

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

Higor Zuquetto Rosa

**INFLUÊNCIA BENÉFICA DE DIFERENTES TEMPOS DE EXERCÍCIO
FÍSICO SOBRE A DROGADIÇÃO INDUZIDA POR MORFINA EM
RATOS: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES**

Santa Maria, RS
2019

Higor Zuquetto Rosa

**INFLUÊNCIA BENÉFICA DE DIFERENTES TEMPOS DE EXERCÍCIO FÍSICO
SOBRE A DROGADIÇÃO INDUZIDA POR MORFINA EM RATOS: ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilise Escobar Bürger
Co-Orientadora: Dra. Raquel Cristine Silva Barcelos

Santa Maria, RS
2019

ROSA, HIGOR SUQUETTO

INFLUÊNCIA BENÉFICA DE DIFERENTES TEMPOS DE EXERCÍCIO
SOBRE A DROGADIÇÃO INDUZIDA POR MORFINA EM RATOS:
ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES / HIGOR SUQUETTO
ROSA. - 2019.

74 p.; 30 cm

Orientadora: MARILISE ESCOBAR BURGER

Coorientadora: RAQUEL CRISTINE SILVA BARCELOS

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2019

1. ABUSO DE DROGAS 2. ADIÇÃO 3. EXERCÍCIO FÍSICO 4.
ÓPIOIDE I. ESCOBAR BURGER, MARILISE II. SILVA BARCELOS,
RAQUEL CRISTINE III. TÍTULO.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo
autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Higor Zuquetto Rosa

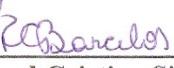
**INFLUÊNCIA BENÉFICA DE DIFERENTES TEMPOS DE EXERCÍCIO FÍSICO
SOBRE A DROGADIÇÃO INDUZIDA POR MORFINA EM RATOS: ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES**

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

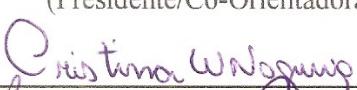
Aprovado em 15 de fevereiro de 2019:



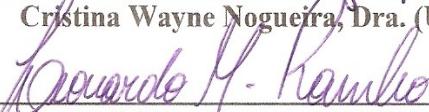
Marilise Escobar Bürguer, Dra.
(Presidente/Orientadora)



Raquel Cristine Silva Barcelos, Dra.
(Presidente/Co-Orientadora)



Cristina Wayne Nogueira, Dra. (UFSM)



Leonardo Magno Rambo, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2019.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

Dedico esta dissertação, àqueles que sempre foram meus maiores mestres nessa vida, são meu alicerce em todas as decisões e conquistas e, confiaram em mim: minha família!

AGRADECIMENTOS

A concretização de cada etapa que conquistamos na vida está vinculada a varias circunstâncias e pessoas. Não podemos esquecer-nos de agradecê-las após cada etapa que vencemos, pois uma meta é constituída de várias etapas. De tal forma, faço o mínimo que posso, escrevendo aqui algumas palavras de agradecimento.

Primeiramente agradeço a benevolência do “Patrão Velho” lá das alturas por ter guiado e iluminado cada passo que dei até hoje para chegar aonde cheguei.

Agradeço aos meus maiores mestres nessa vida, meu pai Clovis Noé da S. Rosa e minha mãe Maria Rosa Z. Rosa por todos os ensinamentos que me passaram, todas as preocupações que tiveram comigo, por sempre estarem ao meu lado nas minhas escolhas, me mostrando os melhores caminhos a seguir. Por sempre terem confiança em mim e nos meus sonhos e, principalmente, por abdicarem de tantas coisas para que eu saísse conquistar meus objetivos e trilhar meu futuro, pois sei que acreditavam que chegaria até aqui e acreditam que chegarei ainda onde quero. À vocês “meus velhos”, agradeço de todo coração e dedico todas as minhas conquistas.

Agradeço aos meus irmãos, Alexandre Z. Rosa e Daiele Z. Rosa, que sempre foram e serão meus orgulhos, minhas fontes inspiradoras. Obrigado por toda a paciência e atenção de sempre, por me darem todo apoio, motivação e também acreditarem em mim. Como sempre digo a vocês: “pisem firme, pois seguirei os passos de vocês”. À minha sobrinha, Ana Cecília S. Rosa, por toda a alegria e amor puro de criança que traz em cada sorriso e cada demonstração de carinho, a qual faz esquecermos qualquer coisa. À meu sobrinho, João Vicente S. Rosa, o mais novo integrante da família, que veio dar ainda mais luz e encher de alegria nossa família.

À minha orientadora, Professora Dra. Marilise Bürger, agradeço de todo coração a oportunidade que me deu, abrindo as portas do laboratório em setembro de 2013 para que, como aluno de iniciação científica, começasse trilhar meus sonhos, por ter compartilhado conhecimento, fazendo com que minha bagagem hoje seja muito maior. Agradeço muito também todos os conselhos, as preocupações e a confiança depositada em mim, pois muitas vezes és muito mais que a orientadora, é uma “segunda mãe”.

À minha co-orientadora, Raquel Barcelos, minha “mãe-científica / Co-co” que, sem dúvida alguma, não conseguirei reunir todas as palavras que possam abranger os agradecimentos que lhe devo. Muitíssimo obrigado por todas as ajudas, correções, conhecimentos compartilhados, todos os ensinamentos, por toda paciência que teve em

ensinar e explicar quantas vezes fosse necessário. Agradeço também as preocupações que ultrapassam os limites do laboratório, abrigado por essa grande amizade. Muitas coisas que sei e muito do que sou devo a você. Muito obrigado por tudo!

A todos os colegas do laboratório FARMATOX, pelas ajudas, discussões e sugestões em experimentos, resultados, redação do manuscrito e dessa dissertação. Certamente a tarefa foi menos árdua com a ajuda de vocês.

Um agradecimento especial ao meu colega Hecson Segat, pois foi trabalhando em seus experimentos desde que cheguei ao laboratório que me engajei nessa linha de pesquisa e hoje sigo pesquisando drogadição e exercício físico. Obrigado pelos ensinamentos, discussões e sugestões acerca dos experimentos.

Obrigado aos meus ex-colegas de graduação, aqueles amigos que a gente conquista na universidade, Cristina Rigon, Paulo Cesar Araujo, Marina Lovatto, Carol Stein, Marissa Serafin são, sem dúvidas, pessoas que a gente encontra ao decorrer da vida e podemos contar para qualquer coisa. Obrigado por toda a parceria!

Gostaria também de agradecer aqueles que no decorrer da vida tornam-se irmãos, Dione Bachinski, Paulo Cesar Araujo, Cristina Rigon e Cristian Kroth, pessoas que sempre se fazem presentes em qualquer momento que seja e fazem com que possamos vencer obstáculos de forma mais leve. Obrigado por todas as conversas, conselhos e momentos de alegrias compartilhados. Carrego vocês dentro do peito.

Aos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Farmacologia que somaram muito para minha formação, meus agradecimentos.

À todos os animais utilizados, meios para a realização deste trabalho, que compartilharam Natal, Ano Novo e férias junto comigo, todo o meu respeito e gratidão.

À Universidade Federal de Santa Maria, por disponibilizar cursos de Pós-Graduação gratuitos e de qualidade e por garantir o acesso universal ao conhecimento.

O meu agradecimento ao CNPq, CAPES e PROAP-UFSM pelos recursos financeiros.

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

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram chegar até aqui e que de alguma maneira fizeram ou fazem parte da minha vida, dedico essa conquista a vocês!

*“Qualquer dia desses vou sentar à sombra
De um tarumã copado que eu mesmo plantei
Repensar a vida cuidar meus ressábios
E fazer com gosto as coisas que eu sei”.*

(Gujo Teixeira/Luiz Marenco)

RESUMO

INFLUÊNCIA BENÉFICA DE DIFERENTES TEMPOS DE EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A DROGADIÇÃO INDUZIDA POR MORFINA EM RATOS: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES

AUTOR: Higor Zuquetto Rosa

ORIENTADORA: Prof.^a Dra. Marilise Escobar Bürger

CO-ORIENTADORA: Dra. Raquel Cristine Silva Barcelos

A morfina é um opioide de elevado emprego clínico, cujas propriedades analgésicas são acompanhadas de euforia e bem estar, favorecendo assim a drogadição, o que configura um sério problema de saúde pública. A drogadição por opioides tem impulsionado a busca por novos tratamentos, porém, até agora, os utilizados clinicamente são apenas paliativos. O exercício físico tem mostrado benefícios na adição. Porém a carência de dados na literatura estimulou o desenvolvimento deste estudo, cujo objetivo foi avaliar possíveis adaptações moleculares e comportamentais decorrentes de diferentes tempos de exercício físico em animais expostos à morfina. Ratos Wistar foram subdivididos em sedentários, exercício de curto, médio e longo prazo e submetidos ao protocolo de natação por 0, 14, 28 e 42 dias, respectivamente. Na última semana de exercício, os animais foram submetidos ao paradigma de preferência de lugar condicionado (PLC) por morfina (4 mg/Kg), seguida de análises moleculares envolvendo o sistema dopaminérgico e receptor de glicocorticóide no *nucleus accumbens* e hipocampo (CEUA 9373231116-UFSM). Nossos resultados apontam, que além da menor preferência pela droga, grupos exercitados mostraram menor imunorreatividade do transportador de dopamina (DAT), dos receptores dopaminérgicos tipo 1 e 2 (D1R e D2R) e glicocorticóide (GR), em relação ao grupo sedentário. Nossa estudo demonstra que o exercício físico, independentemente do tempo de atividade, modificou parâmetros comportamentais de adição por morfina, possivelmente através de adaptações moleculares em alvos relacionados ao sistema de recompensa. A partir deste estudo é possível propor o exercício físico como uma abordagem terapêutica a ser estrategicamente incluída nos tratamentos de drogadição por opioides.

Palavras-chave: Abuso de drogas. Adição. Exercício físico. Opioide.

ABSTRACT

BENEFICIAL INFLUENCE OF DIFFERENT PHYSICAL EXERCISE TIME ON MORPHINE INDUCED DRUG ADDICTION IN RATS: BEHAVIORAL AND MOLECULAR ASPECTS

AUTHOR: Higor Zuquetto Rosa

ADVISOR: Prof.^a Dra. Marilise Escobar Bürger

CO-ADVISOR: Dra. Raquel Cristine Silva Barcelos

Morphine is an opioid of high clinical employment, whose analgesic properties are accompanied by euphoria and well being, thus favoring drug addiction, which constitutes a serious public health problem. Drug addiction by opioids has driven the search for new treatments, but so far, those used clinically are only palliative. Physical exercise has shown beneficial in addition. But the lack of data in the literature stimulated the development of this study, whose objective was to evaluate possible molecular and behavioral adaptations resulting from different times of physical exercise in animals exposed to morphine. Wistar rats were subdivided into sedentary, short, medium and long term exercise and submitted to swimming protocol for 0, 14, 28 and 42 days, respectively. In the last week of exercise, the animals were submitted to a paradigm of morphine-conditioned place preference (CPP) (4 mg/Kg), followed by molecular analyzes involving the dopaminergic system and glucocorticoid receptor in the *nucleus accumbens* and hippocampus (CEUA 9373231116-UFSM). Our results show that addition of minor preference for drug in exercised groups showed less of the transporter dopamine (DAT) immunoreactivity , dopaminergic receptors type 1 and 2 (D1R and D2R) and glucocorticoid (GR) compared to sedentary group. Our study demonstrates that physical exercise, regardless of uptime, was able to modify behavioral parameters of addition per morphine, possibly through molecular adaptations in targets related to the reward system. From this study it is possible to propose physical exercise as a therapeutic approach to be strategically included in the treatment of opioid drug addiction.

Keywords: Drug abuse. Addiction. Physical exercise. Opioid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Representação das estruturas químicas de substâncias opioides natural (A), semi-sintética (B) e sintética (C), respectivamente.....	17
Figura 2 - Papel dos opióides na via de recompensa encefálica.....	20

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Figure 1 - Experimental protocol.....	50
Figure 2 - Drug place preference behavior induced by morphine (4 mg/Kg for 4 day), was observed in CPP paradigm after 2, 4 or 6 weeks of physical exercise, depending on the experimental group.	51
Figure 3 - Influence of physical exercise on the Y-maze task, performed 24 h after the last morphine injection. Memory was assessed by correct alternation percentage. Total arm entries (a) and % alternation (b) were quantified..	52
Figure 4 - DAT levels (a), D1R levels (b) and D2R levels (c) were analyzed in the <i>nucleus accumbens</i> of rats.....	53
Figure 5 - DAT levels (a), D1R levels (b) and D2R levels (c) were analyzed in the hippocampus of rats..	54
Figure 6 - GR levels were analyzed in the <i>nucleus accumbens</i> (a) and hippocampus (b), of rats.....	55
Graphical abstract.	56

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Table 1 – Effect of physical activity on body weight gain, epididymal fat weight/body weight ratio and blood lactate levels.....	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATV	Área Tegmental Ventral
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas
DAT	Transportados de dopamina (do inglês: <i>Dopamine transporter</i>)
D1R	Receptor dopaminérgico do tipo 1
D2R	Receptor dopaminérgico do tipo 2
GABA	Ácido Gama-aminobutírico (do inglês: <i>gamma-Aminobutyric acid</i>)
Gi	Proteína G inibitória
GR	Receptor de glicocorticóide
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
MDMA	3, 4-metilenodioximetanfetamina
NAc	<i>Nucleus accumbens</i>
NIDA	Instituto Nacional sobre Abuso de Drogas (do inglês: <i>National Institute on Drug Abuse – USA</i>)
PLC	Preferência de Lugar Condicionado
SNC	Sistema Nervoso Central
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (do inglês: <i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. A ADIÇÃO	14
1.2. EPIDEMIOLOGIA: USO INDISCRIMINADO DE OPIOIDES.....	16
1.3. OPIOIDES: FARMACODINÂMICA E AÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)	17
1.4. MODELO ANIMAL PARA AVALIAÇÃO DE ADIÇÃO À DROGAS ADITIVAS....	21
1.5. EXERCÍCIO FÍSICO: HISTÓRICO E BENEFÍCIOS.....	22
1.6. INTER-RELAÇÃO ENTRE EXERCÍCIO FÍSICO E DROGAS ADITIVAS	25
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. OBJETIVO GERAL	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. DESENVOLVIMENTO	29
4.1. MANUSCRITO CIENTÍFICO	29
5. CONCLUSÕES	57
6. PERSPECTIVAS	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	73

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada em seções dispostas em: Introdução, Justificativa, Objetivos, Desenvolvimento (Manuscrito Científico), Conclusões, Perspectivas e Referências.

Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos resultados e Referências encontram-se inseridos na seção Desenvolvimento, subseção Manuscrito Científico, representando a íntegra deste estudo.

As Referências (Item 6) referem-se somente às citações que aparecem na seção Introdução desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ADIÇÃO

O consumo de drogas abusivas é alarmante em nível mundial e ocorre devido as propriedades hedônicas dessas substâncias (BÜTTNER, 2011; 2017; CONNOR et al., 2014; KARCH; DRUMMER, 2016). Segundo o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC, do inglês *United Nations Office on Drugs and Crime*, 2017), cerca de 250 milhões de pessoas, ou seja, 5% da população adulta mundial usaram drogas pelo menos uma vez no ano de 2015 e cerca de 29,5 milhões desses consumidores de drogas, ou seja, 0,6% da população adulta global, sofram com transtornos por uso de drogas. O abuso de drogas é um grande problema de saúde pública mundial (GONÇALVES et al., 2016; POTENZA et al., 2011), afetando negativamente não apenas os indivíduos dependentes, mas também seus familiares, empregadores e a sociedade em geral (UHL; GROW, 2004; VOLKOW; BALER; GOLDSTEIN, 2011) e está relacionado com alterações dos valores pessoais e sociais devido a um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos (PERGOLIZZI et al., 2017). A adição por drogas abusivas está intimamente relacionada a elevados custos médico-hospitalares, perda de atividade cotidiana, marginalização e criminalidade, sendo assim uma das desordens psiquiátricas mais caras (UHL; GROW, 2004). Conforme o Instituto Nacional sobre Abuso de Drogas (NIDA, do inglês *National Institute on Drug Abuse – USA*, 2018), o custo anual de um paciente em tratamento é, aproximadamente, 4.700 dólares.

O uso ocasional, mas limitado, de um fármaco passível de abuso é clinicamente distinto do uso escalonado de uma droga, da perda de controle sobre a limitação do seu consumo e da ocorrência da busca compulsiva crônica que caracteriza a dependência (KOOB; VOLKOW, 2010). Assim, a adição é caracterizada pela compulsão da procura e utilização da droga com a perda do controle em limitar seu uso, podendo gerar disforia, ansiedade e irritabilidade quando o indivíduo é impedido de utilizá-la (KOOB; LE MOAL, 1997; 2008). A restrição do acesso à droga pode levar à síndrome de abstinência motivacional, definida como dependência de substância segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) da Associação Americana de Psiquiatria (2014). O uso crônico de drogas aditivas leva à dependência física e psicológica e a retirada da droga desencadeia sintomas aversivos conhecidos como síndrome da abstinência (O'BRIEN, 1997).

As substâncias psicoativas possuem um alto poder aditivo, levando o indivíduo adicto à perda do controle emocional e ao comportamento compulsivo, resultando em consequências

sociais e sobre a saúde (MILTON; EVERITT, 2012). Um quadro psiquiátrico-motivacional, fonte para a dependência de drogas abusivas, tem aspectos tanto de transtornos do controle impulsivo, quanto de transtornos compulsivos (EVERITT; ROBBINS, 2005; MOELLER et al., 2001). Os distúrbios do controle dos impulsos são caracterizados por um crescente sentimento de tensão ou excitação antes de cometer um ato impulsivo e prazeroso, e pela gratificação ou alívio no momento de cometer o ato. Tais fatores estão amplamente associados a mecanismos de reforço positivo. Por outro lado, os transtornos compulsivos são caracterizados por ansiedade e estresse antes de cometer um comportamento compulsivo repetitivo, e alívio do estresse por realizar tal comportamento. Esses fatos estão associados a mecanismos de reforço negativos (KOOB; VOLKOW, 2010). A drogadição tem, geralmente, a impulsividade dominando os primeiros estágios, que combinada com a compulsividade, dominam os estágios posteriores. Nesse contexto, à medida que o indivíduo passa da impulsividade para a compulsividade, ocorre uma mudança de reforço positivo, levando o comportamento motivado a um reforço negativo e a automação direcionando o comportamento motivado (KOOB, 2004). Esses estágios interagem entre si, tornando-se mais intensos e culminam, finalmente, no estado patológico denominado de dependência (KOOB; LE MOAL, 1997) e a transição do uso ocasional de drogas para a adição envolve a neuroplasticidade (KOOB; KANDEL; VOLKOW, 2008).

A retirada de drogas em indivíduos adictos é caracterizada por ansiedade, agitação e irritabilidade que estão associadas ao estado emocional negativo e contribuem para a recaída após períodos de abstinência (KOOB; LE MOAL, 2008). Nesse contexto, o ambiente pode contribuir para o uso continuado da droga, bem como para o alto risco de recaída após abstinência uma vez que o uso repetido da droga proporciona uma forte associação entre os seus efeitos hedônicos e o ambiente de administração (HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006). A busca pela droga é influenciada por esses estímulos condicionados associados, que levam à recaída após um período de abstinência. Além disso, na abstinência, ocorre aumento dos níveis de cortisol sanguíneo, o qual é indicativo de estresse e ansiedade, devido a alterações no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (ROY et al., 2006). A incidência de recaídas é muito alta em indivíduos adictos e é, geralmente, acompanhada de prejuízos neuropsiquiátricos que envolvem instabilidade emocional, depressão, anedonia, impulsividade, agressividade, déficit de atenção, entre outros (MAJEWSKA, 1996). Por tudo isso, o abuso de drogas representa uma séria questão de saúde em todo o mundo (BÜTTNER, 2011).

1.2. EPIDEMIOLOGIA: USO INDISCRIMINADO DE OPIOIDES

A partir do início do século XXI a UNODC começou a monitorar a produção de ópio em nível global e verificou que entre 2016 e 2017 a sua produção aumentou 65%, atingindo 10.500 toneladas, a mais alta estimativa já registrada (UNODC, 2017). Neste mesmo relatório foi mencionado que o uso não medicinal de medicamentos sob prescrição está se tornando uma enorme ameaça para a saúde pública, sendo os opioides responsáveis pelos maiores danos, contabilizando 76% de mortes envolvendo distúrbios relacionados ao uso de drogas (UNODC, 2017).

Anteriormente, a UNODC (2014) relatou que 1,45% da população brasileira fizeram uso abusivo de opioides e 0,1% fizeram uso de ópio ou heroína. Em 2010, o Brasil já apresentava uma das maiores taxas de uso de opioides da América do Sul (0,5% da população entre 15 e 64 anos) e o uso extraterapêutico de opioides lícitos correspondem pela maioria dos casos de abuso (INCB, 2012). Segundo levantamento realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas em 2005 (CEBRID, 2010) envolvendo 108 cidades do país, 1,3% da população fez uso de analgésicos opioides pelo menos uma vez na vida em todas as faixas etárias, havendo predomínio de uso em mulheres em relação aos homens. Uma análise realizada com estudantes de ensino fundamental e médio de escolas públicas e privadas nas capitais brasileiras mostrou que na capital do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, entre 1.725 estudantes, 0,5% já usaram ópio/heroína durante a vida (CEBRID, 2010), revelando uma realidade muito preocupante. Do ponto de vista clínico, a prescrição de opioides é problemática, pois a administração contínua pode levar a tolerância e dependência (ZHU et al., 1999).

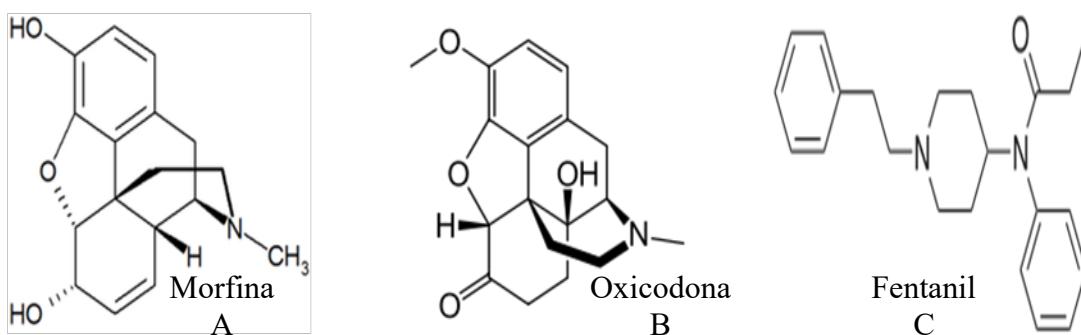
O uso abusivo de opioides ocorre tanto por pacientes detentores de prescrição, quanto por profissionais da saúde. Uma pesquisa realizada no Brasil com 198 médicos em tratamento de dependência química residentes em São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Minas Gerais, indicou que 26,7% fizeram uso de opioides, demonstrando assim, que os profissionais da saúde passam por situações facilitadoras para o uso e abuso de drogas (ALVES et al., 2005; 2012). E, mesmo após o desaparecimento dos sintomas físicos da dependência, ex-usuários crônicos de opioides exibem grandes taxas de recaídas ao uso dessas drogas, o que pode estar relacionado a uma interação entre o sistema opioide e o de recompensa encefálico (NESTLER, 1996).

1.3. OPIOIDES: FARMACODINÂMICA E AÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Algumas substâncias que são desenvolvidas para o tratamento de doenças e por apresentarem efeitos euforizantes ou hedônicos podem ser utilizadas com finalidade recreacional (BAILLIF-COUNIOU et al., 2015). Neste sentido, o uso abusivo dessas substâncias pode levar à dependência, tolerância, síndrome de abstinência e recaída (GRUBER; SILVERI; YURGELUN-TODD, 2007; SILVA, 2002). Entre essas substâncias, pode ser citado o grupo dos opioides (YARGEAU et al., 2014).

A palavra “ópio” deriva-se da palavra grega *opion* (“suco da papoula” - *Papaver somniferum*) e as substâncias derivadas do ópio são denominados de opioides (STOELTING et al., 2017). Os opioides podem ter origem natural (alcaloides derivados do ópio, como a morfina), semissintética (a partir da simples modificação da molécula de morfina que produz compostos com propriedades distintas, como a oxicodona, dionina, metopon, oximorfona e heroína) ou ainda inteiramente sintética (os quais são moléculas sintetizadas, ou seja, não são produzidos pela modificação química da molécula de morfina, mas possuem atividade farmacológica semelhante, como o fentanil, meperidina, remifentanil, metadona, levorfanol, petazocina, buprenorfina e etorfina) (DINIS-OLIVEIRA, 2016; RANG et al., 2011; STOELTING et al., 2017) (Fig. 1). De todas as substâncias opioides, a mais conhecida e utilizada na terapêutica é a morfina, cujo nome é derivado de Morfeu, o “Deus do sono”, na mitologia grega (DUARTE, 2005).

Figura 1 - Representação das estruturas químicas de substâncias opioides natural (A), semissintética (B) e sintética (C), respectivamente.



Fonte: Adaptado de STOELTING et al. (2017).

Opioides são substâncias que reduzem a sensibilidade dolorosa (analgesia) e são usados, principalmente, na terapia da dor crônica e da dor aguda de alta intensidade, sendo também fundamentais para os cuidados perioperatórios modernos (STOELTING et al., 2017). Quando administrados em doses elevadas provocam euforia, estados hipnóticos, depressão respiratória, enquanto seu uso crônico favorece o desenvolvimento de drogadição (McDONALD; CARLSON; IZRAEL, 2012).

No Brasil, assim como em outros países, a prescrição e os aspectos éticos relacionados aos opioides estão regulamentados, devendo ser seguidos pelos profissionais competentes. Essa classe de medicamentos, também conhecidos como entorpecentes, faz parte do grupo A1 pela Portaria/SVS nº 344 de 12.05.1998, cuja prescrição exige a notificação da receita, ou seja, o receituário do tipo A (cor amarela) de controle especial que deve ser emitido em duas vias para a aquisição lícita desses fármacos em farmácias e drogarias (BRASIL, 1998). Essa prescrição só é permitida para médicos, cirurgiões-dentista (somente para uso odontológico – Lei 5081/66) (BRASIL, 1966) e médicos veterinários (somente para uso veterinário – Lei 5517/68) (BRASIL, 1968).

A compreensão da farmacodinâmica dos opioides é muito importante para a prática clínica (PERGOLIZZI et al., 2017), pois, com base na interação com os receptores, os opioides podem ser classificados como agonistas, agonistas parciais, agonista-antagonista misto e antagonistas (PATHAN; WILLIAMS, 2012). Em nível molecular, os receptores opioides pertencem à família dos receptores metabotrópicos, os quais são acoplados à uma proteína G, sendo o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) o segundo mensageiro principal (TRESCOT et al., 2008). A ativação do receptor, acoplado a proteína G inibitória (Gi), por um agonista opioide, resulta na inibição da atividade da adenilato-ciclase, conduzindo a uma redução nos níveis de AMPc intracelular, resultando no fechamento dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem, dos canais de Na⁺ nas terminações pré-sinápticas, inibindo a liberação de neurotransmissores como o glutamato e também de mediadores inflamatórios como a substância P, causadora de dor (PERGOLIZZI et al., 2017; SWIFT; LEWIS, 2009). Além disso, também pode induzir a hiperpolarização dos neurônios pós-sinápticos pela abertura dos canais de K⁺ (FREYE; LEVY, 2008; PERGOLIZZI et al., 2017).

Os opioides se ligam a receptores fisiológicos que recebem o mesmo nome genérico do grupo, nomeadamente, receptores opioides. Assim, três tipos de receptores opioides são bem descritos na literatura, classificados em *mu* (μ), *kappa* (κ) e *delta* (δ) (PATHAN; WILLIAMS, 2012). Esses receptores estão presentes em todo SNC e sua modulação fisiológica é feita pelos opioides endógenos como as encefalinas, dinorfina, endorfina e

endomorfinas (BOWERS; CHOI; RESSLER, 2012). Os receptores opioides podem também estar presentes em terminações nervosas aferentes periféricas (BODNAR; KLEIN, 2005) e em diversos outros órgãos como o intestino, glândulas adrenais, rins, pulmões, baço, testículos, ovários, útero, estômago, fígado e coração (WITTERT; HOPE; PYLE, 1996).

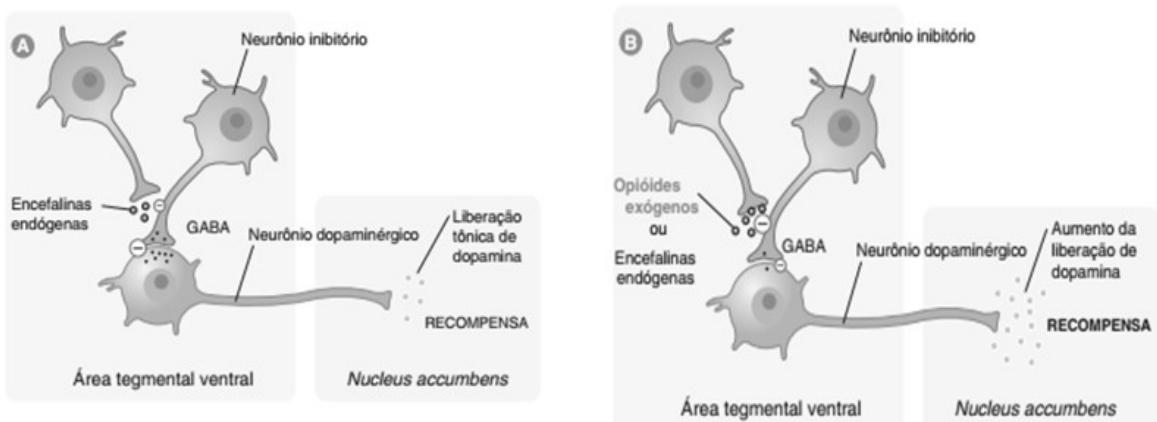
De acordo com o subtipo do receptor e sua localização no sistema nervoso, algumas ações são bem definidas. Os receptores μ estão localizados principalmente no tronco cerebral, no tálamo medial, nas lâminas III e V do córtex cerebral, no tálamo, substância cinzenta periaquedatal, substância gelatinosa (corno posterior da medula) e trato gastrintestinal, e são responsáveis pela analgesia, depressão respiratória, diminuição do trânsito intestinal, sedação, adição e dependência (DHAWAN et al., 1996; TRECOT et al., 2008). Os receptores κ são encontrados na medula espinhal, tronco cerebral, áreas límbicas, hipotálamo e neurônios sensitivos periféricos, e contribuem para analgesia espinhal, sedação, dispneia, dependência, disforia, diurese, termorregulação, secreção neuroendócrina e depressão respiratória (DHAWAN et al., 1996; TRECOT et al., 2008). Cabem aos receptores δ , localizados nos núcleos pontinos, amígdala, bulbo olfatório, córtex cerebral e neurônios sensitivos periféricos, a analgesia espinhal e supraespinal, modulação das funções cognitivas e de dependência física, além da redução da motilidade gástrica (DHAWAN et al., 1996; PATHAN; WILLIAMS, 2012; TRECOT et al., 2008).

Um importante local de ação dos opioides está situado na área tegmental ventral (ATV), na qual, fisiologicamente, interneurônios GABAérgicos causam a inibição tônica dos neurônios dopaminérgicos responsáveis pela ativação da via de recompensa encefálica no *nucleus accumbens* (NAc) (OMELCHENKO; SESACK, 2009; SADAT-SHIRAZI, et al., 2018) (Figura 2A). Esses interneurônios GABAérgicos podem ser inibidos por encefalinas endógenas, que se ligam a receptores μ nas terminações GABAérgicas (KOOB, 1992; SADAT-SHIRAZI, et al., 2018; SULZER, 2011) (Figura 2B). Os opioides exógenos, como a morfina, também se ligam aos receptores μ , ativando-os. Além disso, ativam também a via de recompensa encefálica mediante desinibição dos neurônios dopaminérgicos na ATV e induzem, consequentemente, o aumento liberação de dopamina (DEVINE et al., 1993; SADAT-SHIRAZI, et al., 2018; SULZER, 2011).

Os opioides induzem tolerância, que se resume na necessidade de doses progressivamente maiores para obtenção do mesmo efeito, e também a dependência, que consiste no desejo de consumí-los (BELL; SALMON, 2009; PERGOLIZZI et al., 2017). A administração contínua da droga opioide permite a ativação posterior de um ou mais fatores de transcrição intranucleares, ativando a codificação do gene da adenilato-ciclagem, provocando

uma verdadeira modificação neuroadaptativa, reduzindo a resposta celular frente à mesma dose inicial da droga opioide (SWIFT; LEWIS, 2009). A interação da substância opioide a seus receptores causa a regulação positiva da via do AMPc em neurônios do *locus coeruleus* (NESTLER; MALENKA, 2004) e NAc (CHIENG; WILLIAMS, 1998). O reforço positivo decorrente do uso de opioides parece estar ligado a um número restrito de regiões cerebrais, incluindo corpos celulares dopaminérgicos dentro da ATV (WISE, 1987), assim como no NAc que faz parte do sistema de recompensa cerebral (BROWN; JACOBUS; MCKENNA, 2016). De acordo com estudos anteriores, vários sistemas de neurotransmissores, incluindo dopamina, glutamato, acetilcolina, ácido gama-aminobutírico (GABA), histamina e óxido nítrico estão envolvidos na recompensa da morfina (ALAEI; POURSHANAZARI; RAFATI, 2002; ZARINDAST, et al., 2004).

Figura 2 - Papel dos opioides na via de recompensa encefálica.



Fonte: DAVID; GOLAN, 2009.

A exposição crônica aos opioides pode reduzir a neurogênese, alterando assim, a transmissão sináptica do hipocampo (EISCH et al., 2000). De particular importância, essas regiões cerebrais estão envolvidas na informação associada à adição (GIRAULT, 2012; NESTLER, 2001; SADAT-SHIRAZI, et al., 2018), participando de respostas relacionadas ao sistema de recompensa (KATZ et al., 2007; REZAYOF et al., 2003) e ao comportamento de busca pela droga, mesmo após a desintoxicação (PERGOLIZZI et al., 2017). Desse modo, os opioides são bem conhecidos por sua capacidade de produzir euforia, motivando certos indivíduos a se envolver com uso recreacional com consequências individuais e sociais devastadoras (PERGOLIZZI et al., 2017; ROSENFIELD; LOOSE, 2007).

Os opioides podem alterar a morfologia do cérebro através de mecanismos neurotóxicos vasculares, metabólicos e diretos (CUNHA-OLIVEIRA; REGO; OLIVEIRA, 2008). O uso contínuo e crônico de opioides pode levar a danos neuronais ou à morte (BÜTTNER, 2011), à redução da densidade de substância cinzenta no córtex pré-frontal (YUAN et al., 2009), consistente com estudos que relatam alterações no fluxo sanguíneo cerebral no córtex pré-frontal e alterações comportamentais associadas (DAGLISH et al., 2001; SELL et al., 1999). Outras regiões envolvidas no sistema de recompensa que também mostram volumes menores incluem o NAc (SEIFERT et al., 2015) e a amígdala (UPADHYAY et al., 2010). As alterações relacionadas ao NAc envolvem comportamentos de busca pela droga (CARLEZON; THOMAS, 2009) e as alterações relacionadas à amígdala podem facilitar a vulnerabilidade a comportamentos de risco (LOVE; STOHLER; ZUBIETA, 2009).

1.4. MODELO ANIMAL PARA AVALIAÇÃO DE ADIÇÃO À DROGAS ADITIVAS

O uso repetido de drogas proporciona uma forte associação entre os efeitos hedônicos da droga e o ambiente de administração, e esse pode contribuir para o uso continuado da droga de abuso, bem como para o alto risco de recaída após abstinência (HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006), como dito anteriormente. Nesse sentido, o protocolo de preferência de lugar condicionado (PLC) tem sido amplamente utilizado para a pesquisa na área da adição a drogas de abuso envolvendo experimentos animais (ANTONIAZZI et al., 2014; KUHN et al., 2015; SEGAT et al., 2014; VEY et al., 2016). Tal teste se baseia na capacidade de estímulos ambientais, originalmente neutros, desenvolverem propriedades motivacionais positivas (preferência pelo lugar) ou negativas (aversão ao ambiente), após serem apresentados a esse ambiente repetidamente na presença de uma substância com potencial de abuso (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006).

O aparato de PLC consiste em uma caixa com três compartimentos separados por portas de guilhotina manuais: duas caixas de igual tamanho ($45 \times 45 \times 50\text{cm}$) e intensidade equivalente de luz, mas com diferentes características internas das paredes e pisos. Um compartimento possui piso branco e paredes listradas, enquanto o outro possui piso listrado e paredes brancas lisas. O acesso a esses dois compartimentos ocorre através de um compartimento central cinza ($18 \times 36 \times 50\text{cm}$), com piso liso. Estímulos variados como cor, textura e odor podem ser usados na indução do PLC e têm sido amplamente empregados em

modelos animais que utilizam ratos (ANTONIAZZI et al., 2014; KUHN et al., 2015; SEGAT et al., 2014; VEY et al., 2016).

O protocolo de PLC é dividido em várias fases: I) Habituação: fase que os animais são alocados no aparato para excluir o seu comportamento exploratório natural; II) Pré teste: realizado para excluir uma eventual preferência natural do animal por algum compartimento; III) Condicionamento: administra-se a droga no animal e aloca-o em um dos compartimentos e, no turno inverso, administra-se o veículo e aloca-se o animal no compartimento oposto ao anterior; IV) Teste:fase que o tempo gasto pelo animal no compartimento em que recebeu a droga na fase de condicionamento é avaliado. Ou seja, após alguns dias de administração da droga, é permitido que os animais explorem livremente o aparato. O tempo gasto no ambiente associado à droga é considerado como um índice de preferência. Assim, um maior tempo gasto no compartimento em que o animal recebeu a droga indica preferência, enquanto que o menor tempo indica aversão (HEINRICHS et al., 2010; VOIGT et al., 2011).

1.5. EXERCÍCIO FÍSICO: HISTÓRICO E BENEFÍCIOS

Na história da humanidade, o exercício físico é uma das mais antigas atividades. No estilo de vida nômade do homem primitivo (10.000a.C.), a atividade física regular foi impulsionada pelo desejo de sobreviver através da caça e coleta (KINLOCH, 1985; HHS, 1996). Ademais, foi um componente principal da vida nas celebrações e nos jogos culturais, além de ser uma prática integrante da expressão religiosa, social e cultural (EATON; SHOSTAK; KONNER, 1988).

A crença de que o exercício físico poderia ser considerado medicamento ou parte da medicina não é nova. No início do século XX, antes que o foco principal da medicina ocidental se tornasse o cuidado com os doentes, uma grande parte dos deveres médicos estavam focados na preservação e promoção da saúde, além da prevenção da doença (CARVALHO et al., 2016). Essa forte ênfase na saúde, em detrimento da doença, data de dois médicos mais proeminentes do mundo antigo: Hipócrates (460-370a.C.) e Galeno (129 - 210d.C.) (BERRYMAN, 2010). Foi Hipócrates que escreveu dois livros sobre dietas alimentares e observou que apenas comer não mantém um homem saudável; também deve-se praticar exercícios físicos. Assim, a alimentação e a atividade física trabalharão em conjunto para produzir saúde (ALLBUTT, 1924). Galeno, por sua vez, estruturou sua teoria médica em torno das “coisas naturais” (da natureza - fisiologia), das “coisas não naturais” (coisas não inatas) e das “coisas contranaturais” (contra a natureza - patologia). O centro dessa teoria era

a saúde e os usos e abusos das seis “coisas não-naturais”: 1) ar, 2) alimentos e bebidas (dieta), 3) sono e vigília, 4) movimento (exercício físico) e descanso, 5) excreções e retenções, e 6) paixões da mente. Se as coisas não-naturais fossem observadas e praticadas com moderação, a saúde seria o resultado. Mas se não fossem seguidas, realizadas em excesso ou entrassem em desequilíbrio, resultariam em doença ou enfermidade. Essas seis categorias contemplam todas as atividades referentes à saúde para as quais o indivíduo tem controle (BERRYMAN, 1989). Atualmente, a atividade física permanece de fundamental importância para a saúde e o bem-estar, uma vez que trata-se de uma prática de baixo custo e de fácil acesso, além de ser uma maneira simples e econômica de reduzir os custos de saúde para a sociedade, melhorar a qualidade de vida e prevenir a morte precoce (BIZE; JOHNSON; PLOTNIKOFF, 2007; PRATT et al., 2014).

Atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em gasto energético (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985), dentro da qual está o exercício físico. Entre os benefícios mais importantes da atividade física regular estão a redução da prevalência de muitas doenças, bem como a diminuição da mortalidade (CELIS-MORALES et al., 2012; LÖLLGEN; BÖCKENHOFF; KNAPP, 2009; WILLIAMS, 2012), sendo que a redução desses fatores são independente de condições socioeconômicas, como educação e renda (LANTZ et al., 1998). O exercício físico é frequentemente associado à redução da mortalidade por todas as causas e a associação inversa, entre exercício físico e mortalidade, foi encontrada em ambos os sexos (SABIA et al., 2012). Evidências apontam impacto favorável do exercício físico sobre condições crônicas de saúde que possuem as maiores ocorrências de fatalidades na sociedade, como distúrbios cardiovasculares, obesidade, e câncer de mama e de cólon (WARBURTON; BREDIN, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a inatividade física como a quarta principal causa de mortalidade global e um dos principais determinantes de várias doenças crônicas (GAZIANO; GALEA; REDDY, 2007; WHO, 2008). Nesse contexto, o exercício físico é reconhecido como um importante componente de um estilo de vida saudável e é recomendado por profissionais da saúde e cientistas (DONALDSON, 2000; WATTANAPISIT; TUANGRATANANON; THANAMEE, 2018). Evidências apontam que maiores benefícios fisiológicos e psicológicos ocorrem se o exercício físico for realizado em um ambiente natural, denominado exercício verde (GLADWELL et al., 2013; SHANAHAN et al., 2016).

A relação entre o exercício físico regular e a saúde física e psicológica tem sido bem documentada na literatura (EIJKEMANS et al., 2012; HOLTERMANN et al., 2013; STANTON; HANDY; MESTON, 2018). Estudos pré-clínicos demonstram os benefícios do exercício físico na neurogênese e gliogênese (AKERS et al., 2014; MA et al., 2017; VOSS et al., 2013), além de possuir efeitos benéficos para a saúde em geral (LIANG; BELLO; MORAN, 2015), os quais são mediados por alterações biológicas que ocorrem a longo prazo e, assim, podem explicar seus múltiplos benefícios em vários estados patológicos (BARDO; COMPTON, 2015). Em concordância com esses achados, estudos têm mostrado associações positivas entre exercício físico e funções cognitivas, bem-estar e saúde mental na população em geral (BIDDLE; ASARE, 2011; RACHELE et al., 2014). Além disso, tem se mostrado os efeitos benéficos do exercício físico em variáveis relacionadas à cognição, como a atenção e função executiva (DUNSKY et al., 2017; NORTHEY et al., 2018), da mesma forma que em cérebros de indivíduos saudáveis e com transtornos psiquiátricos ou neurodegenerativos (ANG; GOMEZ-PINILLA, 2007). Os benefícios físicos, psicológicos, sociais e emocionais alcançados a partir da atividade física podem ser obtidos por indivíduos de todas as idades (MICHAËLSSON et al., 2007; WARBURTON; NICOL; BREDIN, 2006). Uma evidência disso foi demonstrada durante o período da adolescência em que o exercício físico foi associado à redução da probabilidade de depressão e transtornos de ansiedade (BOONE; LEADBEATER, 2006), à menor probabilidade de iniciar o uso de tabaco e maconha (LISHA; CRANO; DELUCCHI, 2014) e ao maior bem-estar (MILLER; HOFFMAN, 2009).

A influência do tempo de execução/prática do exercício físico também tem sido investigada. Evidências demonstram uma associação positiva entre os seus efeitos benéficos à saúde e o tempo de execução da atividade física, sugerindo uma mudança de estilo de vida sedentário para um estilo de vida com níveis recomendados de atividade física (GARBER et al., 2011). Mesmo em curto prazo (agudo), o exercício físico já demonstrou vários benefícios, observados através da diminuição de parâmetros de depressão e ansiedade (DUNN; TRIVEDI; O'NEAL, 2001; FRITZ; O'CONNOR, 2016) e aumento das medidas de autoestima e bem-estar (FOX, 1999). Além disso, o exercício físico pode reduzir a impulsividade (WANG et al., 2016), aumentar o funcionamento cognitivo (NANDA; BALDE; MANJUNATHA, 2013; WENG et al., 2015) e o controle executivo (LABELLE et al., 2013). Assim, a cronificação da prática do exercício físico torna os seus benefícios mais evidentes (AREM et al., 2014) e uma relação entre a periodicidade/cronicidade de execução do exercício físico e os desfechos em saúde já foi proposta (HASSELL et al., 2007),

associando maiores benefícios a longos prazos da prática de atividade física (GARBER et al., 2011).

1.6. INTER-RELAÇÃO ENTRE EXERCÍCIO FÍSICO E DROGAS ADITIVAS

O abuso de drogas, como os opioides, provoca alterações neurais de longa duração que podem estar relacionadas às anormalidades comportamentais associadas aos déficits cognitivos, à tolerância e à dependência (WILLIAMS; CHRISTIE; MANZONI, 2001). Por se tratar de um distúrbio crônico, a drogadição requer um tratamento a longo prazo e, dessa forma, foram desenvolvidos medicamentos para aumentar os benefícios das intervenções psicossociais, reduzir o desejo pela droga e diminuir a probabilidade de recaída ao seu uso compulsivo (HOSSEINI et al., 2009). No entanto, até o momento, a maioria desses tratamentos não tiveram resultados satisfatórios (KAMPMAN, 2008; RIBEIRO; MARQUES, 2002) e vários pesquisadores têm empregado esforços na descoberta de métodos adjuvantes que, juntamente aos tratamentos convencionais, possam ser efetivos no tratamento da drogadição, sendo o exercício físico uma dessas ferramentas estudadas (AARDE et al., 2015; BARDO; COMPTON, 2015; SEGAT et al., 2014; 2017).

O exercício físico exerce seus efeitos sobre o cérebro através de vários mecanismos, incluindo neurogênese e liberação de opioides endógenos (McGOVERN, 2005). Evidências mostraram que os níveis de endorfina, principalmente a β -endorfina, são elevados com o exercício físico (LETT et al., 2002), podendo produzir euforia semelhante aos opiáceos, e melhora o humor (McGOVERN, 2005). Já foi sugerido que o exercício físico pode elevar a produção endógena de catecolaminas quando os níveis estão reduzidos após o uso descontinuado de drogas, e atuar como um catalisador na promoção do crescimento neuronal, de tal forma que o exercício físico poderia ser usado como uma ajuda valiosa no tratamento da adição (HOSSEINI et al., 2009). Outras evidências mostram que o exercício pode alterar os níveis de alguns neurotransmissores que também são envolvidos nos efeitos hedônicos das drogas aditivas, como a dopamina, noradrenalina e epinefrina (MEEUSEN et al., 1997; SKRIVER et al., 2014). Além disso, o exercício físico pode aumentar a expressão da tirosina hidroxilase, a enzima limitante na síntese de dopamina, sendo assim capaz de aumentar a produção de catecolaminas (JI et al., 2014).

Os transtornos não relacionados às drogas aditivas, como os transtornos alimentares e os jogos de azar, foram conceituados dentro do quadro da adição, com dados neurobiológicos que suportam a semelhança entre a dependência de substâncias, a obesidade e o jogo

patológico (FRASCELLA et al., 2010; GRANT et al., 2010; KENNY, 2011; POTENZA, 2008). Nesse contexto, o exercício físico também tem sido demonstrado como um evento gratificante (AZRIN; EHLE; BEAUMONT, 2006; BRENÉ et al., 2007), pois a longo prazo leva a neuroadaptações importantes, sugerindo que ativa o circuito neural de recompensa (LETT et al., 2002; SMITH et al., 2008). Outros estudos demonstram que o exercício físico provoca alterações em vários sistemas de neurotransmissores (DE OLIVEIRA et al., 2010), como o sistema dopaminérgico (EDDY; STANSFIELD; GREEN, 2014; YOON et al. 2007), que tem sido relacionado ao abuso de drogas em estudos clínicos (STICE et al., 2008; VOLKOW et al., 2008; WANG et al., 2004) e pré-clínicos (WU et al., 2009). Dados comportamentais mostram que numa situação de escolha em que a atividade física e as drogas aditivas estão disponíveis concomitantemente, o exercício físico pode substituir o uso de drogas (BARDO; COMPTON, 2015). Além disso, indivíduos que se envolvem em atividades, como o exercício físico, durante o curso do tratamento para transtornos por uso de substâncias, mostram melhores resultados em relação aos indivíduos não exercitados (BROWN et al., 2010; WEINSTOCK; BARRY; PETRY, 2008). Estudos pré-clínicos demonstraram consistentemente que ratos que receberam acesso livre a rodas de corrida em sua gaiola a curto (22 horas) e a longo (6 semanas ou mais) prazo, autoadministraram menos cocaína, metanfetamina e outros estimulantes psicomotores que ratos sedentários (AARDE et al., 2015; MILLER et al., 2012; SMITH et al., 2012). Outros estudos observaram que o exercício de curto prazo reduziu os sintomas associados à abstinência de nicotina (ABRANTES et al., 2014; PRAPAVESSIS et al., 2014; WILLIAMS et al., 2011) e o desejo por nicotina e metanfetamina (ELIBERO; VAN RENSBURG; DROBES, 2011; HAASOVA et al., 2013; WANG et al., 2016). Além disso, o exercício físico de longo prazo reduz a recompensa da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), além de reduzir a liberação aguda de dopamina estimulada por MDMA no NAc (CHEN et al., 2008). A recompensa após o exercício físico é mediada por opioides endógenos (EPLING; PIERCE, 1992), de tal forma que agonistas e antagonistas opioides podem reforçar e atenuar, respectivamente, os efeitos prazerosos da atividade física (BOER et al., 1990; SISTI; LEWIS, 2001). Neste sentido, o efeito de recompensa do exercício físico pode ser gerado por ativar os mesmos sistemas cerebrais/neuronais ativados pela morfina e outros opiáceos (LETT et al., 2002).

2. JUSTIFICATIVA

O exercício físico promove a saúde e a função neural, uma vez que apresenta reconhecida capacidade de induzir neurogênese (HOSSEINI et al., 2009), além de melhorar a função cognitiva (AHMADIASL; ALAEI; HÄNNINEN, 2003; ARCHER, 2011; SUTOO; AKIYAMA, 2003). Por outro lado, a drogadição configura como um grave problema de saúde pública mundial, influenciando negativamente as relações familiares, os valores pessoais e sociais (GONÇALVES et al., 2016; PERGOLIZZI et al., 2017). Considerando, que os tratamentos atualmente disponíveis para a drogadição são escassos, ineficazes e apenas paliativos (KAMPMAN, 2008; RIBEIRO; MARQUES, 2002), nosso grupo de pesquisa tem empregado esforços no estudo de novas abordagens terapêuticas para auxiliar no tratamento e prevenção da drogadição e, entre estas, está o exercício físico (SEGAT et al., 2014; 2017), uma vez que tal prática pode modificar funcionalmente os sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotonérgico no SNC (LU; CHOW, 1999; SCHINDER; POO, 2000). De particular importância para o desenvolvimento do presente estudo, o exercício físico e a drogadição podem ativar os mesmos circuitos cerebrais (BARDO; COMPTON, 2015; CZOTY; MARTELLE; NADER, 2010; ZERNIG et al., 2007), o que torna essa abordagem interessante e promissora. É importante ressaltar que, até o presente, nenhum estudo mostrou a influência do tempo (curto, médio e longo prazo) de prática do exercício físico sobre parâmetros moleculares e comportamentais relacionados à drogadição por drogas opioides, em particular a morfina, o que enfatiza a importância inovadora do presente estudo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações comportamentais e adaptações moleculares consequentes à prática de exercício físico em curto, médio e longo prazo, em ratos expostos à morfina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a influência de diferentes tempos de prática de exercício físico sobre a preferência por morfina;
- Verificar a influência de diferentes tempos de prática de exercício físico sobre comportamentos de memória de trabalho e locomoção em ratos previamente expostos à morfina;
- Avaliar a efetividade do protocolo de exercício físico;
- Quantificar marcadores moleculares relacionados ao sistema dopaminérgico e receptor de glicocorticóide no hipocampo e *nucleus accumbens* de ratos submetidos à prática de diferentes tempos de exercício físico e expostos à morfina.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1. MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de um manuscrito científico, o qual se encontra aqui estruturado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito, seguindo as normas exigidas pelo periódico internacional, para o qual foi submetido.

Physical exercise modifies behavioral and molecular parameters related to opioid addiction regardless of training time

Rosa H.Z.^a, Barcelos R.C.S.^a, Segat H.J.^b, Roversi Kr.^a, Dias V.T.^a, Milanesi L.H.^a, Burger M.E.^{abc}

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

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

^cDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Corresponding authors

Marilise Escobar Burger (Ph.D)

Pharmacology Graduation Program, UFSM

marilise.burger@uol.com.br

Raquel Cristine Silva Barcelos (Ph.D)

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFSM

raquel.barcelos@hotmail.com

Total words: 4617 words.

Abstract

Addiction is a devastating disorder that distresses the entire world. The search for effective non-pharmacological therapies to treat abusive drug addiction is urgent. Physical exercise is a useful tool to treat addictions because addictive drugs and exercise share a common neural circuit. Considering this, we evaluated molecular adaptations due to time of physical exercise in opioid exposed animals. Rats performed one among three swimming protocols: sedentary (SED), short-term exercise (S-EXE), medium-term exercise (M-EXE) and long-term exercise (L-EXE) for 14, 28 and 42 days, respectively. On the last exercising week, the animals were concomitantly submitted to a paradigm of morphine-conditioned place preference (CPP), and subsequently in the y-maze task. In sequence behavioral assessments and euthanasia were performed and the brain areas: *nucleus accumbens* (NAc) and hippocampus were dissected for molecular measurements (DAT, D1R, D2R and GR). Our findings showed that, besides minor morphine-CPP, all exercised groups showed a decreased DAT, D1R, D2R and GR immunoreactivity, in comparison to the SED group. Regardless of training time, our results show that even a short-term exercise is able to modify behavioral parameters related to drug withdrawal and still exert significant adaptations in molecular targets of the dopaminergic system and in glucocorticoid receptors, which are closely linked to drug addiction. Our proposal is that the physical exercise can be definitively included in drug addiction detox programs, acting as an important tool together with the pharmacological treatment, which alone has shown low efficacy.

Keywords: Opioid addiction; DAT; D1R; D2R; GR; Morphine-CPP.

1. Introduction

Addiction is a devastating disorder found all over the world (Büttner, 2017), comprising a set of physiological, behavioral and cognitive phenomena, which together, alter personal, family and social values. The main addictive drugs predominantly consumed around the world, include opiates, cannabis, cocaine and correlates, amphetamine and its derivatives (Karch and Drummer, 2016; Connor et al., 2014). Over the last decades, opioid drugs prescription has dramatically increased in well-developed countries, being interconnected to the rising rates of abuse and addiction following the medical treatment (Rudd et al., 2016). The non-clinical use of opioid drugs is variable, ranging from a rare use (up to twice a year), to frequent and compulsive use, fitting in the addiction issue (Compton et al., 2016). These substances are able to increase dopamine (DA) levels in the *Nucleus accumbens* (NAc) (Carboni et al., 1990; Di Chiara and Imperato, 1988b), a brain area closely involved in addiction. Our study focuses on the fact that, in the last years, opioid overdose reports are at an all-time high (Calcaterra et al., 2013; Jones et al., 2015). In this context, morphine, an opioid drug, is related to physical and psychological signs, including anxiety and depression besides autonomic-somatic symptoms (Bates et al., 2017; Miladi-Gorji et al., 2012). Chronic morphine exposure is connected to modifications in the neural circuits plasticity, especially affecting the brain reward processing system (Wang et al., 2015), leading to craving, desire to reinforce an abusive use, besides potential relapse symptoms years after drug withdrawal (Bates et al., 2018; Marchant et al., 2013).

In this sense, an effective treatment to opioids addiction is in fact scarce and only palliative, leading to frequent relapsing episodes. Currently, the use of opiates by addicted people is being replaced by synthetic opioid drugs; for example methadone and/or buprenorphine because they are able to develop minor abstinence symptoms following the drug withdrawal (Wakeman, 2017; Mauger et al., 2014). Regarding this, the search for new strategies that may contribute to the treatment of opioid addiction is an urgent and challenging issue (Lynch et al., 2013). Physical exercise is a potential non-pharmacological treatment that shares the system involved in the early and late stages of the addiction process (Greenwood et al., 2011). Evidences have shown that both physical exercise and addictive drugs activate common reward neural circuits (Lett et al., 2002; Smith et al., 2008), modifying different neurotransmitter systems (de Oliveira et al., 2010), especially the dopaminergic system (Eddy et al., 2014), which exerts a pivotal role in the addiction (Wu et al., 2009). Considering the practice of physical exercise as a favorable tool against drug addiction, several studies have

shown such benefits (Segat et al., 2014; 2017; Lacy et al., 2014; Sanchez et al., 2015); however, so far no study discussing the influence of physical exercise practice time on drug addiction was developed. This study aimed to evaluate behavioral changes and consequent molecular adaptations following the practice of different time points of physical exercise in animals exposed to morphine conditioning in conditioned place preference (CPP) paradigm.

2. Experimental Procedure

2.1. *Animals and experimental protocol*

Thirty three male adult *Wistar* rats (60 day-old) were separated in groups of four (± 1) animals per Plexiglas® cage with free access to food (standard chow; Supralab®, Alisul Alimentos LTDA, São Leopoldo, RS, Brazil) and water in a room with controlled temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), on a 12h light/dark cycle with lights on at 07:00a.m. Before starting the experimental protocols, the animals underwent a 7-day-period of acclimatization. The Animal Ethical Committee of the Federal University of Santa Maria (9373231116-UFSM), which is affiliated to the Council of Animal Experiments (CONCEA), following international norms of animal care and maintenance approved all procedures. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiment.

Animals were randomly placed in five experimental groups, according to the physical protocol regimen: (I and II) Sedentary, vehicle- or morphine-injected group (SED; n=13), (III) Short-term exercise, morphine-injected group (S-EXE; n=7), (IV) Medium-term exercise, morphine-injected group (M-EXE; n=7) and (V) Long-term exercise, morphine-injected group (L-EXE; n=6). While SED groups were only placed in the water without swimming, S-, M- and L-EXE were submitted to the swimming test protocol for two, four and six weeks, respectively. Morphine administration was carried out according to CPP, which concomitantly occurred with the last week of aerobic physical exercise protocol. Group I received the vehicle (solution 0.9% sodium chloride, intraperitoneal (i.p.) and groups II to V received morphine sulfate (4 mg/kg, i.p.) (Vey et al., 2016). After (24h) CPP paradigm, working memory and locomotor activity behaviors of the animals were assessed in Y-Maze paradigm. In sequence, the animals were euthanized for brain tissues collection and molecular analysis (Figure 1).

2.2. *Physical exercise protocols*

The exercise was performed in a swimming pool (diameter 180cm×depth 45cm) under uninterrupted supervision, with water temperature set to $29\pm 1^{\circ}\text{C}$, for 1h per day (two sessions

of 30min with a 10min resting interval), five times per week, for 2, 4 and 6 weeks; respectively, the short-term exercise, medium-term exercise and long-term exercise were performed. During the resting interval, the animals were kept on a platform that allowed them to rest without leaving the water (adapted Segat et al., 2014). The effectiveness of the physical exercise protocol was monitored by body weight (BW) gain, levels of blood lactate and bilateral epididymal fat weight.

2.3. Drug

Morphine sulfate (10mg/mL, Dimorf®, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brazil) was used according to Vey et al. (2015). Morphine sulfate was diluted in 0.9% sodium chloride solution to a standardized final concentration of 4 mg/kg.

2.4. Conditioned place preference (CPP)

The CPP apparatus consisted of three compartments, two of equal size, but with different textures, which are interconnected by a neutral central compartment separated by manual guillotine doors, as broadly described in our studies (Segat et al., 2014, 2016, 2017; Kuhn et al., 2013, 2015a; Vey et al., 2016). This experimental paradigm was performed and adapted from Thanos et al. (2010).

CPP was performed according to the following steps: habituation, pre-test, conditioning, and test. The habituation and pre-test took place as shown in our previous studies (Segat et al., 2014, 2016, 2017; Kuhn et al., 2013, 2015a; Vey et al., 2016). The next day of pre-test, the rats were assigned to receive saline or morphine (4 mg/kg; i.p.), as described by Vey et al. (2015). After 4 days of conditioning, the rats were placed in the neutral choice chamber with access to the entire apparatus, the longest time spent in the drug-paired compartment was considered a preference. Quantifications in the CPP paradigm were assessed by three observers who were unaware of the experimental groups.

2.5. Y-maze test

Y-maze apparatus consisted of three arms Y-shaped (32cm (long)×10cm (wide)×26cm (walls)) (Chu et al., 2012). Briefly, each rat was placed in the center of the Y-maze and was allowed to freely explore the maze during 5min. The total number and the sequence of arms entered were quantified. The total number of arm entries was used as a measure of locomotor activity for the animals. Alternation was defined as three consecutive entries in three different arms, and this measures the memory work. To minimize odor cues,

the maze was wiped clean with ethanol 20°GL before each test. The percentage alternation score was calculated in accordance with Segat et al. (2016).

2.6. Measurement of lactate levels in blood

A blood sample was immediately collected after the last swimming session, i.e., experimental days 14, 28 and 42 for SED, S-EXE, M-EXE and L-EXE groups, respectively, via a small cut in the tail tip vein (25µL) of exercised and sedentary groups (Teixeira et al., 2011). Lactate levels were determined in a blood lactate analyzer (Accutrend® Lactate) to determine the aerobic resistance of the animals that indicates the effectiveness of the swimming protocol (Teixeira et al., 2011).

2.7. Epididymal fat deposits collection

The epididymis is a conjoined tubule located above each testis. Epididymal fat deposits collection from the SED, S-EXE, M-EXE and L-EXE groups was performed. Epididymal fat weight (EFW)/BW ratio was calculated applying the following formula (adapted from Rocha-Rodrigues et al., 2017):

$$\text{EFW / BW ratio} = \frac{\text{EFW (g)}}{\text{BW (g)}} \times 100$$

2.8. Tissue preparations

One day after the last behavioral assessment, the animals were euthanized by cervical decapitation under anesthesia (sodium thiopental, 50 mg/kg, i.p.). Brains were removed and dissected, according to Paxinos and Watson (2007), to remove the hippocampus and the NAc, which were used for molecular analysis. These brain structures were selected due to the fact that the hippocampus is the main brain area connected to the environment where a drug is taken and reward circuits are activated, becoming a potential target to study drug addiction. The NAc is modulated by the dopamine, thus exerting a critical role in the reward circuits. Furthermore, the motivated behaviors by neurochemical changes addictive drugs-induced in mesocorticolimbic pathways are coordinated by these brain areas (Hyman et al., 2006).

2.9. Immunoblotting analysis

Hippocampal and NAc tissues were homogenized with a lysis buffer (20mM Tris-HCl pH=8.0, 137mM NaCl, 1% NP40, 10% glycerol, 10µg.mL⁻¹ aprotinin, 1mM

phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 0.5mM sodium vanadate, 0.1mM benzethonium chloride). Homogenates were centrifuged to obtain supernatants where total protein concentration was determined according to the MicroBCA procedure (Pierce, IL, USA), using bovine serum albumin as standard. Briefly, the separation of protein samples were carried out by electrophoresis on a 10 and 12.5% polyacrylamide gel (according to protein molecular weight), and electrotransferred to a PVDF membrane (Millipore, MA, USA). Non-specific binding sites were blocked in Tris-buffered saline (TBS), pH 7.6, containing 5% non-fat dry milk. Membranes were rinsed in buffer (0.05% Tween 20 in TBS) and incubated with primary antibodies: anti-actin (1:2000), anti-dopamine transporter (DAT) (1:500), anti-D1 receptor (D1R) (1:500), anti-D2 receptor (D2R) (1:500) and anti-glucocorticoid receptor (GR)(1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) followed by anti-rabbit or anti-goat IgG horseradish peroxidase conjugate (1:40.000; Santa Cruz Biotechnology). The immune complexes were visualized by chemiluminescence using the ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA) according to manufacturer's instructions. The film signals were digitally scanned and quantified using ImageJ® software. Actin was used as the internal control for Western blot and the values were used for experimental data standardization.

2.10. Statistical analysis

Data was expressed by mean and standard errors. Statistical difference between negative control (vehicle-SED group) and positive control (morphine-SED group) was analyzed by Student's T test. The exercised groups (S-EXE, M-EXE, L-EXE) and the morphine-SED one had their differences analyzed by one-way ANOVA, followed by the Tukey test when appropriated (software package Statistica® 8.0 for Windows was used). Values of $p<0.05$ were considered statistically significant for all comparisons made. GraphPad Prism® (version 5.01) was used for figures.

3. Results

3.1. Influences of the physical exercise on BW gain, EFW and levels of blood lactate are shown in Table 1.

All time points of exercise (S-EXE, M-EXE and L-EXE) were related to decreased BW gain, minor EFW/BW ratio and increased levels of blood lactate in comparison to SED group ($p<0.05$).

3.2. Influence of the physical exercise on morphine-CPP paradigm is shown in Figure 2.

Analyzing both sedentary groups, the morphine-conditioned animals spent higher time in the drug-conditioned compartment ($p<0.05$), and all exercise protocols reduced this preference ($p<0.05$) in comparison to the sedentary group.

3.3. Influence of the physical exercise on working memory and locomotor activity in Y-maze paradigm is shown in Figure 3.

No differences among the experimental groups were observed in this experimental paradigm.

3.4. Influence of the physical exercise on different molecular markers DAT, D1R, and D2R immunoreactivity in the Nucleus accumbens is shown in Figure 4.

Analyzing both sedentary groups, morphine conditioning increased DAT, D1R and D2R in relation to vehicle group (Fig. 4A, B and C). Considering the exercised groups, both DAT and D1R levels in the NAc were decreased by all exercise protocols in comparison to the sedentary groups (Fig. 4A and B). However, the increased D2R immunoreactivity morphine-induced in this brain tissue was decreased by the medium-term (M-EXE) and longer-term exercise (L-EXE) ($p<0.05$) because of the similarity between values (Fig. 4C).

3.5. Influence of the physical exercise on different molecular markers DAT, D1R, and D2R immunoreactivity in the hippocampus is shown in Figure 5.

Morphine-conditioning in sedentary animals increased DAT, D1R and D2R in comparison to vehicle-treated animals (Fig. 5A, B and C). Among the exercised animals, both hippocampal DAT and D1R levels were decreased by the three exercise protocols in relation to the sedentary group (Fig. 5A and B). In addition, the increased D2R immunoreactivity morphine-induced in this brain tissue was decreased only with the longer-term exercise (L-EXE) ($p<0.05$), presenting comparable values to the sedentary group (Fig. 5C).

3.6. Influence of physical exercise on GR levels in both nucleus accumbens and hippocampus is shown in Figure 6.

Analyzing the sedentary groups, morphine conditioning increased GR immunoreactivity in both NAc and hippocampus (Fig. 6A and B, respectively). Concerning the exercised

groups, while GR levels were decreased by all exercise protocols in the NAc, only the longer-term exercise (L-EXE group) decreased this molecular marker in the hippocampus (Fig. 6B).

4. Discussion

The dopaminergic reward system, which was activated by morphine-conditioning, showed different responses after distinct time points of physical exercise. Due to this, our hypothesis is that depending on the length of physical activity, drug preference behaviors resulting from morphine-conditioning may be attenuated by the physical exercise, what modifies in a favorable way the molecular markers in the dopamine reward system. Our findings showed: (i) the effectiveness of the physical exercise protocols by the increased levels of blood lactate as well as the lower BW gain and reduced percentage of the EFW/BW ratio. These markers were significantly different from SED group; (ii) sedentary animals showed morphine-CPP; (iii) physical activity was able to prevent morphine-CPP, regardless of running time, as observed by minor time spent in the drug-conditioned compartment. Besides, (iv) morphine-conditioning increased DAT, D1R, D2R and GR immunoreactivities in the hippocampus and NAc; (v) all protocols of physical exercise decreased these dopamine molecular markers in NAc and hippocampus, being the L-EXE group more homogeneous.

The increase in blood lactate, immediately after training, considering the rested animals, corresponds to the exercise practice (Jones and Carter, 2000). According to our results, the exercised groups showed an average of 12% increase in blood lactate levels compared to the sedentary group (SED groups), which indicates the effectiveness of the physical exercise protocol, determining the aerobic resistance (Gobatto et al., 2001; Teixeira et al., 2011). In addition, exercised groups presented minor BW gain (about 36%) together with reduced body fat accumulation, indicating a higher caloric burn. Kiens et al. (1993) demonstrated that physical exercise increases muscle capillarity allowing a greater uptake of free fatty acids from the blood. This increased oxidation of lipids due to an enhanced uptake of free fatty acids from plasma by the trained muscle (Kiens et al., 1993) can be related to lower BW gain in the exercised groups, as observed in this study.

In sequence, our study evaluated the phenomena involved in the addiction that can be better understood through animal models, such as CPP (Cruz et al., 2008). CPP paradigm shows similarity to the Pavlovian classic conditioning, once an “unconditioned stimulus” can be acquired in the repeated sections as “conditioned stimuli” (Tzschenk, 1998). The preference of humans and animals for some place over other is natural. This can be linked to sensory characteristics of particular places, and it may also be acquired after events associated

with those places (Huston et al., 2013). In this context, CPP paradigm assumed a crucial importance and is commonly used in researches to study reinforced effects of natural and pharmacological stimuli (Tzschentke, 1998). Our research group has widely employed the CPP paradigm (Kuhn et al., 2013; Segat et al., 2014, 2016, 2017; Vey et al., 2016), because of the above-mentioned advantages and because it is a protocol of prompt reproducibility and simplicity.

Morphine is a potential addictive drug, which is able to develop place preference in CPP paradigm. Therefore, our experimental protocol included a positive (morphine-conditioned sedentary animals) and a negative control (non-conditioned sedentary animals) in order to monitor the morphine-induced hedonic symptoms (Bao et al., 2007; Kauer and Malenka, 2007). Our findings showed that the positive control showed morphine-CPP in relation to the negative control, confirming that our CPP paradigm was successfully conducted. This way, physical exercise prevented the drug conditioning, 25%, 45% and 26% in the S-EXE, M-EXE and L-EXE groups, respectively, as observed by the short time spent in the drug-conditioned compartment compared to SED group. In the Y-maze task 48h after the last morphine administration, the locomotor activity and memory of all experimental groups showed no significant difference as well as the total arm entries number and the percentage of the alternations. The behavioral outcomes that were assessed during the drug abstinence period indicate that morphine-CPP, which was observed in SED group, was not related to locomotor influence or memory loss, according to previous studies (Segat et al., 2016; Takamatsu et al., 2011). Furthermore, these results reinforce that the CPP findings are due to the morphine-induced hedonic effects.

In pre-synaptic dopaminergic nerve terminals, DAT exerts control on the dopamine levels available for binding to pre- and post-synaptic dopamine receptors (Amara and Kuhar, 1993). Our findings demonstrated that morphine-conditioning increased the immunoreactivity of the DAT in the sedentary animals, which showed increased preference for morphine. As the dopamine uptake through DAT provides the primary mechanism to eliminate dopamine from synapses (Carboni et al., 1990), we can infer that the greatest amount of dopamine released in the synaptic cleft after morphine-conditioning culminated in the increased DAT immunoreactivity, as observed in both hippocampus and NAc of the SED group. However, among exercised groups, lower DAT immunoreactivity may be related to the minor dopamine releasing.

The role of dopaminergic receptors in drug addiction has received increased attention (Milanesi et al., 2017). Our study also shows a decreased immunoreactivity of D1R and D2R

in both hippocampus and NAc of the exercised animals, while such levels were increased by morphine in SED group. The reward effects induced by the dopaminergic system are a consequence of the opioid receptors activation (Ozaki et al., 2003). The D1 and D2 dopamine receptors mediate reward effects induced by addictive drugs (Kuhn et al., 2015b). In this sense, D1R activation is related to morphine-preference, since it can control the opioid memory acquisition (Narita et al., 2005), while the blockade of this dopaminergic receptor can prevent it. D1R contributes for the addiction development, while D2R mediates emotion and reinforcement symptoms (Phillips et al., 1994). Thus, opposite outcomes in terms of dopaminergic neurotransmission in the comparison made between the sedentary and exercised animals indicated that both D1R and D2R can be modulated in different brain areas by different time points of physical exercise.

After physical exercise, endogenous opioids preferentially bind to the μ -opioids receptors (MOR) and κ -opioids receptors (KOR), being morphine a partial agonist of mu opioid receptors (Goodman et al., 1988). In this sense, dopamine releasing can be decreased by KOR (Spanagel et al., 1992) and increased by both MOR and δ -opioids receptors (DOR) agonists inhibiting GABAergic neurons (Klitnick et al., 1992). Furthermore, KOR agonists are not related to CPP or self-administration, but may cause aversion, inversely, agonists of MOR and DOR exhibit self-administration by animals and CPP (Herz, 1997). These data supports the idea that there are two opioid systems, an active and an opposite, which regulate the dopamine release (Devine et al., 1993), i.e, KOR activation can regulates negatively the dopaminergic system (Chefer et al., 2005; Narita et al., 2005), decreasing the morphine reward effects. Chronic aerobic exercise can decrease the opioid receptor availability (de Oliveira et al., 2010), consequently reducing the sensitivity to exogenous opioid agonists (Smith and Lyle, 2006). When opioid drugs are chronically administered, comparable effects may be observed (Bernstein and Welch, 1998), indicating a downregulation of the opioid receptors physical exercise-induced, therefore determining tolerance to the effects of opioids with extended training (Smith et al., 2018).

One factor involved in specific aspects of drug addiction is the stress, which triggers the relapse on drug abuse (Ambroggi et al., 2009; Sinha, 2008; Koob and Volkow, 2010). One of the main features of the stress response is an increase in glucocorticoids release, and its consequent interaction with GR (Navarro-Zaragoza et al., 2014). Our findings showed that physical exercise, regardless of its length, was able to decrease the immunoreactivity of the GR in the NAc. Previous studies have indicated that GR signaling plays a crucial role in drug dependence, especially morphine and cocaine (Ambroggi et al., 2009; Wang et al., 2008). The

administration of GR antagonist or the knocking out the gene GR in mice decreased the dopamine concentration, thus inhibiting the cocaine-seeking behavior (Deroche-Gammonet et al., 2003). Furthermore, glucocorticoids can increase dopamine levels in the NAc, exacerbating the effect of addictive drugs, such as cocaine, on this dopamine concentration (Graf et al., 2013). In the hippocampus, the GR are highly expressed, regulate the negative feedback of the HPA axis, play a role in the response to stress (Zhou et al., 2008) and are involved in the behavioral stress response. In the present study, the decrease in GR immunoreactivity was only observed in the L-EXE group in the hippocampus in response to physical exercise, demonstrating the need for a longer protocol of physical activity to observe molecular changes in the brain region after morphine exposure. It has been reported that dysregulation of the HPA axis can result from changes in hippocampal GR (Lui and Li, 2001) and physical exercise may protect against such dysregulation. Based on these preliminary findings, additional studies are necessary to confirm the relations described here to increase knowledge about the opioids, as well as on the relation between physical exercise and addiction.

Physical exercise maintains brain health and the synaptic plasticity (Pietropaolo et al., 2008), in addition it is associated to a reduction in depression and anxiety in humans (Greenwood and Fleshner, 2008) and rodents (Duman et al., 2008; Fox et al., 2008). Furthermore, the voluntary exercise reduced the physical dependence severity and the anxiety behavior in both morphine-dependent and withdrawn rats (Miladi-Gorji et al., 2012). Our findings demonstrated that the protocols of the physical exercise were able to protect the morphine-preference that can be related to the reward pathway activation and neuroplastic changes following physical exercise (Greenwood et al., 2003). Furthermore, studies demonstrated that the physical exercise stimulates the release of endogenous opioid peptides and leads to the reduction in sensitivity to morphine and other Mu opioid agonists (Kanarek et al., 1998; Smith and Yancey, 2003). Consequently, it has been proposed that chronic exercise may induce the cross-tolerance development between endogenous opioid peptides released during exercise and exogenously administered Mu opioid agonists (Houghten et al., 1986). In accordance with our results, studies have shown that the running wheel reduces self-administration and the craving for morphine (Hosseini et al., 2009) and the warding effects of cocaine (Lett et al., 2002) in rats. Previous studies of our group have also shown that the swimming decreased anxiety- and depression-like behaviors in amphetamine exposed animals (Teixeira et al., 2011, Segat et al., 2014). In this sense, we can infer that physical exercise, even when practiced during short-term, is able to decrease the morphine-induced rewarding

effects, thus minimizing the seek for addictive drugs, such as opioids, consequently reducing the risk of relapse following prolonged drug abstinence.

5. Conclusion

Currently, there are no published studies about the influence of different time points of physical exercise on behavioral and molecular markers consequent to morphine-induced addiction. From this, it is possible to propose that the short-term physical exercise causes behavioral changes and molecular adaptations disfavoring the morphine-addiction. This reinforces previous studies of our group regarding the useful role of physical exercise as a non-pharmacological tool in the prevention of drug addiction.

References

- Amara, S.G., Kuhar, M.J., 1993. Neurotransmitter Transporters: Recent Progress. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 73-93.
- Ambroggi, F., Turiault, M., Milet, A., Deroche-Gamonet, V., Parnaudeau, S., Balado, E., Barik, J., van der Veen, R., Maroteaux, G., Lemberger, T., Schutz, G., Lazar, M., Marinelli, M., Piazza, P.V., Tronche, F., 2009. Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminoceptive neurons facilitates cocaine seeking. *Nat. Sci. Neurosci.* 12, 247–249.
- Bao, G., Kang, L., Li, H., Li, Y., Pu, L., Xia, P., Ma, L., Pei, G., 2007. Morphine and heroin differentially modulate *in vivo* hippocampal LTP in opiate-dependent rat. *Neuropsychopharmacology.* 32, 1738–1749.
- Bates, M.L.S., Emery, M.A., Wellman, P.J., Eitan, S., 2017. Inhibiting social support from massage-like stroking increases morphine dependence. *Behav. Pharmacol.* 28, 642-647.
- Bates, M.L.S., Hofford, R.S., Emery, M.A., Wellman, P.J., Eitan, S., 2018. The role of the vasopressin system and dopamine D1 receptors in the effects of social housing condition on morphine reward. *Drug Alcohol Depend.* 188, 113-118.
- Bernstein, M.A., Welch, S.P., 1998. mu-Opioid receptor down-regulation and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation in a mouse model of chronic morphine tolerance. *Mol. Brain Res.* 55(2), 237–242.
- Büttner, A., 2017. The neuropathology of drug abuse. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 13, 8-12.
- Lui, Y., Li, L., 2001. Molecular recognition by artificial receptor. *Chinese J. Org. Chem.* 21 (11), 850-861.
- Calcaterra, S., Glanz, J., Binswanger, I.A., 2013. National trends in pharmaceutical opioid related overdose deaths compared to other substance related overdose deaths: 1999-2009. *Drug Alcohol Depend.* 131, 263-270.
- Carboni, E., Tanda, G.L., Frau, R., Di Chiara, G., 1990. Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up *in vivo* by noradrenergic terminals. *J. Neurochem.* 55, 1067–70.
- Chefer, V.I., Czyzyk, T., Bolan, E.A., Moron, J., Pintar, J.E., Shippenberg, T.S., 2005. Endogenous kappa-opioid receptor systems regulate mesoaccumbal dopamine dynamics and vulnerability to cocaine. *J. Neurosci.* 25, 5029–5037.
- Chu, J., Giannopoulos, P.F., Ceballos-Diaz, C., Golde, T.E., Pratico, D., 2012. Adenoassociated virus-mediated brain delivery of 5-lipoxygenase modulates the AD-like phenotype of APP mice. *Mol. Neurodegener.* 7, 57–67.
- Compton, W.M., Jones, C.M., Baldwin, G.T., 2016. Relationship between Nonmedical Prescription-Opioid Use and Heroin Use. *N. Engl. J. Med.* 374, 154-63.
- Connor, J.P., Gullo, M.J., White, A., Kelly, A.B., 2014. Polysubstance use: diagnostic challenges, patterns of use and health. *Curr. Opin. Psychiatry.* 27, 269-275.

- Cruz, F.C., Marin, M.T., Planeta, C.S., 2008. The reinstatement of amphetamine-induced place preference is long-lasting and related to decreased expression of AMPA receptors in the nucleus accumbens. *Neuroscience*. 151, 313–319.
- de Oliveira, M.S.R., da Silva Fernandes, M.J., Scorza, F.A., Persike, D.S., Scorza, C.A., da Ponte, J.B., de Albuquerque, M., Cavalheiro, E.A., Arida, R.M., 2010. Acute and chronic exercise modulates the expression of MOR opioid receptors in the hippocampal formation of rats. *Brain Res. Bul.* 83, 278-283.
- Deroche-Gammonet, V., Sillaber, I., Aouizerate, B., Izawa, R., Jaber, M., Ghozland, S., Kellendonk, C., Le Moal, M., Spanagel, R., Schutz, G., Tronche, F., Piazza, P.V., 2003. The glucocorticoid receptor as a potential target to reduce cocaine abuse. *J. Neurosci.* 23, 4785–4790.
- Devine, D.P., Leone, P., Pocock, D., Wise, R.A., 1993. Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamine release: in vivo microdialysis studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266, 1236-1246.
- Di Chiara, G., Imperato, A., 1988b. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85, 5274-5278.
- Duman, C.H., Schlesinger, L., Russell, D.S., Duman, R.S., 2008. Corrigendum to "Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice". *Brain Res.* 1199, 148-158.
- Eddy, M.C., Stansfield, K.J., Green, J.T., 2014. Voluntary exercise improves performance of a discrimination task through effects on the striatal dopamine system. *Learn. Memory.* 21, 334-337.
- Fox, J.H., Hammack, S.E., Falls, W.A., 2008. Exercise is associated with reduction in the anxiogenic effect of mCPP on acoustic startle. *Behav. Neurosci.* 122, 943.
- Gobatto, C.A., de Mello, M.A.R., Sibuya, C.Y., de Azevedo, J.R.M., dos Santos, L.A., Kokubun, E., 2001. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 130, 21–27.
- Goodman, R.R., Adler, B.A., Pasternak, G.W., 1988. Regional distribution of opioid receptors, in *The Opiate Receptors*, (Pasternak G. W., ed.). Hurnana Press Inc., New York. 197–230.
- Graf, E.N., Wheeler, R.A., Baker, D.A., Ebbin, A.L., Hill, J.E., McReynolds, J.R., Gasser, P.J., 2013. Corticosterone acts in the nucleus accumbens to enhance dopamine signaling and potentiate reinstatement of cocaine seeking. *J. Neurosci.* 33, 11800–11810.
- Greenwood, B.N., Fleshner, M., 2008. Exercise, learned helplessness, and the stress- resistant brain. *Neuromol. Med.* 10, 81–98.
- Greenwood, B.N., Foley, T.E., Day, H.E., Campisi, J., Hammack, S.H., Campeau, S., Maier, S.F., Fleshner, M., 2003. Free wheel running prevents learned help- lessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J. Neurosci.* 23, 2889–2898.

- Greenwood, B.N., Foley, T.E., Le, T.V., Strong, P.V., Loughridge, A.B., Day, H.E., 2011. Long-term voluntary wheel running is rewarding and produces plasticity in the mesolimbic reward pathway. *Behav. Brain Res.* 217(2), 354–362.
- Herz, A., 1997. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology*. 129, 99-111.
- Hosseini, M., Alaei, H.A., Naderi, A., Sharifi, M.R., Zahed, R., 2009. Treadmill exercise reduces self-administration of morphine in male rats. *Pathophysiology*. 16(1), 3–7.
- Houghten, R.A., Pratt, S.M., Young, E.A., Brown, H., Spann, D.R., 1986. Effect of chronic exercise on beta-endorphin receptor levels in rats. *NIDA Res. Monogr.* 75, 505-8.
- Huston, J.P., Silva, M.A., Topic, B., Müller, C.P., 2013. What's conditioned in conditioned place preference? *Trends. Pharmacol. Sci.* 34, 162–166.
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J., 2006. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 565–598.
- Jones, A.M., Carter, H., 2000. The Effect of Endurance Training on Parameters of Aerobic Fitness. *Sports Med.* 29 (6), 373-386.
- Jones, C.M., Logan, J., Gladden, R.M., & Bohm, M.K., 2015. Vital signs: Demographic and substance use trends among heroin users - United States, 2002–2013. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 64(26), 719–725.
- Kanarek, R.B., Gerstein, A.V., Wildman, R.P., Mathes, W.F., D'Anci, K.E., 1998. Chronic running-wheel activity decreases sensitivity to morphine-induced analgesia in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 61, 19–27.
- Karch, S.B., Drummer, O., 2016. Karch's Pathology of Drug Abuse, five ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Kauer, J.A., Malenka, R.C., 2007. Synaptic plasticity and addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 844–858.
- Kiens, B., Essen-Gustavsson, B., Christensen, N.J., 1993. Skeletal muscle substrate utilisation during sub-maximal exercise in man: effect of endurance training. *J. Physiol.* 469, 459-78.
- Klitenick, M.A., DeWitte, P., Kalivas, P.W., 1992. Regulation of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area by opioids and GABA: an in vivo microdialysis study. *J. Neurosci.* 12, 2623-2632.
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 35, 217–238.
- Kuhn, F.T., Roversi, Kr., Antoniazzi, C.T.D., Pase, C.S., Trevizol, F., Barcelos, R.C.S., Dias, V.T., Roversi, K., Boufleur, N., Benvegnú, D.M., Piccolo, J., Emanuelli, T., Bürger, M.E., 2013. Influence of trans fat and omega-3 on the preference of psychostimulant drugs in the first generation of young rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 110, 58-65.
- Kuhn, F.T., Dias, V.T., Roversi, Kr., Vey, L.T., Freitas, D.L., Pase, C.S., Roversi, K., Veit, J.C., Emanuelli, T., Burger, M.E., 2015b. Cross-Generational trans Fat Consumption Favors Self-Administration of Amphetamine and Changes Molecular Expressions of BDNF, DAT,

- and D1/D2 Receptors in the Cortex and Hippocampus of Rats. *Neurotox. Res.* 28 (4), 319–331.
- Kuhn, F.T., Trevizol, F., Dias, V.T., Barcelos, R.C.S., Pase, C.S., Roversi, K., Antoniazzi, C.T.D.D., Roversi, K., Boufleur, N., Benvegnú, D.M., Emanuelli, T., Bürger, M.E., 2015a. Toxicological aspects of *trans* fat consumption over two sequential generations of rats: Oxidative damage and preference for amphetamine. *Toxicol. Lett.* 232, 58–67.
- Lacy, R.T., Strickland, J.C., Brophy, M.K., Witte, M.A., Smith, M.A., 2014. Exercise decreases speedball self-administration. *Life Sci.* 114(2), 86–92.
- Lett, B.T. Grant, V.L., Koh, M.T., Flynn, G., 2002. Prior experience with wheel running produces cross-tolerance to the rewarding effect of morphine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 101–105.
- Lynch, W.J., Peterson, A.B., Sanchez, V., Abel, J., Smith, M.A., 2013. Exercise as a novel treatment for drug addiction: a neurobiological and stagedependent hypothesis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37(8), 1622–1644.
- Marchant, N.J., Li, X., Shaham, Y., 2013. Recent developments in animal models of drug relapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 675–683.
- Mauger, S., Fraser, R., & Gill, K., 2014. Utilizing buprenorphine-naloxone to treat illicit and prescription-opioid dependence. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 10, 587–598.
- Miladi-Gorji, H., Rashidy-Pour, A., Fathollahi, Y., 2012. Anxiety profile in morphine-dependent and withdrawn rats: effect of voluntary exercise. *Physiol. Behav.* 105, 195–202.
- Milanesi, L.H., Roversi, Kr., Antoniazzi, C.T.D., Segat, H.J., Kronbauer, M., D'avila, L.F., Dias, V.T., Sari, M.H.M., Barcelos, R.C.S., Maurer, L.H., Emanuelli, T., Burger, M.E., Trevizol, F., 2017. Toxicological aspects of the interesterified-fat from processed foods: Influences on opioid system and its reward effects in rats. *Food Chem. Toxicol.* 110, 25–32.
- Narita, M., Kishimoto, Y., Ise, Y., Yajima, Y., Misawa, K., Suzuki, T., 2005. Direct evidence for the involvement of the mesolimbic kappa-opioid system in the morphine-induced rewarding effect under an inflammatory pain-like state. *Neuropsychopharmacol.* 30, 111–118.
- Navarro-Zaragoza, J., Laorden, M.L., Milane's, M.V., 2014. Spironolactone decreases the somatic signs of opiate withdrawal by blocking the mineralocorticoid receptors (MR). *Toxicology.* 326, 36–43.
- Ozaki, S., Narita, M., Narita, M., Iino, M., Miyoshi, K., Suzuk,i T., 2003. Suppression of the morphine-induced rewarding effect and G-protein activation in the lower midbrain following nerve injury in the mouse: involvement of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Neurosci.* 116, 89–97.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Amsterdam: Elsevier.
- Phillips, G.D., Robbins, T.W., Everitt, B.J., 1994. Bilateral intra-accumbens self-administration of d-amphetamine: antagonism with intra-accumbens sch 23390 and sulpiride. *Psychopharmacology* 114(3), 477–485.

- Pietropaolo, S., Sun, Y., Li, R., Brana, C., Feldon, J., Yee, B.K., 2008. The impact of voluntary exercise on mental health in rodents: a neuroplasticity perspective. *Behav. Brain Res.* 192, 42–60.
- Rocha-Rodrigues, S., Rodríguez, A., Gonçalves, I.O., Moreira, A.A., Maciel, E., Santos, S., Domingues, M.R., Frühbeck, G., Ascensão, A., Magalhães, J., 2017. Impact of physical exercise on visceral adipose tissue fatty acid profile and inflammation in response to a high-fat diet regimen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 87, 114–124.
- Rudd, R.A., Aleshire, N., Zibbell, J.E., & Gladden, R.M., 2016. Increases in drug and opioid overdose deaths - United States, 2000–2014. *Am. J. Transplant.* 64(50–51), 1378–1382.
- Sanchez, V., Lycas, M.D., Lynch, W.J., Brunzell, D.H., 2015. Wheel running exercise attenuates vulnerability to self-administer nicotine in rats. *Drug Alcohol Depend.* 156, 193–198.
- Segat, H.J., Barcelos, R.C.S., Metz, V.G., Rosa, H.Z., Roversi, Kr., Antoniazzi, C.T.D., Vey, L.T., Kronsbauer, M., Veit, J.C., Piccolo, J.C., Emanuelli, T., Burger, M.E., 2017. Influence of physical activity on addiction parameters of rats exposed to amphetamine which were previously supplemented with hydrogenated vegetable fat. *Brain Res. Bul.* 135, 69–76.
- Segat, H.J., Kronsbauer, M., Roversi, K., Schuster, A.J., Vey, L.T., Roversi, K., Pase, C.S., Antoniazzi, C.T.D., Burger, M.E., 2014. Exercise modifies amphetamine relapse: Behavioral and oxidative markers in rats. *Behav. Brain Res.* 262, 94–100.
- Segat, H.J., Martini, F., Barcelos, R.C.S., Brüning, C.A., Nogueira, C.W., Burger, M.E., 2016. m-Trifluoromethyl-diphenyldiselenide as a pharmacological tool to treat preference symptoms related to AMPH-induced dependence in rats. *Prog. Neuro-Psychoph.* 66, 1–7.
- Sinha, R., 2008. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1141, 105–130.
- Smith, M.A., Fronk, G.E., Abel, J.M., Lacy, R.T., Bills, S.E., Lynch, W.J., 2018. Resistance exercise decreases heroin self-administration and alters gene expression in the nucleus accumbens of heroin-exposed rats. *Psychopharmacology.* 235, 1245–1255.
- Smith, M.A., Gergans, S.R., Iordanou, J.C., Lyle, M.A., 2008. Chronic exercise increases sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Pharmacol. Rep.* 60, 561–565.
- Smith, M.A., Lyle, M.A., 2006. Chronic exercise decreases sensitivity to mu opioids in female rats: correlation with exercise output. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85(1), 12–22.
- Smith, M.A., Yancey, D.L., 2003. Sensitivity to the effects of opioids in rats with free access to exercise wheels: mu opioid tolerance and physical dependence. *Psychopharmacology.* 167, 426–434.
- Spanagel, R., Herz, A., Shippenberg, T.S., 1992. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 2046–2050.
- Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Hagin, Y., Markou, A., Ikeda, K., 2011. The selective serotonin uptake inhibitor paroxetine, but not fluvoxamine, decreases methamphetamine conditioned place preference in mice. *Curr. Neuropharmacol.* 9, 68–72.

- Teixeira, A.M., Pase, C.S., Boufleur, N., Roversi, K., Barcelos, R.C.S., Benvegnú, D.M., Segat, H.J., Dias, V.T., Reckziegel, P., Trevizol, F., Dolci, G.S., Carvalho, N.R., Soares, F.A.A., Rocha, J.B.T., Emanuelli, T., Bürger, M.E., 2011. 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*. 195, 80-88.
- Thanos, P.K., Bermeo, C., Rubinstein, M., Suchland, K.L., Wang, G.J., Grandy, D.K., Volkow, N.D., 2010. Conditioned place preference and locomotor activity in response to methylphenidate, amphetamine and cocaine in mice lacking dopamine D4 receptors. *J. Psychopharmacol.* 24, 897-904.
- Tzschentke, T.M., 1998. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog. Neurobiol.* 56, 613–672.
- Vey, L.T., Rosa, H.Z., Barcelos, R.C.S., Segat, H.J., Metz, V.G., Dias, V.T., Duarte, T., Duarte, M.M.M.F., Burger, M.E., 2016. Stress during the gestational period modifies pups' emotionality parameters and favors preference for morphine in adolescent rats. *Behav. Brain Res.* 296, 408-417.
- Wakeman, S.E., 2017. Medications for addiction treatment: changing language to improve care. *J. Add. Med.* 11(1), 1–2.
- Wang, X.Y., Zhao, M., Ghitza, U.E., Li, Y.Q., Lu, L., 2008. Stress impairs reconsolidation of drug memory via glucocorticoid receptors in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 28, 5602–5610.
- Wang, Y.P., Wei, S.G., Zhu, Y.S., Zhao, B., Xun, X., Lai, J.H., 2015. Dopamine receptor D1 but not D3 essential for morphine-induced conditioned responses. *Genet. Mol. Res.* 14, 180-189.
- Wu L.Y., Chen, J.F., Tao, P.L., Huang, E.Y., 2009. Attenuation by dextromethorphan on the higher liability to morphine-induced reward, caused by prenatal exposure of morphine in rat offspring. *J. Biomed. Sci.* 16, 106.
- Zhou, J., Li, L., Tang, S., Cao, X., Li, Z., Li, W., Li, C., Zhang, X., 2008. Effects of serotonin depletion on the hippocampal GR/MR and BDNF expression during the stress adaptation. *Beh. Brain Res.* 195, 129-138.

Table 1. Effect of physical activity on body weight gain, epididymal fat weight/body weight ratio and blood lactate levels.

	WEIGHT GAIN (g)	% EPIDIDYMAL FAT / BODY WEIGHT	LACTATE (mmol/L)
SED	43.19 ± 2.68	1.15 ± 0.065	5.28 ± 0.014
S-EXE	28.57 ± 0.81*	0.74 ± 0.020*	6.57 ± 0.207*
M-EXE	21.71 ± 2.64*	0.76 ± 0.044*	5.62 ± 0.024*
L-EXE	22.16 ± 1.54*	0.75 ± 0.043*	5.65 ± 0.048*

Data expressed as mean±SEM. *Indicates significant difference of the sedentary (SED) group ($P<0.05$).

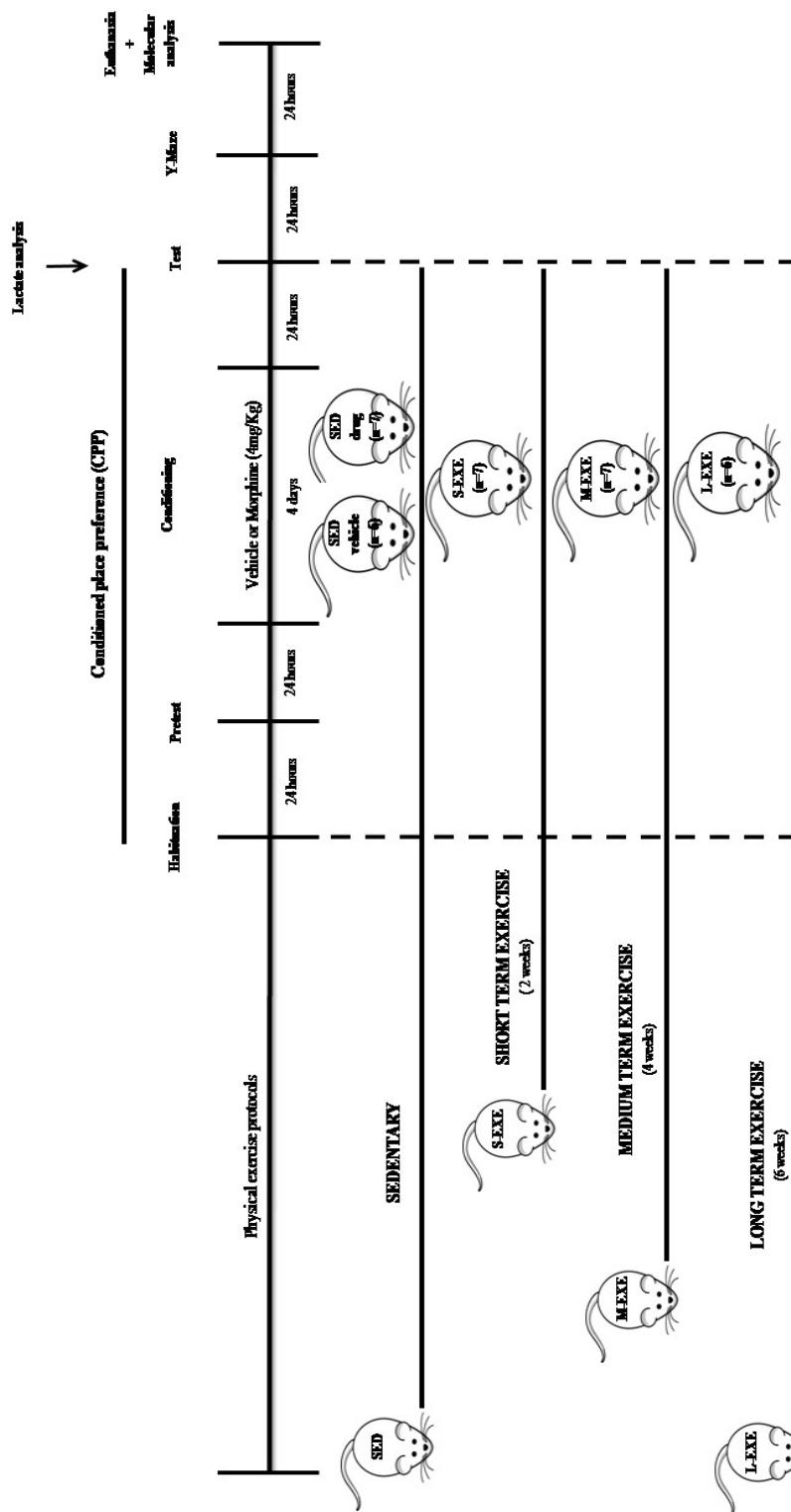


Fig. 1

Figure 1. Experimental protocol: adult male Wistar rats were divided in five groups: (I) sedentary vehicle group (SED; n = 6); (II) sedentary morphine group SED (n = 7); (III) short-term exercise group (S-EXE; n = 7), (IV) medium-term exercise group (M-EXE; n = 7) and (V) long-term exercise group (L-EXE; n = 6). The experimental groups S-EXE, M-EXE and L-EXE were submitted to the physical exercise protocol for 2, 4 and 6 weeks, respectively. Concomitantly to the last exercising week, all experimental groups were submitted to the condition place preference protocol (CPP) with morphine. 24h after CPP last CPP conditioning section, animals were submitted to CPP test and Y-maze paradigm. In sequence, 24h after behavioral evaluations, animals were euthanized for molecular analyses in hippocampus and *nucleus accumbens*.

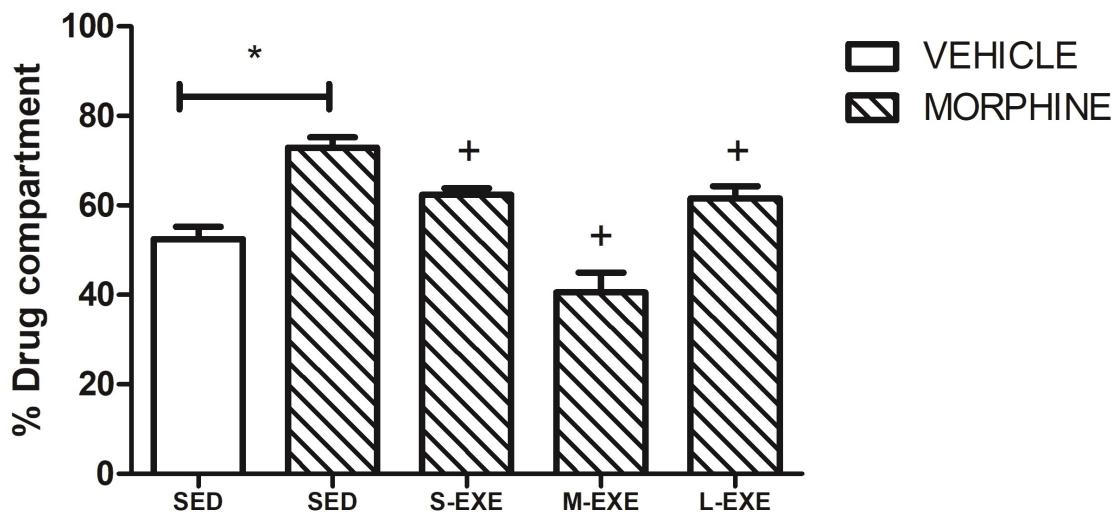


Fig. 2

Figure 2. Drug place preference behavior induced by morphine (4 mg / kg for 4 days), was observed in CPP paradigm after 2, 4 or 6 weeks of physical exercise, depending on the experimental group. * Indicates a significant difference between the sedentary groups. ⁺ indicates the significant difference between the exercised groups and the sedentary group injected with the drug. Data are expressed as mean \pm S.E.M. for $p < 0.05$.

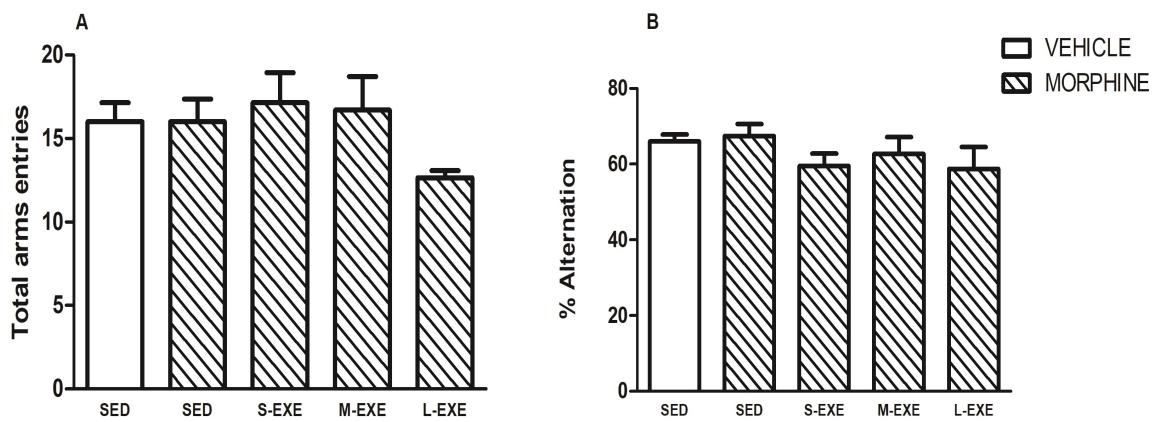


Fig. 3

Figure 3. Influence of physical exercise on the Y-maze task, performed 24 h after the last morphine injection. Memory was assessed by correct alternation percentage. Total arm entries (a) and % alternation (b) were quantified. Data are expressed as mean \pm S.E.M.

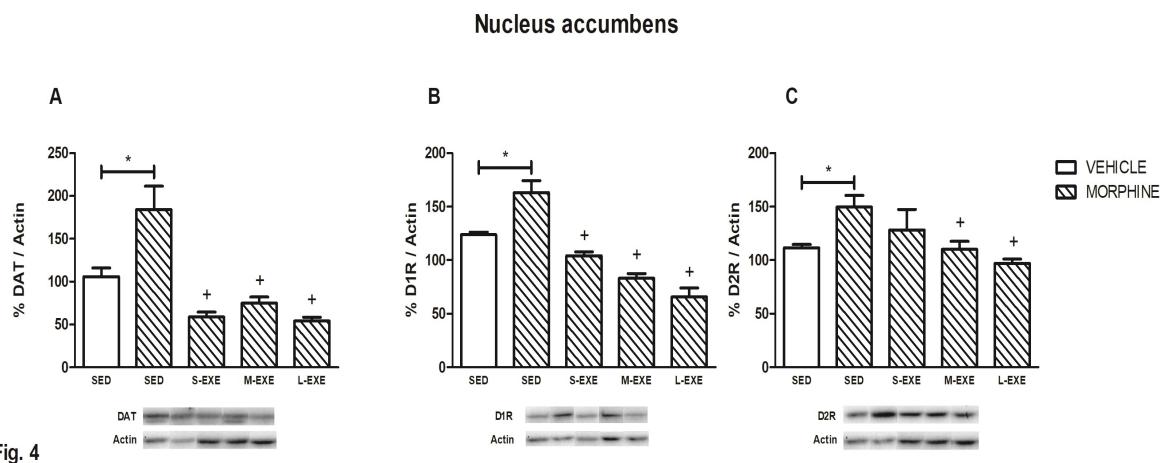


Figure 4. DAT levels (a), D1R levels (b) and D2R levels (c) were analyzed in the *nucleus accumbens* of rats. * Indicates a significant difference between the sedentary groups. + indicates a significant difference between the exercised groups and the sedentary group injected with the drug. Data are expressed as mean \pm S.E.M. for $p < 0.05$.

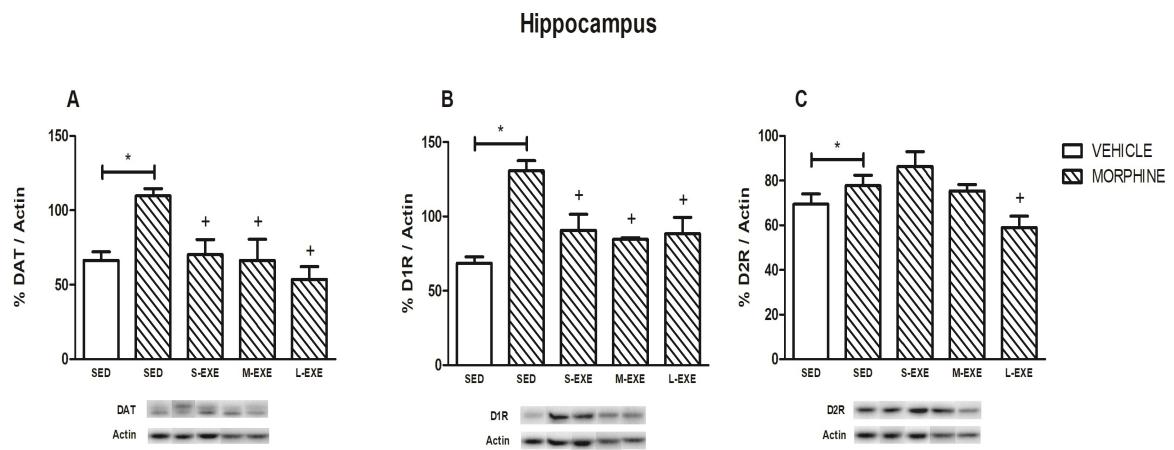


Fig. 5

Figure 5. DAT levels (a), D1R levels (b) and D2R levels (c) were analyzed in the hippocampus of rats. * Indicates a significant difference between the sedentary groups. + indicates a significant difference between the exercised groups and the sedentary group injected with the drug. Data are expressed as mean \pm S.E.M. for $p < 0.05$.

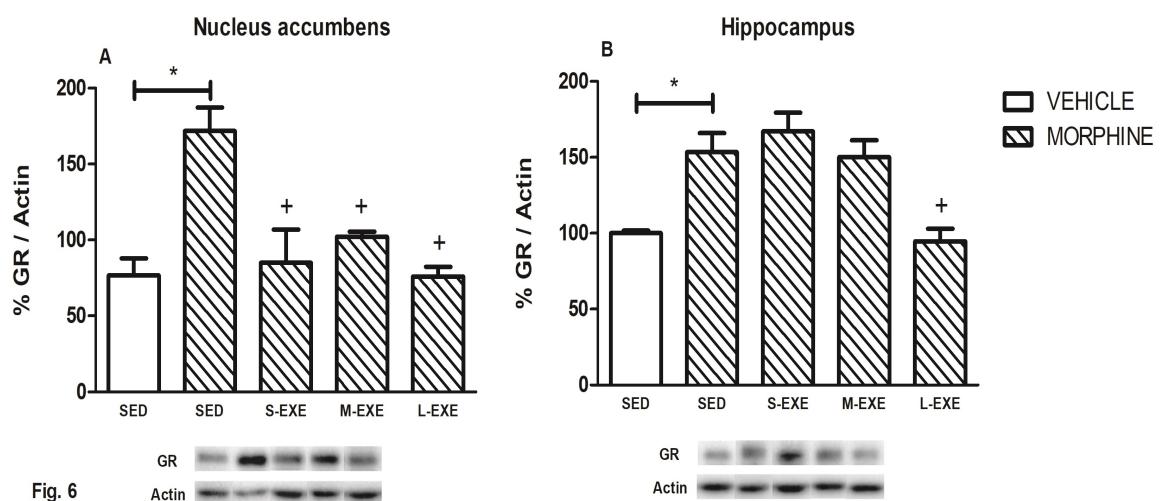
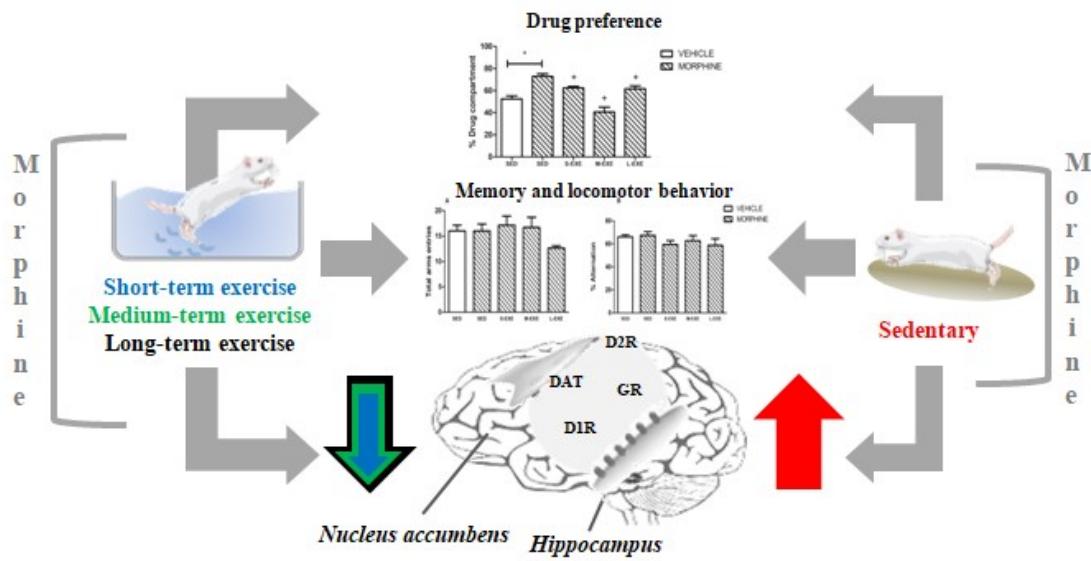


Figure 6. GR levels were analyzed in the *nucleus accumbens* (a) and hippocampus (b), of rats. * Indicates a significant difference between the sedentary groups. + indicates a significant difference between the exercised groups and the sedentary group injected with the drug. Data are expressed as mean \pm S.E.M. for $p < 0.05$.



Graphical abstract

5. CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, os resultados obtidos a partir do presente estudo demonstram a influência benéfica da prática do exercício físico, independentemente do tempo (curto, médio e longo prazo), sobre a PLC por morfina, que nos permite propor:

- A morfina, na dose e períodos em que foi administrada, induziu PLC no grupo sedentário, diferentemente dos grupos exercitados, nos quais foi observada uma prevenção da PLC, mesmo nos animais que foram exercitados pelo menor intervalo de tempo;
- Os grupos experimentais não mostraram diferenças nas avaliações comportamentais de memória e locomoção, confirmando que os resultados obtidos no paradigma de PLC por morfina estão diretamente relacionados aos efeitos hedônicos da droga, porém não a artefatos de perda de memória ou de locomoção;
- Os níveis aumentados de lactato sanguíneo, o menor ganho de peso corporal e a menor razão entre a gordura epididimal e o peso corporal observados em todos os grupos experimentais expostos à prática dos diferentes tempos de exercício confirmando a efetividade do protocolo de exercício físico aqui adotado;
- Análises moleculares nas regiões do hipocampo e *nucleus accumbens* dos animais sedentários expostos à morfina indicaram um aumento da imunoreatividade dos marcadores moleculares dopaminérgicos, como também do receptor de glicocorticóide, diferentemente do que foi observado nos animais exercitados, os quais mostraram em sua maioria uma menor imunoreatividade destes mesmos marcadores moleculares;

O exercício físico, independente do tempo praticado, pode constituir uma abordagem terapêutica interessante frente à drogadição por morfina, pois mesmo em um curto prazo, apresenta efeitos benéficos sobre a drogadição por morfina, como observado no paradigma de PLC e análises moleculares. Assim o exercício físico pode ser uma importante ferramenta adjacente, e pode proporcionar respostas rápidas no tratamento da drogadição.

6. PERSPECTIVAS

Os dados apresentados nessa dissertação mostram-se promissores, considerando que os tratamentos empregados nas clínicas de desintoxicação de drogas são apenas paliativos, mostrando baixa efetividade no tratamento da drogadição. Neste contexto, a busca por ferramentas adjuvantes aos tratamentos convencionais da adição vem sendo estudada por nosso grupo, como o exercício físico, que pode contribuir nos aspectos comportamentais e moleculares, mesmo em um curto tempo de prática, na dependência à morfina. Na continuidade do estudo, pretendemos avaliar o papel do mecanismo opioide endógeno sobre os efeitos benéficos do exercício físico na drogadição. Além disso, pretendemos verificar a relação da ativação endógena do sistema opioide após o uso de drogas aditivas.

Considerando que a drogadição é um grande problema mundial e que está inserida em todos os meios sociais, é de extrema importância a busca de tratamentos adjuvantes à farmacoterapia, que mostrem respostas positivas em um menor intervalo de tempo. Além disso, pesquisar os mecanismos pelos quais o exercício físico é efetivo, contribuindo para o tratamento da adição a drogas, reduzindo a recidiva ao uso de drogas aditivas e, assim, os altos custos do tratamento de toxicodependentes.

REFERÊNCIAS

- AARDE, S. M. et al. One day access to a running wheel reduces self-administration of D-methamphetamine, MDMA and methylone. **Drug Alcohol Depend.** v.151, p.151–158, Jun. 2015. DOI:10.1016/j.drugalcdep.2015.03.016.
- ABRANTES, A. M. et al. A preliminary randomized controlled trial of a behavioral exercise intervention for smoking cessation. **Nicotine Tob. Res.** v. 16 (8), p. 1094–1103, Aug. 2014. DOI:10.1093/ntr/ntu036.
- AHMADIasl, N.; ALAEI, H.; HÄNNINEN, O. Effect of exercise on learning, memory and levels of epinephrine in rats' hippocampus. **J. Sports Sci. Med.**, v.2, pp. 106-109, Sep. 2003.
- AKERS, K. G. et al. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. **Science**, v. 344(6184), p. 598-602, May. 2014. DOI:10.1126/science.1248903.
- ALLBUTT, C. Hippocrates - Hippocrates. With English Translation by W. H. S. Jones, St. Catherine's College, Cambridge (Loeb Classical Library.) Vol. II. Pp. lvi+336: London: Heinemann; New York: G. P. Putnam's Sons, 1923. - Hippocrates and his Successors in Relation to the Philosophy of their Time. By R. O. Moon, M.D., F.R.C.P. The Fitzpatrick Lectures, R.C.P., 1921–22. London: Longmans, 1923. 6s. **The Classical Review**, v. 38, p.7-8, Nov. 1924. DOI: 10.1017/S0009840X00040361.
- ALAEI, H.; POURSHANAZARI, A. A.; RAFATI, A. Electrical stimulation of nucleus raphe dorsalis changes morphine self-administration and withdrawal symptoms in rats. **Pathophysiology**, v. 9 (1), p.1, Oct. 2002. DOI:10.1016/S0928-4680(02)00050-0.
- ALVES, H. N. P. et al. Clinical and demographical aspects of alcohol and drug dependent physicians. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 51, p. 139-143, May./Jun. 2005. DOI:/S0104-42302005000300013.
- ALVES, H. N. P. et al. Clinical and demographic profile of anesthesiologists using alcohol and other drugs under treatment in a pioneering program in Brazil. **Rev. Bras. Anestesiol.**, v. 62, May./Jun. 2012. DOI:10.1016/S0034-7094(12)70136-8.
- ANG, E.; GOMEZ-PINILLA, F. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. **Curr. Med. Chem.**, v. 14(24), p. 2564-71, 2007. DOI :10.2174/092986707782023280.
- ANTONIAZZI, C. T. D. et al. Tactile stimulation and neonatal isolation affect behavior and oxidative status linked to cocaine administration in young rats. **Behav. Process.**, v. 103, p. 297-305, Mar. 2014. DOI:10.1016/j.beproc.2014.01.011.
- ARCHER, T. Physical exercise alleviates debilities of normal aging and Alzheimer's disease. **Acta Neurol Scand.** v. 123, p. 221-38, Apr. 2011. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2010.01412.x.
- AREM, H. et al. Physical activity and cancer-specific mortality in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort. **Int. J. Cancer.** v. 135(2), p. 423–31, Jul. 2014. DOI:10.1002/ijc.28659.

AZRIN, N. H.; EHLE, C. T.; BEAUMONT, A. L. Physical exercise as a reinforcer to promote calmness of an ADHD child. **Behav. Mod.**, v. 30, p. 564-570, Sept. 2006. DOI:10.1177/0145445504267952.

BAILLIF-COUNIOU, V. et al. Hair testing in postmortem diagnosis of substance abuse: An unusual case of slow-release oral morphine abuse in an adolescent. **J. Forensic Legal Med.** v. 36, p. 172-176, Nov. 2015. DOI:10.1016/j.jflm.2015.08.014.

BARDO, M. T.; COMPTON, W. M. Does physical activity protect against drug abuse vulnerability? **Drug Alcohol Dep.**, v. 153, p. 3-13, Aug. 2015. DOI:10.1016/j.drugalcdep.2015.05.037.

BELL, K.; SALMON, A. Pain, physical dependence and pseudoaddiction: redefining addiction for ‘nice’ people? **Int J Drug Policy**. v. 20(2), p. 170–8, Mar. 2009. DOI:10.1016/j.drugpo.2008.06.002.

BERRYMAN, J. W. Exercise is medicine: a historical perspective. **Curr. Sports Med.**, v. 9, p. 195-201, Jul. 2010. DOI:10.1249/JSR.0b013e3181e7d86d.

BERRYMAN, J. W. The tradition of the “six things non-natural”: exercise and medicine from Hippocrates through ante-bellum America. Send to **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 17, p. 515-59, Jan. 1989.

BIDDLE, S. J.; ASARE, M. Physical activity and mental health in children and adolescents: a review of reviews. **Br. J. Sports Med.**, v. 45(11), p. 886-95, Sep. 2011. DOI:10.1136/bjsports-2011-090185.

BIZE, R.; JOHNSON, J. A.; PLOTNIKOFF, R. C. Physical activity level and health-related quality of life in the general adult population: a systematic review. **Prev. Med.**, v. 45(6), p. 401, Dec. 2007. DOI:10.1016/j.ypmed.2007.07.017.

BODNER, R. J.; KLEIN, G. E. Endogenous opiates and behavior:2004. **Peptides**, v. 26 (n.12), p. 2629-2711, Dec. 2005. DOI:10.1016/j.peptides.2005.06.010.

BOER, D. P. et al. Suppression of food deprivationinduced high-rate wheel running in rats. **Physiol. Behav.**, v. 48, p. 339-42, Aug. 1990. Doi:10.1016/0031-9384(90)90324-W.

BOONE, E. M.; LEADBEATER, B. J. Game on: Diminishing risks for depressive symptoms in early adolescence through positive involvement in team sports. **J. Res. Adolescence**, v. 16, pp. 79-90, Jan. 2006. DOI:10.1111/j.1532-7795.2006.00122.x.

BOWERS, M. E.; CHOI, D. C.; RESSLER, K. J. Neuropeptide regulation of fear and anxiety: Implications of cholecystokinin, endogenous opioids, and neuropeptide Y. **Physiol. Behav.**, v. 107, p. 699-710, Dec. 2012. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.03.004.

BRASIL. **Casa Civil**. Lei Nº 5081, Brasília, 1966. Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L5081.htm. Acesso em: 03 jan. 2019.

BRASIL. **Casa Civil**. Lei Nº 5517, Brasília, 1968. Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L5517.htm. Acesso em: 03 jan. 2019.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria/SVS N° 344, Brasília, 1998. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/PRT_SVS_344_1998_COMP.pdf/a3e_e82d3-315c-43b1-87cf-c812ba856144>. Acesso em: 03 jan. 2019.

BRENÉ, S. et al. Running is rewarding and antidepressive. **Physiol. Behav.**, v. 92, p. 136-140, Sept. 2007. DOI:10.1016/j.physbeh.2007.05.015.

BROWN, G. G.; JACOBUS, J.; MCKENNA, B. Structural imaging for addiction medicine: From neurostructure to neuroplasticity. **Neuroscience for Addiction Medicine: From Prevention to Rehabilitation - Methods and Interventions. Prog. Brain Res.**, v. 224, p. 105–127, 2016. DOI: 10.1016/bs.pbr.2015.07.029.

BROWN, R. A. et al. A pilot study of aerobic exercise as an adjunctive treatment for drug dependence. **Ment. Health and Phys. Act.**, v. 3 (1), p. 27–34, Jun. 2010. DOI:10.1016/j.mhpa.2010.03.001.

BÜTTNER, A. Review: the neuropathology of drug abuse. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 37, p. 118–134, Feb. 2011. DOI:10.1111/j.1365-2990.2010.01131.x.

BÜTTNER, A. The neuropathology of drug abuse. **Curr. Opin. Behav. Sci.**. v. 13, p. 8-12, Feb. 2017. DOI: 10.1016/j.cobeha.2016.07.002.

CARLEZON, W. J.; THOMAS, M. Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. **Neuropharmacology**, v. 56 (Suppl. 1), p. 122–132, 2009. DOI:10.1016/j.neuropharm.2008.06.075.

CARVALHO, S. R. et al., Paradigmas médicos e Atenção Primária à Saúde: vigilância da população e/ou produção de vida? **Editorial – Interface**, v. 20(58), p. 531-535, Sep. 2016. DOI: 10.1590/1807-57622016.0410.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Publ. Health Rep.**, v. 100, p. 126-131, Mar. 1985.

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo. VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras – 2010/ E. A. Carlini (supervisão) [et. al.], -- São Paulo: **Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, Brasília** – SENAD, p. 503, 2010.

CELIS-MORALES, C. A. et al. Objective vs. Self-reported physical activity and sedentary time: effects of measurement method on relationships with risk biomarkers. **PLoS One**, v. 7, p. e36345, May. 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0036345.

CHEN, H. I. et al. Long-term compulsive exercise reduces the rewarding efficacy of 3,4-ethylenedioxymethamphetamine. **Behav. Brain. Res.**, v. 187, p. 185-189, Feb. 2008. DOI:10.1016/j.bbr.2007.09.014.

- CHIENG, B., WILLIAMS, J. Increased opioid inhibition of GABA release in nucleus accumbens during morphine withdrawal. *J. Neurosci.*, v. 18, p. 7033–7039, Sep. 1998. DOI:10.1523/JNEUROSCI.18-17-07033.1998
- CONNOR, J. P. et al. Polysubstance use: diagnostic challenges, patterns of use and health. *Curr. Opin. Psychiatry*. 27, 269-275, Jul. 2014. DOI:10.1097/YCO.0000000000000069.
- CUNHA-OLIVEIRA, T.; REGO, A. C.; OLIVEIRA, C. R. Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Res. Rev.*, v. 58, p. 192–208, Jun. 2008. DOI:10.1016/j.brainresrev.2008.03.002.
- CZOTY, P. W.; MARTELLE, J. L.; NADER, M. A. Effects of chronic d-amphetamine administration on the reinforcing strength of cocaine in rhesus monkeys. *Psychopharmacology*, v. 209, p. 375-382, May. 2010. DOI:10.1007/s00213-010-1807-x.
- DAGLISH, M. et al. Changes in regional cerebral blood flow elicited by craving memories in abstinent opiate-dependent subjects. *Am. J. Psychiatry*, v. 158, p. 1680–1686, Oct. 2001. DOI:10.1176/appi.ajp.158.10.1680.
- DAVID; GOLAN. *Princípios de Farmacologia- A Base fisiopatológica da Farmacoterapia*. 2^a Edição, Guanabara Koogan, 2009.
- DE OLIVEIRA, M. S. R. et al. Acute and chronic exercise modulates the expression of MOR opioid receptors in the hippocampal formation of rats. *Brain Res. Bul.*, v. 83, p. 278-283, Oct. 2010. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2010.07.009.
- DEVINE, D. P. et al. Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamine release: in vivo microdialysis studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 266, n. 3, 1236-46, Sep. 1993.
- DHAWAN, B. N. et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.*, v. 48, p. 567-92, Dec. 1996.
- DINIS-OLIVEIRA, R. J. Metabolomics of methadone: clinical and forensic toxicological implications and variability of dose response. *Drug Metab. Rev.*, v. 48, p. 568-576, Nov. 2016. DOI: 10.1080/03602532.2016.1192642.
- DONALDSON, L. J. Sport and exercise: the public health challenge. *Br. J. Sports Med.*, v. 34, p. 409-15, Jul. 2000. DOI:10.1136/bjsm.34.6.409.
- DUARTE, D. F. Opium and opioids: a brief history. *Rev. Bras. Anestesiol.*, v. 55 (1), p. 135-146, Feb. 2005. DOI:10.1590/S0034-70942005000100015.
- DUNN, A. L., TRIVEDI, M. H., O'NEAL, H. A. Physical activity dose-response effects on outcomes of depression and anxiety. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v. 33 (6 Suppl), p. S587-S597, Jun. 2001.
- DUNSKY, A. et al. The effects of a resistance vs. an aerobic single session on attention and executive functioning in adults. *PLoS One*, v. 12(4), e0176092, Apr. 2017. DOI:10.1371/journal.pone.0176092.

- EATON, S. B.; SHOSTAK, M.; KONNER, M. The paleolithic prescription: a program of diet and exercise and a design for living. **New York: Harper and Row**, Aug.1988.
- EDDY, M. C.; STANSFIELD, K. J.; GREEN, J. T. Voluntary exercise improves performance of a discrimination task through effects on the striatal dopamine system. **Learn. Memory**, v. 21, p. 334-337, Jul. 2014. DOI: 10.1101/lm.034462.114.
- EIJKEMANS, M. et al. Physical activity and asthma: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 7, p. e50775, Dec. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0050775.
- EISCH, A. J. et al. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 7579-7584, Jun. 2000. DOI: 10.1073/pnas.120552597.
- ELIBERO, A.; VAN RENSBURG, K. J.; DROBES, D. J. Acute effects of aerobic exercise and hatha yoga on craving to smoke. **Nicotine Tob. Res.**, v. 13 (11), p. 1140–1148, Nov. 2011. DOI:10.1093/ntr/ntr163.
- EPLING, W. F.; PIERCE, W. D. Solving the anorexia puzzle: a scientific approach. **Toronto (Canada): Hogrefe& Huber**, Oct.1992.
- EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nat. Neurosci.**, v. 8, p. 1481–1489 (erratum: 9(7): 979, Jul. 2006), Nov. 2005. DOI: 10.1038/nn1579.
- FOX, K. R. The influence of physical activity on mental well-being. **Public. Health Nutr.**, 2 (3a), pp. 411-418, Sep. 1999. DOI:10.1017/S1368980099000567.
- FRASCELLA, J et al. Shared brain vulnerabilities open the way for nonsubstance addictions: Carving addiction at a new joint? **Ann. New York Acad. Sci.**, v 1187, p. 294-315, Feb. 2010. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05420.x.
- FREYE, E.; LEVY, J. V. Opioids in medicine: a comprehensive review on the mode of action and the use of analgesics in different clinical pain states. **Springer, Dordrecht**, 2008. DOI:10.1007/978-1-4020-5947-6
- FRITZ, K. M.; O'CONNOR, P. J.. Acute exercise improves mood and motivation in young men with ADHD symptoms. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 48 (6), p. 1153-1160, Jun. 2016. DOI: 10.1249/MSS.0000000000000864.
- GARBER, C. E. et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 43, p. 1334-1359, Jul. 2011. DOI: 10.1249/MSS.0b013e318213fefb.
- GAZIANO, T. A.; GALEA, G.; REDDY, K. S. Scaling up interventions for chronic disease prevention: the evidence. **Lancet.**, v. 370, p. 1939–46, Dec. 2007. DOI:10.1016/S01406736(07)61697-3.
- GIRAUT, J. A. Integrating neurotransmission in striatal medium spiny neurons. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 970, p. 407-429, Jan. 2012. DOI: 10.1007/978-3-7091-0932-8_18.

- GLADWELL, V. F. et al. The great outdoors: How a green exercise environment can benefit all. **Extrem Physiol Med.**, v. 2(1), p. 3, Jan. 2013. DOI: 10.1186/2046-7648-2-3.
- GONÇALVES, J. et al. Effects of drugs of abuse on the central neuropeptide Y system. **Addict. Biol.**, v. 21(4), p. 755-65, Jul. 2016. DOI: 10.1111/adb.12250.
- GRANT, J et al. Introduction to Behavioural Addictions. **The Am. J. Drug Alcohol Abuse**, v. 36, p 233-241, Sep. 2010. DOI: 10.3109/00952990.2010.491884.
- GRUBER, S.; SILVERI, M.; YURGELUN-TODD, D. Neuropsychological consequences of opiate use. **Neuropsychol. Rev.**, v. 17, p. 299–315, Sep. 2007. DOI:10.1007/s110650079041y.
- HAASOVA, M. et al. The acute effects of physical activity on cigarette cravings: systematic review and meta-analysis with individual participant data. **Addiction** 108 (1), 26–37, Jan. 2013. doi:10.1111/j.1360-0443.2012.04034.x.
- HASKELL, W. L. et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 39(8), p. 1423-34, Aug. 2007. DOI:10.1249/mss.0b013e3180616b27.
- HEINRICHS, S. C. et al. Baclofen enhances extinction of opiate conditioned place preference. **Behav. Brain Res.**, v. 207, p. 353-359, Mar. 2010. DOI:10.1016/j.bbr.2009.10.013.
- HHS – US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Surgeon general's report on physical activity and health. **From the Centers for Disease Control and Prevention**, JAMA; 276:522, Aug. 1996. DOI:10.1001/jama.1996.03540070018010.
- HOLTERMANN, A. et al. Does the benefit on survival from leisure time physical activity depend on physical activity at work? A prospective cohort study. **PLoS One**, v. 8, p. e54548, Jan. 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0054548.
- HOSSEINI, et al. Treadmill exercise reduces self-administration of morphine in male rats. **Pathophysiology.**, v. 16, p. 3-7, Jun. 2009. DOI:10.1016/j.pathophys.2008.11.001.
- HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: theroleof reward-related learning and memory. **Annu. Rev. Neurosciv.**, v. 29, p. 565-598, Jul. 2006. DOI: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009.
- INCB, Report referencias ao Brasil. **International narcotics control board**. p. 83, 2012. Disponível em: <https://www.incb.org/documents/Publications/AnnualReports/AR2012/AR_2012_E.pdf> . Acessado em: 10. Dez. 2018.
- JI, E.-S. et al. Duration-dependence of the effect of treadmill exercise on hyperactivity in attention deficit hyperactivity disorder. **J. Exerc. Rehabil.**, v. 10(2), p. 75–80, Apr. 2014. DOI: 10.12965/jer.140107.

KAMPMAN, M. K. The search for medications to treat stimulant dependence. **Addiction science & Clinical practice**. Jun. 2008.

KARCH, S. B., DRUMMER, O. Karch's Pathology of Drug Abuse, 5th ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2016.

KATZ, N. et al. Foundations of opioid risk management. **Clin J Pain.**, v. 23, p. 103–18, Feb. 2007. DOI: 10.1097/01.ajp.0000210953.86255.8f.

KENNY, P. J. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. **Neuron**, v. 69, p. 664-679, Feb. 2011. DOI:10.1016/j.neuron.2011.02.016.

KINLOCH, A. J. Hunting in the Ancient World. Berkeley. **University of California Press**, v. 13, p.192, Jul. 1985.

KOOB, G. F. Allostatic view of motivation: implications for psychopathology. In: Bevins RA, Bardo MT (eds). Motivational Factors in the Etiology of Drug Abuse (series title: Nebraska Symposium on Motivation, vol 50). **University of Nebraska Press: Lincoln**, NE. p 1–18, 2004.

KOOB, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and the function of reward pathways. **Trends Pharmacol.Sci**, v. 13, p. 177-184, May. 1992. DOI:10.1016/0165-6147(92)90060-J.

KOOB, G. F.; KANDEL, D.; VOLKOW, N. D. Pathophysiology of addiction. In: Tasman A, Kay J, Lieberman JA, First MB, Maj M (eds). **Psychiatry** 3rd ed, v. 1, p. 354–378, Aug. 2008. DOI:10.1002/9780470515167.ch22.

KOOB, G. F.; Le MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 59, p. 29-53, Jan. 2008. DOI: 10.1146/annurev.psych.59.103006.093548.

KOOB, G. F.; Le MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science.**, v. 278, p. 52-58, Oct. 1997. DOI: 10.1126/science.278.5335.52.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of Addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 217–238, Jan. 2010. DOI: 10.1038/npp.2009.110.

KUHN, F. T. et al. Toxicological aspects of *trans* fat consumption over two sequential generations of rats: Oxidative damage and preference for amphetamine. **Toxicol.Lett.**, v. 232, n. 1, p. 58-67, Jan. 2015. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.10.001.

LABELLE, V. Decline in executive control during acute bouts of exercise as a function of exercise intensity and fitness level. **Brain Cogn.**, v. 81 (1), p. 10-17, Feb. 2013. DOI:10.1016/j.bandc.2012.10.001.

LANTZ, P. M. et al. Socioeconomic factors, health behaviors, and mortality. **JAMA**, v. 279(21), p. 1703–8, Jun. 1998. DOI:10.1001/jama.279.21.1703.

LETT, B. T. et al. Prior experience with wheel running produces cross-tolerance to the rewarding effect of morphine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 72, p. 101-105, May. 2002. DOI:10.1016/S0091-3057(01)00722-5.

LIANG, N.; BELLO, N. T.; MORAN, T. H. Wheel running reduces high-fat diet intake, preference and mu-opioid agonist stimulated intake. **Behav. Brain Res.**, v. 284, p. 1-10, May. 2015. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.02.004.

LISHA, N. E.; CRANO, W. D.; DELUCCHI, K. L. Participation in team sports and alcohol and marijuana use initiation trajectories. **J. Drug.**, v. 44, p. 83-93, Jan. 2014. DOI:10.1177/0022042613491107.

LÖLLGEN, H.; BÖCKENHOFF, A.; KNAPP, G. Physical activity and All-cause mortality: an updated meta-analysis with different intensity categories. **Int. J. Sports Med.**, v. 30, p. 213-24, Dec. 2009. DOI:10.1055/s-0028-1128150.

LOVE, T.; STOHLER, C.; ZUBIETA, J. Positron emission tomography measures of endogenous opioid neurotransmission and impulsiveness traits in humans. **Arch. Gen. Psychiatry.**, v. 66, p. 1124–1134, Oct. 2009. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.134.

LU, B.; CHOW, A. Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. **J. Neurosci. Res.**, v. 58, p. 76-87, Oct. 1999. DOI:10.1002/(SICI)10974547(19991001)58:1<76::AID-JNR8>3.0.CO;2-0.

MA, C. -L. et al. Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. **Behav. Brain Res.**, v. 317, p. 332-339, Jan. 2017. DOI:10.1016/j.bbr.2016.09.067.

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

MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS: DSM-5 / [American Psychiatric Association ; tradução: Maria Inês Corrêa Nascimento...et al.] 5. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2014.

Mc DONALD, D.C.; CARLSON, K.; IZRAEL, D. Geographic variation in opioid prescribing in the U.S. **J. Pain.**, v. 13(10), p. 988–96, Oct. 2012. DOI: 10.1016/j.jpain.2012.07.007.

McGOVERN, M. K. The effects of exercise on the brain. **Biology**, v. 202, p. 1, 2005.

MEEUSEN, R. et al. Endurance training effects on neurotransmitter release in rat striatum: an in vivo microdialysis study. **Acta Physiol. Scand.**, v. 159 (4), p. 335–341, Apr. 1997. DOI:10.1046/j.1365-201X.1997.00118.x.

MICHAËLSSON, K. et al. Leisure physical activity and the risk of fracture in Men. **PLoS Med.**, v. 4, p. e199, Jun. 2007. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040199.

MILLER, K. E.; HOFFMAN, J. H. Mental well-being and sport-related identities in college students. **Sociol. Sport J.**, v. 26, p. 335-356, Jun. 2009.

MILLER, M. L. et al. Reciprocal inhibitory effects of intravenous d-methamphetamine self-administration and wheel activity in rats. **Drug Alcohol Depend.**, v. 121 (1–2), p. 90–96, Feb. 2012. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2011.08.013.

MILTON, A. L.; EVERITT, B. J. The persistence of maladaptive memory: addiction, drug memories and anti-relapse treatments. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 36, p. 1119-1139, Apr. 2012. DOI:10.1016/j.neubiorev.2012.01.002.

MOELLER, F. G. et al. Psychiatric aspects of impulsivity. **Am. J. Psychiatry.**, v. 158, p. 1783–1793, Nov. 2001. DOI:10.1176/appi.ajp.158.11.1783.

NANDA, B.; BALDE, J.; MANJUNATHA, S. The acute effects of a single bout of moderate-intensity aerobic exercise on cognitive functions in healthy adult males. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 7 (9), pp. 1883-1885, Sep. 2013. DOI: 10.7860/JCDR/2013/5855.3341.

NESTLER, E. J. Under Siege: The Brain on Opiates. **Neuron**, v. 89, p. 897-900, May. 1996. DOI:10.1016/S0896-6273(00)80110-5.

NESTLER, E. J. Total recall the memory of addiction. **Neurobiology**, v. 292, p. 2266-2267, Jun. 2001. DOI: 10.1126/science.1063024.

NESTLER, E.; MALENKA, R. The addicted brain. **Sci. Am.**, v. 290, p. 78–85, Mar. 2004.

NIDA (National Institute on Drug Abuse). Principles of Drug Addiction Treatment: A Research-Based Guide. 3rd ed, p.13, Jan. 2018. Disponível em:
<https://d14rmgtrwf5a.cloudfront.net/sites/default/files/675-principles-of-drug-addiction-treatment-a-research-based-guide-third-edition.pdf>. Acessado em: 08 jan. 2019.

NORTHEY, J. M. et al. Exercise interventions for cognitive function in adults older than 50: a systematic review with meta-analysis. **Br. J. Sports Med.**, v. 52(3), p. 154-160, Feb.2018. DOI:10.1136/bjsports-2016-096587.

O'BRIEN, C. P. A range of research-based pharmacotherapies for addiction. **Science**, v. 278, p. 66-70, Oct. 1997. DOI: 10.1126/science.278.5335.66.

OMELCHENKO, N.; SESACK, S. R. Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. **Synapse**, v. 63, p. 895–906, Oct. 2009. DOI: 10.1002/syn.20668.

PATHAN, H.; WILLIAMS, J. Basic opioid pharmacology: an update. **Br. J. Pain.**, v. 6, p. 11-16, Feb. 2012. DOI: 10.1177/2049463712438493.

PERGOLIZZI, J. V. Jr., et al. The Basic Pharmacology of Opioids Informs the Opioid Discourse about Misuse and Abuse: A Review. **Pain Ther.**, v. 6, p. 1-16, Jun. 2017. DOI:10.1007/s40122-017-0068-3.

POTENZA, M. N. et al. Neuroscience of Behavioral and Pharmacological Treatments for Addictions. **Neuron**, v.69, p. 695-711, Feb. 2011. DOI:10.1016/j.neuron.2011.02.009.

POTENZA, M. N. The neurobiology of pathological gambling and drug addiction: an overview and new findings. **Philos. Trans. R. Soc.Lond. B Biol. Sci.**, v. 363, p. 3181-3189, Oct. 2008. DOI:10.1098/rstb.2008.0100.

- PRAPAVESSIS, H. et al. The effects of acute exercise on tobacco cravings and withdrawal symptoms in temporary abstinent pregnant smokers. **Addict. Behav.**, v. 39 (3), p. 703–708, Mar. 2014. DOI: 10.1016/j.addbeh.2013.10.034.
- PRATT, M. et al. The cost of physical inactivity: moving into the 21st century. **Br. J. Sports Med.**, v. 48(3), p. 171–3, Feb. 2014. DOI: 10.1136/bjsports-2012-091810.
- RACHELE, J. N. et al. The association between adolescent self-reported physical activity and wellness: the missing piece for youth wellness programs. **J. Adolesc. Health**, v. 55, p. 281–286, Aug. 2014. DOI: 10.1016/j.jadohealth.2014.01.021.
- RANG, H.P. et al. Farmacologia. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 508-510, 2011.
- REZAYOF, A. et al. Involvement of dopamine receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rats. **J. Psychopharmacol.**, v. 17, p. 415-423, Dec. 2003. DOI: 10.1177/0269881103174005.
- RIBEIRO, M.; MARQUES, A. C. P. R. Abuso e Dependência da Anfetamina. **Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2002.
- ROSENFELD, G. C.; LOOSE, D. S. **Pharmacology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- ROY, S. et al. Modulation of immune function by morphine: implications for susceptibility to infection. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 1, p. 77-89, Mar. 2006. DOI: 10.1007/s114810059009-8.
- SABIA, S. et al. Effect of intensity and type of physical activity on mortality: results from the Whitehall II cohort study. **Am J Public Health**, v. 102(4), p. 698–704, Apr. 2012. DOI:10.2105/AJPH.2011.300257.
- SADAT-SHIRAZI, M. et al. Alteration of dopamine receptors subtypes in the brain of opioid abusers: A postmortem study in Iran. **Neuroscience Letters**, v. 687, p. 169-176, Nov. 2018. DOI:10.1016/j.neulet.2018.09.043.
- SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavior assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addiction**, v. 11, p. 2-38, Mar. 2006. DOI:10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x.
- SCHINDER, A. F.; POO, M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. **Trends Neurosci.**, v. 23, pp. 639-645, Dec. 2000. DOI:10.1016/S0166-2236(00)01672-6.
- SEGAT, H.J. et al. Exercise modifies amphetamine relapse: Behavioral and oxidative markers in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 262, p. 94-100, Apr. 2014. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.01.005.
- SEGAT, H. J. et al. Influence of physical activity on addiction parameters of rats exposed to amphetamine which were previously supplemented with hydrogenated vegetable fat. **Brain Res. Bul.**, v. 135, p. 69-76. , Oct. 2017. DOI:10.1016/j.brainresbull.2017.09.013.

- SEIFERT, C. et al. Reduced volume of the nucleus accumbens in heroin addiction. **Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.**, v. 265(8), p. 637-45, Dec. 2015. DOI:10.1007/s004060140564-y.
- SELL, L. et al. Activation of reward circuitry in human opiate addicts. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, p. 1042–1048, Mar. 1999. DOI:10.1046/j.1460-9568.1999.00522.x.
- SHANAHAN, D. F. et al. Health benefits from nature experiences depend on dose. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 28551, Jun. 2016. DOI: 10.1038/srep28551.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.
- SISTI, H. M.; LEWIS, M. J. Naloxone suppression and morphine enhancement of voluntary wheel-running activity in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 70, p. 359-65, Oct. 2001. DOI:10.1016/S0091-3057(01)00624-4.
- SKRIVER, K. et al. Acute exercise improves motor memory: exploring potential biomarkers. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 116, p. 46–58, Dec. 2014. DOI:10.1016/j.nlm.2014.08.004.
- SMITH, M. A. et al. Access to a running wheel decreases cocaine-primed and cue-induced reinstatement in male and female rats. **Drug Alcohol Depend.**, v. 121 (1–2), p. 54–61, Feb. 2012. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2011.08.006.
- SMITH, M. A. et al. Chronic exercise increases sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. **Pharmacol. Rep.**, v. 60, p. 561-565, Aug. 2008.
- STANTON, A. M.; HANDY A. B.; MESTON, C. M. The Effects of Exercise on Sexual Function in Women. **Sex Med. Rev.**, v.6, p. 548-557, Oct. 2018. DOI:10.1016/j.sxmr.2018.02.004
- STICE, E. et al. Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. **Science**, v. 322, p. 449-52, Oct. 2008. DOI:10.1126/science.1161550.
- STOELTING et al., 2017. Manual de farmacologia e fisiologia na prática anestésica.- 3. ed.- Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SULZER, D. How Addictive Drugs Disrupt Presynaptic Dopamine Neurotransmission. **Neuron.**, v. 69(4), p. 628-49, Feb. 2011. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.02.010.
- SUTOO, D.; AKIYAMA, K. Regulation of brain function by exercise. **Neurobiol. Dis.**, v. 13, p. 1-14, Jun. 2003. DOI:10.1016/S0969-9961(03)00030-5.
- SWIFT, R. M.; LEWIS, D. C. Farmacologia da Dependência e Abuso de Drogas. In: DAVID e GOLAN. **Princípios de Farmacologia- A Base fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2^a Edição, Guanabara Koogan, 2009.
- TRESCOT, A. M. et al. Opioid pharmacology. **Pain Physician.**, v. 11, p. S133-153, Mar. 2008.

UHL, G. R.; GROW, R. W. The burden of complex genetics in brain disorders. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, p. 223–229, Mar. 2004. DOI: 10.1001/archpsyc.61.3.223.

UNODC. World Drug Report. **United Nations Office on Drugs and Crime**. E.14.XI.7, 2014. Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/wdr2014/World_Drug_Report_2014_web.pdf>. Acessado em: 10 dez. 2018.

UNODC. World Drug Report. **United Nations Office on Drugs and Crime**. E.17.XI.6, 2017. Disponível em: <https://www.unodc.org/wdr2017/field/Booklet_1_EXSUM.pdf>. Acessado em: 10 dez. 2018.

UPADHYAY, J. et al. Alterations in brain structure and functional connectivity in prescription opioid-dependent patients. **Brain**, v. 133, p. 2098–2114, Jul. 2010. DOI:10.1093/brain/awq138.

VEY, L. T. et al. Stress during the gestational period modifies pups' emotionality parameters and favors preference for morphine in adolescent rats. **Behav. Brain Res.**, v. 296, p. 408-417, Jan. 2016. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.08.012.

VOIGT, R. M. et al. Administration of GABAB receptor positive allosteric modulators inhibit the expression of previously established methamphetamine-induced conditioned place preference. **Behav. Brain Res.**, v. 216, p. 419-423, Jan. 2011. DOI:10.1016/j.bbr.2010.08.034.

VOLKOW, N. D.; BALER, R. D.; GOLDSTEIN, R. Z. Addiction: Pulling at the Neural Threads of Social Behaviors. **Neuron**, v. 69, p. 599-602, Feb. 2011. DOI:10.1016/j.neuron.2011.01.027.

VOLKOW, N. D. et al. Low dopamine striatal D2 receptors are associated with prefrontal metabolism in obese subjects: possible contributing factors. **Neuroimage**, v. 42, p. 1537-43, Oct. 2008. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2008.06.002.

VOSS, M. W. et al. Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. **Trends Cogn. Sci.**, v. 17(10), p. 525-44, Oct. 2013. DOI:10.1016/j.tics.2013.08.001.

WANG, D. et al. Dose-response relationships between exercise intensity, cravings, and inhibitory control in methamphetamine dependence: an ERPs study. **Drug Alcohol Depend.**, v. 161, p. 331-339, Apr. 2016. DOI:10.1016/j.drugalcdep.2016.02.023.

WANG, H. et al. Blockade of ionotropicglutamatergic transmission in the ventral tegmental area attenuates the physical signs of morphine withdrawal in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 28, p. 1079-87, Nov. 2004. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2004.05.043.

WARBURTON, D. E.; NICOL, C. W.; BREDIN, S. S. Health benefits of physical activity: the evidence. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 174, p. 801-9, Mar. 2006. DOI:10.1503/cmaj.051351.

WARBURTON, D. E. R.; BREDIN, S. S. D. Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. **Curr. Opin. Cardiol.**, v. 32(5), p. 541-556, Sep. 2017. DOI: 10.1097/HCO.0000000000000437.

WATTANAPISIT, A.; TUANGRATANANON, T.; THANAMEE, S. Physical activity counseling in primary care and family medicine residency training: a systematic review. **BMC Medical Education**, v. 18, p.159, Jun. 2018. DOI:10.1186/s12909-018-1268-1.

WEINSTOCK, J.; BARRY, D.; PETRY, N. M. Exercise-related activities are associated with positive outcome in contingency management treatment for substance use disorders. **Addict. Behav.**, v. 33 (8), p. 1072–1075, Aug. 2008. DOI: 10.1016/j.addbeh.2008.03.011.

WENG, T. B. et al. Differential effects of acute exercise on distinct aspects of executive function. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 47 (7), p. 1460-1469, Jul. 2015. DOI:10.1249/MSS.0000000000000542.

WHO (World Health Organization). 2008–2013 Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases. 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/nmh/Actionplan-PC-NCD-2008.pdf>>. Acesso em: 04 Jan. 2019.

WILLIAMS, D. M. et al. Acute effects of moderate intensity aerobic exercise on affective withdrawal symptoms and cravings among women smokers. **Addict. Behav.**, v. 36 (8), p. 894–897, Aug. 2011. DOI: 10.1016/j.addbeh.2011.04.001.

WILLIAMS, J. T.; CHRISTIE, M. J.; MANZONI, O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. **Physiol. Rev.**, v. 81, pp. 299-343, Jan. 2001. DOI:10.1152/physrev.2001.81.1.299.

WILLIAMS, P. T. Attenuating effect of vigorous physical activity on the risk for inherited obesity: a study of 47,691 runners. **PLoS One**, v. 7, p. e31436, Feb. 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0031436.

WISE, R. A. The role of reward pathways in the development of drug dependence. **Pharmacol. Ther.**, v. 35(1-2), p. 227-63, 1987. DOI:10.1016/0163-7258(87)90108-2.

WITTERT, G.; HOPE, P.; PYLE, D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 218(n.3), p. 877-881, Jan. 1996. DOI:10.1006/bbrc.1996.0156.

WU, L. Y. et al. Attenuation by dextromethorphan on the higher liability to morphine-induced reward, caused by prenatal exposure of morphine in rat offspring. **J. Biomed. Sci.**, v. 16, p. 106, Nov. 2009. DOI: 10.1186/1423-0127-16-106.

YARGEAU, V. et al. Analysis of drugs of abuse in wastewater from two Canadian Cities. **Sci. Total Environ.**, v. 487, p. 722-730, Jul. 2014. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.094.

YOON, M. C. et al. Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Neurosci. Lett.**, v. 423, p. 12-17, Aug. 2007. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.06.031.

YUAN, Y. et al. Gray matter density negatively correlates with duration of heroin use in young lifetime heroin-independent individuals. **Brain Cogn.**, v. 71, p. 223–228, Dec. 2009. DOI:10.1016/j.bandc.2009.08.014.

ZARINDAST, M. R. et al. GABA (A) receptor in the basolateral amygdale are involved in mediating morphine reward. **Brain Res.**, v. 1006, p. 49-58, Apr. 2004.
DOI:10.1016/j.brainres.2003.12.048.

ZERNIG, G. et al. Explaining the escalation of drug use in substance dependence: models and appropriate animal laboratory tests. **Pharmacology**, v. 80, p. 65-119, Aug. 2007.
DOI:10.1159/000103923.

ZHU, Y. et al. Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. **Neuron**, v. 24, p. 243-252, Sept. 1999.
DOI:10.1016/S0896-6273(00)80836-3.

ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA



Comissão de Ética no Uso de Animais

de

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

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

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

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

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

Origem:	Biotério Central UFSM	Sexo:	Machos	Idade:	21 a 60 dias	N:	166
Espécie:	Ratos heterogênicos					Peso:	80 a 250 g
Linhação:	Wistar						

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

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

Santa Maria, 11 de janeiro de 2019



Comissão de Ética no Uso de Animais

— de —

Universidade Federal de Santa Maria

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

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