

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE  
PARÂMETROS DE DEPENDÊNCIA E RECAÍDA EM  
RATOS EXPOSTOS À ANFETAMINA: ASPECTOS  
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Hecson Jesser Segat**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE  
PARÂMETROS DE DEPENDÊNCIA E RECAÍDA EM RATOS  
EXPOSTOS À ANFETAMINA: ASPECTOS  
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS**

**Hecson Jesser Segat**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para  
obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilise Escobar Burger**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica**

**A comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado**

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS DE  
DEPENDÊNCIA E RECAÍDA EM RATOS EXPOSTOS À  
ANFETAMINA: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS**

Elaborada por  
**Hecson Jesser Segat**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Marilise Escobar Bürger, Dr<sup>a</sup>**  
(Presidente Orientadora)

---

**Marcelo Tadeu Marin, Dr. (UNESP)**

---

**Cristina Wayne Nogueira, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 10 de fevereiro de 2015.

***“Ponha sua vida nas mãos do Senhor, confie nele, e ele o ajudará!”***

***Sl 37:5***

*Dedico esta dissertação, em primeiro lugar, àqueles que sempre foram meu alicerce, me apoiaram em todas as decisões e confiaram em mim: minha família!*

## AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão a Deus e por todos aqueles que me vigiam e protegem diariamente, sempre me guiando por caminhos melhores a fim de evoluir de ceifar num futuro, os melhores frutos plantados.

Tenho imensa satisfação em poder dizer um muito obrigado a toda a minha família, mas principalmente meu pai Doalcir, minha mãe, Iva, meu irmão Kléryston, minha cunhada e colega de profissão, Michele, e meus sobrinhos Lázaro e Roberta. Vocês sempre foram minha base, meu porto seguro, sempre me apoiaram, me aconselharam e compartilharam diversos momentos desta caminhada comigo. Muito obrigado por vocês existirem.

Gostaria de expressar minha gratidão à Professora Dra. Marilise Burger, que além de ser uma ótima orientadora, sempre soube me compreender em todos os momentos desta trajetória. Obrigado profe por sempre ter acreditado e confiado em mim.

Gostaria de agradecer aos amigos e colegas do Farmatox, Camila, Caren, Daniele, Fábio, Fábíola, Geisa, Karine, Katiane, Luciana, Maikel, Verônica, Vinícia e Higor, por me acompanharem nesta árdua tarefa de fazer pesquisa, me auxiliarem nos experimentos, redação desta dissertação, resumos e trabalhos. Também lhes agradeço pela amizade companheirismo e parceria.

Um muito obrigado especial àquela pessoa que esteve no meu lado desde o dia em que pus os pés no laboratório, “minha mãe científica”, Raquel. Muito do que sei hoje, devo a você.

Sou muito grato também àquelas pessoas que o destino de uma forma ou outra colocou no meu caminho e que levo comigo dentro do peito. Muito obrigado por tudo Daniel, Dalila, Fran, Liti, Lou, Melise

Aos professores e funcionários dos programas de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica e de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram para minha formação, meu agradecimento.

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

À Universidade Federal de Santa Maria, por disponibilizar cursos Pós-Graduação gratuitos e de qualidade e por garantir o acesso universal ao conhecimento. Também agradeço ao CNPq e PROAP-UFSM, pelos recursos financeiros.

Aos Professores que gentilmente aceitaram o convite para compor minha banca de dissertação e avaliar este trabalho.

A todos os que de uma ou de outra maneira fizeram ou fazem parte da minha vida...Dedico essa conquista a vocês!

*"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."*

*Chico Xavier*

## **Resumo**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS DE DEPENDÊNCIA E RECAÍDA EM RATOS EXPOSTOS À ANFETAMINA: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS**

AUTOR: HECSON JESSER SEGAT

ORIENTADORA: MARILISE ESCOBAR BÜRGER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de fevereiro de 2015.

Compostos anfetamínicos e seus derivados são amplamente utilizados na clínica médica, porém podem provocar quadros de dependência, tolerância e abstinência. Além disso, estas drogas são capazes de afetar as funções e o metabolismo de neurotransmissores do sistema nervoso central (SNC) provocando desequilíbrios oxidativos. Neste sentido, já é documentado que o exercício físico melhora as condições de bem estar e auto-estima, favorecendo a plasticidade e, conseqüentemente, a proteção neuronal. Nesse contexto, o presente estudo visou avaliar a influência do exercício físico regular e contínuo sobre parâmetros comportamentais e de ansiedade relacionados à recaída ao uso de anfetamina em modelo animal de preferência condicionada de lugar (PCL). Ratos Wistar adultos foram condicionados com anfetamina no protocolo de PCL ou veículo por 14 dias e, na seqüência, metade de cada grupo foi submetida à atividade física aeróbica regular e contínua por 5 semanas, enquanto os demais não foram exercitados. Ao término da última sessão de exercício físico, os animais foram re-condicionados ao uso de anfetamina ou veículo por mais 3 dias. Após esta fase, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de PCL para avaliar sintomas de recaída pela preferência à droga, sendo também avaliados parâmetros de ansiedade em labirinto em cruz elevado. O status oxidativo na região do hipocampo foi avaliado através da geração de espécies reativas (RS), dos níveis de proteína carbonilada (PC) e atividade das enzimas catalase (CAT) e Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Observou-se que a anfetamina *per se* foi capaz de desenvolver a PCL nos animais. Entretanto, após 5 semanas de exercício físico aeróbico regular e contínuo, os animais expostos à anfetamina



mostraram menor PCL pela droga quando comparados ao grupo sedentário, indicando menor índice de recaída à anfetamina. Além disso, o exercício físico regular e contínuo exerceu influência favorável ao reduzir o nível de ansiedade e os danos oxidativos cerebrais, os quais foram associados ao condicionamento com anfetamina. Desse modo, o exercício físico regular e contínuo é uma ferramenta promissora no tratamento de dependência e recaída ao uso abusivo de drogas.

**Palavras-chave:** Preferência condicionada de lugar. Recaída. Anfetamina. Exercício físico

## **Abstract**

Dissertation of Master's Degree

Postgraduate Programme in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **INFLUENCE OF PHYSICAL EXERCISE ON DEPENDENCE AND RELAPSE PARAMETERS EVALUATED IN RATS EXPOSED TO AMPHETAMINE: BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS**

AUTHOR: HECSON JESSER SEGAT

ADVISOR: MARILISE ESCOBAR BÜRGER

Date and place of defense: Santa Maria, February, 10<sup>th</sup>, 2015.

Amphetamine compounds and its derivatives are widely used in clinical medicine, but it is known that frames can cause dependence, tolerance and withdrawal. Furthermore, these drugs can alter metabolism and the functions of central neurotransmitters causing oxidative imbalances. In this sense it is already documented that exercise improves the conditions of well-being and self-esteem, and improve the plasticity and thus neuronal protection. In this context, the present study aimed to evaluate the influence of regular and continuous exercise on anxiety and behavioral parameters related to relapse to the use of amphetamine in an animal model of conditioned place preference (CPP). Male Wistar rats were conditioned to the use of AMPH or vehicle for 14 days and then half of each group was subjected to aerobic, regular and continuous physical activity for 5 weeks, while the others were not exercised. At the end of the last exercise session, the animals were re-conditioned to the use of AMPH/vehicle for more 3 days. After this phase, the animals were subjected to behavioral testing CPP to evaluate relapse to drug use, and the elevated plus maze to measure anxiety parameters. Hippocampal oxidative status was evaluated by levels of generation of reactive species (RS), carbonyl protein (CP), and activity levels of catalase (CAT) and Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, respectively. It was observed that the per amphetamine was able to develop is the CPP in the animals, however after the completion of 5 weeks of aerobic exercise, there was a reduction in the rate preferably compared to sedentary rats indicating a lower rate of relapse to

amphetamine. In addition, exercise was shown to be beneficial to reduce the degree of anxiety and oxidative damage in these animals by amphetamine. Thus, regular and continuous exercise is a promising tool in the treatment of dependence and relapse to the indiscriminate use of drugs.

**Keywords:** Conditioned place preference. Relapse. Amphetamine. Physical exercise

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1:</b> Estrutura química básica da anfetamina .....	17
<b>Figura 2:</b> Esquema das vias dopaminérgicas mesocortico-límbico no encéfalo de rato .....	18
<b>Figura 3.</b> Ação das enzimas antioxidantes no processo de combate a ER .....	21

### ARTIGO CIENTÍFICO

<b>Figura 1:</b> Experimental design.....	31
<b>Figura 2:</b> Drug preference behavior induced by amphetamine (4mg/kg for 14 days), which was observed in conditioned place preference paradigm.....	32
<b>Figura 3:</b> Influence of physical exercise on elevated plus maze task, performed 24h after the last amphetamine injection.....	32
<b>Figura 4:</b> Influence of physical exercise on the oxidative status in hippocampus of rats conditioned with amphetamine for 14 days.....	33
<b>Figura 5:</b> Correlations between amphetamine preference and both reactive species generation, catalase activity, as well as between protein carbonyl levels and catalase activity, which were quantified in the hippocampus.....	33
<b>Tabela 1:</b> Influence of the physical exercise on the catalase and Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase activities in the hippocampus of rats exposed to amphetamine.....	33

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	14
1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Dependência e psicoestimulantes .....	15
1.2 Estresse oxidativo, defesas antioxidantes e drogas psicoestimulantes .....	19
1.3 A atividade física como um adjuvante na prevenção e tratamento da adição à psicoestimulantes .....	21
1.4 Preferência condicionada de lugar a psicoestimulantes .....	23
2 OBJETIVOS .....	25
2.1 Objetivo geral .....	25
2.2 Objetivos específicos .....	25
3 MANUSCRITO CIENTÍFICO .....	26
3.1 Artigo Científico .....	27
4. CONCLUSÃO .....	36
5. PERSPECTIVAS .....	37
6. REFERÊNCIAS .....	38

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação está estruturada em seções dispostas em: Introdução, Objetivos, Artigo Científico, Conclusões, Perspectivas e Referências.

Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos resultados e Referências encontram-se inseridos no artigo contido na seção **ARTIGO CIENTÍFICO**, representando a íntegra deste estudo.

As **REFERÊNCIAS (ITEM 6)** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Dependência e psicoestimulantes**

Antes do século XIX o uso de drogas psicoativas era considerada um comportamento depravado, em que os usuários tinham “livre arbítrio de decidir” se consumiam ou não a droga, e quando “optavam” por consumi-la, acabavam por gerar comportamentos “indecentes e pecaminosos” (McKIM, 2004). No entanto, este conceito de conduta comportamental opcional ao uso de drogas é obsoleto desde 2001, quando a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2001) definiu que a dependência química deve ser tratada simultaneamente como doença crônica, podendo ser considerada também um problema social.

A dependência é um quadro caracterizado pelo conjunto de sintomas que indicam o uso compulsivo de uma ou mais substâncias aditivas, ou seja, é um comportamento que foge do controle do indivíduo, o qual manifesta sintomas de disforia, ansiedade e irritabilidade quando é impedido de utilizar tais substâncias (KOOB; Le MOAL, 1997, 2008). Além disso, a incidência à recaída ao uso abusivo de drogas é muito frequente em indivíduos previamente dependentes, sendo geralmente, acompanhada de prejuízos neuropsiquiátricos que envolvem instabilidade emocional, depressão, anedonia, impulsividade, agressividade, déficit de atenção, entre outros (MAJEWSKA, 1996). Por envolver elevados custos médico-hospitalares, marginalização e criminalidade, a dependência a drogas torna-se uma das doenças psiquiátricas mais caras (UHL; GROW, 2004), e conseqüentemente, um gravíssimo problema de saúde pública (POTENZA et al., 2011). Além disso, afeta diretamente os indivíduos usuários e indiretamente seus familiares, bem como a sociedade em geral (UHL; GROW, 2004; VOLKOW et al., 2011).

Recentes estudos permitiram avanços na compreensão da neurobiologia da dependência ao observar que os jogos de azar e a alimentação compulsiva também causam quadros aditivos. Estes estudos mostraram a semelhança entre dependência de drogas, compulsão alimentar/obesidade e o jogo patológico e, por este motivo, tais comportamentos mesmo não sendo drogas de abuso, foram recentemente incluídos dentro do quadro de adição. (FRASCELLA et al., 2010; GRANT et al., 2010).

As anfetaminas foram a classe de substâncias psicoativas sintetizadas pela primeira vez no século XIX, quando sua prescrição médica tinha por finalidade a estimulação do sistema nervoso central (SNC), o alívio da fadiga, como também a facilitação da passagem de ar através das vias aéreas superiores. A partir de 1945, as anfetaminas foram amplamente utilizadas na segunda Guerra Mundial por soldados aliados, alemães e japoneses em vista do aumento da coragem, redução da fadiga e da fome. Tais efeitos eram realmente percebidos por seus usuários que suportavam mais tempo em combates (SILVA, 2002).

Na década de 60, houve uma explosão no consumo de anfetaminas, ocasionando uma “epidemia anfetamínica”, o que levou as organizações de saúde pública a criarem normas que procurassem reduzir seu emprego. Iniciou-se, a partir de então, o controle da comercialização, uma vez que as anfetaminas passaram a ser consideradas drogas psicotrópicas, sendo, portanto, ilegal seu uso sem acompanhamento médico adequado (RIBEIRO; MARQUES, 2002).

O termo anfetamina é utilizado para designar um grupo de substâncias estimulantes do SNC pertencentes à classe das feniletilaminas, com uma substituição de um grupo metila na posição do carbono alfa (Figura 1). Diversas substituições na estrutura química da feniletilamina foram realizadas, dando origem a outras substâncias simpaticomiméticas de ação central (GRAEFF, 1972; YONAMINE, 2004). Apesar destas drogas serem capazes de reduzir o sono, a fadiga e o apetite, são também capazes de aumentar auto-confiança e a capacidade de concentração. Neste sentido, seu uso clínico é altamente restrito, uma vez que têm o poder de desenvolver quadros de grave dependência (KUMAR, 2008; BOUTREL, 2004; QU, 2008; VOLKOW, 2009; GRAEFF, 1989). Mesmo assim, muitos atletas, estudantes, médicos, motoristas e pilotos fazem o uso indiscriminado dessas drogas (CENTRE FOR ADDICTION AND MENTAL HEALTH, 2004). Eles as utilizam em decorrência da propriedade da droga em aumentar a vigília e o estado de alerta por maior período de tempo, otimizando a concentração e o raciocínio (YONAMINE, 2004). Fica claro que os efeitos indesejáveis decorrentes do uso de psicoestimulantes anfetamínicos são desconsiderados por estes grupos, incluindo a elevação da temperatura corporal, da frequência cardíaca e respiratória, a inibição do apetite e conseqüentemente a redução do peso corporal e, em um período mais longo de tempo, sintomas de ansiedade e insônia (MATSUMOTO et al., 2002).

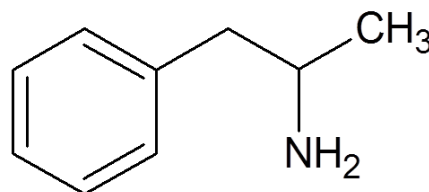
Paradoxalmente, anfetaminas como o metilfenidato são muito utilizadas no tratamento clínico de crianças portadoras da síndrome de hiperatividade e déficit de atenção (THDA) (RITZ et al., 1987; BERMAN et al., 2009). Além disso, outras drogas anfetamínicas



tais como sibutramina, anfepramona, mazindol e femproporex têm sido utilizadas na clínica médica com a finalidade de inibir o apetite e promover o emagrecimento (BELLAYER, et al., 2001; BARONEZA ,et al., 2007). Estas drogas sacietógenas foram banidas da comercialização através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 52/2011, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em outubro de 2011. No entanto, em 2014 a RDC 52/2011 foi invalidado pela RDC 50/2014, a qual permite novamente o a comercialização controlada dos medicamentos anorexígenos acima citados (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. 2014).

Contudo, drogas como a metilendioximetanfetamina (MDMA), um derivado anfetamínico popularmente conhecido como “ecstasy”, a dextroanfetamina e a metanfetamina são frequentemente utilizadas ilícita e indiscriminadamente (LILE et al., 2005; WESTOVER et al., 2008). Estas drogas são frequentemente utilizadas por jovens e adultos com finalidade recreacional devido às suas propriedades psicoestimulantes (GREEN et al., 2003; SCHIFANO, 2004). No entanto, após doses elevadas ou uso prolongado, os psicoestimulantes podem produzir sintomas que incluem aumento psicomotor e potencial de reforço positivo, e em alguns casos, delírios, alucinações, crises de pânico, agressividade intensa, sintomas muito semelhantes aos da esquizofrenia e que podem requerer tratamento psiquiátrico (BELLOT et al., 1997; GRAEFF, 1989; ROTHMAN; BAUMANN, 2003).

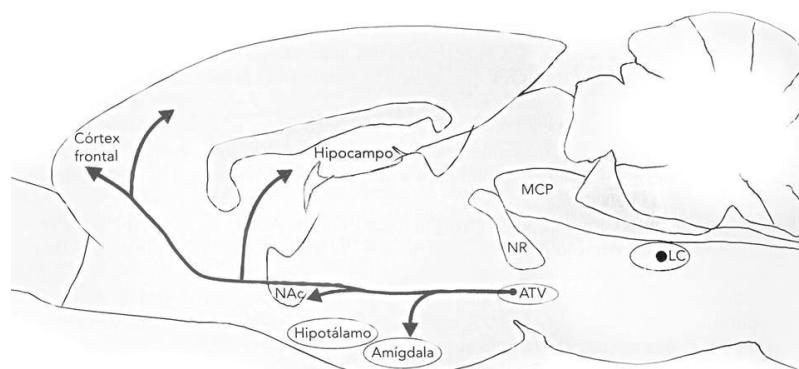
As anfetaminas são rapidamente absorvidas no trato gastrointestinal e penetram livremente pela barreira hematoencefálica, o que explica os efeitos pronunciados sobre o SNC. Além disso, são rapidamente absorvidas pela mucosa nasal, sendo distribuídas na maior parte dos tecidos. Essas substâncias são excretadas principalmente de modo inalterado na urina, havendo aumento na taxa de excreção quando a urina torna-se mais ácida. A meia vida plasmática da anfetamina varia de cinco até trinta horas, o que varia com o fluxo urinário e o pH (RANG et al., 2001).



**Figura 1:** Estrutura química básica da anfetamina. Fonte:

<<http://quimicaintriganteedu.blogspot.com.br/2011/10/presenca-das-aminas-em-nossa-vida.html>>

Hooks et al. (1993) e Robinson; Berridge (1993) relatam que o uso de anfetaminas pode afetar a neuroplasticidade no sistema de recompensa como o *meso-acumbens* dopaminérgico, contribuindo para a dependência. Além disso, já é descrito na literatura que as anfetaminas exercem sua ação estimulante por: I) aumentarem a liberação de monoaminas no SNC, pois atuam como substratos para o transportador de monoaminas e desse modo agem como agonistas indiretos (SULZER et al.,1995); II) impedir a recaptção de neurotransmissores monoaminérgicos e III) inibir a monoaminoxidase (MAO), enzima responsável por degradar as monoaminas. Através destes mecanismos, ocorre um aumento nos níveis de dopamina (DA), serotonina (5-HT) e norepinefrina (NE) na fenda sináptica (HOLMES; RUTLEDGE, 1976). Estas substâncias atuam direta ou indiretamente no sistema neurotransmissor dopaminérgico, o qual desempenha um importante papel no sistema mesocortico-límbico, e que está relacionado com mecanismos de recompensa, motivação e excitação (PETTENUZZO et al., 2008; ACQUAS et al., 2002). Tal sistema origina-se na área tegmental ventral (ATV), situada na extremidade do tronco cerebral projetando-se para o *nucleus acumbens* (NAc), amígdala, córtex pré-frontal, e hipocampo (Figura 2) (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012). Os neurônios dopaminérgicos cumprem a maior parte desta neurotransmissão, estando, conseqüentemente, muito envolvidos no sistema de recompensa (KATZUNG, 2010).



**Figura 2:** Esquema das vias dopaminérgicas mesocortico-límbico no cérebro de rato. Adaptado de GRAEFF; GUIMARÃES, 2012.

O uso abusivo de anfetaminas cresce a uma taxa alarmante e apresenta elevado índice em países que cumprem regras rigorosas contra o uso de drogas ilícitas, como os Estados Unidos (SAMHSA, 2004). Um levantamento realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID, 2010), mostrou que 30% dos estudantes do ensino fundamental e médio consumiram algum tipo de entorpecente entre os meses de agosto a dezembro de 2010, incluindo anfetaminas, MDMA, cocaína e crack. Outro estudo realizado pelo Grupo Interdisciplinar de Estudos de Álcool e Drogas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (GREA FMUSP) mostrou que 89% dos estudantes universitários das 27 capitais brasileiras experimentaram pelo menos uma substância psicotrópica. Dentre as drogas mais relatadas, as anfetaminas aparecem em 3º lugar (12,9%), seguida da cocaína, citada em 7º lugar (CEBRID, 2010).

Outro fator agravante ao uso de drogas psicotrópicas, como as anfetaminas, cocaína e álcool é que, além de serem capazes de provocar dependência, é muito comum que os usuários, uma vez dependentes, retornem a utilizá-las após um período de desintoxicação e abstinência, provocando um quadro denominado recaída. Apesar de ser um fenômeno complexo, diferentes procedimentos experimentais têm sido desenvolvidos a nível laboratorial a fim de reproduzir, em modelos animais, parâmetros que avaliem a recaída ao uso de drogas (GALESI, 2009). Dessa forma, as drogas anfetamínicas constituem uma entidade terapêutica, porém, também são substâncias de abuso, dependendo do contexto do seu emprego (LILE et al. ,2005; WESTOVER et al. 2008).

## **1.2 Estresse oxidativo, defesas antioxidantes e drogas psicoestimulantes**

Espécies reativas (ER) podem ser definidas como átomos, moléculas orgânicas ou inorgânicas capazes de existir sob formas independentes, e que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Podem ser gerados no citoplasma, na mitocôndria ou na membrana celular e, de acordo com o sítio de formação, danificar proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997).

As ER mais importantes são derivadas do oxigênio, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs) e incluem o oxigênio singlete ( $\cdot\text{O}_2$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o radical hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ), o ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o radical

alcoxil ( $\text{LO}^\cdot$ ) e o radical peroxil ( $\text{LOO}^\cdot$ ) (HARMAN, 1999; KRISTAL; YU, 1992). Também merecem destaque as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), representadas por radicais como o óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), o dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\cdot$ ), o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) e o óxido nitroso ( $\text{HNO}_2^\cdot$ ) (HALLIWELL, 2009). As EROs e as ERNs são subprodutos do metabolismo celular e contribuem para os mecanismos pró-oxidantes e danos celulares quando produzidas em excesso (HUANG et al., 2000).

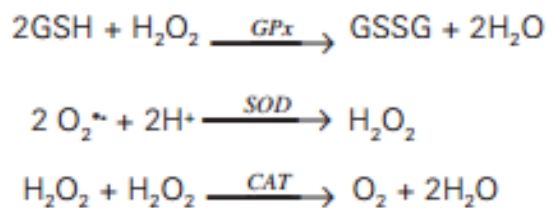
No entanto, o organismo conta com um elaborado sistema antioxidante para metabolizar as ER. Tal sistema é constituído por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (BRIGANTI; PICARDO., 2003; LOPEZ-TORRES et al., 1994). Entre os antioxidantes enzimáticos, a glutatona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) desempenham um papel central. A GPx remove  $\text{H}_2\text{O}_2$  e forma água, convertendo a glutatona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A SOD catalisa a remoção do radical superóxido através da conversão à  $\text{H}_2\text{O}_2$ , enquanto a enzima CAT remove o  $\text{H}_2\text{O}_2$  convertendo-o em água e  $\text{O}_2$  (LOHR et al., 2003) (Figura 3). Entre os não-enzimáticos, podemos citar os compostos sintetizados pelos seres vivos como bilirrubina, ceruloplasmina, melatonina, coenzima Q e ácido úrico; além de outros compostos presentes na dieta como ácido ascórbico, tocoferóis, carotenoides e flavonóides (SCHNEIDER; OLIVEIRA., 2004).

Quando a produção de ER excede a capacidade antioxidante do organismo, resultando no desequilíbrio entre os fenômenos pró-oxidantes e as defesas antioxidantes celulares, gera um quadro denominado estresse oxidativo (EO), que é uma manifestação bioquímica de agressão a biomoléculas e está associado a diversas complicações cardiovasculares, neurológicas, endócrinas e musculares, entre várias outras (VAZIRI, 2004). Tal fenômeno pode levar à degradação da membrana, disfunção celular, danos ao DNA e apoptose (FREY et al. 2006; HALIWELL, 2006). Além disso, o cérebro, devido a sua alta taxa metabólica, associada à concentração elevada de ácidos graxos e metais de transição é especialmente vulnerável aos efeitos nocivos das ER (REYNOLDS et al., 2007). Adicionalmente, o SNC apresenta baixas concentrações de antioxidantes e capacidade reduzida de regeneração, reforçando sua susceptibilidade ao ataque de ER (REYNOLDS et al., 2007; LOHR et al., 2003; FLOYD, 1999).

Os peróxidos lipídicos e seus produtos de metabolismo, como o malondialdeído, podem afetar direta ou indiretamente muitas funções essenciais para a homeostase das células e dos tecidos. Como consequência, o aumento da peroxidação da membrana lipídica pode evocar uma resposta imune e inflamatória, ativar a expressão gênica, a proliferação celular ou iniciar a apoptose. Consequentemente, há uma estreita relação entre a produção de EROs, o

prejuízo da defesa antioxidante, o dano peroxidativo da membrana celular e os processos inflamatórios ou patológicos degenerativos (BRIGANTI; PICARDO, 2003).

Neste sentido, Sulzer et al. (2005) observaram que a anfetamina, por ser uma droga simpaticomimética indireta, aumentaria significativamente a concentração de DA a partir dos transportadores neuronais de DA (DAT) pré-sinápticos. O DAT é o principal responsável pelo término da transmissão dopaminérgica, pois faz a recaptação da DA novamente ao terminal neuronal. Este aumento de DA elevaria conseqüentemente a desaminação oxidativa, catalisada pela MAO, bem como sua auto-oxidação. Tal metabolismo leva à formação de  $H_2O_2$  e dopamino-quinonas, que ao reagir com metais de transição, podem ser convertidos a radical hidroxil, via reação de Fenton (GRAHAM, 1978), radicais capazes de iniciar processos oxidativos em lipídios e proteínas, culminando em dano celulares (FINKEL; HOLBROOK, 2000; VALKO et al., 2007).



**Figura 3.** Ação das enzimas antioxidantes no processo de combate a ER. Adaptado de SCHNEIDER; OLIVEIRA., 2004

### 1.3 A atividade física como um adjuvante na prevenção e tratamento da adição à psicoestimulantes

A eficácia da atividade física regular na prevenção de doenças crônicas é bem descrita. Diversos estudos relatam os benefícios do exercício físico a longo prazo na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes melito, hipertensão, câncer, obesidade, artrite e depressão (MORA et al., 2007; OMS, 1994; BARBANTI, 1990). Especialmente em jovens, a prática de exercícios físicos gera resultados positivos como adoção de uma dieta saudável, desestimula o uso de tabaco, álcool e outras drogas, além reduzir a violência e promover integração social (OMS, 1994).

A prática de exercício físico regular, em casos de ex-usuários e usuários de drogas, pode criar uma rede de cooperação proporcionando o encontro para praticar esportes e manter a união entre os pares (MIALICK, 2008). Este tipo de atividade favorece o melhoramento das habilidades psicológicas, físicas e sociais e tem sido considerado um método alternativo relacionado com a redução do consumo de drogas (COSGROVE et al., 2002). Segundo Campersen et al. (1985), a atividade física é definida como qualquer movimento corporal realizado pela musculatura esquelética, que leve a um gasto energético acima do repouso. Além disso, é reconhecida como um importante componente de um estilo de vida saudável, sendo recomendada por médicos e especialistas (DONALDSON, 2000). Neste sentido, os efeitos de uma atividade física moderada e regular se mostram promissores em diversas desordens neurológicas, cuja fisiopatologia está relacionada ao EO (SALIM et al., 2010).

A atividade física regular tem a capacidade de aumentar a auto-estima (MORGAN, 1982; WAADE, 2004), bem-estar (NORRIS et al., 1990, 1992; MULLER et al., 2006) e diminuir incidência de depressão (VEALE et al., 1992; DUNN et al., 2005) e ansiedade (ANTUNES et al., 2005; MANGER e MOTTA, 2005). Além disso, o exercício físico exerce efeitos neuroprotetores, principalmente pela redução de lesões cerebrais e por retardar o aparecimento de diversas doenças neurodegenerativas (HOWELLS et al., 2005; KIRALY; KIRALY, 2005; SUTOO; AKIYAMA, 2003).

Estudos apontam que as ER têm sido relacionadas a doenças neurológicas e ao declínio cognitivo observado no envelhecimento, o que sugere seu importante papel nas funções cerebrais (AHLEMEYER; KRIEGLESTEIN, 2000; CADET; BRANNOCK, 1998). A atividade física regular parece estimular o estado redox do cérebro e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, atenuando a formação de ER e melhorando, assim, as funções fisiológicas e a resistência ao EO (RADAK et al., 2001; RADAK; CHUNG; GOTO, 2005), mesmo se realizado de forma intensa (OGONOVSKY et al., 2005). Além disso, evidências mostram que o exercício físico espontâneo pode aumentar os níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, do inglês, Brain Derived Neurotrophic Factor), uma neurofina responsável pela diferenciação, crescimento e sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, colinérgicos e noradrenérgicos durante a vida adulta (MATTSON, 2004; SCHUMAN, 1999; NEEPER, 1996) e sinapsina I, cujo papel é auxiliar a liberação de vesículas sinápticas (VAYNMAN, 2004) no hipocampo (HICKS, et al., 1998; GRIESBACH et al., 2007).

O hipocampo é uma região cerebral pertencente ao sistema meso-límbico e como citado anteriormente, esta região está estreitamente relacionada à dependência (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012) e conseqüentemente geração de ER provocadas pelo uso de

psicotrópicos. Há alguns anos acreditava-se que regiões cerebrais como o hipocampo não possuíam capacidade de regeneração (Van PRAAG, et al., 1999). Já se sabe que algumas regiões do cérebro, como a zona sub-granular do giro denteado desta região são passíveis de neurogênese (ZHAO, et al., 2008). Ainda, estes processos que geram novos neurônios bem como a complexidade dendrítica e a sinaptogênese estão aumentados após sessões de atividade física no giro denteado hipocampal (CHRISTIE, 2006; REDILA et al., 2006).

Nesse sentido, o exercício físico promove um aumento da plasticidade e melhora a funcionalidade cerebral normal e comprometida (COTMAN; BERCHTOLD, 2002; SUTOO; AKIYAMA, 2003). Ademais, um recente estudo realizado com ratos em nosso laboratório mostrou que o exercício físico aeróbico regular e sistemático é capaz de modular o sistema de recaptação pré-sináptica de DA em situações de desequilíbrio causado por drogas e/ou patologias (TEIXEIRA et al., 2011).

Lima et al. (2009) mostraram a capacidade do exercício físico em prevenir a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, e reduzir a inibição da enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase na região do córtex, induzidas por modelo experimental de trauma cerebral. A enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, nas membranas cerebrais, é responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico transmembrana, podendo afetar diretamente a liberação de neurotransmissores e atividade neural (LI; STYS, 2001).

Desse modo, já é bem estabelecido que o exercício físico tem a capacidade de aumentar a autoestima, bem-estar e diminuir índices de depressão, além de exercer efeitos neuroprotetores. Entretanto, poucos relatos mencionam a influência do exercício físico sobre a reincidência ao uso de drogas anfetamínicas após um período de abstinência com posterior exposição à droga. Tendo em vista o crescente índice de abuso de psicoestimulantes, este estudo torna-se de fundamental importância, pois irá avaliar a influência do exercício físico sobre a recaída ao abuso destas drogas em modelo de preferência condicionada de lugar induzido por anfetamina.

#### **1.4 Preferência condicionada de lugar a psicoestimulantes**

Experimentalmente, os psicoestimulantes aumentam a atividade locomotora e exploratória e são facilmente auto-administrados pelo seu potente efeito aditivo ou de reforço

(GRAEFF, 1989). A exposição repetida à anfetamina tem sido experimentalmente empregada como um modelo animal de alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por psicoestimulantes em ratos (CAMP; De JONGHE; ROBINSON, 1997; FREY et al., 2006; KAUER-SANTÁNNA et al., 2007). Tal exposição causa sensibilização comportamental (PELEG-RABSTEIN et al., 2009), além de promover modificações neuroquímicas e estruturais em diferentes regiões cerebrais (ROBINSON; KOLB, 2004).

Os efeitos de recompensa induzidos por drogas de abuso têm sido avaliados através da preferência condicionada de lugar (PCL) (CRUZ et al., 2008), que consiste em um aparato utilizado para promover condicionamento através de pistas. Esse paradigma é baseado na habilidade do animal em encontrar pistas associadas com a droga para descobrir o local de preferência e possui importantes implicações na busca de drogas e recaídas em humanos (NEISEWANDER; PIERCE; BARDO, 1990). A PCL envolve o pareamento repetido de um compartimento com um estímulo específico (droga), enquanto o compartimento oposto é pareado com um estímulo neutro (veículo da droga). O dia do teste ocorre após o condicionamento e na ausência dos estímulos, é permitido ao animal acesso livre aos compartimentos. Um maior tempo de permanência no compartimento pareado anteriormente com a droga indica a preferência do animal pela droga, enquanto o menor tempo indica aversão (TZCHENTKE, 1998; 2007).

Como mencionado anteriormente, as drogas psicoestimulantes como a anfetamina induzem à dependência, recaída e também a formação de ER. Por outro lado, a prática de exercício físico regular e contínuo é importante para manter as funções cerebrais saudáveis, pois reduz os danos oxidativos nessas regiões, conforme demonstrado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa. Neste sentido, a realização deste estudo torna-se relevante, uma vez que poderá determinar se o exercício físico exerce influência comportamental e bioquímica sobre a recaída em indivíduos previamente condicionados ao uso de anfetamina.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência do exercício físico aeróbico, regular e contínuo sobre parâmetros comportamentais de preferência e recaída, sintomas de ansiedade e status oxidativo da região do hipocampo em ratos condicionados com anfetamina.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Expor ratos à anfetamina em paradigma de PCL à droga;
- ✓ Verificar a influência do exercício aeróbico, físico regular e contínuo sobre a recaída após re-exposição à anfetamina;
- ✓ Verificar a influência do exercício físico aeróbico, regular e contínuo sobre comportamentos de ansiedade em ratos previamente expostos à anfetamina;
- ✓ Determinar marcadores de status oxidativo cerebral, na região do hipocampo, em ratos expostos à anfetamina e submetidos à atividade física aeróbica, regular e contínua, com posterior re-exposição à droga;
- ✓ Avaliar a relação entre as alterações comportamentais e o status oxidativo cerebral em ratos expostos à anfetamina e submetidos à atividade física aeróbica, regular e contínua, com posterior re-exposição à droga.

### **3 MANUSCRITO CIENTÍFICO**

Os resultados inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de artigo científico, o qual se encontra aqui estruturado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências, encontram-se no próprio artigo, o qual está disposto na mesma forma em que foi publicado.

### 3.1 Artigo Científico

## EXERCISE MODIFIES AMPHETAMINE RELAPSE: BEHAVIORAL AND OXIDATIVE MARKERS IN RATS

H.J. Segat, M. Kronbauer, Kr. Roversi, A.J. Schuster, L.T. Vey, K. Roversi, C.S.  
Pase, C.T.D. Antoniazzi, M.E. Burger

Periódico: Behavioural Brain Research

Status: Publicado

## Licença da Elsevier para a utilização deste conteúdo publicado

### Review Order

Please review the order details and the associated [terms and conditions](#). To edit billing or contact information please click on 'account info' at the top of this page.

Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Behavioural Brain Research
Licensed content title	Exercise modifies amphetamine relapse: Behavioral and oxidative markers in rats
Licensed content author	H.J. Segat, M. Kronbauer, Kr. Roversi, A.J. Schuster, L.T. Vey, K. Roversi, C.S. Pase, C.T.D. Antoniazzi, M.E. Burger
Licensed content date	1 April 2014
Licensed content volume number	262
Licensed content issue number	n/a
Number of pages	7
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS DE DEPENDÊNCIA E RECAÍDA EM RATOS EXPOSTOS À ANFETAMINA: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS
Expected completion date	Feb 2015
Estimated size (number of pages)	46
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
Total	0.00 USD



Contents lists available at ScienceDirect

## Behavioural Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)

## Research report

## Exercise modifies amphetamine relapse: Behavioral and oxidative markers in rats

H.J. Segat<sup>a</sup>, M. Kronbauer<sup>a</sup>, Kr. Roversi<sup>c</sup>, A.J. Schuster<sup>c</sup>, L.T. Vey<sup>c</sup>, K. Roversi<sup>c</sup>, C.S. Pase<sup>b</sup>, C.T.D. Antoniazzi<sup>b</sup>, M.E. Burger<sup>a,b,c,\*</sup><sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica-Universidade Federal de Santa Maria-UFSM-RS, Brazil<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia-Universidade Federal de Santa Maria-UFSM-RS, Brazil<sup>c</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia-Universidade Federal de Santa Maria-UFSM-RS, Brazil

## HIGHLIGHTS

- Rats developed preference and relapse to amphetamine (AMPH).
- AMPH increased intensified anxiety-like symptoms related to abstinence.
- AMPH increased oxidative damages and modified enzymes activity in hippocampus.
- Exercise reduced AMPH-relapse and anxiety-like symptoms after re-exposure to drug.
- Exercise increased enzymes activity and prevented oxidative damages in hippocampus.

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 November 2013

Received in revised form 6 January 2014

Accepted 10 January 2014

Available online 18 January 2014

## Keywords:

Relapse  
Psychostimulants  
Amphetamine  
Physical exercise

## ABSTRACT

Exercise has been reported to attenuate rewarding symptoms related to addictive drugs mainly by affecting the brain neuroplasticity and neurotransmission. In this study, we investigated the influence of physical exercise on the behavioral and enzymatic status related to drug relapse in rats. Animals were primarily treated with amphetamine (AMPH; 4.0 mg/kg, i.p.) or vehicle (C; NaCl 0.9% solution) in the conditioned place preference (CPP) paradigm for 14 days. Half of each experimental group was then submitted to swimming sessions (60 min/day, 5 days/week) for 5 weeks. Animals were re-exposed to AMPH- or vehicle-CPP paradigm for another 3 days, in order to observe drug relapse and anxiety-like symptoms, which were observed 24 h after AMPH reconditioning in CPP, and elevated plus maze (EPM), respectively, and brain biochemical evaluations were carried out subsequently. While AMPH was related to place preference and anxiety, indicating drug addiction and abstinence symptoms, respectively, physical activity was able to prevent relapse symptoms after AMPH reconditioning, as observed through consecutive decreased CPP and anxiety-like symptoms. In addition, AMPH exposure increased reactive species (RS) generation and protein carbonyl (PC) levels together with decreased activity of catalase- and Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase in hippocampus. On the other hand, while all AMPH-induced effects were prevented by physical activity, there was a negative correlation between PC levels ( $r=0.65$ ;  $p<0.003$ ) and CAT activity, and a positive correlation between RS generation and PC levels ( $r=0.54$ ;  $r=0.52$ ,  $p<0.05$ ) with AMPH-CPP after exercise. These results indicate that exercise has a clear beneficial influence on the prevention of psychostimulant drug relapse.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Physical exercise has been associated with different health benefits, including increased self-esteem and well-being and reduced

incidence of anxiety and depression [1]. Together, these factors are able to retard the progress of degenerative diseases, thus ameliorating brain plasticity and the cognitive process [2]. Recently, studies of our group have shown the beneficial influence of moderate exercise on movement disorders [3], anxiety-like symptoms and memory acquisition [4], besides modulating the dopamine transporter (DAT) activity in rat striatum [5]. So far, different studies have shown beneficial influences of exercise on the prevention and reversal of addiction [6], but few studies into relapse and abstinence symptoms of psychostimulants like AMPH have been performed.

\* Corresponding author at: Centro de Ciências da Saúde Programa de Pós-Graduação em Farmacologia 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Tel.: +21 55 3220 8342.

E-mail addresses: [mariliseeb@yahoo.com.br](mailto:mariliseeb@yahoo.com.br), [marilise.escobar@pq.cnpq.br](mailto:marilise.escobar@pq.cnpq.br) (M.E. Burger).

Drug dependence is a serious problem of public health for which treatment options are scarce, making physical exercise an economical and promising tool. Psychostimulant drugs have been widely used around the world and their effects include increased attention, motivation and well-being [7]. In this context, amphetamine-like (AMPH) drugs are psychostimulant agents clinically used to treat narcolepsy, morbid obesity [8], and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) [9]. On the other hand, AMPH-like drugs, represented by methamphetamine and methylene-dioxy-methamphetamine (MDMA or “ecstasy”) are illicit, whose recreational use has increased alarmingly, causing serious concerns due their association with positive reinforcement, tolerance and dependence [10].

Biochemically, AMPH is able to increase the neurotransmission in the central nervous system (CNS), facilitating processes of monoamine release and re-uptake, leading to increased extracellular levels of dopamine (DA), serotonin (5-HT) and nor epinephrine (NE) [11]. High doses or continued administration of AMPH is related to psychosis-like symptoms such as disordered thinking, anxiety and restlessness, besides stereotyped behavior [12]. On the other hand, the withdrawal of this substance is frequently related to loss of interest or pleasure in common life rewarding stimuli [13]. Experimentally, discontinuation of AMPH administration after its chronic use is related to anxiety-like and depressive behaviors. Even after long periods of abstinence, psychostimulant drugs are associated with high relapse rates upon re-exposure to drug [14], reinforcing its high addictive power. Indeed, relapses to psychostimulant drugs have been related to different factors, including drug priming, environmental cues and stress, which can be reflected on specific brain areas, including hippocampus [15], amygdala, orbit- and pre-frontal cortex, nucleus accumbens and pallidum. All these brain areas are essentially innervated by dopaminergic projections, whose changes involve adaptive conditions that occur in addiction [16]. Of particular importance, the hippocampus is primarily stimulated by monoamines such as dopamine (DA), whose release may be significantly increased by AMPH. In fact, this drug is able to partially inhibit monoamine oxidase (MAO) activity, contributing to accumulation of DA and other monoamines in the synaptic cleft. This excess of monoamines has been described as pivotal in drug rewarding symptoms, which are related to pleasure and euphoria, whereupon dopamine (DA) plays a critical role [17].

Conditioned place preference (CPP) is an animal model commonly used to study the reinforcement and relapse of addictive drugs such as AMPH [18]. In this model, animals are previously conditioned with an abuse drug in the non-preferred compartment of the apparatus. After some days of conditioning, this stimulus is used to estimate the preference and relapse for the drug, which may be related to reinforcement symptoms and dependence reinstatement [19]. For this, CPP paradigm was used to quantify the amphetamine-preference and relapse, while the elevated plus maze (EPM) was used to evaluate fear- and anxiety-like symptoms, which have been related to drug abstinence [18]. Thus, the present study was developed to evaluate the influence of chronic and moderate physical exercise on withdrawal and relapse symptoms after AMPH conditioning.

## 2. Methods

### 2.1. Animals and experimental procedure

Twenty adult male Wistar rats weighing  $350 \pm 50$  g, from the breeding facility of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil, were kept in Plexiglas cages with free access to food and water in a room with controlled temperature ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and

on a 12 h light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m., following international norms of animal care and maintenance.

### 2.2. Drugs and solutions

D,L-Amphetamine (Merck, Germany) 4 mg/mL, was used according to Kuhn et al. [18].

### 2.3. Conditioned place preference (CPP) paradigm

CPP is an animal model used to evaluate hedonic reinforcement effects of drug. It uses a three-compartment box separated by manual guillotine doors: two compartments of equal size ( $45 \text{ cm} \times 45 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ ) with equivalent intensity of light but different visual clues: one with a white floor and striped walls, and the other with a striped floor and smooth white walls. These two compartments converge to a third smaller compartment. The apparatus was cleaned with alcohol 20% using wet sponge and paper towel before the introduction of each animal. On day 1, rats were kept for 15 min in each compartment for habituation; on day 2 we performed the pre-test, which consists in letting the animal freely choose one of the compartments for 15 min. On the next 14 days, animals were conditioned with D,L-amphetamine (4.0 mg/kg, i.p.) for 25 min in the non-preferred compartment, and with vehicle in the preferred compartment, with an interval of 4 h between each administration. After this conditioning phase, on the testing day, rats were placed in the common compartment with free access to both compartments. Time spent in the drug-paired environment was interpreted as preference, whereas time spent away from that environment was interpreted as aversion [18]. After 5 weeks of training (described below), the animals were submitted to more three days of AMPH reconditioning in CPP, which was followed of an additional test of drug preference as described above. Relapse symptoms were quantified by the higher time spent in the drug-paired environment in this second drug exposure (adapted from Cruz et al. [19]).

### 2.4. Exercise protocol

After 14 days of drug conditioning, the exercise group were subjected to a swimming protocol in a plastic container (diameter 180 cm  $\times$  depth 45 cm) under continuous supervision, with water temperature set to  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ , for 1 h per day (two 30 min sessions with a 10 min rest interval), five times per week for 5 weeks (adapted from Teixeira et al. [5]). During the interval, the animals were kept on a platform that allowed them to rest without leaving the water (adapted from Teixeira et al. [5]).

### 2.5. Elevated plus maze (EPM)

To evaluate the influence of exercise on anxiety-like symptoms, animals were observed in the EPM, which is based on the innate fear rodents have for open and elevated spaces [20]. The apparatus consists in a platform elevated 50 cm from the floor. Forty-centimeter (40 cm) high walls enclose two opposite arms ( $50 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ ) whereas the other two arms have no walls. All of the arms have a central intersection ( $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ ). At the beginning of the test, the rat was placed in central intersection facing the open arm. Time spent in the closed arms, head dipping frequency in the open arms and entries number in both closed and open arms (number of total entries) were quantified for 5 min in the EPM.

### 2.6. Biochemical measurements

Twenty-four hours after behavioral evaluations, animals were anesthetized with sodium thiopental, 50 mg/kg, i.p.) and



**Fig. 1.** Experimental design: after basal behavioral evaluation (pre-test), animals were treated with AMPH in CPP paradigm for 14 days, when the 1st behavioral evaluation was performed. Subsequently, animals were submitted to the swimming protocol (1 h per day, 5 days per week) for 5 weeks ( $n = 5$ ), which was followed by another 3 days of AMPH conditioning. 24 h after the last AMPH administration, animals were re-exposed to CPP evaluation and EPM, in order to observe relapse and anxiety-like behaviors, respectively. Behavioral evaluations were followed by biochemical analysis (oxidative status) in hippocampus. Abbreviations: AMPH: amphetamine; CPP: conditioned place preference; EPM: elevated plus-maze.

euthanized by exsanguinations. Brains were immediately removed and cut coronally at the caudal border of the olfactory tubercle, and the hippocampus was dissected out, homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for biochemical evaluations.

#### 2.6.1. Reactive species (RS) generation with DCH (dichlorofluorescein-reactive species, DCH-RS)

RS levels were measured using the oxidant sensing fluorescent probe, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) [21]. The oxidation (DCHF-DA) to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was determined at 488 nm for excitation and 525 nm for emission. After homogenization of hippocampus in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 and centrifuged (15 min, 3,500 rpm), 3 mL of the same buffer was added. After 10 s, 10  $\mu$ M (DCHF-DA) (prepared in ethanol) was added to the mixture, and the fluorescence intensity from DCF was measured for 300 s and expressed as a percentage of the untreated control group. The protein content was normalized by quantification according to Lowry et al. [22].

#### 2.6.2. $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase activity

$\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase activity was determined in hippocampus according to the method proposed by Muszbeck et al. [23] with some modifications. The method for ATPase activity measurement was based on determination of the inorganic phosphate (Pi) released to the reaction medium by hydrolysis of the ATP. The reaction was started with the addition of ATP to the reaction medium and was finished by the addition of the color reagent (1 mL) containing ammonium molybdate (2%), Triton X-100 and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10%) after 15 min of incubation at 37 °C. The formed molybdate-Pi complexes were measured spectrophotometrically at 405 nm. Values were calculated in relation to a standard curve constructed with Pi at known concentrations and also corrected by the protein content [22].

#### 2.6.3. Catalase (CAT) activity

CAT activity was spectrophotometrically quantified by the method of Aebi [24], which involves monitoring the disappearance of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the presence of cell homogenate (pH 7 at 25 °C) at 240 nm for 120 s. The enzymatic activity was expressed in  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$  tissue.

#### 2.6.4. Protein carbonyl determination

The oxidative damage to proteins was assessed in the hippocampus by determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) [25]. Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and re-dissolved in DNPH. The quantification of protein carbonyls in the samples was determined in the absorbance of 370 nm.

#### 2.7. Statistical analysis

CPP data before exercise protocol were analyzed by Student's *t* test. For all other analysis, two-way ANOVA followed by Duncan's tests were used (Software package Statistica 8.0 for Windows).

Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant for all comparisons made. Power analyses sample calculation (Manova-Two-way; Statistica software) was carried out in order to verify the balance between the number of subjects, the larger of the observed effect and the required alpha value (Fig. 1).

### 3. Results

#### 3.1. Behavioral evaluations

##### 3.1.1. The development of preference for AMPH evaluated in conditioned place preference (CPP) is shown in Fig. 2

The behavioral evaluation performed before the exercise protocol showed that AMPH-treated animals remained longer in the drug-conditioned place than did the vehicle group, which did not show place preference ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2A).

After exercise, two-way ANOVA revealed a significant main effect of drug and exercise [ $F(1,16) = 25.85$  and  $20.27$ ;  $p < 0.05$ ], respectively, and a significant drug  $\times$  exercise interaction [ $F(1,16) = 9.001$ ,  $p < 0.05$ ]. Post-hoc test revealed that AMPH conditioning increased the time spent in the drug-conditioned place of both sedentary and exercise groups; however, exercise was able to reduce this time in comparison to the sedentary group. In fact, between vehicle-injected groups, both sedentary and exercised animals showed no differences in the place preference parameters (Fig. 2B).

##### 3.1.2. Anxiety-like symptoms evaluated in EPM (Fig. 3)

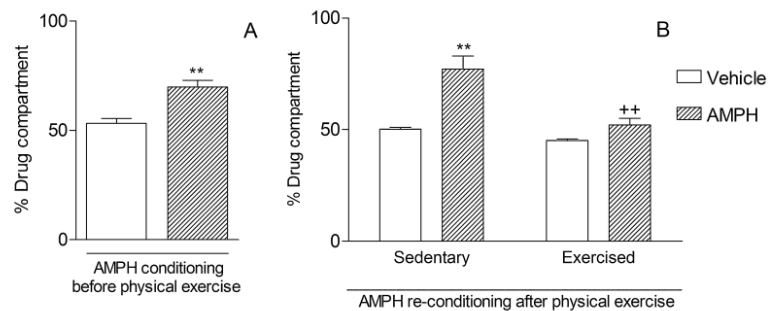
Two-way ANOVA of time in the closed arms of EPM revealed a significant main effect of drug and exercise [ $F(1,16) = 78.31$  and  $6.80$ ;  $p < 0.001$ ], respectively, and a significant drug  $\times$  exercise interaction [ $F(1,16) = 43.41$ ,  $p < 0.001$ ].

Duncan's test showed that in sedentary animals, AMPH increased the time spent in closed arms, while this effect was not observed in the exercise groups. In fact, exercise was able to reduce this AMPH-induced anxiety marker as compared to the sedentary group (Fig. 3A).

Two-way ANOVA of the number of entries into open arms of EPM revealed a significant drug  $\times$  exercise interaction [ $F(1,16) = 7.21$ ,  $p < 0.05$ ]. Post-hoc test indicated that AMPH treatment was able to reduce the number of open arms entries in sedentary rats only. In fact, between exercised groups, this behavioral parameter was similar across AMPH- and vehicle-injected groups, but it was higher in sedentary animals exposed to AMPH conditioning (Fig. 3B).

Two-way ANOVA of head dipping frequency in EPM revealed a significant drug  $\times$  exercise interaction [ $F(1,16) = 6.25$ ,  $p < 0.05$ ]. Post hoc test showed that AMPH reduced head dipping frequency in sedentary rats, but this effect was not observed in the exercised group (Fig. 3C), where it was higher than in sedentary animals exposed to AMPH conditioning.

No influence of AMPH or exercise on number of entries in both open and closed arms of EPM was observed (Fig. 3D).



**Fig. 2.** Drug preference behavior induced by amphetamine (AMPH, 4 mg/kg for 14 days), which was observed in CPP paradigm (Fig. 2A). Thereafter, rats were submitted to swimming (1 h per day, five days per week) for 5 weeks, followed by 3 additional days of AMPH exposure in the same CPP paradigm (Fig. 2B). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* ( $p < 0.001$ ) indicates a significant difference from vehicle-injected group in the same physical activity; \*\* ( $p < 0.001$ ) indicates a significant difference from sedentary group in the same treatment.

### 3.2. Biochemical evaluations

#### 3.2.1. Estimation of reactive species (RS) generation and protein carbonyl (PC) levels in hippocampus (Fig. 4)

Two-way ANOVA revealed a significant main effect of drug and exercise [ $F(1,16) = 7.11$  and  $8.43$ ;  $p < 0.05$ , respectively] on ROS generation and a significant main effect of drug [ $F(1,16) = 28.32$ ;  $P < 0.001$ ] and drug  $\times$  exercise interaction [ $F(1,16) = 79.13$ ;  $p < 0.001$ ] on PC levels, respectively.

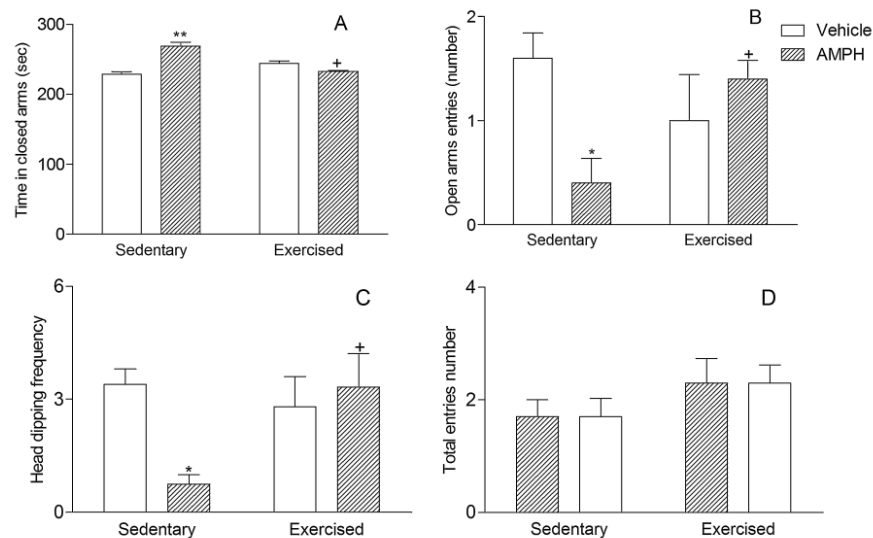
Hippocampal RS generation was increased by AMPH in sedentary but not in exercised animals. Indeed, exercise was able to reduce RS generation in AMPH-treated animals, whose PC levels were similar to those of the control group (Fig. 4A). AMPH treatment increased PC levels in hippocampus of sedentary animals, which were lower in exercised animals. Indeed, exercise showed influence per se on PC levels, as observed by increased PC levels in hippocampus of the vehicle-injected group and decreased PC levels in hippocampus of the AMPH-treated group (Fig. 4B).

#### 3.2.2. Estimation of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ activity and catalase (CAT) activity in hippocampus (Table 1)

Two-way ANOVA revealed a significant main effect of exercise [ $F(1,16) = 11.59$ ;  $p < 0.05$ ] and a significant drug  $\times$  exercise interaction [ $F(1,16) = 11.35$ ;  $p < 0.05$ ] on  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  activity. A significant interaction between drug  $\times$  exercise was also observed [ $F(1,16) = 12.98$ ;  $p < 0.05$ ] in CAT activity.

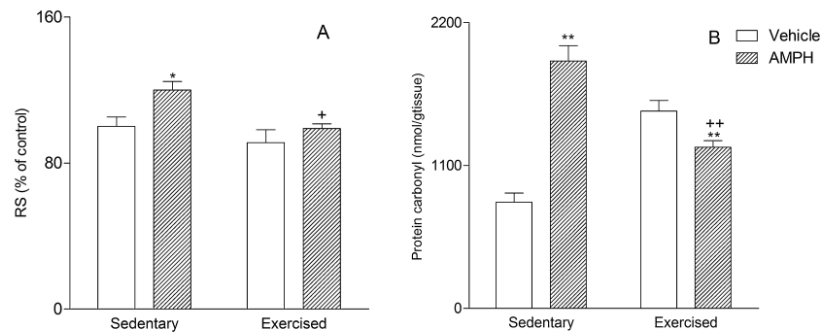
Duncan's test indicated that AMPH conditioning decreased both  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  and CAT activity in hippocampus when compared to control group. Exercise restored these activities, which were similar to those in non-conditioned groups (Table 1).

Statistical analyses revealed a significant positive correlation between RS generation ( $r = 0.54$ ,  $p = 0.013$ , Fig. 5A) and PC levels in hippocampus ( $r = 0.52$ ,  $p = 0.016$ , Fig. 5B) with AMPH-CPP after exercise protocol. On the other hand, regression analyses between PC levels and CAT activity in hippocampus ( $r = 0.65$ ,  $p = 0.0025$ , Fig. 5C) revealed a significant negative correlation.



**Fig. 3.** Influence of physical exercise on elevated plus maze (EPM) task, performed 24 h after the last amphetamine (AMPH) injection. Animals were conditioned with AMPH (4 mg/kg, i.p.) for 14 days, and sequentially submitted to swimming (1 h per day, five days per week) for 5 weeks, followed by another 3 days of AMPH administration. Anxiety-like symptoms were evaluated by time spent in the closed arms (A), number of entries in the open arms (B), and head dipping frequency (C). The total number of entries in both closed and open arms (D) was indicative of the locomotor status. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ) Indicates a significant difference from vehicle-injected group in the same physical activity; + ( $p < 0.05$ ) indicates a significant difference from sedentary group in the same treatment.





**Fig. 4.** Influence of physical exercise on the oxidative status in hippocampus of rats conditioned with amphetamine (AMPH; 4 mg/kg, i.p.) for 14 days. Animals were sequentially submitted to swimming (1 h per day, five days per week) for 5 weeks, followed by another 3 days of AMPH administration. (A) Reactive species (RS) generation; (B) protein carbonyl (PC) levels. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ) indicates a significant difference from vehicle-injected group in the same physical activity; + ( $p < 0.05$ ), ++ ( $p < 0.001$ ) indicates a significant difference from sedentary group in the same treatment.

**Table 1**

Influence of the physical exercise on the catalase (CAT) ( $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g tissue}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) and  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  ( $\text{nmol pi/mg protein/min}$ ) activities in the hippocampus of rat exposed to AMPH.

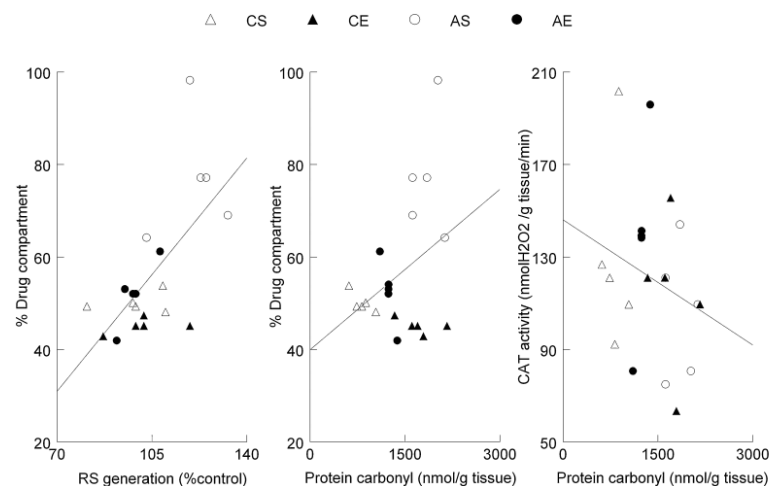
	Sedentary		Exercised	
	Vehicle	AMPH	Vehicle	AMPH
CAT	150.98 $\pm$ 7.81	86.43 $\pm$ 6.04**	122.45 $\pm$ 8.99	126.30 $\pm$ 15.23*
$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$	124.02 $\pm$ 3.49	84.49 $\pm$ 10.25*	124.37 $\pm$ 8.42	150.39 $\pm$ 13.78***

Data means  $\pm$  S.E.M.; \* ( $p < 0.05$ ); \*\* ( $p < 0.001$ ) indicates difference between treatments in same physical activity. \* ( $p < 0.05$ ); \*\* ( $p < 0.001$ ) indicates difference between physical activity in the same treatment.

#### 4. Discussion

In the present study we observed that: (i) AMPH-conditioning increased AMPH-CPP of sedentary rats; (ii) Five weeks of physical activity after AMPH-conditioning with subsequent re-exposure to AMPH prevented relapse symptoms, as observed by longer time in the drug-conditioned compartment; (iii) Exercise was also able to prevent anxiety-like symptoms related to drug abstinence, as observed by longer time spent in the closed arms and fewer entries and head dipping in the open arms of EPM. Indeed, these findings

cannot be considered a locomotor artifact, because the experimental groups showed similar entries number in both closed and open arms of the EPM [26]. Furthermore, the reduced emotionality observed in the exercised groups confirms the effectiveness of this innovative swim protocol [5], whose execution includes rest intervals. We believe that these rest intervals may have contributed to a smaller development of stress, which can be observed in swimming protocols continues. While several studies have shown beneficial influences of exercise on drug addiction, data about drug relapses are scarce. In this sense, Carroll et al. [27] reported that one year



**Fig. 5.** Correlations between amphetamine (AMPH) preference and both reactive species (RS) generation (A) and catalase (CAT) activity (B), as well as between protein carbonyl (PC) levels and CAT activity (C), which were quantified in the hippocampus. Animals were conditioned with AMPH (4.0 mg/kg for 14 days) followed by 5 weeks of swimming (1 h per day; 5 days per week), and re-exposed to AMPH for another 3 days. (Statistical analysis revealed the following  $P$  significance levels for the  $r$ -values were 0.54 ( $p = 0.013$ ); 0.52 ( $p = 0.016$ ) and 0.65 ( $p = 0.002$ ) respectively.)

after initiating detoxification treatment, 70% of the patients presented drug relapse, confirming that pharmacotherapy alone is not sufficient to treat addiction [28]. In this context, the CPP paradigm may be understood as involving different steps, namely acquisition, expression, extinction and reinstatement, and therefore can be considered as a reliable measure of drug reward [19]. In this study, AMPH induced CPP, causing also reinstatement to this preference five weeks after its extinction, while exercise could prevent both CPP and drug relapse. Interestingly, Bannerman et al. [29] observed that AMPH withdrawal was related to decrease of neurogenesis in ventral dentate gyrus, which has a major role in fear and anxious behaviors. Similarly, in this study, re-exposure to AMPH was associated with increased fear and anxiety in the animals, while 5 weeks of exercise prevented such behaviors without interfering with the locomotor activity, which was unaltered in the EPM paradigm. In this sense, physical exercise may be considered a neuroprotective event, since it is able to enhance synaptic plasticity, accelerating the maturation of dendritic spines in newborn neurons of rodents [30]. Moreover, changes in synaptic plasticity appear to be specific to the hippocampus, indicating the importance of neurogenesis in this brain area [31].

In addition to these behavioral findings, AMPH-conditioning and AMPH-re-exposure were related to: (i) increased oxidative markers in the hippocampus, which were quantified by higher RS generation and PC levels; (ii) changes in enzymes, such as Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase and CAT, whose activities were decreased. On the other hand, exercise was able to prevent RS generation, thus minimizing the damage to proteins (PC levels), as also observed in the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase and CAT, whose activities were restored in the hippocampus. Following these considerations, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase has been recognized to play a critical role in cell functions, regulating ion exchanges between cells and the intercellular space [32]. Furthermore, it is essential in the maintenance of neuronal and synaptic plasticity [33]. In this study, exercise exerted no influence per se on the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity, but when the hippocampal area showed AMPH-induced oxidative damage, physical activity was able to protect enzyme activity. In this sense, we suggested that exercise, by its known property of increasing membrane plasticity [2] could adjust the pump activation [34]. We believe this finding is consistent with a recent study of our group, when exercise presented modulatory effects on dopamine uptake, especially when this transporter was damaged by oxidative processes consequent to striatal dopaminergic excess [5]. With regard to RS generation and the oxidative status, these are naturally increased by the aerobic cellular metabolism, thus exerting an important role in modulation of signal transduction pathways and gene expression [35]. However, when RS production is exacerbated by any factor, as AMPH, for example, this excess may cause damage to macromolecules such as proteins, membrane lipids and DNA, leading to death of brain neurons [36]. In fact, AMPH can produce long-term deficits in dopaminergic and serotonergic systems, mainly because accumulated DA is susceptible to auto-oxidation and generation of DA-quinones, which are able to damage and inhibit the function of macromolecules [37]. These RS are able to inhibit mitochondrial functions, thus reducing ATP production [38]. Interesting for our findings, the positive correlations observed between RS generation and PC levels with AMPH-CPP indicated a corresponding interaction of the oxidative processes with reward mechanisms, while the negative correlation between PC levels and CAT activity indicated a possible functional impairment in neutralizing hydrogen peroxides. In fact, CAT exerts a fundamental role in RS detoxification [39].

In conclusion, sedentary rats showed AMPH-conditioned place preference and relapse symptoms after drug extinction, which were concomitant with oxidative damage to the hippocampus. Exercise was able to reduce AMPH-induced place preference and behavioral symptoms of abstinence, preventing relapse symptoms

during drug re-exposure. Exercise was also able to maintain the physiologic oxidative status in the hippocampus, confirming its modulatory role in brain areas more susceptible to AMPH damage. In this sense, regular physical activity can be useful as an adjuvant therapy to prevent psychostimulant drug relapses, thus minimizing the harmful effects of addiction.

#### Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq, CAPES, FAPERGS and PRPGP (PROAP) for the research fellowships and financial support.

#### References

- [1] Manger TA, Motta RW. The impact of an exercise program on posttraumatic stress disorder, anxiety, and depression. *Int J Emerg Ment Health* 2005;7:49–57.
- [2] Wu A, Yinga AZ, Gomez-Pinilla F. Exercise facilitates the action of dietary DHA on functional recovery after brain trauma. *Neuroscience* 2013;248:655–63.
- [3] Teixeira AM, Dias VT, Pase CS, Roversi K, Bouffleur N, Barcelos RCS, et al. Could dietary trans fatty acids induce movement disorders? Effects of exercise and its influence on Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase and catalase activity in rat striatum. *Behav Brain Res* 2012;226:504–10.
- [4] Teixeira AM, Pase CS, Bouffleur N, Roversi K, Barcelos RCS, Benvenú DM, et al. Exercise affects memory acquisition, anxiety-like symptoms and activity of membrane-bound enzyme in brain of rats fed with different dietary fats: impairments of trans fat. *Neuroscience* 2011;195:80–8.
- [5] Teixeira AM, Muller LG, Reckziegel P, Bouffleur N, Pase CS, Villarinho JG, et al. Beneficial effects of an innovative exercise model on motor and oxidative disorders induced by haloperidol in rats. *Neuropharmacology* 2011;60:432–8.
- [6] Sharma HS, Muresanu D, Sharma A, Patnaik R. Cocaine-induced breakdown of the blood-brain barrier and neurotoxicity. *Int Rev Neurobiol* 2009;88:297–334.
- [7] Howard P, Shuster J, Twycross R, Mihalyo M, Wilcock A. Psychostimulants. *J Pain Symptom Manage* 2010;40:789–95.
- [8] Clegg-Kraynok MM, McBean AL, Montgomery-Downs HE. Sleep quality and characteristics of college students who use prescription psychostimulants non medically. *Sleep Med* 2011;12:598–602.
- [9] Berman SM, Kuczenski R, McCracken JT, London ED. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. *Mol Psychiatry* 2009;14:123–42.
- [10] Westover AN, Paul AN, Robert WH. Acute myocardial infarction in young adults who abuse amphetamines. *Drug Alcohol Depend* 2008;96:49–56.
- [11] Holmes JC, Rutledge CO. Effects of the D- and L-isomers of amphetamine on uptake, release and catabolism of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine in several regions of rat brain. *Biochem Pharmacol* 1976;25:447–51.
- [12] Viggiano D, Ruocco LA, Sadile AG. Dopamine phenotype and behavior in animal models: in relation to attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27:623–37.
- [13] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Press; 1994.
- [14] Thanos PK, Stamos J, Robison LS, Heyman B G, Wang ATGJ, Robinson JK, et al. Daily treadmill exercise attenuates cocaine cue-induced reinstatement and cocaine induced locomotor response but increases cocaine-primed reinstatement. *Behav Brain Res* 2013;239:8–14.
- [15] Rogers JL, See RE. Selective inactivation of the ventral hippocampus attenuates cue-induced and cocaine-primed reinstatement of drug-seeking in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2007;87(4):688–92.
- [16] Di Chiara G. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* 1999;32(2):137–41.
- [17] Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 1987;94:469–92.
- [18] Kuhn FT, Roversi KR, Antoniazzi CTD, Pase CS, Trevizol F, Barcelos RCS, et al. Influence of trans fat and omega-3 on the preference of psycho stimulant drugs in the first generation of young rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2013;110:58–65.
- [19] 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.
- [20] Montgomery K. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol* 1955;48:254–60.
- [21] Hempel SL, Buettner GRO, Malley YQ, Wessels DA, Faherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 20, 70-dichloro dihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)- carboxy-20, 70-dichloro dihydrofluorescein diacetate, and dihydrohodamine. *Free Radic Biol Med* 1999;27:146–59.

- [22] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin–Phenol reagents. *J Biol Chem* 1951;193:265.
- [23] Muszbek L, Szabó T, Fésüs L. A highly sensitive method for the measurement of the ATP-ase activity. *Anal Biochem* 1997;77:286–8.
- [24] Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 1984;105:121–6.
- [25] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol* 1990;86:464–78.
- [26] Holems A, Rodgers RJ. Prior exposure to the elevated plus-maze sensitizes mice to the acute behavioral effects of fluoxetine and phenelzine. *Eur J Pharmacol* 2003;459(2–3):221–30.
- [27] Carroll KM, Rounsaville BJ, Nich C, Wirtz PW, Gordon LT, Gawin FH. One year follow-up of psychotherapy and pharmacotherapy for cocaine dependence: delayed emergence of psychotherapy effects. *Arch Gen Psychiat* 1994;51:989–97.
- [28] Kalivas PW, Volkow ND. New mediators for drug addiction hiding in glutamatergic neuroplasticity. *Mol Psychiat* 2011;16:974–86.
- [29] Bannerman DM, Grubb M, Deacon RMJ, Yee BK, Feldon J, Rawlins JNP. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res* 2003;139(1–2):197–213.
- [30] Griesbach GS, Gomez-pinilla F, Hovda DA. Time window for voluntary exercise-induced increases in hippocampal neuroplasticity molecules after traumatic brain injury is severity dependent. *J Neurotrauma* 2007;24:1161–71.
- [31] Van Praag H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromol Med* 2008;10:128–40.
- [32] Mobasher A, Avila J, Cózar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJO, et al. Na,K-ATPase isozyme diversity: comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep* 2000;20:51–91.
- [33] Scuri R, Lombardo P, Cataldo E, Ristori C, Brunelli M. Inhibition of Na/K ATPase potentiates synaptic transmission in tactile sensory neurons of the leech. *Eur J Neurosci* 2007;25:159–67.
- [34] Srinivasarao P, Narayanareddy K, Vajreswari A, Rupalatha M, Padmini SP, Padmini RAO. Influence of dietary fat on the activities of subcellular membrane-bound enzymes from different regions of rat brain. *Neurochem Int* 1997;31(6):789–94.
- [35] Esposito F, Ammendola R, Faraonio R, Russo T, Cimino F. Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence. *Neurochem Res* 2004;29:617–28.
- [36] Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 2004;58:39–46.
- [37] Teixeira AM, Reckziegel P, Müller LG, Pereira RP, Roos DH, Rocha JBT, et al. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;92:231–5.
- [38] Brown JM, Yamamoto BK. Effects of amphetamines on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress. *Pharmacol Therapeut* 2003;99:45–53.
- [39] Teixeira AM, Trevizol F, Colpo G, Garcia SC, Charão M, Pereira RP, et al. Influence of chronic exercise on reserpine-induced oxidative stress in rats: behavioral and antioxidant evaluations. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;88:465–72.

## 4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesta dissertação, podemos concluir e/ou propor que:

- ✓ A anfetamina, na dose e períodos em que foi administrada, induziu PCL, tanto no teste comportamental realizado após a fase de condicionamento, quando no teste de recaída, realizado após a re-exposição à droga;
- ✓ Animais submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbico não mostraram PCL após re-exposição à anfetamina. Além disso, esses mesmos animais mostraram menores parâmetros de ansiedade quando em abstinência da droga;
- ✓ Análises bioquímicas em hipocampo dos animais sedentários indicaram o desenvolvimento de danos oxidativos induzidos pela anfetamina.
- ✓ Pode-se concluir que prática regular de atividade física aeróbica e moderada pode ser útil na prevenção de recaída ao uso de drogas psicoestimulantes anfetamínicos, desfavorecendo também o desenvolvimento de processos oxidativos em área cerebral relacionada à sintomas de recompensa.

## **5. PERSPECTIVAS**

Os dados apresentados nesta dissertação mostram-se promissores, desde que até o presente, os tratamentos empregados nas clínicas de desintoxicação não são padronizados, mostrando baixa efetividade no controle de recaídas. Deste modo, a busca de novos tratamentos, mesmo que complementares, podem contribuir nos aspectos comportamentais e bioquímicos relacionados à dependência a psicoestimulantes como mostrado no presente estudo. Como perspectiva, nós pretendemos avaliar os efeitos benéficos da atividade física regular sobre aspectos moleculares e de neurotransmissão cerebral relacionados à drogadição. De fato, sabe-se que a dependência por substâncias psicoativas está inserida em todos os meios sociais, sendo de extrema importância a busca e compreensão de tratamentos adjuvantes à farmacoterapia, que possam contribuir com o tratamento da adição à drogas psicoativas, reduzindo sua busca, bem como as recaídas, tão comum entre os usuários.

## 6. REFERÊNCIAS

ACQUAS, E.; TANDA, G.; DI CHIARA, G. Differential effects on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naïve and caffeine-pretreated rats. **Neuropsychopharmacol.**,v. 27, p. 182-193, 2002.

AHLEMEYER, B.; KRIEGLESTEIN, J. Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid and tocopherol protects cultured neurons from streptozotocin-induced oxidative stress and apoptosis. **Neurochem. Int.**, v. 26, p. 1-5, 2000.

ANDERSON, D. Antioxidant defense against reactive species causing genetic and other damage. **Mutat Res.**, v. 350, p. 103-108, 1996.

ANTUNES, H.K. et al. Depression, anxiety and quality of life scores in seniors after an endurance exercise program. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 27, p. 266–271, 2005.

BARBANTI, V. J. **Aptidão Física: Um convite à saúde**. São Paulo. Manole, 1990.

BARONEZA J. E.; MOERIRA C. Q.; MOREIRA E. G.; FARIA M. J. S. S. Avaliação Toxicológica e Reprodutiva de Camundongos Machos Adultos Tratados com Femproporex. **Acta Sci. Health Sci.** vol. 29, nº 2, p. 115-120, Maringá, 2007.

BELLAVER L. H. et al. Efeitos da Dietilpropiona, Energia da Dieta e Sexo Sobre o Ganho de Peso Corporal, Peso dos Órgãos e Deposição de Tecidos em Ratos. **Arq. Brás. Endocrinol. Metab.** vol.45, nº2, pág. 21 - 36. São Paulo Mar./Abr. 2001.

BELLOT, R. G. et al. Repeated monosialoganglioside administration attenuates behavioral sensitization to amphetamine. **Brain. Res.**, v. 747, p. 169-172, 1997.

BERMAN, S. M. et al. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. **Mol. Psychiatry.**, v. 14, p. 123-142, 2009.

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

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. S. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 17, p. 663-669, 2003.

CADET, J.L.; BRANNOCK, C. Free radicals and pathobiology of brain dopamine systems. **Neurochem. Int.**, v. 32, p. 117-131, 1998.

CAMP, D. M; DE JONGUE, 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. 130-140, 1997.

CAMPERSEN, C.J. et al. Physical activity, exercise and Physical fitness: definitivos and distinctions for health related research. **Public Health Reports**, p. 172-179, 1985.

CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. (2010) Ópio, opiáceos/opioides, morfina, 20—Disponível em:<[http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/quest\\_drogas/opiaceos.htm#1](http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/quest_drogas/opiaceos.htm#1)> Acesso em: 08 ago. 2013.

CENTRE FOR ADDICTION AND MENTAL HEALTH. **Do you know...Amphetamines**. Toronto. Centre for Addiction and Mental Health, 2004. 2p.

CHRISTIE, B.R. et al. Voluntary exercise rescues deficits in special memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. **Eur. J.Neurosci.**, v. 21, p. 1719-1726, 2005.

COSGROVE, K.P.; HUNTER, R.G.; CARROLL, M.E. Wheel-running attenuates intravenous cocaine self-administration in rats: sex differences. **Pharmacol. Biochem. Behav.**,v. 73, p. 663-671, 2002.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain and health plasticity. **Trend Neurosci.**, v. 25, p. 295-301, 2002.

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. 313-319, 2008.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO (DOU), Resolução-Re N° 3.764, De 25 de Setembro de 2014. ISSN 1677-7042, N° 186, sexta-feira, 26 de setembro de 2014.

DONALDSON, L. J. Sport and exercise: the public health challenge. **J. Sports and Med.**, v.34, 409-410, 2000.

DUNN, A.L et al. Exercise treatment for depression: Efficacy and dose response. **Am. J. Prev. Med.**, v. 28, p. 1-8, 2005.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FLOYD, R. A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 222, p. 236-245, 1999.

FRASCELLA, J. et al. Shared brain vulnerabilities open the way for nonsubstance addictions: Carving addiction at a new joint? **Ann. of the New York acad. Sci.**,v. 1187, p. 294–315,2010.

FREY, B.N. et.al. Effects of lithium and valproate on amphetamine induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **J. Psychiatr. Neurosci.**,v.31(5), p. 326-32, 2006.

FREY, B.N. Increased oxidative stress in submitochondrial particles after chronic amphetamine exposure. **Brain Res.**, v. 1097, p. 224-229, 2006.

GALESI, F. L. Análise comportamental do modelo animal de recaída cue-induced. São Paulo, 2009. 92p.

GRAEFF, F. G; GUIMARÃES, F.S. Fundamentos da Psicofarmacologia. Ed. Atheneu, 2ª Ed. 275p, 2012.

GRAEFF, F. G. Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. Ed. Pedagógica e universitária LTDA, 2ª Ed. 1989.

GRAEFF, FG. Tese de livre docência, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, p. 1-2, 1972.

GRAHAM, D.G. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinines. **Mol. Pharmacol.**, v. 14, p. 633-643, 1978.

GRANT, J. et al. Introduction to Behavioural Addictions. **Am. J. Drug Alcohol Abuse.**, v. 36, p 233-241, 2010.



GREEN, A. R. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA Ecstasy). **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p. 463-508, 2003.

GRIESBACH, G.S.; GOMEZ-PINILLA, F.; HOVDA, D.A. Time window for voluntary exercise-induced increases in hippocampal neuroplasticity molecules after traumatic brain injury is severity dependent. **J. Neurotrauma**, v. 24, p. 1161–1171, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are now? **J. Neurochem.**, v. 97, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 46, p.531-542, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine, third ed., Oxford University Press, New York, p. 650-660, 1999.

HARMAN, D. Ageing: minimizing free radical damage. **J. Anti Age. Med.**, v.2, p. 15-36, 1999.

HICKS, R.R. et al. Effects of exercise following lateral fluid percussion brain injury in rats. **Restor Neurol Neurosci.**, v. 12, p. 41–47, 1998.

HOLMES, J.C., RUTLEDGE, C.O. Effects of the d- and l-isomers of amphetamine on uptake, release and catabolism of norepinephrine, dopapamine and 5-hydroxytryptamine in several regions of rat brain. **Biochem. Pharmacol.**, v. 25, p. 447-451, 1976.

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

HOWELLS, F.M. et al. Stress reduces the neuroprotective effect of exercise in a rat model for Parkinson's disease. **Behav. Brain Res.**, v. 165, p. 210–220, 2005.

HUANG, T.T. Ubiquitous overexpression of Cu,Zn superoxide dismutase does not extend life span in mice. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**; v. 55, p. B5-9, 2000.

KATZUNG, B. G. Farmacologia Básica e Clínica. 10ª edição. Ed Mcgraw-hill. São Paulo, 2010.

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, 2007.

KIRALY, M.A.; KIRALY, S.J. The effect of exercise on hippocampal integrity: review of recent research. **Int. J. Psychiatry Med.**, v. 35, p. 75-89, 2005.

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

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

KRISTAL B. S., B YU B.P. An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. **J. Gerontol.**, v. 47, p. B107-B114, 1992.

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

LI, S; STYS, P.K. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na<sup>+</sup>-dependent transport spinal cord white matter. **Neuroscience**, v.107, p. 675-683, 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 Alcohol Depen.**, v. 78, p. 135-140, 2005.

LIMA, F.D. et al. Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase inhibition after traumatic brain injury. **Brain Research**, v. 1279, p. 147-155, 2009.

LOHR, J. B.; KUCZENSKI, R.; NICULESCU, A. B. Oxidative mechanism and tardive dyskinesia. **CNS Drugs.**, v. 17, p. 47-62, 2003.

LOPEZ-TORRES, M. et al. Effect of age on antioxidants and molecular markers of oxidative damage in murine epidermis and dermis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 102, p. 476-480, 1994.

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

MANGER, T.A.; MOTTA, R.W. The impact of an exercise program on posttraumatic stress disorder, anxiety, and depression. **Int. J. Emerg. Ment. Health**, v.7, p. 49–57, 2005.

MATTSON, M.P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends. Neurosci.**, v. 27, p. 5895-94, 2004.

MATSUMOTO, T. et al. Methamphetamine in Japan: the consequences of methamphetamine abuse as a function of route of administration. **Addiction**, v.97, p. 809, 2002.

McKIM, W. A. *Drugs and behavior: An introduction to behavioral pharmacology* (4th ed.). New Jersey: Prentice Hall, 2004.

MIALICK, E.S. Uma proposta de implantação de programas de atividades físicas para comunidades terapêuticas. Encontro Interdisciplinar. Dependência Química. Saúde e Responsabilidade Social.- Educando e Transformando Através da Educação Física. Campinas, SP, 2008.

MORA, S. et al. Physical Activity and Reduced Risk of Cardiovascular Events: Potential Mediating Mechanisms. **Circulation.**, v. 116, p. 2110-2118, 2007.

MORGAN, W.P. Psychological effects of exercise. **Behav.Med. Update.**, v. 4, p. 25–30, 1982.

MULLER, S.M.; DENNIS, D.L.; GORROW, T. Emotional well-being of college students in health courses with and without an exercise component. **Percept. Mot. Skills.**, v. 103, p. 717–725, 2006.

NASCIMENTO, E. C.; NASCIMENTO, E.; SILVA, J. P. Uso de álcool e anfetaminas entre caminhoneiros de estrada. **Rev. Saúde Pública**, v. 41, n. 2, p. 290-3. 2007.

- NEEPER, S.A.; GOMEZ-PINILLA, F.; COTMAN, C. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res.**, v. 726, p. 49-56, 1996.
- NEISEWANDER, J. L.; PIERCE, R. C.; BARDON, M. T. Naloxone enhances the expression of morphine-induced conditioned place preference. **Psychopharmacology**, v. 100, p. 201-205, 1990.
- NORRIS, R.; CARROLL, D.; COCHRANE, R. The effects of aerobic and anaerobic training on fitness, blood pressure, and psychological stress and well-being. **J. Psychosom. Res.**, v. 34, p. 367-375, 1990.
- NORRIS, R.; CARROLL, D.; COCHRANE, R. The effects of physical activity and exercise training on psychological stress and well-being in an adolescent population. **J. Psychosom. Res.**, v. 36, p. 55-65, 1992.
- OGONOVSKY, E. et al. The effects of moderate, strenuous and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. **Neurochem. Int.**, v. 46, p. 635-640, 2005.
- OMS (Organização Mundial da Saúde). Transtornos devido ao uso de substâncias. Em Organização Pan-Americana da Saúde & Organização Mundial da Saúde (Orgs.). Relatório sobre a saúde do mundo. Saúde Mental: nova concepção, nova esperança, pp.58-61. Brasília: Gráfica Brasil, 2001.
- OMS (Organização Mundial da Saúde). Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. Universidade de São Paulo (USP), v. 2, 1994.
- OMS (Organização Mundial da Saúde). Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. Décima Revisão, São Paulo: Centro Colaborador da OMS para Classificação de Doenças em Português; Universidade de São Paulo, v. 2, 1994.
- PELEG-RAIBSTEIN, D. et al. The amphetamine sensitization model of schizophrenia: relevance beyond psychotic symptoms. **Psychopharmacology**, v. 206, p. 603-21, 2009.
- PETTENUZZO, L.F. et al. Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. **Physiol. Behav.**, v. 95, p. 295-301, 2008.
- POTENZA, M.N. et al. Neuroscience of Behavioral and Pharmacological Treatments for Addictions. **Neuron**, v. 69, p. 695-711, 2011.

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, 2008.

RADAK, Z. et al. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochem. Int.**, v. 6, p. 17-23, 2001.

RADAK, Z.; CHUNG, H.Y. GOTO, S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful in rat brain. **Neurochem. Int.**, v. 6, p. 71-75, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 4ª. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 508-510, 2001.

REDILA, V.A.; CHRISTIE, B.R. Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 137, p. 1299-1307, 2006

REYNOLDS, A. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 82, p. 297-325, 2007.

RIBEIRO, M; MARQUES, A. C. P. R. Abuso e Dependência da Anfetamina. Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2002. Disponível em: <[http://www.bibliomed.com.br/diretrizes/pdf/abuso\\_anfetamina.pdf](http://www.bibliomed.com.br/diretrizes/pdf/abuso_anfetamina.pdf)>. Acesso em: jan. 2015.

RITZ, M.C. et al. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. **Science**, v. 237, p. 1219–1223, 1987.

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, 1993.

ROBINSON, T.E.; KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology**, v.47(Suppl 1), p. 33–46, 2004.

ROTHMAN, R.B.; BAUMANN, M.H. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 479, p. 23-40, 2003.

SALIM, S.; et al. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. **Behav. Brain Res.**, 208, 545-552, 2010.

SAMHSA, Substance Abuse and Mental Health Services Administration. Overview of Findings from the 2003 National Survey on Drug Use and Health., **Office of Applied Studies**, Rockville, MD, 2004.

SCHIFANO, F. A bitter pill. Overview of ecstasy (MDMA, MDA) related fatalities. **Psychopharmacology**, v. 173, p. 242-248, 2004.

SCHUMAN, E.M. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 1, p. 105-109, 1999.

SHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Ver. Bras. Med. Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.

SILVA, P. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 1374.

SULZER, D. et al. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 4102-4108, 1995.

SUTOO, D.; AKIYAMA, K. Regulation of brain function by exercise. **Neurobiol. Dis.**, v. 13, p. 1-14, 2003.

TEIXEIRA, A.M. et al. Beneficial effects of an innovative exercise model on motor and oxidative disorders induced by haloperidol in rats. **Neuropharmacology**, v.60, p.432-438, 2011.

TZSCHENTKE, 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, p. 613-672, 1998.

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

UHL, G.R.; GROW, R.W. The burden of complex genetics in brain disorders. **Arch. Gen. Psychiatry.**, v. 61, p. 223-229, 2004.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

Van PRAAG, H.; KEMPERMANN, G., CAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci.**, v.2, p. 266-270, 1999

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GÓMEZ-PINILLA, F. Exercise Induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. **J. Neurosci. Res.**, v. 76, p. 356-362, 2004.

VAZIRI, N. D. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. **Current Opinion Nephrology Hypertension**, v.13,n.1, p. 93-99,2004.

VEALE, D. et al. Aerobic exercise in the adjunctive treatment of depression: a randomized control ledtrial. **J. R. Soc. Med.**, v. 85, p. 541–544, 1992.

VOLKOW, N.D.; BALER, R.D.; GOLDSTEIN, R.Z..Addiction: Pulling at the Neural Threads of Social Behaviors. **Neuron.**, v. 69, p. 599–602, 2011.

VOLKOW, N.D.; FOWLER, J.S.; LOGAN, J. et al. Effects of modafinil on dopamine and dopamine transporters in the male human brain: clinical implications. **JAMA**, 2009.

WAADE, N.R. Exercise improves self-esteem in children and young people. **Aust. J. Physiother.**, v. 50, p. 117, 2004.

WESTOVER, A.N.; PAUL, A.N.; ROBERT, W.H. Acute myocardial infarction in young adults who abuse amphetamines. **Drug Alcohol Depen.**,v. 96, p. 49–56, 2008.

YONAMINE, M. A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

YU, T. W.; ANDERSON, D. Reactive oxygens species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation .**Mutat. Res.**, v. 379, p. 201-210, 1997.

ZHAO, C.; DENG, W.; CAGE, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, p. 645-660, 2008.