the same brain area, as observed by protein carbonyl levels.

Considering the animal model here adopted, CPP is one of the most used experimental models to better understand the reinforcement and relapse of addictive drugs [31,32] involving passive exposure to the drug. In the CPP paradigm, an “unconditioned stimulus” can be acquired in the repeated sections as “conditioned stimuli”, showing similarity to the Pavlovian classic conditioning [47]. It is inherent that other animal species, as well as humans, have a preference for some places over others, and this may be due to particular sensory characteristics of the place or can be acquired as a consequence of events associated with such places [48]. Different phenomena involved in addiction such as reward and relapse symptoms, are factors intensely influenced by environmental cues, serving as basis for the CPP paradigm, where the animal relates the environmental cues (of the place) with the hedonic effects of the drug [49]. In the present study, animals have shown AMPH-CPP, since this drug is closely related to hedonic symptoms, which were significantly minimized by the FO treatment. So far, few studies have shown concern about the major problem of AMPH addiction: relapse [33-35], what reaffirms the relevance of our findings. Although this is the first study to show an effect of treatment with FO following withdrawal and re-exposure to AMPH, there are some evidences that the n-3 PUFA status may interact with drug addiction. Humans addicted to drugs often consume a lipid-poor diet resulting in low n-3 PUFA levels [50]. These lipid deficient diets alter the n-3 PUFA content of specific brain regions, decrease membrane fluidity and the expression of multiple pre- and post-synaptic proteins [52]. In our study, treatment with FO has been able to significantly reduce relapse to AMPH. This interesting finding may be related to increased DHA incorporation in neuronal phospholipid membranes, as observed in the FO-treated animals, which was also inversely associated to stress, anxiety and aggression, behaviors often linked to abstinence and relapse [25-27, 52].

In addition, our study included assessments in the open-field task, where the locomotor performance of animals was not modified by FO or AMPH exposure (data not shown). Indeed, this behavioral assessment was useful to assure that the CPP findings were

not a locomotor artifact, since this preference behavior was a consequence of the establishment of AMPH-induced addiction [33-35, 53].

The PFC plays an important role in emotional and behavioral functions [54]. Dysfunctions in this brain region may contribute to the pathophysiology of psychostimulant withdrawal due to the fact that the PFC is part of a mesocortical circuit [55]. In this sense, our study has investigated the influence of FO on this important brain area over withdrawal and re-exposure to AMPH. We focused on molecular targets of dopamine such as specific receptors and transporters, which have key roles in the dopaminergic function, since it is well described that this substance is a neurotoxic drug capable of causing neuroadaptations in the dopaminergic mesocorticolimbic system [56].

Although the exact molecular mechanism of AMPH-induced dopaminergic neurotoxicity has not been fully elucidated, it is believed that the oxidative stress originated from dysregulation of dopamine levels is responsible for most of the deleterious effects of this drug [57]. Indeed, AMPH induces a dopaminergic redistribution inside the terminal by reducing the function of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT-2). Considerable evidence suggests that aberrant VMAT-2 function contributes to the long-term dopaminergic deficits caused by AMPH [58]. In fact, these data corroborate our results, which showed decreased VMAT-2 immunoreactivity after re-exposure to AMPH. However, treatments that reverse AMPH-induced alterations in VMAT-2 distribution or function prevent these deficits [59, 60]. Zimmer et al. [61] revealed that diets with n-3 PUFA increase the VMAT-2 level in the frontal cortex. In contrast, it has already been demonstrated that the deficit in n-3 PUFA could significantly alter the physical properties of vesicular membranes impairing synaptic vesicles such as VMAT-2 [62]. Our results are in accordance to these studies since FO treatment *per se* was able to increase VMAT-2 in the PFC. Interestingly, in the current study we found a decrease of VMAT-2 of rats during AMPH abstinence. A number of evidences suggest that substances with antioxidant potential can inhibit reactive species production upon AMPH exposure by attenuating the reduction of VMAT-2 [63]. Therefore, antioxidant agents could protect against AMPH-induced toxicity [63, 64]. Our findings agree with these studies once the reduction of VMAT-2 immunoreactivity induced by AMPH administration was restored by FO treatment. In fact, treatment with FO, which is rich in n-3 PUFAs and a potent antioxidant in the CNS [65], was able to reduce carbonyl protein levels, an oxidative damage marker, attenuating AMPH-induced toxicity.

The dopamine transporter (DAT) is also an important regulator of cytoplasmic DA levels [67]. Moreover, tyrosine hydroxylase (TH) is the rate-limiting enzyme for DA

synthesis (Costa et al., 2013), of fundamental importance for dopaminergic neurotransmission. Several studies have shown that repeated administration of AMPH in rodents cause neurodegeneration of dopaminergic axon terminals, reducing the immunoreactivity of TH and DAT in different brain regions, including the PFC [67-69]. These data are consistent with the results found in our study, where AMPH caused a decrease in TH and DAT immunoreactivity. These results might indicate a homeostatic response in which VMAT-2 compensates for the impact of reduced TH by increasing vesicular packaging of newly synthesized dopamine. Contrary to that, FO treatment had no effect on TH and DAT levels. Nonetheless, these data indicate that the dopamine system is differentially changed by n-3 PUFA.

It is well established that AMPH produces excessive dopamine release into the extra neuronal space resulting in the activation of dopamine receptors [70]. Several AMPH effects, including the reward-related phenomena, are related to the activation of D1 and D2 receptors, and it has been suggested that these receptors mediate relapse and drug-seeking behavior mechanisms [71]. In our study, AMPH-conditioned animals remained longer in the drug-conditioned compartment in comparison to vehicle group possibly because the drug increased D1R and D2R immunoreactivity. These results are in accordance with Moratalla et al. [72], who show that an overstimulation of dopamine D1 and D2 receptors contribute to the neurotoxic effects of AMPH.

On the other hand, FO treatment was able to prevent AMPH preference after reconditioning. Some studies in the literature have shown that while the D1R agonist type produces CPP, the use of D1R and D2R antagonists is known to prevent the acquisition of AMPH-CPP [73, 74]. Moreover, resistance to METH-induced neurotoxicity in D1R knockout mice can be related to a reduced dopamine content and turnover found in these animals. Therefore, the lower content and turnover of DA in D1R knockout mice might significantly decrease the production of reactive species, what could also clarify the neuroprotective effects of D1R inactivation [56]. Here, we have not investigated the turnover of dopamine, but our findings have evidenced that the reduction in D1 receptor levels caused by FO treatment was sufficient to reduce oxidative damage, showing that our results are in accordance with findings of other authors. In addition, several groups have assessed the ability of D2R antagonists to prevent the long-term effects of AMPH-like drugs. Pharmacological agents that block D2R have proved effective to partially or completely protect against METH-induced toxicity [75, 76]. In fact, we have observed that FO was able to reverse the increase in D1 and

D2 receptor levels after re-exposure to AMPH. In the sense, it is possible to suggest that FO is acting as a dopaminergic receptor antagonist, thus reducing the neurotoxic effects of AMPH.

The neurochemistry results obtained in our study confirmed that dopaminergic neurotransmission was affected by FO treatment. There is evidence that diverse effects such as modifications in the biophysical properties of neuronal membranes and gene regulation could be involved in the link between n-3 PUFA and dopamine neurotransmission, although the precise mechanisms of this link are complex and multifactorial [26, 77]. Several findings show that changes in dietary PUFA act on membrane fluidity [78]; it can therefore be hypothesized that membrane changes induced by n-3 PUFA could change the formation of vesicles, as we have observed. As already proposed, biochemical modifications in neuronal membranes might also be involved in abnormalities of the neurotransmitter receptors which are included in these membranes [79]. In addition, modification of the lipid content in the diet could act on the regulation of gene transcription. It can be hypothesized that such regulation takes place in the brain and that dietary modulation of n-3 PUFA content influences gene expression and transcription, thus explaining differences in protein levels in FO-treated rats. This hypothesis can be supported by recent data where n-3 PUFA-deficient rat models have evidenced that genes of dopamine receptors [80, 81] as well as the DHA content of specific brain regions were altered, causing decrease in membrane fluidity and expression of pre- and post-synaptic proteins [51, 82]. Taken together, these data from the literature and our results can explain the beneficial effect of FO to prevent relapse to drugs and act favorably as a modulator of the dopaminergic system, preserving dopaminergic brain areas from oxidative damages thus minimizing AMPH-induced damages.

Conclusion

In summary, this study provides evidence that an n-3 PUFA experimental treatment is able to alter neurotransmission of dopaminergic systems reversing specific cellular effects of amphetamine use. These experimental findings reinforce the hypothesis that strong links exist between the PUFA status, aspects of brain function such as neurotransmission processes, and behavior. Furthermore, if these results were carefully transposed into human pathophysiology, the attenuating effect of fish oil on the reintegration of AMPH-CPP shows that it may have promising application in the treatment of relapse to drugs.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq, CAPES, FAPERGS and PRPGP (PROAP) for the fellowships and financial support. The authors are grateful to the Herbarium for their donation of fish oil capsules.

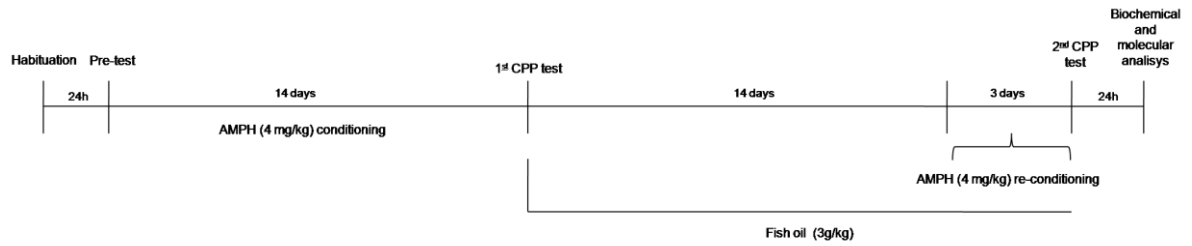


Figure 1. Experimental design: after basal behavioral evaluation (pre-test), animals were treated with AMPH (4 mg/kg, i.p.) for 14 days, when the 1st behavioral evaluation was performed in the CPP paradigm. Subsequently, animals were treated with FO (3 mg/kg, p.o.) during 14 days, followed by three more days of AMPH conditioning. Twenty-four hours after the last AMPH administration, animals were re-exposed to CPP evaluation followed by biochemical and molecular analysis. Abbreviations: AMPH: amphetamine; and CPP: conditioned place preference.

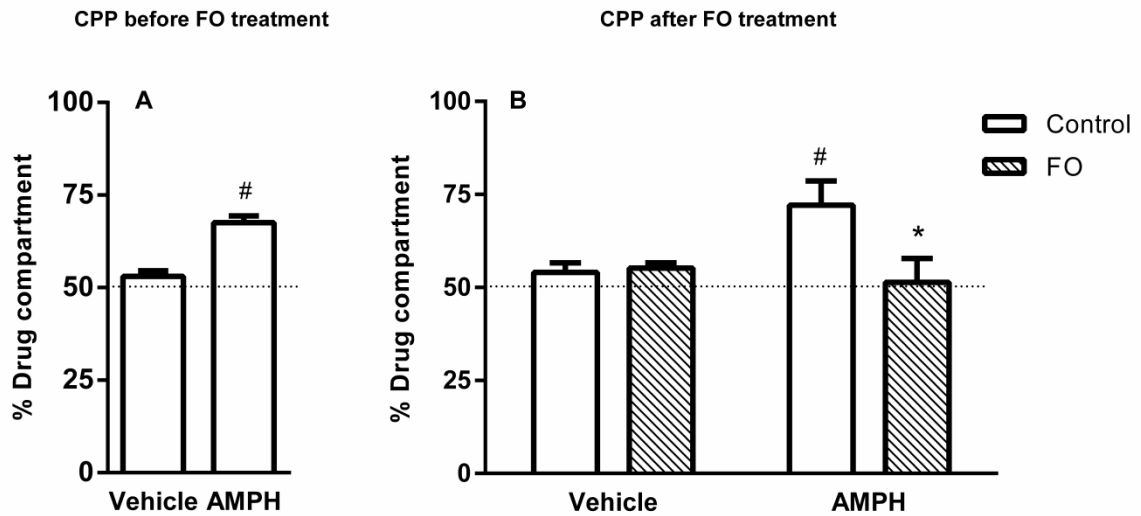


Figure 2. Drug preference behavior induced by amphetamine (AMPH, 4 mg/kg, i.p. for 14 days) observed in CPP paradigm before 14 days of FO (3 mg/kg, p.o.) treatment (Fig. 2A), and after FO treatment followed by re-conditioning with AMPH (Fig. 2B). Data are expressed as mean \pm S.E.M. * indicates significant differences of treatment (control/FO) in the same conditioning (vehicle/AMPH) ($P < 0.05$). # indicates significant differences of conditioning (vehicle/AMPH) in the same treatment (control/FO) ($P < 0.05$). Abbreviations: FO: fish oil; AMPH: amphetamine.

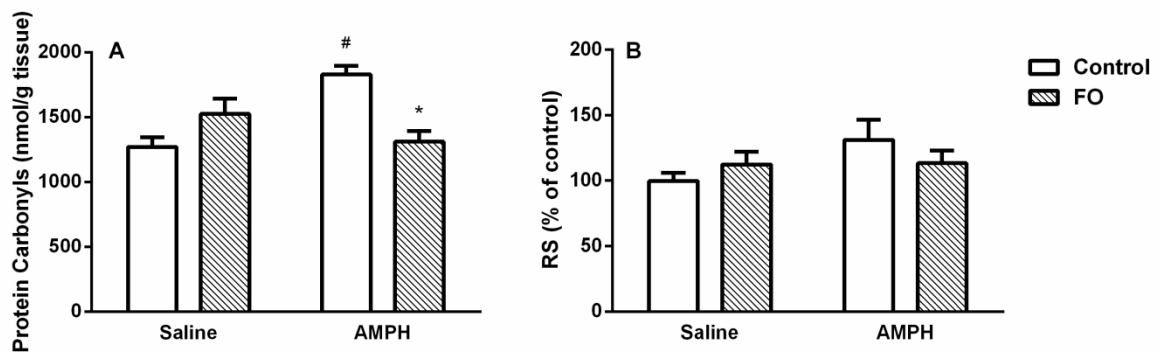


Figure 3. Protein carbonyls (Fig. 3A) and reactive species (Fig. 3B) levels performed in prefrontal cortex of rats exposed to AMPH (4 mg/kg, i.p. for 14 days). Subsequently, animals were treated with FO (3 mg/kg, p.o.) during 14 days, followed by re-conditioning with AMPH. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * indicates significant differences of treatment (control/FO) in the same conditioning (vehicle/AMPH) ($P < 0.05$). # indicates significant differences of conditioning (vehicle/AMPH) in the same treatment (control/FO) ($P < 0.05$). Abbreviations: FO: fish oil; AMPH: amphetamine.

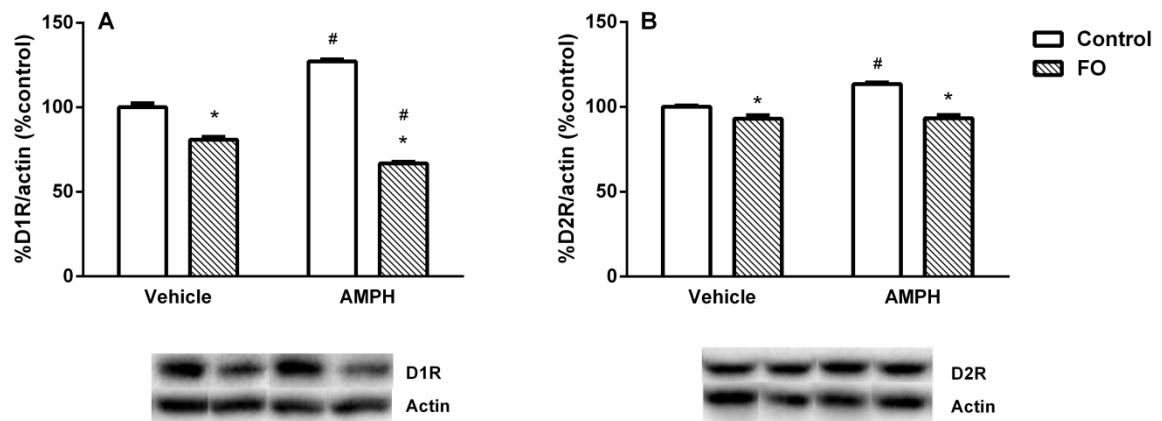


Figure 4. Prefrontal cortex D1R (4A) and D2R (4B) immunoreactivity of rats exposed to AMPH (4 mg/kg, i.p. for 14 days). Subsequently, animals were treated with FO (3 mg/kg, p.o.) during 14 days, followed by re-conditioning with AMPH. Each band in the sequence correspond to one bar in the figure. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * indicates significant differences of treatment (control/FO) in the same conditioning (vehicle/AMPH) ($P < 0.05$). # indicates significant differences of conditioning (vehicle/AMPH) in the same treatment (control/FO) ($P < 0.05$). Abbreviations: FO: fish oil; AMPH: amphetamine.

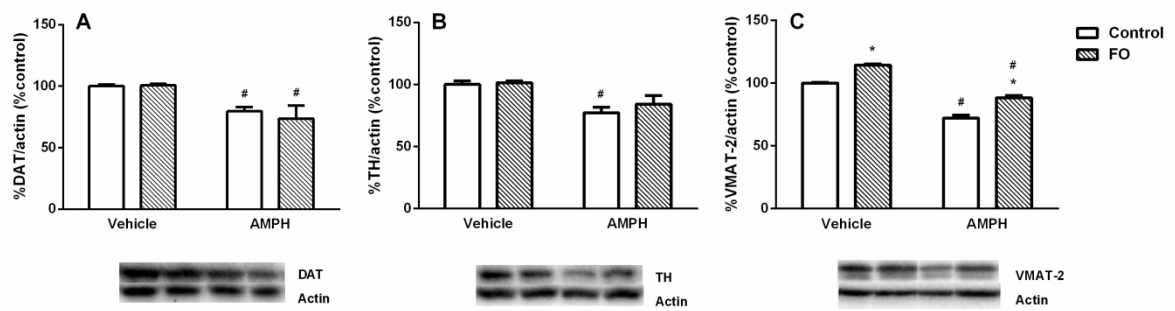


Figure 5. Prefrontal cortex DAT (5A), TH (5B) and VMAT-2 (5C) immunoreactivity of rats exposed to AMPH (4 mg/kg, i.p. for 14 days). Subsequently, animals were treated with FO (3 mg/kg, p.o.) during 14 days, followed by re-conditioning with AMPH. Each band in the sequence correspond to one bar in the figure. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * indicates significant differences of treatment (control/FO) in the same conditioning (vehicle/AMPH) ($P < 0.05$). # indicates significant differences of conditioning (vehicle/AMPH) in the same treatment (control/FO) ($P < 0.05$). Abbreviations: FO: fish oil; AMPH: amphetamine.

Table 1. Fatty acids composition in the prefrontal cortex of rats conditioned with amphetamine and treated with fish oil (% of total fatty acids identified)

Fatty acid	Mean (\pm S.E.M.)			
	Vehicle		Amphetamine	
	C	FO	C	FO
\sum SFA	49.45 \pm 0.49	49.38 \pm 0.96	49.29 \pm 1.57	49.52 \pm 0.51
\sum MUFA	22.55 \pm 0.41	21.66 \pm 0.40	22.26 \pm 0.74	22.74 \pm 0.60
18:3 n-3	0.32 \pm 0.05	0.27 \pm 0.13	0.27 \pm 0.21	0.46 \pm 0.13
20:5 n-3	0.22 \pm 0.11	0.05 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01
22:5 n-3	0.12 \pm 0.01	0.47 \pm 0.17*	0.08 \pm 0.00	0.32 \pm 0.01*
22:6 n-3	11.55 \pm 0.46	13.21 \pm 0.21*	12.09 \pm 0.11	13.06 \pm 0.09*
\sum n-3	12.22 \pm 0.48	14.00 \pm 0.53*	12.59 \pm 0.36	13.82 \pm 0.01*
\sum n-6	15.76 \pm 0.22	15.53 \pm 0.44	16.02 \pm 0.96	14.95 \pm 0.19
n6/n3 ratio	1.29 \pm 0.03	1.11 \pm 0.03*	1.27 \pm 0.05	1.09 \pm 0.01*

* indicate a significant difference among C and FO groups in the same conditioning ($P < 0.05$)
SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids

References

- [1] Miszkiel J, Filip M, Przegaliński E. Role of serotonin (5-HT)_{1B} receptors in psychostimulant addiction. *Pharmacol Rep* 2011; 163:1310-15.
- [2] UNODC – United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention. *World Drug Report*. 2017.
- [3] Phillips KA, Epstein DH, Preston KL. Psychostimulant addiction treatment. *Neuropharmacol* 2011; 87:150-60.
- [4] Robertson SD, Matthies HJ, Galli A. A closer look at amphetamine induced reverse transport and trafficking of the dopamine and norepinephrine transporters. *Mol Neurobiol.*, 2011; 39:73–80.
- [5] Baik JH. Dopamine Signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits* 2013; 7:152.
- [6] Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacol* 2010; 35: 217–38.
- [7] Feltenstein MW, See RE. The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 261-74.
- [8] Mukda S, Kaewsuk S, Ebadi M, Govitrapong P. Amphetamine induced changes in dopamine receptors in early postnatal rat brain. *Dev Neurosci* 2009; 31:193–201.
- [9] Neve KA. *The Dopamine Receptors*, second ed. Springer. New York, 2010.
- [10] Wei X, Ma T, Cheng Y, Huang CCY, Wang X, Lu J et al. Dopamine D1 or D2 receptor-expressing neurons in the central nervous system. *Addict Biol* 2017; 23:569-84.
- [11] Coffey SF, Dansky BS, Carrigan MH, Brady KT. Acute and protracted cocaine abstinence in an outpatient population: a prospective study of mood, sleep and withdrawal symptoms. *Drug Alcohol Dep* 2000; 59:277-86.
- [12] Vallöf D, Vestlund J, Engel JA, Jerlhag E. The Anorexigenic Peptide Neuromedin U (NMU) Attenuates Amphetamine-Induced Locomotor Stimulation, Accumbal Dopamine Release and Expression of Conditioned Place Preference in Mice. *PLoS ONE* 2016; 11:5.
- [13] Denis I, Potier B, Heberden C, Vancassel S. Omega-3 polyunsaturated fatty acid and brain aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015; 18:139–46.
- [14] Gomes LM, Silva-Carvalho M, Teixeira LJ, Rabelo J, Mota IT, Bilesimo R et al. Omega-3 fatty acids and mood stabilizers alter behavioral and oxidative stress parameters in animals subjected to fenproporex administration. *Met Brain Dis* 2017; 32: 519-28.
- [15] Foster RH, Hardy G, Alany RG. Borage oil in the treatment of atopic dermatitis. *Nutrition* 2010; 26: 708–18.

- [16] Barceló-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res* 2009; 48:355-74.
- [17] Ixtaina VY, Martínez ML, Spotorno V, Mateo CM, Maestric DM, Diehl BWK et al. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *J Food Comp Anal* 2011; 24:166-74.
- [18] Richardson AJ, Puri BK. A randomized double-blind, placebo controlled study of the effects of supplementation with highly unsaturated fatty acids on ADHD-related symptoms in children with specific learning difficulties. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26:233-39.
- [19] Freeman MP, Hibbeln JR, Wisner KL, Davis JM, Mischoulon D, Peet M et al. Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry. *J Clin Psychiat* 2006; 67: 1954–67.
- [20] Logan AC. Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression. *Altern Med Rev* 2003; 8:410-25.
- [21] Jicha GA, Markesbery WR. Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2010; 5: 45-61.
- [22] Palacios-Pelaez R, Lukiw WJ, Bazan NG. Omega-3 essential fatty acids modulate initiation and progression of neurodegenerative disease. *Mol Neurobiol* 2010; 41:367-74.
- [23] Barcelos RCS, Benvegno DM, Bouffleur N, Reckziegel P, Müller LG, Pase, CS et al. Effects of α -3 essential fatty acids (α -3 EFAs) on motor disorders and memory dysfunction typical neuroleptic-induced: behavioral and biochemical parameter. *Neurotox Res* 2010; 17: 228–37.
- [24] Barcelos RCS, Benvegno DM, Bouffleur N, Pase, CS, Teixeira AM, Reckziegel P et al. Short term dietary fish oil supplementation improves motor deficiencies related to reserpine-induced parkinsonism in rats. *Lipids* 2011; 46:143–49.
- [25] Buydens-Branchey L, Branchey M, McMakin D, Hibbelin JR. Polyunsaturated fatty acid status and relapse vulnerability in cocaine addicts. *Psychiatry Res* 2003a; 120: 29–35.
- [26] Buydens-Branchey L, Branchey M, McMakin D, Hibbelin JR. Polyunsaturated fatty acid status and aggression in cocaine addicts. *Drug Alcohol Depend* 2003b; 71:319–23.
- [27] Buydens-Branchey L, Branchey M, Hibbelin JR. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids decrease feelings of anger in substance abusers. *Psychiatry Res* 2008; 157:95-104, 2008.
- [28] Buydens-Branchey L, Branchey M, Hibbelin JR. Associations between increases in plasma n-3 polyunsaturated fatty acids following supplementation and decreases in anger and anxiety in substance abusers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32:568–75.

- [29] Antoniazzi CTD, Boufleur N, Dolci G, Roversi Kr, Kuhn FT, Pase CS et al. Influence of neonatal tactile stimulation on amphetamine preference in young rats: parameters of addiction and oxidative stress. *Pharmacol Biochem Behav* 2014a; 124:341–349.
- [30] Antoniazzi CTD, Boufleur N, Pase CS, Kuhn FT, Dias VT, Segat HJ et al. Tactile stimulation and neonatal isolation affect behavior and oxidative status linked to cocaine administration in young rats. *Behav Processes* 2014b; 103:297–305.
- [31] Cruz FC, Marin MT, Planeta CS. The reinstatement of amphetamine-induced place preference is long-lasting and related to decreased expression of ampa receptors in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 2008; 151: 313–9.
- [32] Kuhn FT, Roversi KR, Antoniazzi CTD, Pase CS, Barcelos RCS, Dias VT et al. Influence of trans fat and omega-3 on the preference of psychostimulant drugs in the first generation of young rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2013; 110: 58–65.
- [33] Segat HJ, Kronbauer M, Roversi Kr, Schuster AJ, Vey LT, Roversi K et al. Exercise modifies amphetamine relapse: behavioral and oxidative markers in rats. *Behav Brain Res* 2014; 262:94–100.
- [34] Segat HJ, Martini F, Barcelos RCS, Brüning CA, Nogueira CW, Burger ME. m-Trifluoromethyl-diphenyldiselenide as a pharmacological tool to treat preference symptoms related to AMPH-induced dependence in rats. *Prog Neuro-Psychoph* 2016; 66:1–7.
- [35] Segat HJ, Barcelos RCS, Metz VG, Rosa HG, Roversi Kr, Antoniazzi, CTD et al. Influence of physical activity on addiction parameters of rats exposed to amphetamine which were previously supplemented with hydrogenated vegetable fat. *Brain Res Bul* 2017; 135: 69–76.
- [36] Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 2007; 12:227- 462.
- [37] Pase CS, Roversi Kr, Trevizol F, Roversi K, Kuhn FT, Schuster AJ et al. Influence of perinatal trans fat on behavioral responses and brain oxidative status of adolescent rats acutely exposed to stress. *Neuroscience* 2013; 247: 242-52.
- [38] Trevizol F, Roversi K, Dias VT, Roversi Kr, Pase CS, Barcelos RCS et al. Influence of lifelong dietary fats on the brain fatty acids and amphetamine-induced behavioral responses in adult rat. *Prog Neuro Psychopharmacol* 2013; 45:215–22.
- [39] Vazquez V, Penit-Soria J, Durand C, Besson MJ, Giros B, Daugé V. Brief early handling increases morphine dependence in adult rats. *Behav Brain Res* 2006; 170: 211-18.
- [40] Paxinos G, Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, sixth ed. Ne Academic Press, New York, 2007.
- [41] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:911–17.

- [42] Hartman L, Lago BC. A rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. *Lab Pract* 1973; 22: 475–76.
- [43] Yan LY, Traber MG, Packer L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 1995, 228:349–51.
- [44] Hempel SL, Buettner GRO, Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 20, 70-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-20, 70-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol Med* 1999; 27:146–59.
- [45] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 19:265–75.
- [46] Pase CS, Roversi Kr, Roversi K, Vey LT, Dias VT, Veit JC et al. Maternal trans fat intake during pregnancy or lactation impairs memory and alters BDNF and TrkB levels in the hippocampus of adult offspring exposed to chronic mild stress. *Physiol Behav* 2017; 169:114–23.
- [47] Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 1998; 56:613–72.
- [48] Huston JP, Silva MAS, Topic B, Muller CP. What's conditioned in conditioned place preference? *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34:162–6.
- [49] McCorvy JD, Harland AA, Maglathlin R, Nichols DE. A 5-HT (2C) receptor antagonist potentiates a low dose amphetamine-induced conditioned place preference. *Neurosci Lett* 2011; 505: 10–3.
- [50] Zapparoli JX, Sugawara EK, de Souza AA, Tufik S, Galduroz JC. Omega-3 Levels and Nicotine Dependence: A Cross-Sectional Study and Clinical Trial. *Eur Addict Res* 2016; 22:153–62.
- [51] Chen L, Meng Q, Yu X, Li C, Zhang C, Cui C et al. Possible mechanisms underlying the biphasic regulatory effects of arachidonic acid on Ca²⁺ signaling in HEK293 cells. *Cell Signall* 2012; 24:1565-72.
- [52] Kuhn FT, Dias VT, Roversi Kr, Vey LT, Freitas DL, Pase CS et al. Cross-generational trans fat consumption favors self-administration of amphetamine and changes molecular expressions of BDNF, DAT, and D1/D2 receptors in the cortex and hippocampus of rats. *Neurotoxic Res* 2015; 28:319–31.
- [53] Takamatsu Y, Yamamoto H, Hagin Y, Markou A, Ikeda K. The selective serotonin uptake inhibitor paroxetine, but not fluvoxamine, decreases methamphetamine conditioned place preference in mice. *Curr Neuropharmacol* 2011; 9:68–72.
- [54] Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 2005; 162:1403–41.

- [55] Murray RC, Hebbard JC, Logan AS, Vanchipurakel GA, Gilbert YE, Horner KA. Stress and withdrawal from d-amphetamine alter 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in the prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 2014; 559:44–9.
- [56] Ares-Santos S, Granado N, Moratalla R. The role of dopamine receptors in the neurotoxicity of methamphetamine. *J Intern Med* 2013; 273:437-53.
- [57] Toborek M, Seelbach MJ, Rashid CS, András IE, Chen L, Park M. Voluntary exercise protects against methamphetamine-induced oxidative stress in brain microvasculature and disruption of the blood-brain barrier. *Mol Neurodegener* 2013; 8: 22.
- [58] Hadlock G, Chu PW, Walters ET, Hanson GR, Fleckenstein AE. Methamphetamine-Induced Dopamine Transporter Complex Formation and Dopaminergic Deficits: The Role of D₂ Receptor Activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 335:207-12.
- [59] Eyerman DJ, Yamamoto BK. Lobeline attenuates methamphetamine-induced changes in vesicular monoamine transporter 2 immunoreactivity and monoamine depletions in the striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312:160–9.
- [60] Sandoval V, Riddle EL, Hanson GR, Fleckenstein AE. Methylphenidate alters vesicular monoamine transport and prevents methamphetamine-induced dopaminergic deficits. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304:1181–7.
- [61] Zimmer L, Breton P, Durand G, Guilloteau D, Besnard JC, Chalon S. Prominent role of n-3 polyunsaturated fatty acids in cortical dopamine metabolism. *Nutr Neurosci* 1999; 2:257–65.
- [62] Kodas E, Page G, Zimmer L, Vancassel S, Guilloteau L, Durand G et al. Neither the density nor function of striatal dopamine transporters were influenced by chronic n-3 PUFA deficiency in rodents. *Neurosci Lett* 2002; 321:95–9.
- [63] Mudka S, Vimolratana O, Govitrapong P. Melatonin attenuates the amphetamine-induced decrease in vesicular monoamine transporter-2 expression in postnatal rat striatum. *Neurosci Lett* 2011; 488:154–7.
- [64] Fumagalli F, Gainetdinov RR, Wang YM, Valenzano KJ, Miller GW, Caron MG. Increased methamphetamine neurotoxicity in heterozygous vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *J Neurosci* 1999; 19:2424–31.
- [65] Dixit S, Dhar P, Mehra RD. Alpha lipoic acid (ALA) modulates expression of apoptosis-associated proteins in hippocampus of rats exposed during postnatal period to sodium arsenite (NaAsO₂). *Toxicol Rep* 2015; 2:78–87.
- [66] Volz TJ, Hanson GR, Fleckenstein AE. The role of the plasmalemmal dopamine and vesicular monoamine transporters in methamphetamine-induced dopaminergic deficits. *J Neurochem* 2007; 101:883–88.

- [67] Ares-Santos S, Granado N, Oliva I, Shea EO, Martin ED, Colado MI et al. Dopamine D1 receptor deletion strongly reduces neurotoxic effects of methamphetamine. *Neurobiol Dis* 2012; 45:810–20.
- [68] Granado N, Lastres-Becker I, Ares-Santos S, Oliva I, Martin E, Cuadrado A. Nrf2 deficiency potentiates methamphetamine-induced dopaminergic axonal damage and gliosis in the striatum. *Glia* 2011; 59:1850–63.
- [69] Gou H, Wen D, Chunling M, Li M, Li Y, Zhang W et al. Protective effects of cholecystinin-8 on methamphetamine-induced behavioral changes and dopaminergic neurodegeneration in mice. *Behav Brain Res* 2015; 283:87-96.
- [70] Hansen JP, Riddle EL, Sandoval V, Brown JM, Gibb JW, Hanson GR et al. Methylenedioxymethamphetamine decreases plasmalemmal and vesicular dopamine transport: mechanisms and implications for neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 1093–100.
- [71] Carati C, Schenk S. Role of dopamine D1- and D2-like receptor mechanisms in drug-seeking following methamphetamine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 98:449–54.
- [72] Moratalla R, Khairnar A, Simola N, Granado N, García-Montes JR, Porceddu PF et al. Amphetamine-related drugs neurotoxicity in humans and in experimental animals: Main mechanisms. *Prog Neurobiol* 2017; 155:149-70.
- [73] Beninger RJ, Miller R. Dopamine D1-like receptors and reward related incentive learning. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 22:335–45. DOI: 0149-7634/98.
- [74] Young JW, Geyer MA. Action of modafinil—increased motivation via the dopamine transporter inhibition and D1 receptors? *Biol Psychiatry* 2010; 67:784–87.
- [75] Eisch AJ, Marshall JF. Methamphetamine neurotoxicity: dissociation of striatal dopamine terminal damage from parietal cortical cell body injury. *Synapse* 1998; 30:433–45.
- [76] Metzger RR, Haughey HM, Wilkins DG, Gibb JW, Hanson GR, Fleckenstein AE. Methamphetamine-induced rapid decrease in dopamine transporter function: role of dopamine and hyperthermia. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295:1077–85.
- [77] Borsonelo EC, Galduróz JCF. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: Review and propositions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008; 78:237-245.
- [78] Suzuki H, Park S, Tamura M, Ando S. Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acids composition of brain stem phospholipids and synaptic membranes fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mech Ageing Dev* 1998; 101:119-28.
- [79] Murphy MG. Dietary fatty acids and membrane protein function. *J Nutr Biochem* 1990; 1:68–79.

[80] Kitajka K, Sinclair AJ, Weisinger RS, Mathai M, Jayasooriya AP, Halver JE et al. Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc Natl AcadSci* 2004; 101:10931–36.

[81] Kuperstein F, Yakubov E, Dinerman P, Gil S, Eylam S et al. Overexpression of dopamine receptor genes and their products in the postnatal rat brain following maternal n-3 fatty acid dietary deficiency. *J Neurochem* 2005; 95:1550–62.

[82] Sidhu VK, Huang BX, Kim HY. Effects of docosahexaenoic acid on mouse brain synaptic plasma membrane proteome analyzed by mass spectrometry and (16)O/(18)O labeling. *J Proteome Res* 2011; 10:5472-80.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados experimentais obtidos no presente estudo podemos chegar às seguintes conclusões:

- ✓ O tratamento com óleo de peixe preveniu a recaída induzida pelo recondicionamento com anfetamina;
- ✓ O tratamento com óleo de peixe preveniu os danos oxidativos induzidos por anfetamina no córtex pré-frontal;
- ✓ Ácidos graxos poli-insaturados n-3 alteram a neurotransmissão dopaminérgica e revertem efeitos celulares da anfetamina;
- ✓ O óleo de peixe pode ser considerado como uma terapia adjuvante no tratamento da adição por psicoestimulantes.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Na continuidade de minha formação acadêmica, durante o doutorado, irei me dedicar a uma importante linha de pesquisa já estabelecida no grupo em que estou inserida, a qual envolve estudos sobre a influência do consumo de diferentes ácidos graxos. Portanto, o futuro da minha trajetória acadêmica deverá abranger estudos visando determinar a influência do consumo de gordura interesterificada, sobre o sistema endocanabinoide, visto que ainda pouco se sabe sobre o impacto do consumo destes ácidos graxos sobre o sistema nervoso central e que o sistema endocanabinoide é um importante modulador de diferentes funções neuronais, envolvido em diversas desordens neurológicas e psiquiátricas.

.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.; MORIGUCHI, T.; SALEM, N. Jr. Decrease in neuron size in docosahexaenoic acid-deficient brain. **Pediatr. Neurol.** v. 26, p. 210-18, Mar. 2002.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Biologia das células**. São Paulo: Moderna, 2004.
- ANDERSON, B.M.; MA, D.W. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? **Lipids Health Dis.** v.8, p. 33, Aug. 2009.
- ANTONIAZZI, C.T.D. et al. Influence of neonatal tactile stimulation on amphetamine preference in young rats: parameters of addiction and oxidative stress. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 124, p. 341–349, Sep. 2014a.
- ANTONIAZZI, C.T.D. et al. Tactile stimulation and neonatal isolation affect behavior and oxidative status linked to cocaine administration in young rats. **Behav. Processes** v. 103, p. 297–305, Mar.2014b.
- ARES-SANTOS, S. et al. Dopamine D1 receptor deletion strongly reduces neurotoxic effects of methamphetamine. **Neurobiol. Dis.** v. 45, p. 810–20, Feb. 2012.
- BAIK, J.H. Dopamine Signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits*. v. 7, p. 152, Oct. 2013.
- BARCELÓ-COBLIJN, G.; MURPHY, E.J. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. **Prog. Lipid Res.** v. 48, n. 6, p. 355-374, Nov. 2009.
- BARCELOS, R.C.S. et al. Effects of α -3 essential fatty acids (α -3 EFAs) on motor disorders and memory dysfunction typical neuroleptic-induced: behavioral and biochemical parameter. **Neurotox Res.**, v. 17, p. 228–237, 31 Jul. 2010.
- BARCELOS, R.C.S. et al. Short term dietary fish oil supplementation improves motor deficiencies related to reserpine-induced parkinsonism in rats. **Lipids**, v. 46, p. 143–149, Jan. 2011.
- BARROS, D. R. et al. **O Despertar do Toxicômano: uma experiência em grupo**. Toxicomanias: Prevenção e Intervenção, p.153-163. João Pessoa: Editora Universitária-UFPB, 2008.
- BERK, M. et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder. Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosc. Biobehav. Rev.** v.35, p. 804-817, Jan. 2011.
- BERMAN, S. M. et al. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. **Mol. Psychiatry**, v. 14, p. 123-142, Feb. 2009.

BOTHAM, K. M.; MAYES, P. A. Biossíntese dos ácidos graxos e eicosanóides. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper Bioquímica Ilustrada**. 27ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.

BOURRE, J. M. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J. Nutr. Health Ag.* v.8, n.3, p.163-74, 2004.

BOUTREL, B.; KOOB, G.F. What keeps us awake: the neuropharmacology of stimulants and wakefulness-promoting medications. *Sleep*, v. 27, p. 1181-1194, 15 Sep. 2004.

BOZZATELLO, P. et al. Supplementation with Omega-3 Fatty Acids in Psychiatric Disorders: A Review of Literature Data. *J. Clin. Med.* v. 5, p. 67, Jul. 2016.

BROSSARD, N. et al. Retroconversion and metabolism of [13C]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [13C] 22:6n-3-triacylglycerols. *Am. J. Nutr.* v. 64, p. 577-586, Oct. 1996.

BURDGE, G.C.; JONES, A.E.; WOOTTON, S.A. Eicosapentaenoic and Docosapentaenoic acids are the principal products of α -Linolenic acid metabolism in young men. *Br. J. Nutr.* v. 88, p. 355-364, Oct. 2002.

BURR, M.L. Lessons from the story of n-3 fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* v.71, p. 397S-8S, Jan. 2000.

BUYDENS-BRANCHEY, L. et al. Polyunsaturated fatty acid status and relapse vulnerability in cocaine addicts. *Psychiatry Res.* v. 120, p. 29–35, Aug. 2003a.

BUYDENS-BRANCHEY, L. et al. Polyunsaturated fatty acid status and aggression in cocaine addicts. *Drug Alcohol Depend.* v. 71, p. 319–323, Sep. 2003b.

BUYDENS-BRANCHEY, L.; BRANCHEY, M. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids decrease feelings of anger in substance abusers. *Psychiatry Res.* v. 157, p. 95-104, Jan. 2008.

BUYDENS-BRANCHEY, L., BRANCHEY, M., HIBBELN, J.R. Associations between increases in plasma n-3 polyunsaturated fatty acids following supplementation and decreases in anger and anxiety in substance abusers. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 32, p. 568–75, 15 Feb. 2008.

CADET, J.L. et al. Neurotoxicity of substituted amphetamines: molecular and cellular mechanisms. *Neurotox. Res.* v. 11, p. 183-202, Apr. 2008.

CALDER, P. C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.83, p.1505S-1519S, Jun. 2006.

CALDERON, F.; KIM, H. Y. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neuroch.* V.90, p.979–88, Aug. 2004.

CAMP, D. M.; DeJONGHE, D. K.; ROBINSON, T. E. Time-dependent effects of repeated amphetamine treatment on norepinephrine in the hypothalamus and hippocampus assessed with in vivo microdialysis. *Neuropsychopharmacology*, v. 17, p. 130-40, Sep. 1997.

CANSEV, M. Synaptogenesis: Modulation by Availability of Membrane Phospholipid Precursors. **Neuromolecular Med.** v.18, n. 3, p. 426-440, Sep. 2016.

CAO, D.N. et al. Advances and challenges in pharmacotherapeutics for amphetamine-type stimulants addiction. **Eur. J. Pharmacol.** v. 780, p. 129-135, Jun. 2016.

CARLEZON, W.A.; DUMAN R.S.; NESTLER R.J. The many faces of CREB. **Trends neurosci.** v. 8, n. 4, p. 436-445, Aug. 2005.

CARRIE, I. et al. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice: effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. **J Lipid Res**, v.41, p.465-472, Mar. 2000.

CARVALHO, M. et al. Toxicity of amphetamines: an update. **Archi. Toxicol.** v. 86, p. 1167-1231, Aug. 2012.

CHALON, S. Omega 3 fatty acids and monoamine neurotransmission. **Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids.** v.75, p.259–69, Oct-Nov. 2006.

CHANG, P.K. et al. Docosahexaenoic acid (DHA): a modulator of microglia activity and dendritic spine morphology. **J Neuroinflammation.** p. 12:34, Feb. 2015.

CHIUEH, C.C. et al. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus. **Free Radic. Biol. Med.** v. 13, p. 581-583, Nov. 1992.

CHOU, I.; NARASIMHAM, K. Neurobiology of addiction. **Nat. neurosci.** v. 8, n. 11, p. 1427, 2005.

CLEGG-KRAYNOK, M.M.; MCBEAN, A.L.; MONTGOMERY-DOWNS, H.E. Sleep quality and characteristics of college students who use prescription psychostimulants nonmedically. **Sleep Med.**,v. 12, p. 598–602, Jun. 2011.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. **A célula. Uma abordagem molecular.** 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

CRUZ, F.C.; MARIN, M.T.; PLANETA, C.S. The reinstatement of amphetamine-induced place preference is long-lasting and related to decreased expression of ampa receptors in the nucleus accumbens. **Neuroscience** v. 151, p. 313–9, Jan. 2008.

DAS , U.N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. **J. Biotech.** v.1, p.420-439, Apr. 2006.

DENIS, I. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid and brain aging. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care** v. 18, p. 139–46, Mar. 2015.

DIAS, V.T. et al. Trans-fat supplementation over two generations of rats exacerbates behavioral and biochemical damages in a model of mania: Co-treatment with lithium. **Life Sciences**, v. 132, p. 6–12, 29 Apr. 2015.

- DU BOIS, T.M.; DENG, C.; HUANG, C.F. Membrane phospholipid composition, alterations in neurotransmitter systems and schizophrenia, **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry** v. 29, p. 878–888, Jul. 2005.
- DYALL, S.C.; MICHAEL-TITUS, A.T. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. **Neuromolecular Med.** v. 10, n. 4, p. 219-235, Jun. 2008.
- ECKERT, G.P.; LIPKA, U.; MULLER, W.E. Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: focus on mitochondria. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids** v. 88, n. 1, p. 105-114, Jan. 2013.
- EMKEN, E.A.; ADLOF, R.O., GULLEY, R.M. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. **Biochim. Biophys. Acta** v.1213, p. 277-288, Aug. 1994.
- EVERITT, B.J.; ROBBINS, T.W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature Neurosc.** v. 8, n. 11, p. 1481-1489, Nov. 2005.
- FELTENSTEIN, M.W.; SEE, R.E. The neurocircuitry of addiction: an overview. **Br. J. Pharmacol.** V. 154, n. 2, p. 261-274, May 2008.
- FOSTER, R.H.; HARDY, G.; ALANY, R.G. Borage oil in the treatment of atopic dermatitis. **Nutrition** v. 26, p. 708–718, Jul-Aug. 2010.
- FREEMAN, M.P. et al. Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry. **J. Clin. Psychiat.** v. 67, p. 1954–1967, Dec. 2006.
- FREY, B.N. Increased oxidative stress in submitochondrial particles after chronic amphetamine exposure. **Brain Res.**,v. 1097, p. 224-229, 30 Jun. 2006.
- GRIMSGAARD, S. et al. Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effect on serum fatty acids. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 66, p. 649-659, Sep. 1997.
- GOLDSTEIN, R.Z.; VOLKOW, N.D. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: Neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **Am. J. Psychiatry**, v.159, p. 1642-1652, Oct. 2002.
- GOMES, L.M. et al. Omega-3 fatty acids and mood stabilizers alter behavioral and oxidative stress parameters in animals subjected to fenproporex administration. **Met. Brain Dis.** v. 32, p. 519- 528, Apr. 2017.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology an Medicine.**4th edition, Oxford University Press, New York, 2007.
- HASHIMOTO, M. et al. Docosahexaenoic acid induced protective effect against impaired learning in amyloid beta-infused rats is associated with increased synaptosomal membrane fluidity. **Clin. Exp. Pharm. Physiol.** v.33, p.934–939, Oct. 2006.

HERMIDA-AMEIJEIRAS, A. et al. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. **Neurochem. Int.** v. 45, p. 103-116, Jul. 2004.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L.L. **Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman**, 2ª edição, AMGH, 2015.

HOOKS, M.S. et al. Environmental and pharmacological sensitization: effects of repeated administration of systemic and intra-nucleus accumbens cocaine. **Psychopharmacol.**, v. 111, p. 109, 1116, Apr. 1993.

HORROBIN, D.F. The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. **Schizophr. Res.** v. 30, p. 193–208, Apr. 1998.

HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acid** v.70,p.361–372, Apr. 2004.

HOWARD, P. et al. Psychostimulants. **J. Pain Symptom Manag.** v. 40, p. 789-795, 2010.

HULBERT, A.J., RANA, T., COUTURE, P. The acyl composition of mammalian phospholipids: an allometric analysis. **Comp BiochemPhysiol A Physiol.**, v. 132, p. 515–27, Jul. 2002.

HUSTON, J.P. What's conditioned in conditioned place preference? **Trends Pharmacol. Sci.** v. 34, n. 3, p. 162–166, Mar. 2013.

INNIS, S. M. Fatty acids and early human development. **Early Hum Dev**, v.83, n.12, p.761-6. Dec. 2007.

IXTAINA, V.Y. et al. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. **J. Food Comp. Anal.** v. 24, p. 166-174, Mar. 2011.

JICHA, G.A.; MARKESBERY, W.R. Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. **Clin. Interv. Aging** v. 5, p. 45-61, Apr. 2010.

JUMP, D.B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. **Curr. Opin. Lipidol.** v.13, p.155–64, Apr. 2002.

KAPLAN, F.; OUDEYER, P.-Y. The progress-drive hypothesis: an interpretation of early imitation. In: Nehaniv, C., Dautenhahn, K. (Eds.), **Models and Mechanisms of Imitation and Social Learning: Behavioural, Social and Communication Dimensions**. University Press, New York, Cambridge, pp. 361–377, 2007.

KATZUNG, B.G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 12th Edition. – Lange Medical Publications, San Francisco, 2012.

KAUER-SANT'ANNA, M. et al. A gastrin-releasing peptide receptor antagonist blocks d-amphetamine-induced hyperlocomotion and increases hippocampal NGF and BDNF levels in rats. **Peptides**, v. 28, p. 1447-52, Jul. 2007.

KESHAVAN, M.S.; ANDERSON, S.; PETTEGREW, J.W. Is schizophrenia due to excessive synaptic pruning in the prefrontal cortex? The Feinberg hypothesis revisited, **J. Psychiatr. Res.** v. 28, p. 239–265, May-Jun. 1994.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science** v. 278, p. 52-58, Oct. 1997.

KOOB, G.F.; SANNA, P.P.; BLOOM, F.E. Neuroscience of addiction. **Neuron** v. 21, n. 3, p. 467-76, 1998.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 59, p. 29-53, 2008.

KUCZENSKI, R. et al. Hippocampus norepinephrine, caudate dopamine and serotonin, and behavioral responses to the stereoisomers of amphetamine and methamphetamine. **J. Neurosci.** v. 15, p. 1308-1317, Feb. 1995.

KUMAR, R. Approved and investigational uses of modafinil: an evidence-based review. **Drugs**, v. 68, p. 1803-1839, 2008.

KUHN, F.T. et al. Influence of trans fat and omega-3 on the preference of psychostimulant drugs in the first generation of young rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 110, p. 58–65, Sep. 2013.

KUHN, F.T. et al. Cross-generational trans fat consumption favors self-administration of amphetamine and changes molecular expressions of BDNF, DAT, and D1/D2 receptors in the cortex and hippocampus of rats. **Neurotoxic. Res.** v. 28, p. 319–331, Nov. 2015.

LANE, M. A.; BAILEY, S. J. Role of retinoid signaling in the adult brain. **Prog Neurobiol.** v.75, p.275–93, Mar. 2005.

LAURITZEN, L. et al. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Progress in Lipid Research** v. 40, p. 1-94, Jan-Mar. 2001.

LILE, J.A.; ROSS, J.T.; NADER, M.A. A comparison of the reinforcing efficacy of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) with cocaine in rhesus monkeys. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 78, p. 135-140, May 2005.

LIU, Z.H. et al. A Single Bolus of Docosahexaenoic Acid Promotes Neuroplastic Changes in the Innervation of Spinal Cord Interneurons and Motor Neurons and Improves Functional Recovery after Spinal Cord Injury. **J Neurosci.** v. 35, n. 37, p. 1273-1352, Sep. 2015.

LOGAN, A.C. Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression. **Altern. Med. Rev.** v. 8, p. 410-425, Nov. 2003.

MAJEWSKA, M.D. Cocaine addiction as a neurological disorder: implications for treatment. **NIDA Res Monogr.**, v. 163, p. 1-26, 1996.

MCCORVY, J.D. et al. A 5-HT (2C) receptor antagonist potentiates a lowdose amphetamine-induced conditioned place preference. **Neurosci. Lett.** v. 505, p. 10–3, Nov. 2011.

MCCUSTER, M. M.; GRANT-KELS, J. M. Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the omega-6 and omega-3 fatty acids. **Clin. Dermatol.**, v. 440, p. 41-51, Jul. 2010.

MCLELLAN, A.T. Substance misuse and substance use disorders: why do they matter in healthcare? **Transactions of the American Clinical and Climatological Association** v. 128, p. 112-130, 2017.

MILANESI, L.H. et al. Toxicological aspects of the interesterified-fat from processed foods: Influences on opioid system and its reward effects in rats. **Food Chem. Toxicol.** v. 110, p. 25-32, Dec. 2017.

MIRNIKJOO, B. et al. Protein kinase inhibition by ω -3 fatty acids. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 10888-10896, 6 Apr. 2001.

MOREIRA-SILVA, D. Stress abolishes the effect of previous chronic ethanol consumption on drug place preference and on the mesocorticolimbic brain pathway. **Alcohol. Clin. Exper. Res.** v. 38, n. 5, p. 1227-1236, May 2014.

NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**, v. 278, p. 58-63, Oct. 1997.

OHARA, K. et al. The n-3 polyunsaturated fatty acid/dopamine hypothesis of schizophrenia. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry** v. 31, 469–474, Mar. 2007.

OKEN, E.; BELFORT, M. B. Fish, Fish Oil, and Pregnancy. **JAMA**, v.304, n.15, p.1717-1718, Oct. 2010.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **CID-10 Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde**. 7ª ed. rev. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

PALACIOS-PELAEZ, R.; LUKIW, W.J.; BAZAN, N.G. Omega-3 essentialfattyacids modulate initiation and progression of neurodegenerative disease. **Mol. Neurobiol.** v. 41, p. 367-74, Jun. 2010.

PAU, C.W.H.; LEE, T.M.C.; CHAN, S.F.F. The impact of heroin on frontal executive functions. **Arch. Clin. Neuropsychol.** v. 17, p. 663-670, Oct. 2002.

PHILLIPS, K.A.; EPSTEIN, D.H.; PRESTON, K.L. Psychostimulant addiction treatment. **Neuropharmacology** v. 87, p. 150-160, Dec. 2014.

POTENZA, M.N. et al. Neuroscience of Behavioral and Pharmacological Treatments for Addictions. **Neuron**,v. 69, p. 695-711, 24 Feb. 2011.

PRIOR, P. L; GALDURÓZ, J. C.F. (N-3) Fatty Acids: Molecular Role and Clinical Uses in Psychiatric Disorders. **Adv. Nutr.** v. 3, p. 257–265, May. 2012.

QU, W.M. et al. Dopaminergic D1 and D2 receptors are essential for the arousal effect of modafinil. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 8462-8469, Aug. 2008.

RANG, H.P. et al. **Rang and Dale's Pharmacology**. 8th edition. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RICHARDSON, A.J.; PURI, B.K. A randomized double-blind, placebo-controlled study of the effects of supplementation with highly unsaturated fatty acids on ADHD-related symptoms in children with specific learning difficulties. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry** v. 26, 233–239, Feb. 2002.

RIEMER, S. et al. Lowered omega-3 PUFAs are related to major depression, but not to somatization syndrome. **J. Affect. Dis.**, v. 123, p.173-180, Aug. 2009.

ROBERTSON, S.D.; MATTHIES, H.J.; GALLI, A. A closer look at amphetamine induced reverse transport and trafficking of the dopamine and norepinephrine transporters. **Mol. Neurobiol.** v. 39, p. 73–80, Feb. 2009.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res. Rev.**,v. 18, p. 247-291, Sep. 1993.

ROSS, B.M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and anxiety disorders. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids** v. 81, p. 309–312, Nov-Dez. 2009.

ROVERSI, Kr. et al. Trans fat intake across gestation and lactation increases morphine preference in females but not in male rats: Behavioral and biochemical parameters. **Eur. J. Pharmacol.** v. 788, p. 210-217, Oct. 2016.

SALEM, N., et al. In vivo conversion of linoleic acid to arachidonic acid in human adults. **Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 60, p.407–410, May-Jun. 1999.

SALEM, N. et al. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids** v.36, p.945-979, Sep. 2001.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addic. Biol.** v. 11, p. 2-38, Mar. 2006.

SARSILMAZ, M. et al. Potential role of dietary ω -3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 69, p. 253–259, Oct. 2003.

SEGAT, H. J. et al. Exercise modifies amphetamine relapse: Behavioral and oxidative markers in rats. **Behavioural Brain Research**,v. 262, p. 94–100, 18 Jan. 2014.

SEGAT, H. J. et al. m-Trifluoromethyl-diphenyldiselenide as a pharmacological tool to treat preference symptoms related to AMPH-induced dependence in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 66, p. 1–7, Apr. 2016.

- SEGAT, H.J. et al. Influence of physical activity on addiction parameters of rats exposed to amphetamine which were previously supplemented with hydrogenated vegetable fat. **Brain Res. Bul.** v. 135, p. 69–76, Oct. 2017.
- SHAHAM Y.; HOPE B. T. The role of neuroadaptations in relapse to drug seeking. **Nat. neurosci.** v. 8, n. 11, p. 1437 - 1439, Nov.2005.
- SIMOPOULOS, A. P. et al. Essential fatty acids in health and chronic diseases. **Forum Nutr.** v. 56, p. 67-70, 2003.
- SINCLAIR, A. et al. Omega 3 fatty acids and the brain: review of studies in depression. Review. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.** v.16, n.1, p.391-397, 2007.
- SITTE, H. H.; FREISSMUTH, M. “Amphetamines, New Psychoactive Drugs and the Monoamine Transporter Cycle.” **Trends in Pharmacological Sciences**v. 36, n. 1, p.41–50, Jan. 2015.
- SMIT, E.N. et al. Higher erythrocyte 22:6n-3 and 22:5n-3, and lower 22:5n-3 suggest higher Δ 4-desaturation capacity in women of childbearing age. **Br. J. Nutr.** v. 89, p. 739-740, May 2003.
- SOCCOL, M.; HEIDMANN, C.; OETTERER, M. Seafood as functional food. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 46, n. 3, p. 443-454, Jun. 2003.
- STEINKELLNER, T. et al. The ugly side of amphetamines: short- and long-term toxicity of 3,4- methylenedioxymethamphetamine (MDMA ‘Ecstasy’), methamphetamine and D-amphetamine. **Biol. Chem.** v. 392, p.103-115,Jan. 2011.
- STHAL, S.M. **Psicofarmacologia – Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas**, 4^a edição. Guanabara Koogan, 09 /2014.
- STILLWELL, W. et al. Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. **Reprod. Nutr. Develop.** v, 45, n. 5, p. 559–579, Sep-Oct. 2005.
- SU, K. P. et al.. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. **Eur. Neuropsychopharm.**, v.13, p.267-271, Aug. 2003.
- SULZER, D. et al. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 4102-4108, May. 1995.
- SULZER, D. How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. **Neuron.** v. 69, p. 628-649, Feb. 2011.
- TEIXEIRA-GOMES, A. et al. The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. **Int. J. Dev. Neurosci.** v. 41, p. 44-62, Apr. 2015.
- TIEGES, Z. et al. Caffeine does not modulate inhibitory control. **Brain and Cognition.** v. 69, p. 316-327, Mar. 2009.

TOBOREK, M. et al. Voluntary exercise protects against methamphetamine-induced oxidative stress in brain microvasculature and disruption of the blood-brain barrier. **Mol. Neurodegener.** v. 8, p. 22, Jun. 2013.

TUNG, C.S. et al. The neurotoxic mechanisms of amphetamine: step by step for striatal dopamine depletion. **Neuroscience Letters.** v. 639, p.185-191, Feb. 2017.

TZCHENTKE, T.M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. **Prog. Neurobiol.** v. 56, n. 6, p. 613–672, Dec. 1998.

TZCHENTKE, T.M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addict. Biol.** v. 12, p. 227- 462, Sep. 2007.

UNODC – United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention. **World Drug Report 2014**, 2014

UNODC – United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention. **World Drug Report 2017**, 2017

VALLÖF, D. The Anorexigenic Peptide Neuromedin U (NMU) Attenuates Amphetamine-Induced Locomotor Stimulation, Accumbal Dopamine Release and Expression of Conditioned Place Preference in Mice. **PLoS ONE** v. 11, p. 5, May 2016.

VEY, L.T. et al. Stress during the gestational prerioid modifies pup’s emotionality parameters and favors preference for morphine in adolescent rats. **Behav. Brain Res.** v. 296, p. 408-417, Jan. 2016.

VIOLA, P.; VIOLA, M. Virgin olive oil as a fundamental nutritional component and skin penetration end efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 69, p. 948-957, 2008.

VOLKOW, N.D. et al. Effects of modafinil on dopamine and dopamine transporters in the male human brain: clinical implications. **JAMA**, 18 Mar. 2009.

VOLKOW, N.D.; BALER, R.D.; GOLDSTEIN, R.Z. Addiction: pulling at the neural threads of society. **Neuron.** v. 69, n.4, p. 599-602, Feb. 2011.

WAINWRIGHT, P.E. Do essential rational use for n-3 fatty acids play a role in brain and behavioral development? **Neurosc. Biobehav. Rev.**,v. 16, p. 193-2052, Summer 1992.

WESTOVER, A.N.; NAKONEZKY, P.A.; HALEY, R.W. Acute myocardial infarction in young adults who abuse amphetamines. **Drug Alcohol Depen.**, v. 96, p. 49–56, 1 Jul. 2008.

WISE, R.A. Dopamine, learning, and motivation. **Nature Reviews Neuroscience.** v. 5, n. 6, p. 483-494, Jun. 2004.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Docosaheaxaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Neuroscience**, v.155, n.3, p.751-9, Aug. 2008.

WURTMAN, R.J.; O'ROURKE, D.; WURTMAN, J.J. Nutrient Imbalances in Depressive Disorders Possible Brain Mechanisms. **The Psychobiology of Human Eating Disorders: Preclinical and Clinical Perspectives** v. 575, p. 75-85, Dec. 1989.

YAMAMOTO, B.K.; RAUDENSKY, J. The role of oxidative stress, metabolic compromise, and inflammation in neuronal injury produced by amphetamine-related drugs of abuse. **J. Neuroimmune Pharmacol.** v. 3, p. 203-217, Dec. 2008.

ZARARSIZ, I. et al. Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. **Cell Biochem. Funct.** v. 24, p. 237–244, May 2006.

ZIMMER, L. et al. Prominent role of n-3 polyunsaturated fatty acids in cortical dopamine metabolism. **Nutr. Neurosci.** v. 2, p. 257–265, 1999.

ZIMMER, L. et al. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters dopamine vesicle density in the rat frontal cortex. **Neurosci. Lett.** v. 284, p. 25–28, Apr. 2000.

ZIMMER, L. et al. The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 75, p. 662–77, Apr. 2002.

ANEXO:

Carta de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais da
Universidade Federal de Santa Maria.



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do exercício físico e de diferentes ácidos graxos dietéticos em modelos animais de abuso de drogas e déficit de memória", protocolada sob o CEUA nº 9373231116, sob a responsabilidade de **Marilise Escobar Bürger e equipe; Higor Zuquetto Rosa; Priscila Ferreira Haygert; Vinícia Garzella Metz; Laura Hautrive Milanesi; Verônica Tironi Dias** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 05/04/2017.

We certify that the proposal "Influence of physical exercise and different dietary fatty acids in animal models of drug abuse and memory deficit", utilizing 166 Heterogenics rats (166 males), protocol number CEUA 9373231116, under the responsibility of **Marilise Escobar Bürger and team; Higor Zuquetto Rosa; Priscila Ferreira Haygert; Vinícia Garzella Metz; Laura Hautrive Milanesi; Verônica Tironi Dias** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 04/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2017** a **03/2018** Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 60 dias**

N: **166**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **80 a 250 g**

Resumo: Substâncias psicoestimulantes como as anfetaminas e opioides como a morfina, deixaram de ser utilizadas somente com finalidades terapêuticas e têm sido muito utilizadas com caráter abusivo, gerando assim, preocupações devido a sua associação com a tolerância e dependência (WESTOVER et al., 2008). De um modo geral, a prevenção e os tratamentos até agora desenvolvidos são pouco eficazes quando se trata de indivíduos intensamente dependentes de opioides e anfetaminas (RIBEIRO e MARQUES, 2002). Dessa forma, o desenvolvimento de novas ferramentas a serem empregadas na farmacodependência se torna importante devido ao impacto deletério envolvido. Nesse contexto, a atividade física têm se mostrado como uma alternativa, visto que estudos epidemiológicos relatam que a participação em atividades que promovam a aptidão física está associada a uma menor incidência ao abuso de drogas (FIELD; DIEGO; SANDERS, 2001; KIRKCALDY; SHEPHARD; SIEFEN, 2002). Ainda, o consumo de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (AGPI-3) têm mostrado influências benéficas na prevenção de doenças que afetam o sistema nervoso central, incluindo a redução da drogadição por psicoestimulantes (BUYDENS-BRANCHEY et al., 2003a, 2003b, 2008). Por fim, é sabido que a composição da dieta afeta o tipo de ácido graxo incorporado pela membrana fosfolipídica (ABBOTT et al., 2012; BARCELOS et al. 2011, 2013, 2015; KUHN et al. 2013, 2015) e conseqüentemente as funções fisiológicas do cérebro (HAAG, 2003). O alto consumo de ácidos graxos trans (AGT) têm sido relacionado com inúmeras doenças incluindo os danos oxidativos cerebrais e seus prejuízos. Na tentativa de minimizar os prejuízos, os AGT estão sendo substituídos pela gordura interesterificada que ainda não possui estudos quanto a seus efeitos sobre o SNC. Têm sido quase um consenso entre pesquisadores que a ingestão excessiva de gordura saturada está relacionada com várias doenças, sendo que, uma das doenças relacionadas está diretamente ligada à maior incidência da Doença de Alzheimer. (MORRIS, 2003). Nesse sentido, o presente projeto visa avaliar a influência do exercício físico e da suplementação de AGPI-3 como ferramentas alternativas na prevenção e tratamento, respectivamente, da toxicodependência por opioides e psicoestimulantes, assim como, avaliar comparativamente a influência da suplementação de diferentes tipos de gordura sobre possíveis danos de memória em um modelo animal de Doença de Alzheimer.

Local do experimento: Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 21. Laboratório FARMATOX

Santa Maria, 20 de agosto de 2018



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Brook Roseberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria