

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**MARIA CAROLINA MACHADO DA SILVA**

**VIAS NEUROINFLAMATÓRIAS ENVOLVIDAS NO TRANSTORNO POR USO DE  
COCAÍNA**

**Belo Horizonte, 2023**

**MARIA CAROLINA MACHADO DA SILVA**

**VIAS NEUROINFLAMATÓRIAS ENVOLVIDAS NO TRANSTORNO POR USO DE  
COCAÍNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Fisiologia e Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**

**Coorientadora: Prof. Dra. Aline Silva de Miranda**

**Belo Horizonte, 2023**

043

Silva, Maria Carolina Machado da.

Vias neuroinflamatórias envolvidas no transtorno por uso de cocaína [manuscrito] / Maria Carolina Machado da Silva. – 2023.  
138 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira. Coorientadora: Prof. Dra. Aline Silva de Miranda.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Transtornos Relacionados ao Uso de Cocaína. 3. Microglia. 4. Proteína 3 que Contém Domínio de Pirina da Família NLR. 5. Receptor 4 Toll-Like. I. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. II. Miranda, Aline Silva de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 379 DE MARIA CAROLINA MACHADO DA SILVA

**"Vias Neuroinflamatórias Envolvidas no Transtorno por Uso de Cocaína"**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **28 de novembro de 2023**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira** - ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

**Profa. Dra. Ana Lucia Brunialti Godard** - ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

**Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar** - ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

**Profa. Dra. Eliana Cristina de Brito Toscano** - UFJF

**Profa. Dra. Cristina Martins e Silva** - UFES/ES

**Belo Horizonte, 28 de novembro de 2023**



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 11/01/2024, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Eliana Cristina de Brito Toscano, Usuário Externo**, em 11/01/2024, às 20:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Martins e Silva, Usuário Externo**, em 12/01/2024, às 09:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Lucia Brunialti Godard, Professora do Magistério Superior**, em 12/01/2024, às 10:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 22/01/2024, às 10:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2936867** e o código CRC **E41B7741**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, não tenho nem palavras para expressar minha gratidão a Deus. Sou uma pessoa extremamente abençoada, rodeada de pessoas maravilhosas e com grandes oportunidades na vida.

Aos meus pais, pelo amor incondicional. Eu não estaria aqui hoje se eles não tivessem se sacrificado tanto pelo meu sucesso. Agradeço pela educação que recebi e pelos exemplos valiosos que meus pais sempre foram.

Agradeço à minha família pelo amor e apoio ao longo de toda a minha vida.

Ao professor Dr. Antônio Carlos, por ter me dado a oportunidade de trabalhar em um projeto tão incrível, e também pelos ensinamentos. Agradeço sinceramente por ter um orientador que me concedeu a liberdade de desenvolver meus próprios experimentos e sempre me incentivou.

A professora Dra. Aline Miranda, por ter aceitado ser minha co-orientadora e ter contribuído muito com a minha formação acadêmica, através de discussões científicas e compartilhando seus conhecimentos de forma tão atenciosa, e também pela realização dos meus experimentos. Também agradeço pela oportunidade de trabalhar nos projetos dela, com suas alunas maravilhosas, Heliana, Bruna e Carol.

Aos Professores Dr. Helton e Dr. Luciene, agradeço pelo acolhimento no laboratório e pela oportunidade de colaborar em seus projetos.

À Paula Bellozi, agradeço por me receber de braços abertos como sua IC e por me ensinar tudo com tanta paciência.

Ao Giovanni Gomes, por ter contribuído na realização de vários experimentos e por ter me ensinado tanto.

As minhas queridas alunas de iniciação científica Larissa, Nádia, Sarah e Thainã, por terem sido uns anjos na minha vida e por terem me ajudado tanto. Sou muito abençoada pela oportunidade de trabalhar com meninas tão inteligentes, dedicadas e gentis.

Aos amigos do laboratório de neurofarmacologia, por sempre criarem um clima tão divertido e agradável no laboratório. Em especial a Roberta e Gabi, por terem contribuído na realização dos experimentos.

A minha orientadora e meu co-orientador do exterior, Habibeh Khoshbouei e Eduardo Candelario-Jalil, por terem me aceitado em seus laboratórios e terem contribuído com minha formação acadêmica durante o doutorado sanduíche. Também agradeço a todos os membros dos laboratórios por todos os ensinamentos e momentos de diversão.

Aos professores do Laboratório de neuropsicofarmacologia Dr. Fabrício Moreira e Dra. Daniele Aguiar, pela colaboração que possibilitou a realização dos meus experimentos. Também agradeço às amigas do Laboratório de neuropsicofarmacologia Anna Paula, Rayssa, Lia, Nícia e Day, por tornarem meus dias mais alegres durante esses anos de mestrado e doutorado.

Aos professores Lilian Lacerda e Ricardo Fujiwara, pela colaboração maravilhosa. Também agradeço aos meus queridos amigos Ramayana, Luísa e Jorge, pela amizade maravilhosa e por ficarem fazendo experimentos comigo durante a madrugada.

Ao professor Victor Rodrigues e sua aluna Rúbia Fernandes, pela colaboração com a técnica de golgi.

A Berg e o André, por serem pessoas incríveis, que sempre me ajudaram quando eu precisava e pelas risadas enquanto tomávamos café.

Aos professores Sérgio Costa e Vivian Vasconcelos, pela colaboração que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Antônio Lúcio Teixeira, agradeço por disponibilizar o PLX3397, o qual possibilitou a realização do meu projeto e pela colaboração intelectual.

Aos meus amigos Rodrigo, Carol, Paola, Mariana e Luiz, por serem pessoas tão incríveis na minha vida. Agradeço eternamente pela amizade e pelos bons momentos.

Ao projeto Rafah, pela oportunidade de levar amor incondicional ao próximo.

Aos professores do Fisfar, por terem contribuído com a minha formação acadêmica.

Aos funcionários, Webster, Rinaldo e Cida, por serem sempre tão educados e simpáticos.

Aos professores da banca examinadora, agradeço por se disponibilizarem para avaliar e discutir meu trabalho em um dia tão especial.

Agradeço ao CAPI e ao LANEK.

E às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

“Coloquei meu coração e minha alma em meu trabalho e  
perdi minha cabeça no processo.”

Van Gogh

## **APOIO FINANCEIRO**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - Processo APQ-02559-17

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Processo 308628/2002-5

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Diferentes dados sugerem que as células da glia podem participar nos processos de transtorno por uso de substâncias (SUD), pois respondem às alterações neuroquímicas induzidas por psicoestimulantes. De fato, estudos anteriores demonstraram que a cocaína se liga ao complexo MD-2/TLR4, sendo reconhecida como uma substância exógena e levando à neuroinflamação. No entanto, o papel da ativação da micróglia e do TLR4 nas alterações comportamentais induzidas pela cocaína ainda é pouco compreendido. **MÉTODOS:** Camundongos foram tratados com cocaína e MPLA e submetidos à análise fenotípica da micróglia por citometria de fluxo. Os camundongos foram tratados com o depletor microglial PLX3397 (40 mg/kg, durante 7 dias) e submetidos à sensibilização comportamental induzida pela cocaína (15 mg/kg, i.p.). Em seguida, foram sacrificados e seus cérebros removidos para análise do número e morfologia das células da microgliais, bem como quantificação dos níveis de CX3CL1 e BDNF no cérebro. Além disso, camundongos tratados com o agonista tendencioso do receptor TLR4 – MPLA (50 µg/kg, i.p.) – por dois dias ou camundongos TLR4<sup>-/-</sup> foram submetidos à sensibilização comportamental. Além disso, as vias do inflamassoma/caspase e da quinurenina são importantes para o controle de processos inflamatórios e atividade imunológica da micróglia. No presente trabalho, utilizamos ferramentas farmacológicas e genéticas para identificar o papel dessas vias nas alterações comportamentais, bioquímicas e histológicas induzidas pela cocaína em camundongos. **RESULTADOS:** O tratamento com PLX3397 diminuiu o número de células Iba-1+ e atenuou a sensibilização comportamental. No grupo de depleção parcial, a droga também aumentou a ativação das células restantes da micróglia. Animais tratados com PLX3397 + cocaína apresentaram alterações nos níveis de CX3CL1 no estriado, hipocampo e no córtex pré-frontal, assim como BDNF, em comparação com os animais tratados apenas com cocaína. Além disso, os níveis de CX3CL1 e BDNF apresentaram uma correlação com a sensibilização comportamental induzida pela cocaína. Além disso, o tratamento com MPLA reduziu a hiperlocomoção induzida pela cocaína, enquanto os camundongos TLR4<sup>-/-</sup> mostraram um aumento na atividade locomotora induzida pela cocaína em comparação com os animais WT. Em relação ao fenótipo microglial, observamos diferentes populações de micróglia entre os animais tratados com salina, cocaína e cocaína + MPLA, com diferenças na expressão de CX3CR1, CD62L, CD11b, CD44, CD11c, Single H e P2RY12. Além disso, a cocaína aumentou o número e ativação de monócitos (Ly6C+), aumentou os linfócitos TCD8+ e TCD4+ de memória central, mas não de memória efetora, o que foi prevenido pelo MPLA. A cocaína também diminuiu as espinhas dendríticas no cérebro, o que também foi prevenido pelo MPLA. Por fim, a inibição das vias do inflamassoma e caspase reduz a sensibilização induzida pela cocaína sem alterar a preferência de lugar condicionado. Por outro lado, a inibição da via da quinurenina reduz tanto a sensibilização induzida pela cocaína quanto a preferência de lugar condicionado. **CONCLUSÃO:** Considerando esses dados, sugerimos que a microglia participa nas alterações que ocorrem na neurobiologia da dependência de cocaína através da ativação do TLR4.

**Palavras-chave:** Adicção; Transtorno por Uso de Substância, Cocaína; Micróglia; NLRP3; TLR4, quinurenina.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Different data suggest that glial cells may participate in drug addiction processes, since they respond to neurochemical changes induced by psychostimulants. Indeed, previous reports have shown that cocaine binds in the complex MD-2/TLR4, being recognized as an exogenous substance and leading to neuroinflammation. However, the role of microglia activation and TLR4 in cocaine induced behavioral abnormalities is still poorly understood. **METHODS:** Mice were treated with cocaine and MPLA and submitted to microglia phenotypic and inflammation analysis by flow cytometry. Mice were treated with microglial depletor PLX3397 (40 mg/kg, during 7 and subjected to behavioral sensitization induced by cocaine (15 mg/kg, i.p.). Thereafter, they were euthanized and had their brain removed for analysis of number and morphology of microglia cells, as well as quantification of CX3CL1 and BDNF levels in the brain. In addition, mice treated with the TLR4 receptor biased agonist MPLA (50 µg/kg, i.p.) during two days or TLR4<sup>-/-</sup> mice were submitted to behavioral sensitization. In addition, the inflammasome/caspase pathway and the kynurenine pathway are important for the control of inflammatory processes and the immunological activity of microglial cells. In the present work, we used pharmacological and genetic tools to identify the role of these pathways in behavioral, biochemical and histological changes induced by cocaine in mice. **RESULTS:** PLX3397 treatment reduced Iba-1<sup>+</sup> cells and attenuated behavioral sensitization. In the partial depletion group, the drug also increased activation of remaining microglia cells. Animals treated with PLX3397 + cocaine showed altered CX3CL1 in the striatum, hippocampus and in the PFC, as well as BDNF, in comparison with the animals treated with only cocaine. Besides, CX3CL1 and BDNF levels presented a correlation among the cocaine-induced behavioral sensitization. Moreover, MPLA treatment reduced cocaine-induced hyperlocomotion, while TLR4<sup>-/-</sup> mice showed an increase in cocaine-induced locomotor activity compared to WT animals. There are different microglia populations between saline, cocaine and cocaine + MPLA treated animals, with differences in the expression of CX3CR1, CD62L, CD11b, CD44, CD11c, Single H and P2RY12. In addition, cocaine increased monocyte number and activation (Ly6C<sup>+</sup>), increased lymphocytes TCD8<sup>+</sup> and TCD4<sup>+</sup> central memory, but not effector memory, which was prevented by MPLA. Cocaine also decreased the dendritic spine in the brain, which was also prevented by MPLA. Finally, inhibition of the inflammasome and caspase pathways, reduces cocaine-induced sensitization without altering conditioned place preference. On the other hand, inhibition of the kynurenine pathway reduces both cocaine-induced sensitization and conditioned place preference. **CONCLUSION:** Considering this data, we suggest that microglia participates in the alterations that occur in neurobiology of cocaine addiction may through TLR4 activation.

**Keywords:** Addiction; Substance Use Disorder, Cocaine; Microglia; TLR4, NLRP3; kynurenine.

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Número de pessoas que usaram drogas e que desenvolveram SUD, no mundo, nos anos de 2011, 2016 e 2021 (World drug report, 2023).

Fig. 2: Sistema de recompensa. O sistema de recompensa é formado principalmente pela área tegmentar ventral, pelo NAc e pelo PFC (Biorender).

Fig. 3: Estágios e neurocircuitos da neurobiologia do SUD (Adaptado de Volkow et al., 2016).

Fig 4: Número de mortes devido ao uso de cocaína no Brasil (UNODC, 2022).

Fig 5: A cocaína altera os níveis de dopamina na via mesocorticolímbica do cérebro por bloquear a recaptação através do bloqueio de DAT. Consequentemente, a ativação de receptores D1 e D2 estimula cascatas de sinalização intracelular que modulam processos de neuroplasticidade (Rooge and Wood, 2013).

Fig 6: Participação da micróglia em processos neurofisiológicos como desenvolvimento neuronal (a), neurogênese adulta (b), interações sinápticas (c), e em transtornos psiquiátricos e doenças neurológicas (d) (Adaptado de Wake et al., 2013).

Fig 7: estrutura dos receptores TLRs, que são formados estruturas transmembranas, um domínio extracelular caracterizado por LRR e um domínio intracelular que contém o domínio TIR (Zayat et al., 2019).

Fig 8: Vias intracelulares de ativação do TLR4, que pode ser MyD88 dependente ou independente, levando a translocação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B (Zhang et al., 2017).

Fig 9: Estrutura do inflamassoma NLRP3, que é composto pela proteína NLRP3, pela ASC e pela caspase-1 (Sonessa et a., 2020).

Fig 10: Via das quinureninas (Haroon et al., 2011).

Fig 11: Protocolo experimental da sensibilização comportamental.

Fig 12: Protocolo experimental do CPP.

Fig 13: Efeitos do tratamento com PLX3397 durante 21 dias no número de células Iba-1, na expressão de CX3CR1 e na sensibilização comportamental.

Fig 14: Efeitos da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína no número na expressão de CD68+.

Fig 15: Efeitos da depleção parcial da micróglia e da cocaína na morfologia das células.

Fig 16: Efeito da depleção parcial da micróglia da administração de cocaína na expressão de GFAP no NAc.

Fig 17: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína nos níveis de CX3CL1 e na expressão de CX3CR1 no cérebro.

Fig 18: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína nos níveis de citocinas no cérebro.

Fig 19: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína nos níveis neurotróficos e na expressão de mRNA de TrkB no cérebro.

Fig 20: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína na expressão de DCX+

Fig 21: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína na expressão de receptores de dopamina e transportador de dopamina.

Fig 22: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína na expressão de receptores e transportadores de dopamina.

Fig 23: Análises de clusters das populações celulares identificadas no cérebro pelo tSNE e heatmap evidenciando os níveis de expressão de cada marcador de superfície, de acordo com as populações

Fig 24: Quantificação do número total de células imunológicas no cérebro.

Fig 25: Quantificação da frequência células imunológicas no cérebro.

Fig 26: Análises de clusters das populações microgliais identificadas no cérebro pelo tSNE.

Fig 27: Avaliação do fenótipo das células mieloides do cérebro.

Fig 28: Quantificação do número total de células mieloides no sangue.

Fig 29: Quantificação da frequência de células mieloides no sangue.

Fig 30: Quantificação de CD69 de células mieloides no sangue.

Fig 31: Quantificação do número total de células linfoides no sangue.

Fig 32: Quantificação do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue.

Fig 33: Expressão de marcadores de ativação e memória em linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Fig 34: Quantificação do número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue.

Fig 35: Expressão de marcadores de ativação e memória em linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

Fig 36: Avaliação de células NK no sangue.

Fig 37: Avaliação do hemograma.

Fig 38: Avaliação do número de espinhas dendríticas.

Fig 39: Efeitos do MPLA, um agonista tendencioso do TLR4, na sensibilização comportamental.

Fig. 40. Avaliação de animais TLR4<sup>-/-</sup> na sensibilização comportamental.

Fig 41: Efeitos do MPLA, um agonista tendencioso do TLR4 na CPP.

Fig. 42. Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$ .

Fig. 43. Avaliação de animais NLRP3<sup>-/-</sup> na sensibilização comportamental.

Fig. 44. Avaliação de animais CASP1<sup>-/-</sup> na sensibilização comportamental.

Fig. 45. Avaliação de animais NLRP3<sup>-/-</sup> e CASP1<sup>-/-</sup> na CPP.

Fig. 46. Avaliação de animais tratados com 1-MT na sensibilização comportamental.

Fig. 47 Avaliação de animais IDO<sup>-/-</sup> na sensibilização comportamental.

Fig. 48. Avaliação de camundongos IDO<sup>-/-</sup> na CPP.

Fig. 49: A cocaína pode, direta ou indiretamente, ativar a micróglia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**1-MT** - 1-metil-triptofano

**QA** - ácido quinolínico

**AMPA** -  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

**BDNF** - Fator neurotrófico derivado do cérebro

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais

**CPF** - Córtex pré-frontal

**CPP** - Preferência condicionada pelo lugar

**CREB** - *cAMP response element-binding* (Fator de Transcrição regulada pelo AMPc)

**CRF** - *Corticotropin-releasing hormone* (hormônio libertador de corticotropina)

**CX3CL1** - Fractalquina

**$\Delta$ fosB** - Delta FosB

**DSM-5** - Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais - 5

**DAT** - Transportador de dopamina

**DEA** - Drug Enforcement Administration

**DSM-5** - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5

**ELISA** - Ensaio de imunoabsorção enzimática

**ERK** - *Extracellular signal-regulated kinase* (quinase regulada por sinal extracelular)

**GDNF** - Fator neurotrófico derivado da glia

**IDO** - indoleamina-2,3-dioxigenase

**IL** - Interleucina

**KAT** - quinurenina aminotransferase

**KMO** - quinurenina 3-monooxigenase

**KYN** - quinurenina

**KYNA** - ácido cinurênico

**LTD** - Depressão de longa duração

**LNUD** - Levantamento Nacional sobre uso de Drogas pela População Brasileira

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**LTD** - *Long-term depression* (depressão de longa duração)

**LTP** - *Long-term potentiation* (potenciação de longa duração)

**MD-2** - Fator de diferenciação mielóide 2

**MEF2** - fator 2 de aumento de miócitos

**MPLA** - Monofosforil lipídio A

**MSN** - Neurônios espinhosos médios

**NAc** - Núcleo accumbens

**NET** - Transportador de noradrenalina

**NLRP3** - Proteína 3 com domínios NACHT, LRR e PYD

**NGF** - Fator de crescimento do nervo

**PFC** - *Prefrontal cortex* (córtex pré-frontal)

**PRRs** - *Pathogen-associated molecular pattern* (receptores de reconhecimento de padrões)

**SNC** - Sistema nervoso central

**SERT** - Transportador de serotonina

**SUD** - Transtorno por uso de substâncias

**TDO** - triptofano-2,3-dioxigenase

**TH** - Tirosina hidroxilase

**TLR** - Receptor do tipo toll

**TNF** - Fator de necrose tumoral

**TPSO** - proteína translocadora microglial de 18 kDa

**UNODC** - United Nations Office on Drugs and Crime

**VMAT 2** - Transportador monoaminérgico vesicular 2

**VTA** - Área tegmentar ventral

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	34
1.1 TRANSTORNOS POR USO DE SUBSTÂNCIAS .....	34
1.1.1 Aspectos epidemiológicos, históricos e sociais do transtorno por uso de substâncias .....	34
1.1.2 Histórico e sociológico.....	35
1.1.3 Definição, diagnóstico e neurobiologia .....	37
1.2 COCAÍNA .....	41
1.3 COCAÍNA E INFLAMAÇÃO .....	45
1.4 CÉLULAS MICROGLIAIS.....	45
1.5 RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÃO (PRRS).....	49
1.5.1 TLRs.....	50
1.5.2 NLRP3/CASP1/IL-1B.....	54
1.5.3 Papel do TLR4 e da via NLRP3/Casp1/Il-1 $\beta$ em processos de plasticidade sináptica .....	56
1.6 VIA DAS QUINURENINAS .....	57
2 OBJETIVOS .....	60
2.1 Objetivo Geral .....	60
2.2 Objetivos específicos .....	60
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.1 Animais.....	61
3.2 Drogas.....	61
3.3 Testes comportamentais .....	61
3.3.1 Sensibilização comportamental .....	61
3.3.2 Preferência Condicionada ao Lugar .....	63
3.4 Perfusão transcardíaca .....	64
3.5 Preparo dos cérebros para técnicas histológicas .....	65
3.6 Imunofluorescência .....	65

3.7 Imunohistoquímica .....	66
3.8 Análise de Sholl.....	66
3.9 Avaliação dos níveis de fatores neurotróficos e citocinas por ELISA .....	67
3.10 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	67
3.11 Processamento e imunofenotipagem de células imunológicas no cérebro e no sangue .....	68
3.11.1. Processamento do cérebro .....	68
3.11.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica .....	68
3.11.2. Processamento e imunofenotipagem do sangue .....	70
3.12 Hemograma.....	71
3.13 Golgi .....	71
3.14 Análise estatística .....	72
4 RESULTADOS .....	73
4.1 O tratamento com PLX3397 durante 21 dias reduziu o número de microgliais e protegeu contra a sensibilização comportamental induzida por cocaína .....	73
4.2 A depleção parcial da micróglia e a cocaína aumentam a expressão de CD68..	74
4.3 A depleção parcial da micróglia induz alterações morfológicas nas células remanescentes.....	75
4.4 A depleção parcial da micróglia e a cocaína aumentaram a expressão de GFAP .....	77
4.5 A associação de cocaína e da depleção parcial da micróglia aumentaram os níveis de CX3CL1 e os níveis do mRNA de CX3CR1 .....	78
4.6 A depleção parcial da micróglia e a cocaína alteraram os níveis de citocinas de maneira região dependente.....	80
4.7 A depleção parcial da micróglia e a cocaína alteraram os fatores neurotróficos e os níveis de mRNA de TrkB de maneira região dependente .....	82
4.8 A depleção parcial da micróglia reduziu a expressão de células DCX+ apenas em animais que não foram tratados com cocaína.....	83

4.9 A depleção parcial da cocaína e da micróglia podem alterar a via dopaminérgica .....	84
4.10 Papel do receptor TLR4 nas alterações imunológicas induzidas pela cocaína .	87
4.10.1 Cocaína e MPLA aumentam o número total de células imunológicas do cérebro .....	87
4.10.2 Cocaína e MPLA alteram o fenótipo microglial.....	89
4.10.3 Cocaína induz aumento e alterações na população de células mielóides da periferia, sendo esse efeito prevenido pelo MPLA .....	91
4.10.4 Cocaína induz aumento e alterações na população de células linfóides da periferia, sendo esse efeito prevenido pelo MPLA .....	93
4.10.5 Cocaína altera os parâmetros hematológicos .....	97
4.11 Cocaína diminui o número de espinhas dendríticas, sendo esse efeito revertido pelo MPLA.....	98
4.12 Participação do receptor TLR4 nas alterações comportamentais induzidas por cocaína.....	99
4.12.1 Pré-tratamento com MPLA, um agonista fraco do receptor TLR4, diminui a hiperlocomoção induzida por cocaína .....	99
4.12.2 Animais TLR4 <sup>-/-</sup> apresentam um aumento da sensibilização comportamental induzida por cocaína .....	100
4.12.3 Pré-tratamento com MPLA não foi capaz de alterar a CPP induzida por cocaína .....	101
4.13 MPLA alterou os níveis cerebrais de IL-1 $\beta$ .....	102
4.14 Participação da via NLRP3/CASP1 nas alterações comportamentais induzidas por cocaína.....	103
4.14.1 Animais NLRP3 <sup>-/-</sup> apresentam uma diminuição na sensibilização comportamental induzida por cocaína.....	103
4.14.2 Animais CASP1 <sup>-/-</sup> apresentam uma diminuição na sensibilização comportamental induzida por cocaína.....	104

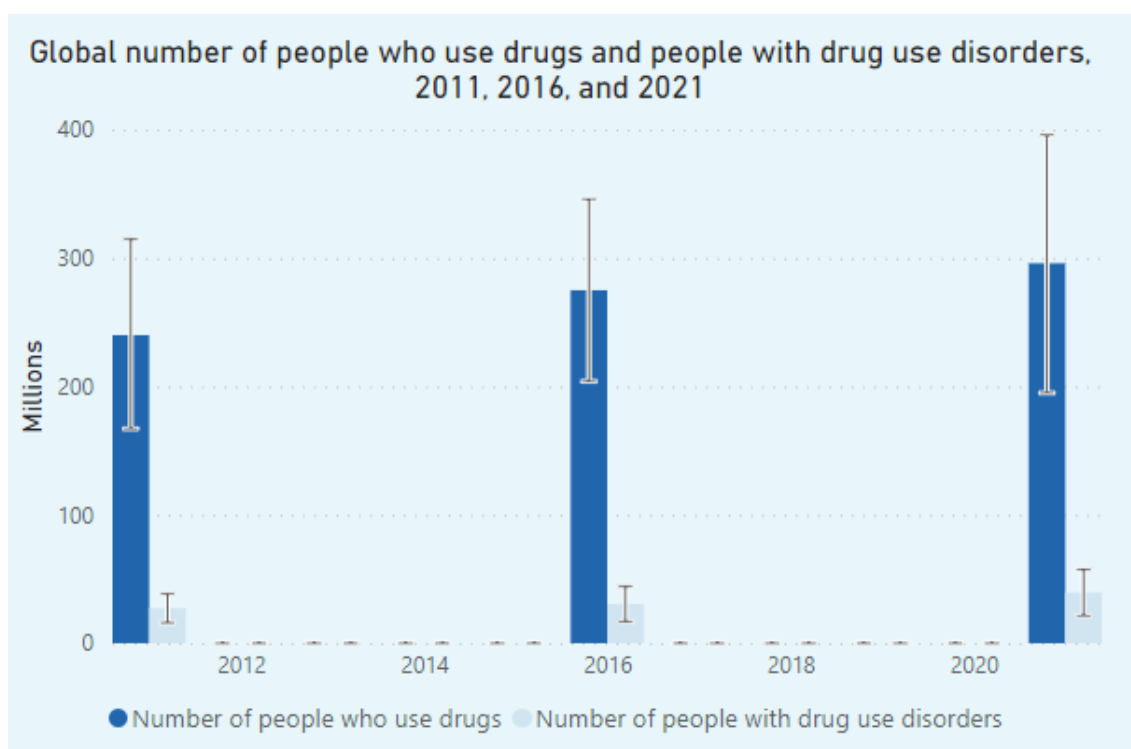
4.14.3 Animais NLRP3 <sup>-/-</sup> e CASP1 <sup>-/-</sup> e não apresentam diferenças na CPP induzido pela cocaína .....	106
4.15 Participação da via IDO nas alterações comportamentais induzidas por cocaína .....	107
4.15.1 O tratamento com 1-MT, inibidor da IDO, diminuiu a sensibilização comportamental induzida por cocaína em camundongos machos e fêmeas .....	107
4.15.2 Camundongos IDO <sup>-/-</sup> machos e fêmeas apresentam uma diminuição da resposta aguda a cocaína na sensibilização comportamental .....	108
4.15.3 Camundongos machos e fêmeas tratados com 1-MT ou IDO <sup>-/-</sup> apresentam uma diminuição da taxa de preferência induzida por cocaína.....	109
5. DISCUSSÃO .....	111
6. CONCLUSÃO.....	124
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	125

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 TRANSTORNOS POR USO DE SUBSTÂNCIAS

#### 1.1.1 Aspectos epidemiológicos, históricos e sociais do transtorno por uso de substâncias

Apesar dos efeitos deletérios do uso de substâncias psicoativas serem bem conhecidos, o número de pessoas que usam drogas tem aumentado a cada ano. Dados do Relatório Mundial Sobre Drogas de 2023, divulgado pela Organização das Nações Unidas (ONU), demonstram que o número estimado de pessoas que utilizam substâncias psicoativas cresceu de 240 milhões em 2011 para 296 milhões em 2021, um aumento de 23% em apenas 10 anos (*World Drug Report 2023*). Desses, cerca de 40 milhões desenvolveram transtorno por uso de substâncias (*substance use disorder, SUD*). Além disso, o número de óbitos consequente do uso problemáticos de drogas chegou a cerca de 500 mil em 2019, um aumento de 100% em relação a 1991. Por fim, mesmo que não leve ao óbito propriamente dito, em 2021, o uso de drogas gerou uma “perda de vida saudável” de aproximadamente 32 milhões de anos (*World Drug Report 2023*) (Fig. 1).



**Fig. 1.** Número de pessoas que usaram drogas e que desenvolveram SUD, no mundo, nos anos de 2011, 2016 e 2021 (*World drug report, 2023*).

No Brasil, os dados mais atuais em relação ao número de usuários apontam que quase 70 milhões de pessoas usaram drogas em 2015, com cerca de 8.467 óbitos. Já em 2021, apesar do número de pessoas que usaram drogas ainda não estarem disponíveis, dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde apontam que o número de óbitos relacionados ao uso de drogas chegou a 12.233 mil (DATA SUS, 2023), um aumento de quase 45% em relação a 2015. Além disso, o Sistema Único de Saúde registrou, em 2021, cerca de 400,3 mil atendimentos relacionados ao uso dessas substâncias psicoativas (INFOPEN, 2023).

O uso de substâncias psicoativas não só compromete a qualidade de vida individual, mas também traz prejuízos para toda a sociedade, uma vez que gera prejuízos econômicos, além do aumento da criminalidade e da violência. Por exemplo, em 2019, o Brasil investiu 476.863.640 milhões para implementação de políticas brasileiras no combate às drogas, sendo 22.683.341 milhões no Ministério da Saúde, 421.230.765 milhões no Ministério da Justiça e 32.949.534 no Ministério da Cidadania (INFOPEN, 2023). Além disso, estima-se que a violência relacionada ao tráfico de drogas leve a uma redução de expectativa de vida ao nascer dos brasileiros de 4,2 meses, ou a uma perda de 1.148 milhões de anos potenciais de vida perdidos, com prejuízos de R\$50 bilhões anuais no custo de bem-estar. Além disso, o tráfico de drogas está associado a outros mercados ilegais que prejudicam o meio ambiente e os direitos humanos. Por exemplo, na Bacia Amazônica, o tráfico ilícito de drogas promove a ocupação ilegal de terras, extração ilegal de madeira, mineração ilegal, tráfico de animais silvestres e outros crimes que afetam o meio ambiente chamados de narco-desmatamento (*World Drug Report, 2023*).

### **1.1.2 Histórico e sociológico**

Apesar do uso de drogas ser considerado atualmente um problema de saúde pública, devemos compreender que este não é um fenômeno da sociedade moderna. Pelo contrário, é algo intrínseco ao desenvolvimento humano, uma vez que o uso de substâncias psicoativas ocorre de forma universal há milhares de anos, em todas as sociedades e antes mesmo de haver registros escritos, visando diferentes intuitos como em rituais religiosos e na medicina (Sullivan and Hagen, 2002). Já foram descobertos fósseis e artefatos de muitas classes de drogas como estimulantes, opióides, alucinógenos e cannabis, que datam dezenas de milhares de anos. De forma interessante, referências literárias ao uso de álcool, ópio e outras drogas podem ser

observados na Bíblia, na Ilíada & Odisseia e nos mitos gregos (Crocq, 2007; Martin et al., 2014) o que demonstra seu uso milenar.

“O registro histórico e antropológico do uso de drogas, ao longo do processo de desenvolvimento histórico do ser social, indica uma prevalência fenomênica dessa atividade que lhe confere um caráter trans-histórico. Ou seja, trata-se de uma prática cuja prevalência fenomênica está presente em todas as sociedades e culturas e em todos os contextos históricos” (BRITES, 2006, p. 47).

Além do uso medicinal e religioso, registros também sugerem que o uso de substâncias psicoativas de forma recreativa também ocorre há milhares de anos. Por exemplo, o uso de maconha é datado 2800 aC. Na própria Odisseia, Helena de Troia utilizava uma mistura de drogas em seu vinho que afastava sentimentos ruins como raiva, tristeza e dor (Crocq, 2007; Martin et al., 2014). Por outro lado, padrões de uso problemáticos também têm sido relatados desde a antiguidade. Por exemplo, em 323 aC, a morte de Alexandre o grande foi antecipada devido ao uso abusivo de álcool (Crocq, 2007).

Durante anos, estes padrões problemáticos com as drogas de abuso eram considerados apenas um desvio de caráter. Porém, no século XVIII, houve um aumento do número de estudos que buscavam isolar os principais compostos de diferentes substâncias psicoativas, bem como seus efeitos no comportamento humano (Research, 1996). Consequentemente, o conceito do uso abusivo de drogas começou a ser introduzido como um problema médico e não apenas de moral. Já no final do século XX, os avanços tecnológicos permitiram uma melhor compreensão do envolvimento de mecanismos genéticos e moleculares do uso de drogas, bem como uma classificação diagnóstica mais precisa do SUD. Dessa forma, a adicção foi definida como um transtorno psiquiátrico (Crocq, 2007; Leshner, 1997). Porém o debate sobre a adicção ser uma doença cerebral ou uma condição moral ainda está presente, uma vez que valores sociais apontam o uso de drogas como um ato hedonista e voluntário, relacionado com a autodeterminação e responsabilidade pessoal (Heilig et al., 2021; Lewis, 2018).

Porém esse debate é capaz de influenciar o acesso ao tratamento, bem como o estigma associado ao ato de usar drogas, muitas vezes é motivada pela questão de saber se e até que ponto podemos responsabilizar de forma justa os indivíduos dependentes por suas ações. Por se concentrar em fatores biológicos em vez de argumentos morais, a visão da adicção como transtorno ajudou a reduzir o estigma enfrentado pelos pacientes e suas famílias, pelo menos em alguns aspectos (Heilig et al., 2021; Leshner, 1997). Além disso, o modelo de doença cerebral também legitimou o papel do sistema de saúde no tratamento do SUD, possibilitando o desenvolvimento de políticas públicas preventivas e de redução de danos (Da and Teixeira, 2016).

### **1.1.3 Definição, diagnóstico e neurobiologia**

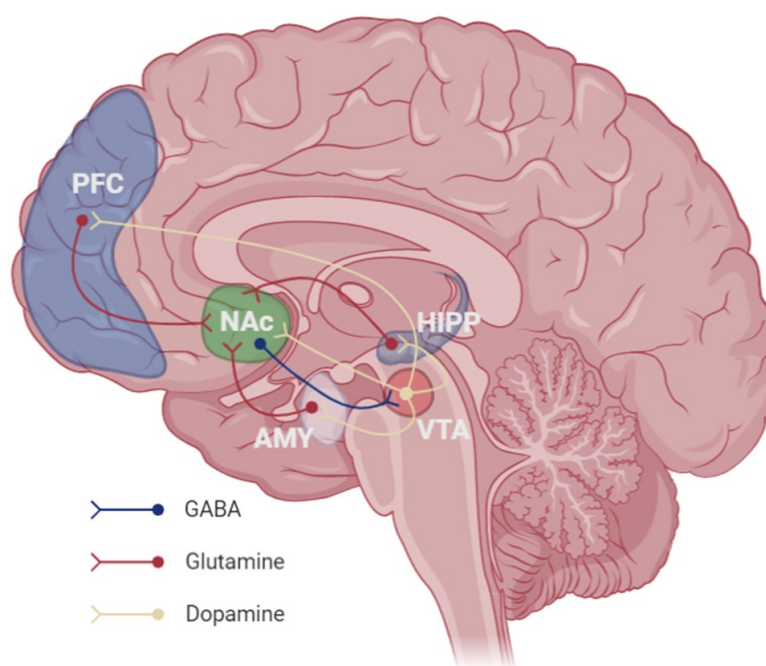
O SUD é definido como um padrão de uso de substâncias psicoativas que causa danos à saúde física e/ou mental. É uma doença progressiva, crônica e recorrente, sendo passível de tratamento e recuperação. É principalmente caracterizada por um comportamento compulsivo de busca pela droga, ausência de autocontrole durante a utilização e alterações fisiológicas e psicológicas negativas (por exemplo, irritabilidade, ansiedade e disforia) na ausência da substância (Volkow et al., 2019a; Volkow and Blanco, 2023a).

Os avanços nas áreas das neurociências possibilitaram uma melhor compreensão das alterações cerebrais responsáveis por esta condição. Nesse sentido, as manifestações biológicas, psicológicas e sociais que ocorrem devido às disfunções que ocorrem nos circuitos cerebrais são utilizadas no diagnóstico da doença (Koob and Volkow, 2016; Volkow et al., 2016; Volkow and Blanco, 2023a). São utilizados onze critérios, os quais estão subdivididos em quatro grupos: controle prejudicado, comprometimento social, uso de risco e critérios farmacológicos (Volkow and Blanco, 2023a).

O diagnóstico é estabelecido quando pacientes atendem a um mínimo de 2 dos 11 critérios totais, podendo ser classificado como leve, moderado ou grave. De acordo com o DSM-V, o transtorno é classificado leve na presença de apenas dois ou três critérios, moderado na presença de quatro ou cinco critérios e, a partir de seis critérios, o transtorno por uso de substâncias é considerado grave e é comumente denominado adicção (Volkow et al., 2016; Volkow and Blanco, 2023a).

De forma interessante, apesar das substâncias psicoativas serem divididas em 10 diferentes categorias, de acordo com suas diferentes propriedades neurofarmacológicas, Chiara e colaboradores (1998) demonstraram por microdiálise que as drogas de abuso compartilham a capacidade de aumentar os níveis de dopamina no sistema de recompensa (Di Chiara and Imperato, 1988). Contudo, é importante ressaltar que as diferentes substâncias psicoativas induzem diferentes níveis de magnitude/velocidade do aumento da dopamina, que por sua vez são fatores que contribuem para os diferentes riscos de potencial de abuso de uma droga. Além disso, com base em suas propriedades farmacológicas únicas, as diferentes drogas também modulam outros neurotransmissores, o que também contribui para os seus efeitos recompensadores e de reforço (Volkow et al., 2019b).

O sistema de recompensa consiste em uma série de estruturas cerebrais interconectadas que regulam as respostas a estímulos recompensadores como alimentação, comportamento sexual, interação social; e aversivos, o que é vital para a sobrevivência e manutenção da (Kalivas and Volkow, 2005; Ross and Peselow, 2009). Esse sistema é formado principalmente pelo núcleo accumbens (NAc), pela a área tegmentar ventral (VTA, ventral tegmental area) e pelo córtex pré-frontal (PFC, prefrontal cortex) (Fig 2) (Koob and Volkow, 2016).



**Fig. 2: Sistema de recompensa.** O sistema de recompensa é formado principalmente pela VTA, pelo NAc e pelo PFC, onde principalmente neurônios dopaminérgicos saem da VTA e se projetam para o NAc, para o hipocampo e para o PFC. (Biorender).

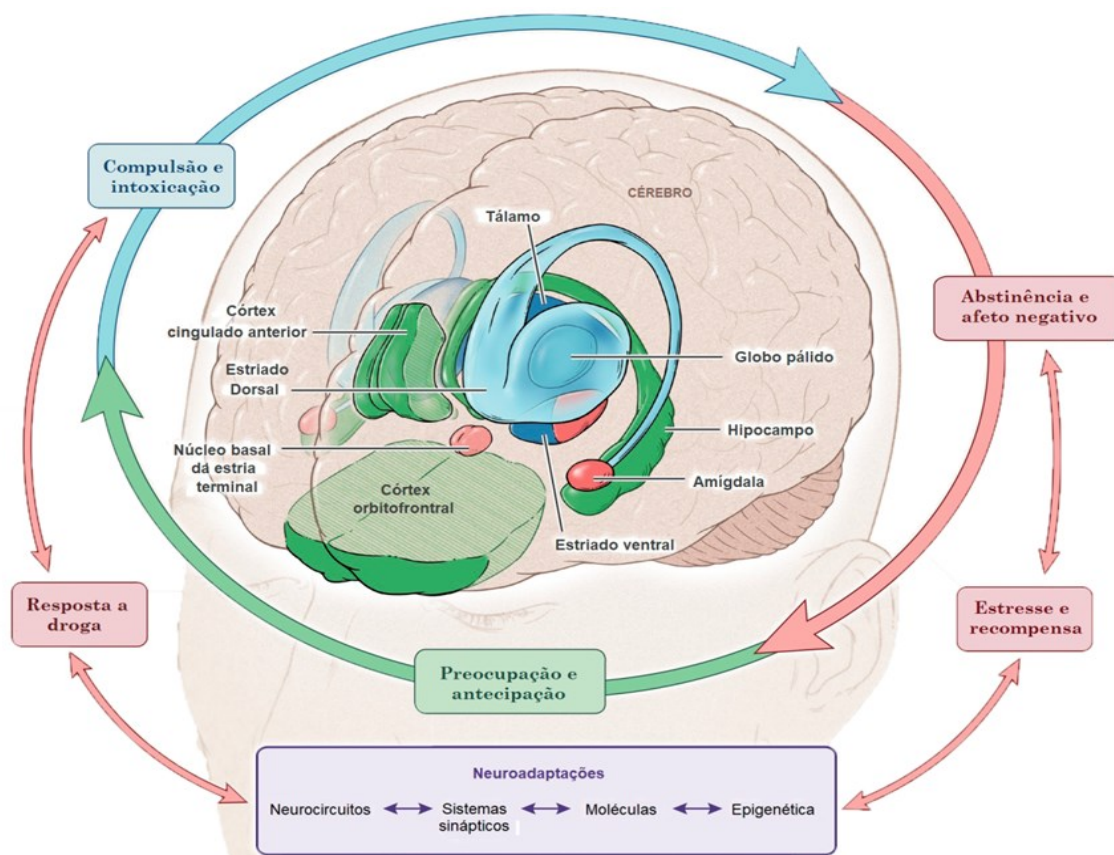
Os neurônios da VTA emitem projeções dopaminérgicas para o NAc, formando a via mesolímbica (Koob and Volkow, 2016). O NAc é uma região heterogênea que faz parte do estriado ventral, sendo que 90-95% são neurônios espinhosos médios (MSN) de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) -érgicos. Os neurônios presentes no estriado dorsal e, por extensão, do NAc, incluem vários tipos de interneurônios, como, por exemplo, neurônios colinérgicos, neurônios que expressam somatostatina/neuropeptídeo Y e interneurônios que expressam parvalbumina (Grueter et al., 2012). Além disso, o NAc também recebe projeções glutamatérgicas do hipocampo e da amígdala. Nesse sentido, espinhas dendríticas do NAc recebem simultaneamente projeções glutamatérgicas e dopaminérgicas, o que torna essa região essencial na integração de informações sobre motivação e recompensa, e também na prevenção de estímulos ou estados aversivos (Koob and Volkow, 2016) (Fig 2).

Os neurônios dopaminérgicos da VTA também se projetam para outras regiões como o hipocampo e a amígdala. Além disso, a VTA também emite projeções para o PFC, que medeia a autorregulação e a valência dos estímulos. Por fim, a VTA recebe projeções de múltiplas áreas cerebrais que controlam o disparo tônico e fásico de seus neurônios dopaminérgicos (Koob, 1992; Volkow et al., 2019a). Em suma, nessa circuitaria cerebral, o NAc é o principal regulador de estímulos recompensadores, a amígdala reguladora de estímulos aversivos, o hipocampo na formação de memórias associadas ao estímulo emocional e o PFC no processo de tomadas de decisões, determinando a resposta comportamental de acordo com cada estímulo (Ito et al., 2004; Kalivas and Volkow, 2005; Otis et al., 2018; Volkow et al., 2019a).

As substâncias psicoativas, principalmente através de estimulação dopaminérgica repetida, são capazes de induzir alterações neuroplásticas persistentes nos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo e em suas projeções para o NAc. Além disso, essas neuroadaptações também envolvem projeções glutamatérgicas em neurônios da VTA e nos MSNs do NAc, sendo o principal foco para as respectivas mudanças comportamentais que caracterizam o SUD (Bender

and Torregrossa, 2020; Briand et al., 2007; Wright and Dong, 2020). De forma interessante, algumas das principais alterações neurais que ocorrem, como alterações na morfologia dendrítica, dos receptores ionotrópicos de glutamato AMPA e NMDA que resultam em potenciação de longo prazo (LTP) e depressão de longa duração (LTD), são semelhantes às alterações sinápticas associadas à formação de memória aprendizagem (Brown et al., n.d.; Volkow et al., 2019a).

Nesse sentido, a transição do uso recreativo de drogas para o uso problemático manifesta-se num ciclo repetitivo de três estágios denominados de compulsão (*binge*) e intoxicação, abstinência e afeto negativo, e preocupação/antecipação ou desejo (*craving*). Esses estágios ocorrem como consequência das alterações neurais que acontecem nas circuitarias envolvidas no sistema de recompensa e motivação, nas funções executivas e na valência dos estímulos emocionais. É importante ressaltar que cada estágio envolve diferentes circuitos neurobiológicos, neurotransmissores e características comportamentais (Fig. 3). Além disso, a duração e a intensidade de cada ciclo irão variar de acordo com a gravidade do SUD, bem como das propriedades farmacológicas de cada substância (Koob and Volkow, 2016; Volkow et al., 2016).



**Fig. 3:** Estágios e neurocircuitos da neurobiologia do SUD. Na fase de intoxicação e compulsão, observa-se ativação das regiões associadas ao prazer (representadas em azul), em resposta a estímulos condicionados provenientes de áreas vinculadas ao aumento da sensibilização (indicadas em verde). Em situações sem a presença da substância, regiões relacionadas às emoções (em tom rosa) desencadeiam uma fase caracterizada por um estado de humor negativo e maior sensibilidade ao estresse. Na fase de preocupação e antecipação, a redução da responsividade do córtex pré-frontal (PFC) propicia o desenvolvimento de um padrão compulsivo de uso da substância. Os comportamentos ao longo dos três estágios da adicção sofrem alterações conforme o indivíduo transita de um uso inicial recreativo para a fase compulsiva da droga, resultado das adaptações neurais progressivas que ocorrem no cérebro (Adaptado de Volkow et al., 2016).

O uso de drogas é capaz de reorganizar e promover mudanças plásticas nos circuitos do sistema de recompensa e do comportamento adaptativo, principalmente por um desbalanço nos níveis de neurotransmissores na via dopaminérgica mesocorticolímbica e na via glutamatérgica corticolímbica (Bobadilla et al., 2017; Saal et al., 2003; Simmons et al., 2019). Porém a etiopatogenia da adicção é um processo muito mais complexo na qual as pessoas apresentam diferentes susceptibilidades. Os fatores de risco para o uso de drogas podem estar associados com questões biológicas, tais como características genéticas, doenças psiquiátricas, alterações hormonais, assim como com questões culturais e socioeconômicas (Kendler et al., 2019; Ouzir and Errami, 2016; Sinha, 2011).

Essa grande heterogeneidade na susceptibilidade para o uso de drogas também promove diferenças na intensidade e na frequência de uso da droga e seus dados associados, o que contribui para a complexidade do tratamento. Entender a natureza e a gravidade do transtorno do paciente é de extrema importância na determinação do tratamento que pode ser por intervenção comportamental, farmacológica ou ambos (Volkow and Blanco, 2023b).

## 1.2 COCAÍNA

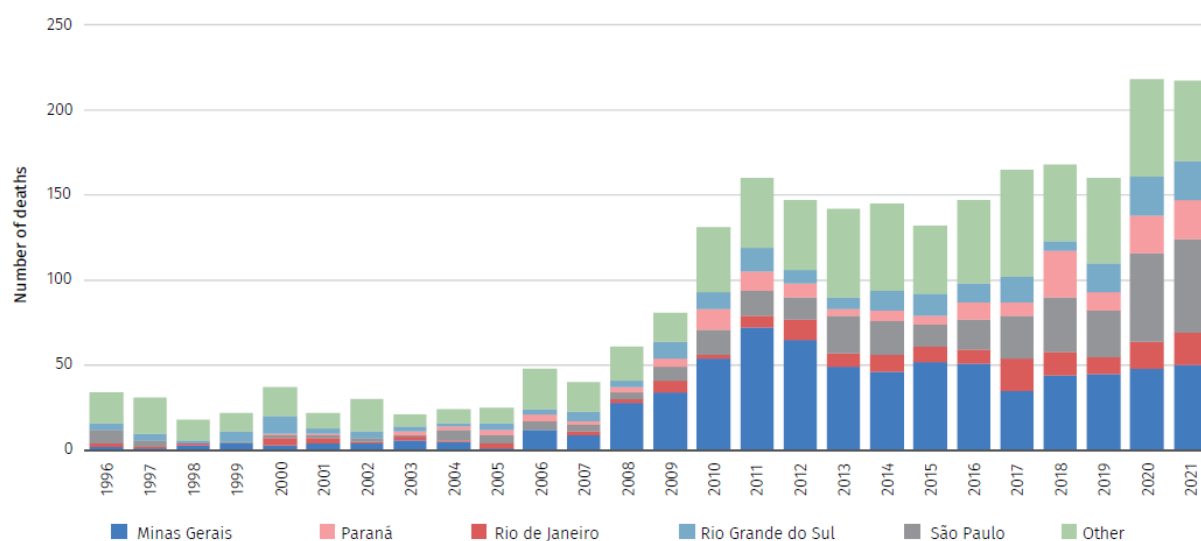
O nome cocaína tem origem da palavra aimará “*Khoka*” cujo significado é “árvore” ou “planta”. Seu nome foi designado pelos índios bolivianos que foram conquistados pelos Incas no século X. É extraída das folhas *Erythroxylon coca* e *Erythroxylon novogratense*, que eram mastigadas ou consumidas em forma de chá

pela elite Inca com o intuito de aumentar força e resistência, além dos efeitos de euforia (Bailey, 1996).

Apesar do uso da cocaína ser registrado em escavações arqueológicas há pelo menos 4.500 anos, datando de quando civilizações andinas utilizavam a folha de coca em rituais religiosos, ao longo da última década, houve uma expansão sem precedentes no mercado global da cocaína, o que levou à consolidação de novos mercados e novas rotas de tráfico. Em 2021, o cultivo de cocaína chegou a 315.500 hectares, com uma produção total de 2.304 toneladas, sendo este o sétimo aumento consecutivo em termos anuais. Dessa forma, em 2021, o mercado da cocaína bateu seu recorde mundial em termos de cultivo, produção e apreensão. Além disso, uma vez que o atual mercado global de cocaína é o resultado de uma combinação da oferta e procura, em 2021, o número de pessoas que utilizaram cocaína chegou a 22 milhões no mundo (World drug report, 2023).

O Brasil consome 20% do mercado mundial de cocaína, sendo o 2º maior consumidor dessa droga no mundo. Além disso, devido à localização geográfica do território brasileiro, o qual faz fronteira com os grandes produtores de coca – Colômbia, Peru e Bolívia –, o Brasil acaba se tornando uma das principais rotas para o tráfico (Abdalla et al., 2014). Como consequência, em 2021, houve também um recorde na quantidade de mortes devido ao uso de cocaína, bem como da quantidade apreendida pela polícia (Fig. 4) (World drug report, 2023).

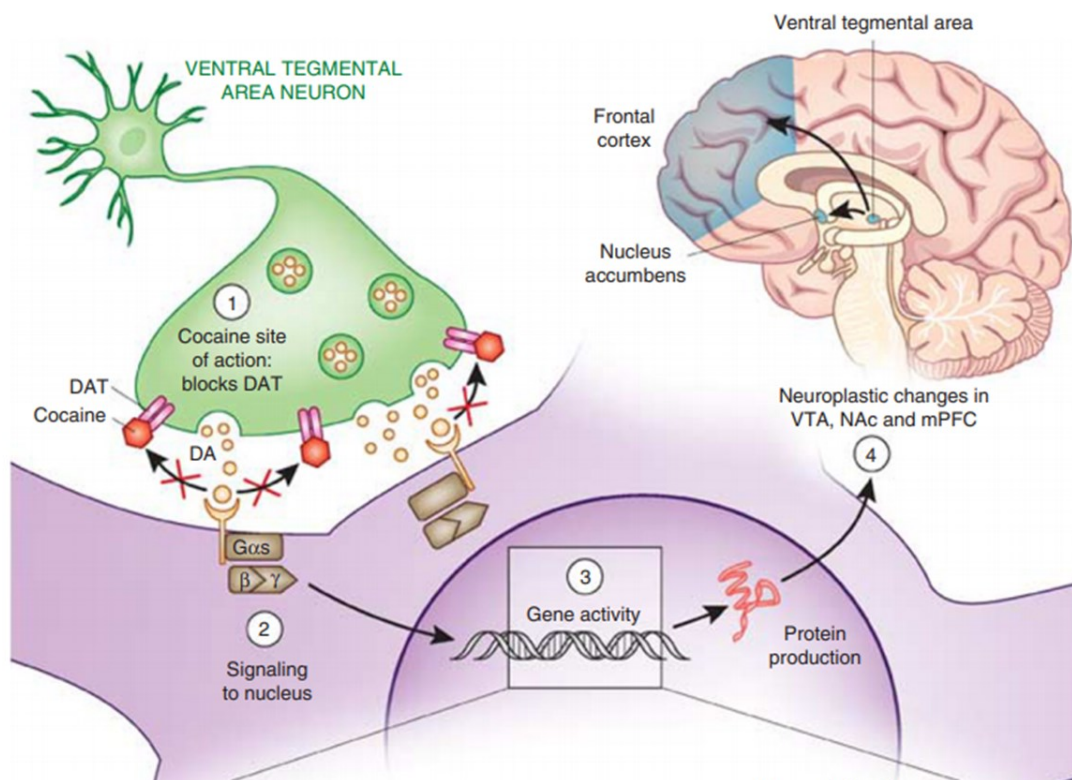
Deaths attributed to cocaine use disorders in Brazil, by federal unit, 1996-2021



**Fig 4:** Número de mortes devido ao uso de cocaína no Brasil entre os anos de 1996 e 2021 (UNODC, 2022).

A cocaína é um alcalóide tropano, que age como um potente anestésico local, vasoconstritor e psicoestimulante. Seu uso recreacional ocorre devido a sua capacidade de induzir um intenso estado de euforia e prazer, melhora no desempenho cognitivo e motor, e pela diminuição da sensação de cansaço e fome (Taylor et al., 2013). Seu mecanismo de ação consiste principalmente no bloqueio dos transportadores de membrana das monoaminas dopamina, serotonina, noradrenalina, o que aumenta a biodisponibilidade destes neurotransmissores nos terminais sinápticos (Argilli et al., 2008).

Os níveis elevados de dopamina induzidos pela cocaína levam a um aumento de sua sinalização via receptores dopaminérgicos que estão relacionados com alterações na expressão de genes e proteínas (Nestler, 2012). A ativação de D1 aumenta os níveis de AMPc, que ativa a proteína quinase A (PKA) e a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (Andrianarivelo et al., 2019; Zhang et al., 2017). Isso leva à ativação de fatores de transcrição como delta FosB ( $\Delta$ FosB), fator de transcrição regulado por AMPc (CREB), fator 2 de aumento de miócitos (MEF2) e fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (McClung and Nestler, 2003; Pulipparacharuvil et al., 2008; Russo et al., 2009), que estão relacionados a alterações na expressão de genes e proteínas que regulam a expressão de receptores, morfologia celular e excitabilidade neuronal (Fig. 5). Por exemplo, a expressão de  $\Delta$ FosB está associada à formação e/ou manutenção de espinhas dendríticas em neurônios D1 e D2 no NAc após exposição crônica à cocaína, enquanto o aumento da atividade do MEF2 exibiu o efeito oposto (Lee et al., 2006).



**Fig 5:** A cocaína altera os níveis de dopamina na via mesocorticolímbica do cérebro por bloquear a recaptação através do bloqueio de DAT. Conseqüentemente, a ativação de receptores D1 e D2 estimula cascatas de sinalização intracelulares que modulam processos de neuroplasticidade no sistema de recompensa (Rooge and Wood, 2013).

Além disso, a cocaína também é capaz de interagir de forma indireta com outras vias de neurotransmissores, como a glutamatérgica e a GABAérgica (Bregin et al., 2019; Wolf and Ferrario, 2010). Por exemplo, em ratos, a auto administração aguda ou crônica de cocaína induziu LTD e reduziu a fosforilação de CREB mediada pelo receptor mGluR1/5 no estriado (Hoffmann et al., 2017). Além disso, uma única dose de cocaína é suficiente para aumentar a razão AMPA/NMDA, o que sugere um aumento na transmissão sináptica excitatória mediada por AMPA em neurônios dopaminérgicos (Yuan et al., 2013).

Dessa forma, a cocaína modifica cascatas de sinalização que ocorrem durante processos neuroplásticos e altera a conectividade funcional do cérebro ao induzir adaptações em processos de memória e aprendizado relacionados com o reforço positivo no sistema de recompensa (Fig 5). Conseqüentemente, a cocaína acaba sendo uma das drogas mais utilizadas, apesar de seus efeitos deletérios (Lüscher and Bellone, 2008; Nutt et al., 2007; Pascoli et al., 2011).

### 1.3 COCAÍNA E INFLAMAÇÃO

Embora alterações no sistema dopaminérgico e glutamatérgico sejam consideradas a chave nas alterações neurobiológicas que regulam o comportamento motivado, sabe-se que as drogas de abuso também podem alterar outros sistemas de neurotransmissão, bem como modular outras vias moleculares, incluindo vias inflamatórias (da Silva et al., 2023). Nos últimos anos, pesquisadores têm destacado as respostas imunes induzidas pelo uso de psicoestimulantes, uma vez que pode ocorrer a ativação de diferentes células imunológicas e alterações nos níveis de mediadores inflamatórios, central ou periféricamente, após a exposição aguda e crônica a essas drogas (Bravo et al., 2023; Fox et al., 2012; Zaparte et al., 2019). Porém os mecanismos pelos quais os psicoestimulantes podem levar ao aumento da inflamação não são completamente compreendidos, bem como as consequências neurais e comportamentais.

### 1.4 CÉLULAS MICROGLIAIS

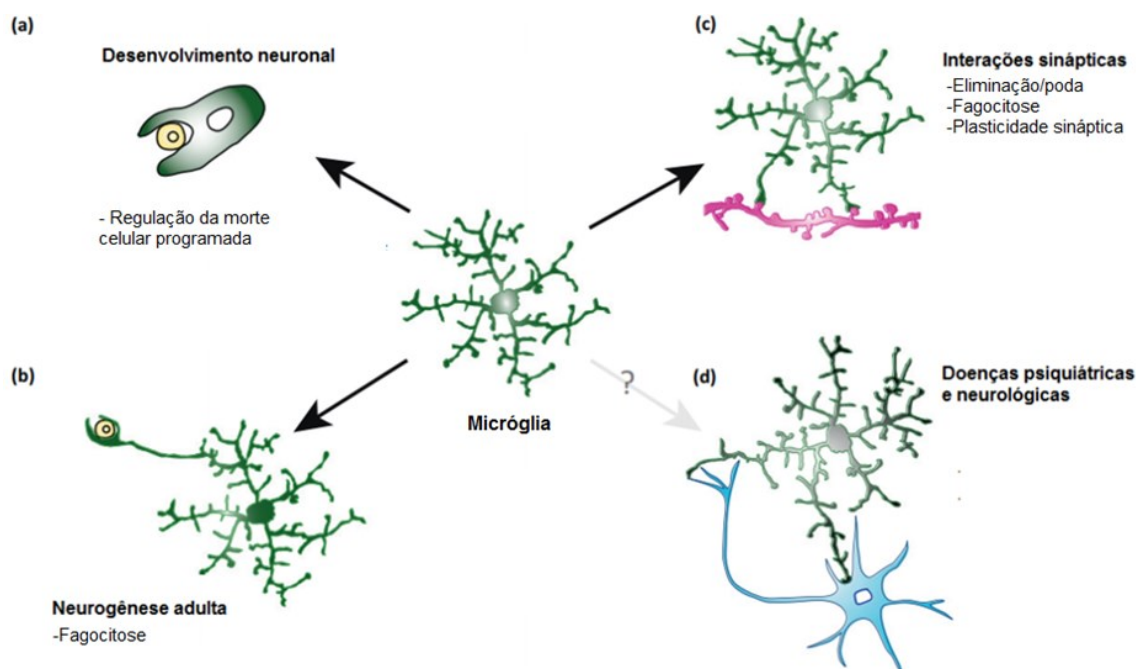
As micróglia são células residentes do sistema imunológico que consistem em cerca de 5-10% de células cerebrais. Eles são as primeiras a responder a insultos patogênicos, ajudando na manutenção da homeostase do SNC. Dessa forma, elas ocupam nichos estratégicos, distribuídas em torno dos somas neuronais, axônios, dendritos e vasos sanguíneos, abrangendo todo o cérebro (Grabert et al., 2016; Morin-Bureau et al., 2018). Assim, as funções microgliais adaptam-se à sua localização e às interações recíprocas com células e estruturas próximas. Além disso, a população microglial é bem heterogênea, com distribuição espacial associadas a diferentes características morfológicas e perfil molecular que dependem do microambiente (Grabert et al., 2016; Jarvis et al., 2020; Stratoulis et al., 2019).

Esta célula foi estudada pela primeira vez em 1899, pelo pesquisador Nissl que a descreveu como uma entidade celular distinta com capacidade migratória e fagocítica. Além disso, devido a sua morfologia, ela foi inicialmente chamada de "Stäbchenzellen". Já em 1913, Ramón y Cajal chamou a micróglia, juntamente com os oligodendrócitos, de "terceiro elemento", sendo os neurônios e os astrócitos o primeiro e o segundo elementos, respectivamente. Porém, em 1932, Pío del Rio-Hortega introduziu o termo "micróglia" e a descreveu fenotipicamente com morfologia

amebóide, que entram em todas as regiões do cérebro durante o desenvolvimento inicial. Já no cérebro maduro, apresentam um fenótipo morfológico ramificado no estado homeostático, mas adquirem uma morfologia amebóide durante eventos patológicos, com aumento de sua atividade fagocítica (Helmut et al., 2011a; Paolicelli et al., 2022; Prinz et al., 2019).

Devido a sua função imunossensora, a micróglia expressa uma infinidade de receptores envolvidos nas funções imunes inatas, principalmente os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores toll-like (TLRs), receptores semelhantes ao gene 1 induzível por ácido retinóico (RIG-1) e receptores semelhantes ao domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NOD) (NLRs) (Frank et al., 2019; Nimmerjahn et al., 2005). Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), desencadeando uma resposta inflamatória. Nesse sentido, essas células se polarizam para um fenótipo com características morfológicas e perfil secretor de citocinas específicos para desempenhar funções como: fagocitose de neurônios apoptóticos e restos celulares, proteção do cérebro contra infecções, eliminação do patógeno e reparo tecidual (Helmut et al., 2011a; Rodríguez-Gómez et al., 2020).

Além disso, essas células são tão versáteis e dinâmicas que não apenas regulam funções imunológicas no SNC, mas também participam da formação de vasos sanguíneos cerebrais, da arquitetura da barreira hematoencefálica, no desenvolvimento e/ou modulação de circuitos neuronais, participando ativamente de processos como excitabilidade neural, neurogênese, morte celular programada, sobrevivência celular e proliferação e, curiosamente, da regulação de comportamentos (Araki et al., 2020; Ferrini and De Koninck, 2013; Parkhurst et al., 2013a; Zhou et al., 2019).



**Fig 6:** Participação da micróglia em processos neurofisiológicos como desenvolvimento neuronal (a), neurogênese adulta (b), interações sinápticas (c), e em transtornos psiquiátricos e doenças neurológicas (d) (Adaptado de Wake et al., 2013).

Em relação ao papel da micróglia no remodelamento dos circuitos neurais, ocorre devido à sua capacidade de alterar elementos pré e pós-sinápticos, alterando então a morfologia das sinapses. Isto é feito através da liberação de fatores tróficos ou do contato direto micróglia-neurônio (Ferrini and De Koninck, 2013; Sipe et al., 2016; Weinhard et al., 2018a). Essa remodelação sináptica pode ocorrer pela liberação de fatores tróficos que induzem a proliferação e sobrevivência celular envolvendo como o BDNF e IL-10 (Lim et al., 2013; Parkhurst et al., 2013b), entre outros. Além disso, sinais que envolvem TNF e IFN- $\gamma$  podem regular a poda sináptica, eliminando o excesso de sinapses imaturas (Aw et al., 2020; Yli-Karjanmaa et al., 2019).

Várias substâncias secretadas pelos neurônios, como os neurotransmissores, podem controlar a capacidade da micróglia de alterar a morfologia das sinapses. Isto é conseguido através da ativação de vários receptores expressos pelas células gliais, incluindo receptores metabotrópicos e ionotrópicos (Helmut et al., 2011b). A comunicação micróglia-neurônio através do CX3CL1, liberado pelos neurônios, e dos receptores CX3CR1, expressos pela micróglia, é tão importante para a excitabilidade neuronal (Bolós et al., 2018; Reshef et al., 2017)[100,101]. Por exemplo, a liberação

de IL-1 $\beta$  pela estimulação de CX3CR1 aumenta a liberação de glutamato, levando à ativação do receptor NMDA pós-sináptico. O TNF, outra importante citocina liberada pela micróglia, também regula a homeostase dos receptores AMPA e pode aumentar a neurotransmissão glutamatérgica (Bertot et al., 2019; Sriram et al., 2006; Stellwagen and Malenka, 2006). Assim, essas células podem remodelar redes neuronais ou controlar as propriedades sinápticas.

Além disso, a remodelação sináptica mediada por outros receptores como o complemento CR3 e receptores purinérgicos. Nesse sentido, a micróglia fagocita espinhas dendríticas e trogócitos pequenas porções de axônios por essas diferentes vias. A atração do processo microglial aos dendritos para fornecer contato com os neurônios é mediada pelos receptores P2RY12 (Sipe et al., 2016; Weinhard et al., 2018a). Nesse sentido, os componentes do complemento C1q, C3 e C4, expressos por neurônios, funcionam como alvos para micróglia. Na verdade, as sinapses podem ser eliminadas pelo reconhecimento do C3 sináptico pelo CR3 microglial. A depleção dessas células gliais ou a inibição do sistema complemento no cérebro de camundongos adultos afeta a remoção da memória no teste de medo contextual (Schafer et al., 2012; C. Wang et al., 2020) Além disso, a modulação da conexão neuronal pela micróglia também pode ocorrer através da formação de sinapses funcionais. A micróglia pode fagocitar a matriz extracelular, estruturas pré-sinápticas de trogócitos e induzir a formação e extensão de filopódios (Bolós et al., 2018; Nguyen et al., 2020; Weinhard et al., 2018b).

Por fim, é importante ressaltar que a micróglia pode modular a atividade de outras células gliais, o que também está relacionado à plasticidade sináptica. Por exemplo, ATP e TNF liberados pela micróglia aumentam a liberação de glutamato pelos astrócitos através dos receptores P2Y1 e TNF, o que altera a transmissão sináptica (Pascual et al., 2012). A liberação de ATP pelos astrócitos também pode atrair processos da micróglia para essas regiões. Além disso, a liberação microglial de BDNF pode atuar nos receptores TrkB dos oligodendrócitos, o que é importante para a mielinização e a memória reguladas pela atividade (Geraghty et al., 2019). Assim, a interação glia-glia é uma comunicação essencial para regular a neuroinflamação e atuar como escultora da plasticidade sináptica.

As alterações sinápticas que ocorrem após a exposição a drogas de abuso têm sido o foco principal dos estudos das bases neurobiológicas do desenvolvimento do SUD (Lüscher and Bellone, 2008; Wright and Dong, 2020). No entanto, as potenciais contribuições de células não neuronais (por exemplo, micróglia e astrócitos) para as adaptações neurais e alterações comportamentais que ocorrem no SUD haviam sido ignoradas ao longo dos anos. De forma interessante, a ativação microglial demonstrou ser capaz de modular a atividade do sistema de recompensa, principalmente porque os neurônios dopaminérgicos apresentam alta suscetibilidade a sinais neuroinflamatórios (Douma and de Kloet, 2020; Taylor et al., 2015). Por exemplo, na via mesolímbica, o nocaute do receptor D3 ou inibição farmacológica promoveu um aumento dos níveis BDNF, ativação microglial e densidade sináptica, o que foi impedido pelo inibidor da micróglia minociclina (J. Wang et al., 2020, 2018). Nesse sentido, essas células poderiam ser essenciais na patogênese do transtorno por uso de substâncias.

De fato, evidências apontam aumento da atividade de células microgliais após o uso de drogas. Fatias cerebrais de usuários de cocaína apresentam um aumento da expressão de aglutinina-1 de *ricinus communis* (RCA-1) – uma lectina que se liga especificamente à micróglia – e também da expressão de CD68 em relação aos pacientes controles (Little et al., 2009). Em primatas não humanos, cortes do estriado de macacos submetidos ao paradigma de autoadministração de cocaína por aproximadamente 15 meses apresentaram maior ligação de [3H]PK11195 – um marcador para a proteína translocadora microglial de 18 kDa (TSPO) (Smith et al., 2019). Além disso, usuários crônicos de METH – outra droga psicoestimulante – apresentam um aumento da expressão de Iba-1 no hipocampo (Mahmoudiasl et al., 2019).

### **1.5 RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÃO (PRRS)**

Nesse sentido, estudos avaliaram a capacidade dos psicoestimulantes ativarem, de forma direta, os PPRs presentes na micróglia. Assim, as drogas de abuso são reconhecidas como substâncias exógenas que, ao atravessarem a barreira hematoencefálica, são capazes de induzir uma neuroinflamação crônica e persistente, caracterizada por alterações na expressão de citocinas no SNC (Lacagnina et al., 2017; Schwarz et al., 2013).

Os PRRs são uma classe de receptores cuja principal função é o reconhecimento de estruturas moleculares específicas presentes na superfície de patógenos, bem como de células em processo apoptose. Estes receptores são compostos basicamente por domínios de reconhecimento de ligantes, domínios intermediários e domínios efetores. Após se ligarem em seus respectivos ligantes, os PRRs recrutam moléculas adaptadoras através de seus domínios efetores, dando início então a ativação de vias de sinalização inflamatórias cujo objetivo é restabelecer a homeostase do hospedeiro. São divididos em 5 famílias: toll-like receptors (TLRs), C-type lectin receptors (CLRs), nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat (LRR)-containing (or NOD-like) receptors (NLRs), RIG-I-like receptors (RLRs), e os AIM2-like receptors (ALRs) (Li and Wu, 2021).

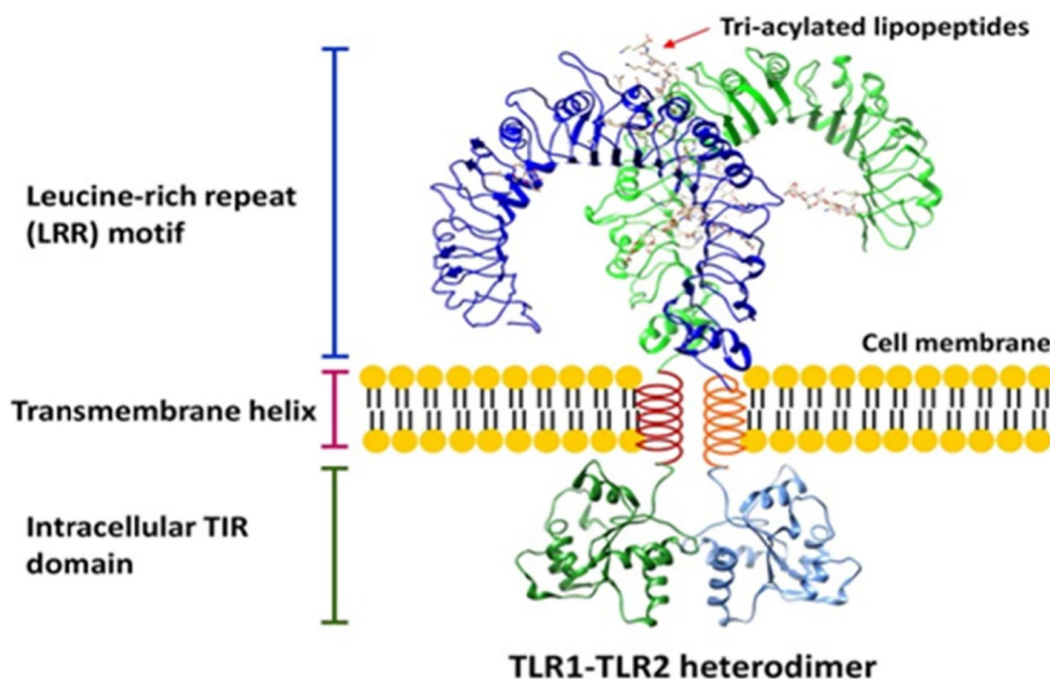
Em um elegante estudo, Northcutt et al. (2015) demonstrou *in silico* o ensaio de docking e ligação competitiva de que a cocaína pode se ligar diretamente ao domínio clássico do fator de diferenciação mielóide 2 (MD-2) no TLR4 (Northcutt et al., 2015). Em culturas de células microgliais e modelos animais, a cocaína aumenta a expressão de TLR4, bem como de outros componentes da via deste receptor – MyD88, IRAK1, TRAF6 e NF- $\kappa$ B (Brown et al., 2018a; Periyasamy et al., 2018; Zhu et al., 2021).

### 1.5.1 TLRs

Os TLRs são a linha de frente do sistema imune inato em diferentes tipos de espécies, desde insetos até mamíferos como os humanos. Esta foi uma das primeiras famílias de PRR a serem descobertas, sendo encontrada pela primeira vez em 1994. Atualmente, existem 10 tipos de TLRs em humanos (TLR1–10) e 12 em camundongos (TLR1 – TLR9, TLR11 – TLR13). Os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 se localizam na superfície celular, enquanto os TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13 são intracelulares. Os diferentes membros da família TLRs são expressos diferencialmente entre as células do sistema imunológico e parecem responder a diferentes estímulos (El-Zayat et al., 2019; Fitzgerald and Kagan, 2020).

Os TLRs são glicoproteínas transmembrana tipo I e são compostos por uma região extracelular, uma região transmembrana e uma região intracelular. Seu domínio extracelular é caracterizado por repetições ricas em leucina (LRR), sendo

essa região responsável pelo reconhecimento dos PAMPs e DAMPs. Já seu domínio citoplasmático contém o mesmo domínio Toll/IL-1R (TIR) que IL-1R, que possui três sequências de aminoácidos conservadas, que são chamadas de cassetes, sendo responsável por iniciar a transdução da sinalização intracelular (El-Zayat et al., 2019).



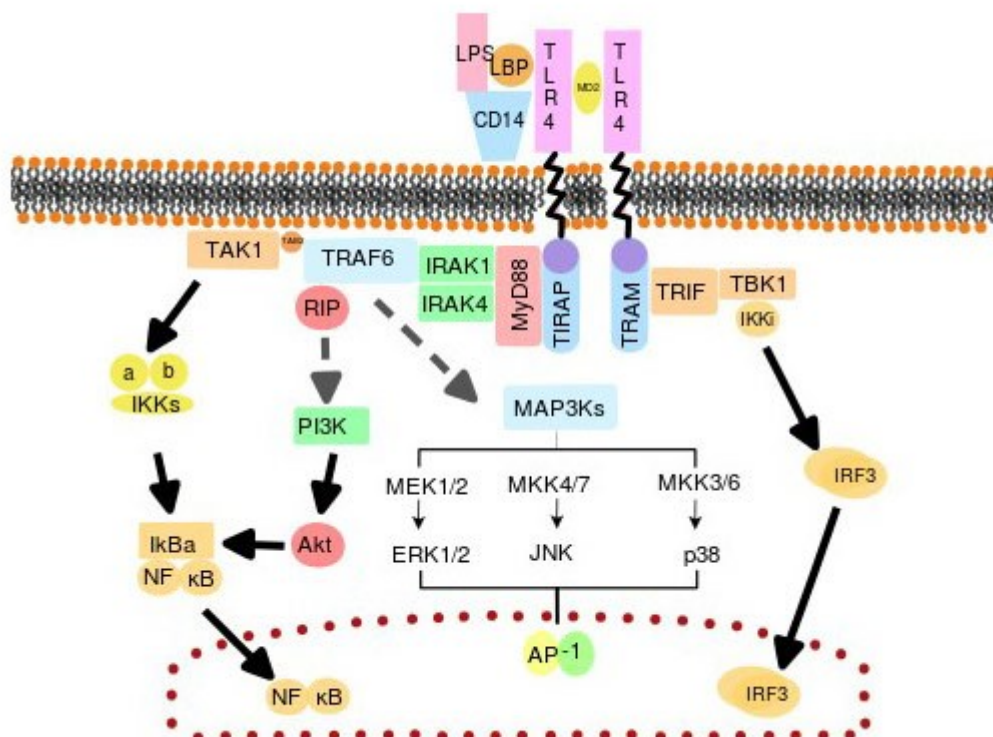
**Fig 7:** Estrutura dos receptores TLRs, que são formados por estruturas transmembranas, um domínio extracelular caracterizado por LRR e um domínio intracelular que contém o domínio TIR (Zayat et al., 2019).

Como dito anteriormente, uma característica dos PRRs é o recrutamento de moléculas adaptadoras através de seus domínios efetores após se ligarem em seus respectivos ligantes. Nesse sentido, os domínios TIR podem se ligar a diferentes proteínas adaptadoras presentes na região citoplasmática. Dependendo do tipo dessas proteínas, a sinalização dos TLRs pode ser dividida em vias dependentes do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) ou independentes de MyD88. De forma interessante, apenas o TLR4 é capaz de ativar as duas vias (Ciesielska et al., 2021; Fitzgerald and Kagan, 2020; T. Yang et al., 2020).

O TLR4 interage com MD-2 e induz a dimerização dos ectodomínios das duas moléculas de TLR4. Na sinalização MyD88 dependente, o TIR interage com as proteínas adaptadoras, TIRAP (também chamado de Mal) e MyD88. Na verdade, o

TIRAP ligado ao TLR4 recruta o MyD88, que se liga à quinase associada ao receptor da interleucina-1 (IRAK) 1 e 2, formando um complexo de sinalização submembranar denominado midossoma. O myddosome recruta a ubiquitina ligase E3 (TRAF6), que desencadeia uma cascata de sinalização envolvendo a quinase TAK1 e que fosforila e ativa as quinases I $\kappa$ B $\alpha/\beta$  (IKK $\alpha/\beta$ ), permitindo a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo. Além disso, a TRAF6 e TAK1, as MAP quinases são fosforiladas para ativar os fatores de transcrição AP-1 e CREB (Brubaker et al., 2015; Ciesielska et al., 2021).

Na via MyD88 independente, a proteína adaptadora TRAM é recrutada, facilitando a interação do TRIF com o TLR4. Em seguida, ocorre a ativação da ubiquitina ligase TRAF3 seguida pela ativação de IKK quinases não canônicas: quinase de ligação a TANK 1 (TBK1) e IKK $\epsilon$ . TBK1 o TRIF que é necessário para recrutar o fator regulador do interferon (IRF) 3. O IRF3 também é fosforilado pelo TBK1 e então se dissocia do TRIF, dimeriza e transloca para o núcleo. Finalmente, o IRF3 e, em menor extensão, também o IRF7 ativado por TBK1 induzem a expressão de genes que codificam o IFN tipo I, a quimiocina CCL5/RANTES e genes regulados por IFN como os que codificam a quimiocina CXCL10/IP-10. Além disso, o TRIF induz a ativação tardia de NF- $\kappa$ B por meio do recrutamento e ativação de TRAF6 ou serina/treonina-proteína quinase 1 que interage com o receptor (RIPK1). O RIPK1 interage com o RIP (RHIM) presente no terminal C do TRIF, que também é reconhecido pelo RIPK3 (Ciesielska et al., 2021; Ullah et al., 2016).



**Fig 8:** Vias intracelulares de ativação do TLR4, que pode ser MyD88 dependente ou independente, levando a translocação de fatores de transcrição como o NF-κB (Zhang et al., 2019).

Em ambas as vias, ocorre a translocação do NF-κB, que representa uma família de fatores de transcrição que regulam uma grande variedade de genes envolvidos em diferentes processos de respostas imunes e inflamatórias. Esta família é composta por cinco membros estruturalmente relacionados, incluindo NF-κB1 (também denominado p50), NF-κB2 (também denominado p52), RelA (também denominado p65), RelB e c-Rel, que medeiam a transcrição de genes alvo pela ligação a um elemento específico de DNA (Liu et al., 2017; Yu et al., 2020).

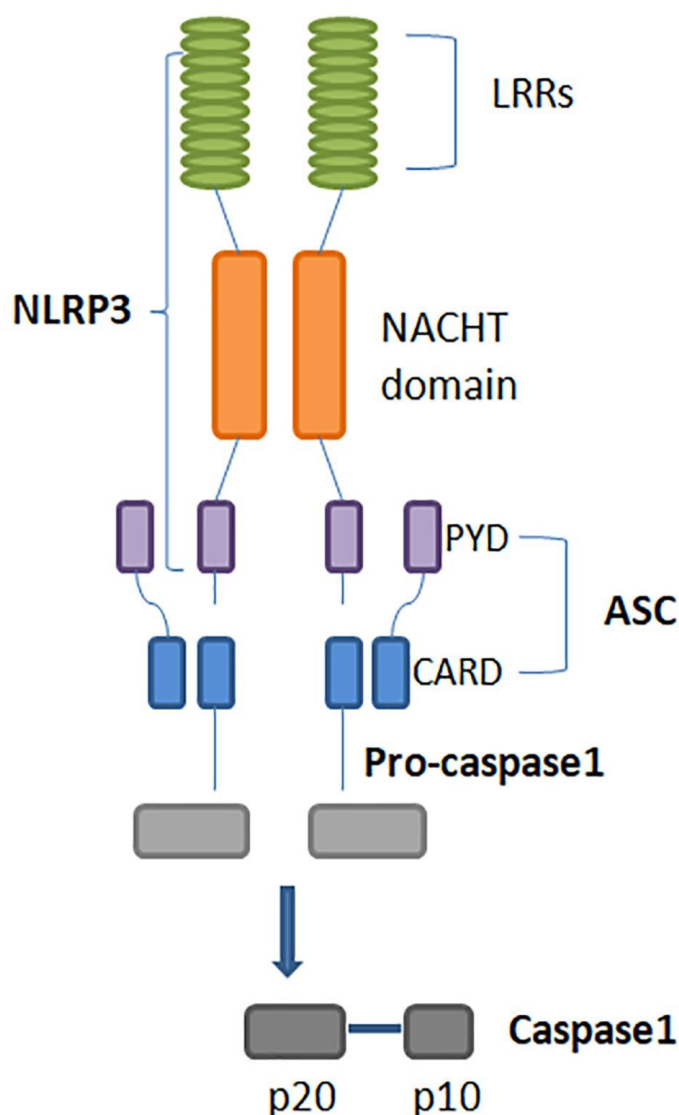
A produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6, é induzida diretamente pelo NF-κB, enquanto a produção de IL-1β é regulada em duas etapas: transcrição e maturação. A IL-1β é primeiramente induzida como um precursor inativo denominado pró-IL-1β pelo NF-κB. Em seguida, a pró-IL-1β é então clivada pela caspase-1 ativa, uma cisteína protease que está envolvida no complexo do inflamassoma (Kelley et al., 2019).

### 1.5.2 NLRP3/CASP1/IL-1B

Os inflamassomas são complexos multiproteicos com atividade proteolítica que regulam a maturação das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-18. Os inflamassomas são compostos por PRRs citosólicos sensíveis ao ligante, como os NLR ou AIM2, a adaptadora ASC com domínio CARD e no efetor – caspase-1 ou caspase-11 (Broz and Dixit, 2016).

O inflamassoma NLRP3 é atualmente o mais caracterizado, sendo este de extrema importância na defesa contra infecções bacterianas, fúngicas e virais. No entanto, tem sido associado à patogênese de várias outras doenças, incluindo doenças neurológicas e psiquiátricas como Doença de Alzheimer, depressão, Parkinson e etc (Kelley et al., 2019).

O NLRP3 é um membro da família NALP e é composto pelo NLR, que contém um domínio de pirina amino-terminal 3 (PYD), um domínio central de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NOD; também conhecido como domínio NACHT) e um domínio de repetição rica em leucina (LRR) C-terminal. A formação do inflamassoma NLRP3 ocorre uma vez que o domínio PYD do NLRP3 interage com o domínio PYD do ASC, e o domínio NOD possui atividade ATPase necessária para a oligomerização de NLRP3 após a ativação. Essas proteínas então se oligomerizam e recrutam a pró-caspase 1 via ASC, uma vez que a pró-caspase 1 sequência CARD da pró caspase-1 se liga à sequência CARD do ASC. Por fim, o agrupamento da pró-caspase-1 induz a auto-clivagem da mesma e a formação da caspase-1. Tanto o PYD quanto o CARD pertencem à superfamília do death domains (DD) e exibem características estruturais comuns aos membros desta família, como por exemplo natureza helicoidal que leva à formação de complexos filamentosos, permitindo a amplificação do sinal e ativação alostérica de moléculas efetoras como as caspases. A caspase 1 é responsável pela clivagem da pro-IL-1 $\beta$  e da pró-IL-18, gerando a forma ativa da IL-1 $\beta$  e da IL-18, respectivamente (Accogli et al., 2023; Kelley et al., 2019).



**Fig 9:** Estrutura do inflamassoma NLRP3, que é composto pela proteína NLRP3, pela ASC e pela caspase-1 (Sonessa et al., 2020).

Para a ativação do inflamassoma NLRP3 são necessários dois estímulos, sendo o primeiro chamado de priming e o segundo de sinal de ativação. A função do priming é induzir a expressão dos precursores da inflamação: pró-IL-1 $\beta$ , pró-IL-18 e NLRP3. Dessa forma, os estímulos de priming são os ligantes dos receptores TLR, que via a ativação do NF- $\kappa$ B induzem a transcrição dos genes *Nlrp3* e *Il1b*. Em seguida, o segundo sinal que é o sinal de ativação irá induzir o recrutamento dos outros componentes (ASC e caspase 1) para formar o complexo do inflamassoma. Este segundo sinal pode ser alterações nos níveis de ATP, fluxos de íons e etc (Accogli et al., 2023; Kelley et al., 2019).

### 1.5.3 Papel do TLR4 e da via NLRP3/Casp1/IL-1 $\beta$ em processos de plasticidade sináptica

Evidências demonstram que a participação da micróglia na regulação dos processos de plasticidade sináptica pode ser via ativação dos PRRs TLR4 e NLRP3. A ativação do TLR4 aumenta a ativação microglial, levando a alterações no tamanho e na densidade das espinhas dendríticas, bem como na expressão das proteínas relacionadas à plasticidade sináptica (Kondo et al., 2011; Xiao et al., 2021). Por exemplo, a ativação microglial via TLR4 induzida pela administração de LPS resultou em um aumento temporário na frequência espontânea de EPSC das células piramidais CA1 do hipocampo (Gao et al., 2014), além de controlar a proliferação e diferenciação neuronal (Rolls et al., 2007).

Além disso, o TLR4 desempenha um papel na fisiologia sináptica do NAc e no comportamento de recompensa das drogas. Animais TLR4<sup>-/-</sup> possuem uma diminuição na razão AMPA/NMDA do NAc, sugerindo uma diminuição na força pós-sináptica causada por uma transmissão reduzida de AMPA ou aumento da transmissão NMDA. Além disso, estes animais também exibem déficits na LTD no NAc, em paralelo com déficits na aprendizagem associadas a recompensa (Kashima and Grueter, 2017). Por fim, a ativação de TLR4 na VTA por injeção local de LPS foi suficiente para produzir uma elevação de dopamina no NAc (Nie et al., 2018).

Assim, o envolvimento da sinalização TLR4 tem sido sugerido em vários distúrbios neuronais, incluindo distúrbios neurodegenerativos, depressão, ansiedade e até mesmo SUD (Brown et al., 2018a; Femenia et al., 2018; K. Zhang et al., 2020). Por exemplo, o bloqueio de TLR4 protege contra alterações cognitivas e desregulação sináptica induzidas pela morfina (Muscat et al., 2023).

Em relação à via NLRP3, já é bem estabelecido que a IL-1 $\beta$  pode impactar de forma negativa ou positiva os processos de plasticidade sináptica, dependendo de sua concentração. Por exemplo, em modelo de estresse crônico, a sinalização de caspase-1 / IL-1 $\beta$  induz alterações nos receptores AMPA e déficit cognitivo (Taoro-Gonzalez et al., 2018). Além disso, níveis elevados de IL-1 $\beta$  inibem processos de LTP no hipocampo, contribuindo para a disfunção da memória (Bellinger et al., 1993; Cunningham et al., 1996). Animais KO para o IL-1R apresentam alterações na

arquitetura sináptica dos neurônios do hipocampo, incluindo diminuição da expressão da proteína pós-sináptica PSD95 (Tomasoni et al., 2017). Nesse sentido, a inibição do inflamassoma NLRP3 aumenta a expressão de AMPA, bem como os níveis de CaMKII e CREB no hipocampo, contribuindo para o processos de LTP (Wang et al., 2022).

## 1.6 VIA DAS QUINURENINAS

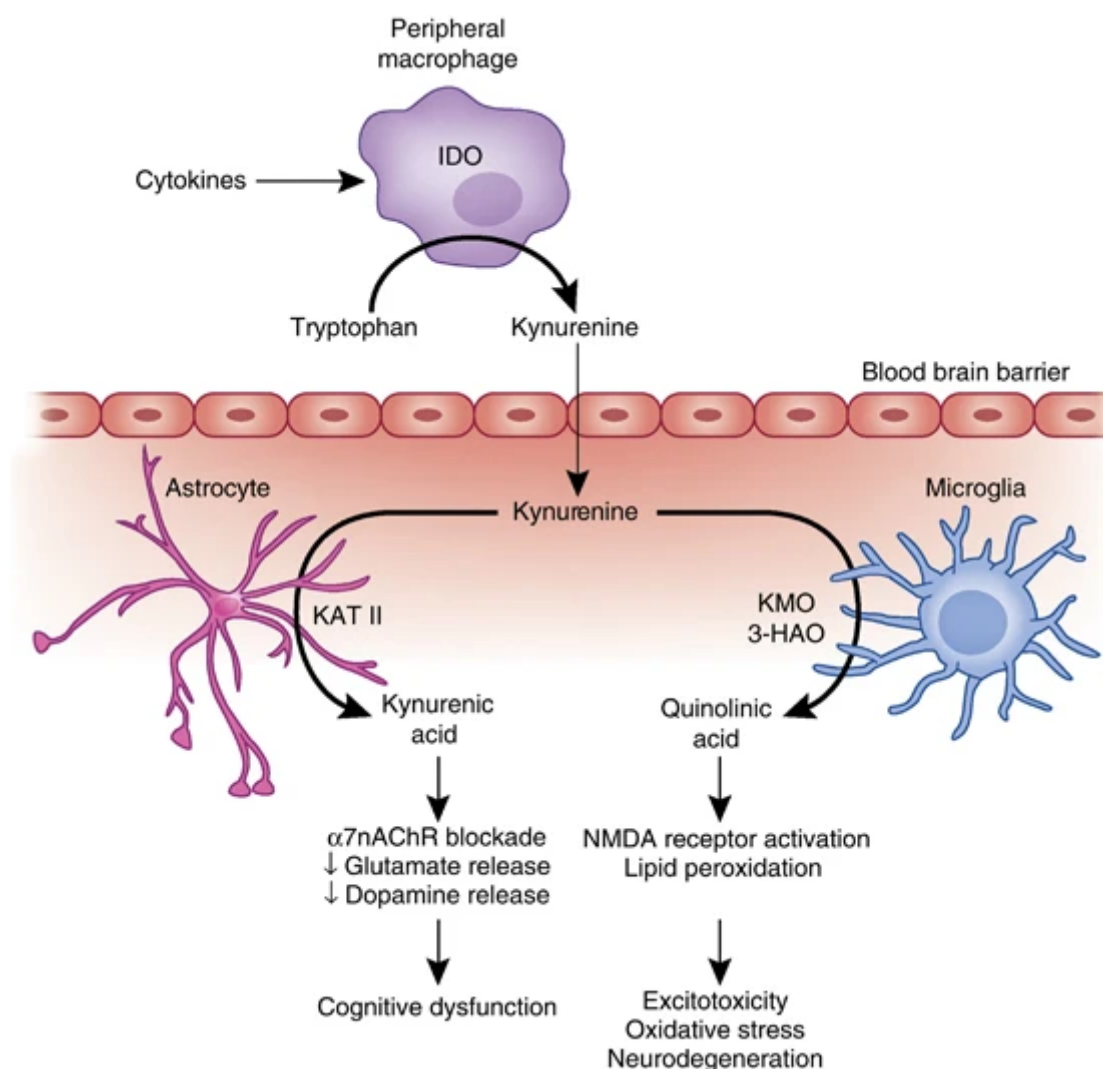
O triptofano é um aminoácido essencial adquirido por meio da dieta, e sua principal função é a formação de proteínas. Este aminoácido pode ser convertido em diversas moléculas bioativas, como a serotonina, melatonina e quinurenina. Porém apenas cerca de 5% do triptofano é convertido em serotonina, sendo os 95% restantes convertido em quinurenina (KYN) e seus metabólitos. Nesse sentido, a via das quinureninas é a principal via de degradação do triptofano e é importante para diversos processos fisiológicos, como a regulação de funções imunológicas (Mithaiwala et al., 2021).

Nesse sentido, essa via também é de extrema importância durante eventos patológicos, sendo regulada por diferentes vias inflamatórias, como a via do TLR4 (Bahraoui et al., 2020; Salazar et al., 2017), a via do inflamassoma (Jeon et al., 2017; S. Zhang et al., 2020) e também pelos níveis das citocinas (Zunszain et al., 2012). Por exemplo, a ativação do complexo TLR4/MD2 em monócitos induz a ativação da enzimaIDO, sendo este efeito revertido pelo LPS-RS, um antagonista do receptor TLR4 (Bahraoui et al., 2020), sendo esse mecanismo importante no desenvolvimento do comportamento tipo depressivo (Hemmati et al., 2019a). Além disso, em outro modelo animal de depressão, a ativação da via TLR4/NLRP3 são capazes de induzir o aumento da IDO e, conseqüentemente, induzir o comportamento tipo depressivo (Hendawy et al., 2023). Nesse sentido, podemos observar que há uma interação entre essas vias inflamatórias, sendo estes importantes no desenvolvimento de alterações comportamentais.

Na via das quinureninas, o triptofano é oxidado em n-formil-quinurenina principalmente pela enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) e, em menor proporção, pela enzima triptofano-2,3-dioxigenase (TDO). Em seguida, a n-formil-quinurenina é então metabolizada em KYN pela quinurenina formamidase. A KYN

então pode ser metabolizada em ácido quinolínico (QA) pela quinurenina 3-monooxigenase (KMO). Por outro lado, a KYN também pode ser metabolizada em ácido cinurênico (KYNA), pela ação da enzima quinurenina aminotransferase (KAT) (Mithaiwala et al., 2021).

As enzimas envolvidas no metabolismo do triptofano ao longo da via da quinurenina (KYN) estão localizadas em todo o corpo, inclusive no cérebro, onde a maior parte do metabolismo da quinurenina ocorre nas células gliais. De forma interessante, a KMO é expressa principalmente pelas células microgliais, enquanto a KAT é expressa principalmente pelos astrócitos (Haroon et al., 2011).



**Fig 10: Via das quinureninas.** A ativação de IDO pelas citocinas em células imunes periféricas ou cerebrais, como os macrófagos e as micróglia, leva à produção de quinurenina, que é convertida em KA por KAT-II em astrócitos ou ácido quinolínico por quinurenina-3-monooxigenase (KMO) e ácido 3-hidroxi-antranílico oxigenase (3-HAO) nas micróglia. Através do bloqueio do  $\alpha 7nAChR$ , o KA pode

reduzir a liberação de glutamato, bem como a liberação de dopamina, os quais podem alterar processos de neurotransmissão. Por outro lado, o ácido quinolínico, através da ativação do receptor NMDA, pode aumentar a liberação de glutamato, bem como levar à peroxidação lipídica, também contribuindo para alterações na neurotransmissão (Haroon et al., 2011).

Estes metabólitos da via das quinureninas têm recebido grande atenção devido à sua capacidade de controlar processos de neurotransmissão. Por exemplo, o QA atua como agonista do receptor NMDA, enquanto a KYNA atua como antagonista atuando principalmente no sítio da glicina (Jhamandas et al., 2000; Potter et al., 2010). Nesse sentido, essa via tem sido estudada em diversas doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (Mithaiwala et al., 2021). Dessa forma, alterações na via IDO também poderiam estar relacionadas ao SUD.

Pouco se sabe sobre os efeitos da cocaína na via das quinureninas. O primeiro estudo da literatura sobre a via IDO em usuários de cocaína observou uma redução do ácido antranílico, um dos metabólitos da via, além de redução dos níveis de KYNA (Araos et al., 2019; Patkar et al., 2009). Além disso, em modelos animais, a inibição da KMO foi capaz de prevenir a recaída por cocaína. Porém mais estudos são necessários para o real entendimento do papel da via IDO nas alterações neurais e comportamentais que ocorrem após o uso de cocaína.

Em suma, embora existam evidências de que a micróglia possa participar da neurobiologia da adicção, os estudos nesta área ainda são escassos. Além disso, pouco se sabe sobre quais seriam as vias inflamatórias que estariam envolvidas nas alterações neurais induzidas pelas drogas de abuso. Nesse sentido, a elucidação do papel da neuroinflamação nas adaptações plásticas induzidas por drogas se torna necessária a fim de se obter uma melhor compreensão da fisiopatologia da adicção e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Testar a hipótese de que vias associadas à atividade microglial estão envolvidas na neurobiologia do transtorno por uso de cocaína.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Testar a hipótese de que a micróglia participa das alterações moleculares que ocorrem após a administração de cocaína.

2.2.1 Testar a hipótese de que a via do receptor TLR4 participa das alterações moleculares e comportamentais induzidos por cocaína.

2.2.2 1 Testar a hipótese de que a via do NLRP3/CASP1/IL-1 $\beta$  participa da sensibilização comportamental e do CPP induzidos por cocaína.

2.2.3 Testar a hipótese de que a via IDO participa da sensibilização comportamental e do CPP induzidos por cocaína.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos WT da linhagem C57Bl/6, machos e fêmeas, com idade entre 8 e 10 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos *knockout* para o receptor TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>), para o inflamassoma NLRP3 (NLRP3<sup>-/-</sup>) e para a enzima caspase 1 (CASP1<sup>-/-</sup>) foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Sérgio Costa, e os camundongos *knockout* para a enzimaIDO (IDO<sup>-/-</sup>) foram gentilmente doados pela Prof. Dra. Vivian Vasconcelos. Os camundongos fêmeas foram utilizados apenas nos experimentos cujo objetivo era avaliar as vias NLRP3, CASP1 E IDO.

Os animais ficaram alojados em gaiolas plásticas e tiveram livre acesso a água e comida, sendo mantidos em ciclo claro/escuro a cada 12 horas com temperatura local de 24 °C. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sendo este projeto aprovado pelos protocolos CEUA nº 381/2019 e 325/2022.

#### **3.2 Drogas**

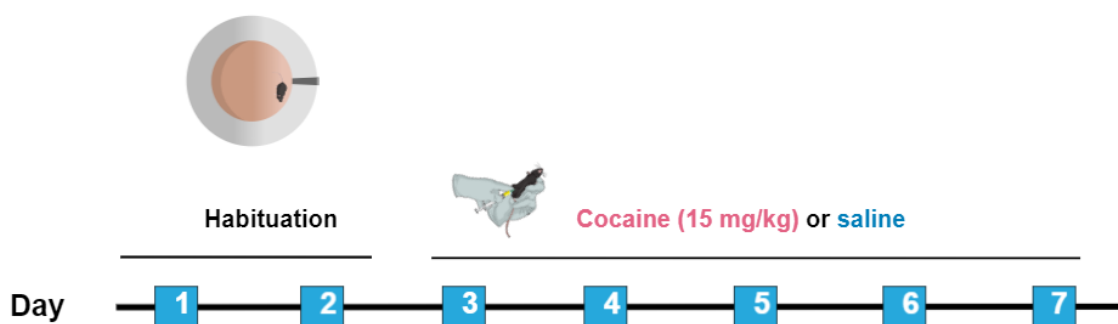
Para a realização do presente estudo, foram utilizadas as seguintes drogas: cocaína (Merck & Co.Inc.®) diluída em solução salina (NaCl 0,9%); pexidartinib (PLX3397 – MedChemExpress) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO - Neon) 1%, polietilenglicol 300 (PEG-300 - Synth) 45%, Tween-80 5%; monofosforil lipídio A (MPLA) diluído em trietilamina 1% e 1-metil-D-triptofano (1-MT) diluído em solução salina (NaCl 0,9%).

#### **3.3 Testes comportamentais**

##### **3.3.1 Sensibilização comportamental**

A sensibilização comportamental é caracterizada pelo aumento de um determinado comportamento como, por exemplo, a atividade locomotora, após a administração repetida de uma droga. Dessa forma, a sensibilização comportamental é um modelo de plasticidade sináptica entre o uso recreativo para o uso abusivo de uma droga (Köks, 2015; Smith et al., 2016).

No teste de sensibilização comportamental, os animais foram submetidos ao campo aberto para avaliação da atividade locomotora. O equipamento consiste em uma arena circular com aproximadamente 120 cm de diâmetro, circundada por uma parede circular de 45 cm de altura. Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e foi avaliada a distância total percorrida por 30 minutos durante 7 dias. Nos dois primeiros dias, os animais eram apenas colocados na arena para que houvesse uma habituação com o ambiente, e pudesse ser observada a atividade locomotora basal dos animais. Já do 3º ao 7º dia, os animais foram tratados com cocaína na dose de 15 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) ou solução salina, e imediatamente colocados no aparato (Fig. 11). A arena foi limpa com álcool 70% entre os testes com cada animal, bem como as fezes de cada roedor foram retiradas da caixa antes do teste seguinte. O teste foi filmado e analisado pelo software ANY-maze (versão 6.0).



**Fig 11:** Protocolo experimental da sensibilização comportamental.

- Para testar a hipótese de que a micróglia participa da sensibilização comportamental induzida por cocaína, camundongos C57Bl/6 foram tratados com PLX3397 durante 21 dias, com o objetivo de depletar a micróglia desses animais. Nos últimos 7 dias deste tratamento, os animais foram submetidos a sensibilização comportamental.

- Para testar a hipótese de que o receptor TLR4 participa da sensibilização comportamental induzida por cocaína, camundongos machos WT C57Bl/6 foram tratados com o agonista fraco do receptor TLR4 – MPLA (50 µg/kg) ou veículo, durante os dias de habituação. Dessa forma, conseguiríamos promover a ativação da

micróglia antes do animal receber a primeira dose de cocaína, obtendo então um modelo de *microglia priming*. Além disso, também foram utilizados camundongos machos TLR4<sup>-/-</sup>.

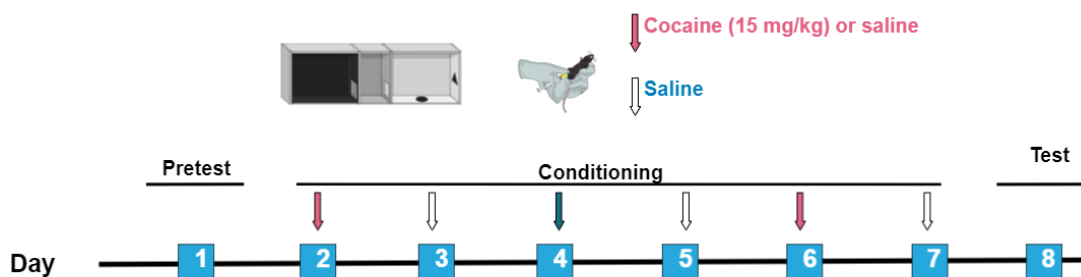
- Para testar a hipótese de que a via NLRP3/CASP1/IL-1 $\beta$  participa da sensibilização comportamental induzida por cocaína, camundongos machos e fêmeas NLRP3<sup>-/-</sup> e CASP1<sup>-/-</sup> foram submetidos a este teste comportamental.

- Para testar a hipótese de que a via IDO participa da sensibilização comportamental, camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas foram tratados com o inibidor enzimático – 1-MT (30 mg/kg) ou veículo, durante todos os dias experimentais, 30 min antes do experimento começar. Além disso, também foram utilizados camundongos machos e fêmeas IDO<sup>-/-</sup>.

### 3.3.2 Preferência Condicionada ao Lugar

A preferência condicionada ao lugar (do inglês *conditioned place preference*, CPP) é utilizada para avaliar a capacidade recompensadora de uma droga, sendo seu paradigma baseado no condicionamento Pavloviano, onde uma pista ambiental (compartimento) se associa com um estímulo (droga) (Smith et al., 2016)(Köks, 2015).

No dia prévio ao teste (dia 1, pré-teste) os animais foram colocados de forma individual no corredor central de uma caixa de acrílico que contém outros dois lados de dimensões iguais, podendo explorar livremente os três compartimentos. O pré-teste foi filmado e foi avaliado o tempo gasto dentro de cada compartimento durante 15 minutos pelo software ANY-maze. Nos dias posteriores, os animais foram tratados com cocaína ou solução salina em dias alternados em um lado da caixa. Nos dias 2, 4 e 6 os animais foram tratados com cocaína imediatamente antes do confinamento ao lado correspondente da caixa, onde permaneceram por 30 minutos. Nos dias 3, 5 e 7 os animais foram confinados no lado oposto e tratados com solução salina, sendo que o grupo controle foi tratado com solução salina todos os dias. No dia do teste (dia 8), os animais foram colocados novamente no corredor central e exploraram livremente o ambiente durante 15 minutos (Fig. 12). O teste foi filmado e foi avaliado o tempo de exploração em cada compartimento. O resultado está apresentado como “taxa de preferência (s)” e o cálculo utilizado é a subtração do tempo que cada animal permaneceu no lado pareado com a cocaína no dia do teste, pelo tempo gasto neste mesmo lado no dia do pré-teste (SMITH et al., 2016).



**Fig 12:** Protocolo experimental do CPP.

- Para testar a hipótese de que o receptor TLR4 participa da CPP induzida por cocaína, camundongos machos WT C57Bl/6 foram tratados com o agonista fraco do receptor TLR4 – MPLA (50 µg/kg) ou veículo, durante dois dias consecutivos, começando um dia antes do início do experimento. Dessa forma, conseguiríamos promover a ativação da micróglia antes do animal receber a primeira dose de cocaína, obtendo então um modelo de *microglia priming*. Além disso, também foram utilizados camundongos machos TLR4<sup>-/-</sup>.

- Para testar a hipótese de que a via NLRP3/CASP1/IL-1β participa da CPP induzida por cocaína, camundongos machos NLRP3<sup>-/-</sup> e CASP1<sup>-/-</sup> foram submetidos a este teste comportamental.

- Para testar a hipótese de que a via IDO participa da CPP induzida por cocaína, camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas foram tratados com o inibidor enzimático – 1-MT (30 mg/kg) ou veículo, durante todos os dias experimentais, 30 min antes do experimento começar. Além disso, também foram utilizados camundongos machos e fêmeas IDO<sup>-/-</sup>.

### 3.4 Perfusão transcárdica

Os animais foram anestesiados por via i.p. com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), e em seguida foi realizada uma toracotomia para exposição da cavidade torácica e visualização do coração. Posteriormente, foi inserida uma agulha hipodérmica conectada a um sistema de perfusão (Bomba peristáltica - Insight®) no ventrículo direito, permitindo a troca do sangue por uma solução de tampão fosfato em salina (PBS – pH 7,4), a uma taxa de perfusão de 4 mL/min.

Para os experimentos de citometria, os animais foram decapitados e seus encéfalos foram retirados logo após a perfusão com 30 mL de PBS. Para os experimentos histológicos, os animais também foram perfundidos com solução de paraformaldeído 4% (PFA – pH 7,4) e seus encéfalos retirados para os processos de pós-fixação, que consiste na estocagem dos encéfalos em solução de PFA 4% durante a noite.

### **3.5 Preparo dos cérebros para técnicas histológicas**

Os cérebros foram colocados em solução de sacarose 30% para desidratação das células, até a saturação, promovendo então uma crioproteção. Posteriormente, os cérebros foram congelados em isopentano 99% e gelo seco, e estocados em freezer de -80°C. Para o preparo dos cortes histológicos, o cérebro foi cortado em um criostato (Leica) a -20 °C na espessura de 30 µm e os cortes foram armazenados em solução anticongelante (etilenoglicol 24%; glicerol 24%; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1256%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,436% diluídos em PBS) a -20 °C.

### **3.6 Imunofluorescência**

Para a técnica de imunofluorescência, cortes de NAc ou hipocampo de 30 µm foram lavados 3 vezes com PBS para retirada da solução anticongelante na qual estavam estocados e foram incubados com glicina 0.1 M, durante 20 min. Os cortes foram novamente lavados 3 vezes com PBS e incubados com solução de bloqueio (10% de albumina bovina sérica – BSA ou NGS ou FBS e 0,5% de Triton-X 100 em PBS) para bloqueio dos sítios inespecíficos e permeabilização durante 1 hora a 37 °C.

Em seguida, os cortes foram incubados a 4 °C com o anticorpo primário anti-Iba-1, anti-CD68, doublecortina ou GFAP durante 24 ou 48 horas, lavados 3 vezes com PBS e incubados com o anticorpo secundário anti-coelho Alexa Fluor durante 1 hora. Posteriormente, os cortes foram lavados 4 vezes com PBS.

Para montagem dos cortes foram utilizadas lâminas silanizadas, meio de montagem Fluoromount (Sigma-Aldrich) e DAPI 1,75 µg/mL (1:1000). As lâminas foram observadas no microscópio LSM880 (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha) no aumento de 20X, e com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio,

foram retiradas fotos do NAc ou hipocampo. A quantificação de células marcadas foi realizada pelo software FIJI.

### **3.7 Imunohistoquímica**

Cortes de NAc e hipocampo de 30 µm foram lavados 3 vezes com PBS, incubados com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% durante 15 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena, e incubados com solução de bloqueio 10% de albumina bovina sérica – BSA ou NGS ou FBS e 0,5% de Triton-X 100 em PBS) durante 1 hora a 37°C.

Em seguida, os cortes foram incubados a 4°C com o anticorpo primário anti-Iba-1 (1:500), durante 72 horas, lavados 3 vezes com PBS e incubados com o anticorpo secundário anti-coelho biotilado (1:500 - Vector) durante a noite. Depois de lavados com PBS, os cortes foram incubados com o complexo Avidina-Biotina (Vector) durante 1 hora, lavados novamente e revelados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e em seguida passaram por um processo de diafanização, no qual foram imersos em sequência em soluções de álcool 70%, 80% e 95% durante 3 minutos cada, álcool 100% 2 vezes, durante 4 minutos cada e xileno 2 vezes, durante 5 minutos.

As lamínulas foram montadas com DPX Mountant for Histology (Sigma-Aldrich) e foram observadas no microscópio LSM880 (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha) no aumento de 40 vezes, e com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio, foram retiradas fotos do NAc.

### **3.8 Análise de Sholl**

Para análise de Sholl, foram selecionadas 5 células por animal de 5 animais por grupo. Apenas células individualizadas com árvores dendríticas completas foram selecionadas para análise. Para cada animal, foi representado o valor médio entre as 5 células. Após a seleção da micróglia, o limiar ajustado foi aplicado às imagens de 8 bits, seguido da aplicação do plugin de análise Sholl do software FIJI. Foram desenhados círculos concêntricos, centrados no soma e aumentando 4 µm a cada círculo. O número de interseções por raio, o total de interseções para cada célula e o

comprimento máximo do ramo (com base no raio máximo interceptado) foram considerados para avaliação. A análise de Sholl foi utilizada como medida para alterações morfológicas que sugerem ativação microglial.

### 3.9 Avaliação dos níveis de fatores neurotróficos e citocinas por ELISA

Os PFC, hipocampos e estriados previamente dissecados foram descongelados e tratados com tampão de extração de citocinas [Tris-HCl 2mM pH 8,0; NaCl 1337 mM; NP40 1%; glicerol 10%; fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,1 mM; pepstatina A 1  $\mu$ M; EDTA 10mM; E-64 10  $\mu$ M e vanadato de sódio 0,5 mM diluídos em água destilada] e em seguida centrifugados a 4°C em 14.000 rpm durante 20 minutos.

Posteriormente, foi realizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para detecção da concentração dos fatores neurotróficos BDNF, fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, *glial cell line-derived neurotrophic factor*) e fator de crescimento do nervo (NGF, *nerve growth factor*). E também das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10, além da quimiocina CX3CL1, utilizando kits da R&D Systems (DuoSet), de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante.

### 3.10 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O RNA total foi obtido do PFC, estriado e hipocampo utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Um micrograma de RNA foi utilizado para sintetizar a primeira fita de cDNA, preparada com transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. A PCR quantitativa foi realizada para analisar a expressão dos genes *Drd1*, *Drd2*, *Drd4*, *Drd5*, *Slc6a3*, *Cx3cr1* e *Ntrk2*. Os dados de expressão obtidos foram normalizados para aqueles do gene de referência *Rpl32*. As sequências iniciadoras utilizadas (sense e antisense), de 5' a 3': *Drd1* (ATGGCTCCTAACACTTCTACCA; GGGTATTCCCTAAGAGAGTGGAC); *Drd2* (ACCTGTCCTGGTACGATGATG; GCATGGCATAGTAGTTGTAGTGG), *Drd4* (GCCTGGAGAACCGAGACTATG; CGGCTGTGAAGTTTGTGTGTG), *Drd5* (CTCGGCAACGTCCTAGTGTG; AATGCCACGAAGAGGTCTGAG), *Slc6a3* (ACTTCAGGGAAGGTGGTGTGGAT;

GTAGAAGTCCACACTGAGGTATGC), Cx3cr1 (TG CCTTCTTCCTCTTCTGGA; TAAAGGGGTTGAGGCAACAG), Ntrk2 (CCGCTAGGATTTGGTGTACTG; CCGGGTCAACGCTGT TAG G) e Rpl32 (GCTGCCATCTGTTTTACGG; TGA CTGGTGCCTGATGAACT) .

### **3.11 Processamento e imunofenotipagem de células imunológicas no cérebro e no sangue**

#### **3.11.1. Processamento do cérebro**

Após a eutanásia, os camundongos foram perfundidos com 20 mL de PBS 1x gelado para retirada do sangue residual nos tecidos. Em seguida, a caixa craniana foi aberta e o cérebro removido. Cada cérebro foi transferido para um tubo de ensaio (de vidro) e macerado com bastão de vidro, em 1 mL de meio RPMI. O homogenato cerebral teve seu volume ajustado para 7 mL com RPMI; em seguida, adicionou-se 3 mL de solução SIP (proporção v/v (mL) – 1:9 de PBS 10x para Percoll, respectivamente). Após homogeneizar o macerado do cérebro com a solução SIP, esse conteúdo foi cuidadosamente transferido para outro tubo, contendo 2 mL de solução SIP 70%. Os tubos foram, então, centrifugados a 500 g, por 30 minutos a 18°C, com desaceleração baixa. Essa etapa permite a formação de um gradiente de concentração, capaz de realizar a separação do anel de leucócitos. Cerca de 4 a 5 mL da interface correspondendo ao anel de leucócitos foi retirada e transferida para um tubo novo. Esse volume foi ajustado para 10 mL com PBS 1x e centrifugado a 500 g, por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet teve volume final ajustado para 200 µL com tampão de lavagem (NaN<sub>3</sub> 2mM, BSA 0.5% e PBS 1x). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo U e 10 µL de cada amostra foram retirados para contagem total de células na câmara de Neubauer (na diluição 1:10 em corante azul de tripan).

#### **3.11.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica**

A marcação das células começou com a adição do marcador de viabilidade celular (LiveDead, AF700, BD Bioscience), seguida de incubação por 10 minutos a 4 °C. Após incubação, a placa foi centrifugada a 1300 rpm, por 8 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 200 µL de PBS 1x, seguido de centrifugação a 1300 rpm, por 8 minutos a 4 °C. Esse processo foi repetido duas

vezes. Ao final da última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 50 µL/poço do mix contendo os anticorpos para receptores de superfície, diluídos em solução diluidora de anticorpos (v/v (mL) – 1:1 51 tampão wash B e PBS 1x). Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela X. A placa foi incubada por 15 minutos a 4°C. Após incubação, repetiu-se o processo de lavagem e centrifugação descrito anteriormente. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo CX3CR1. A placa foi incubada por 30 minutos, em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após incubação, seguiu-se duas etapas de lavagem e centrifugação, conforme já descrito. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço de paraformaldeído 4% e 100 µL/poço de PBS; a placa foi incubada por 20 min em temperatura ambiente, seguida de lavagem e centrifugação. Após a última centrifugação, os pellets foram ressuspensos em 200 µL/poço de PBS 1x e transferidos para tubos FACS. As células foram adquiridas em citômetro Fortessa (BD Biosciences, San Jose, USA) e analisadas com o software FlowJo (Tree Star, Ashlan, OR). Os dados foram analisados através da redução de dimensionalidade e visualizados por T-Distributed Stochastic Neighbour Embedding (tSNE), através do Cytokit (CHEN et al., 2016).

### Painel para análises de cérebro

Anticorpo	Fluorocromo	Titulação
CD45	PECy7	1:800
P2ry12	APC	1:200
CD11b	PerCP	1:200
CX3CR1	APCCy7	1:200
CD11c	APCCy7	1:100
Siglec H	BV421	1:800
CD62L	PECF	
CD44	BV510	1:400

Ly6C	BV570	1:400
CD4	PE	1:800
CD8	Fitc	1:800

### 3.11.2. Processamento e imunofenotipagem do sangue

Foram coletados, aproximadamente, 500  $\mu$ L de sangue que foram transferidos para tubos com EDTA. Em seguida, foi realizada a lise das hemácias 3 vezes com 20ml de solução de ACK buffer, com incubação de 10 minutos, temperatura ambiente (TA), ao abrigo da luz, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. Após a lise, foram adicionados 400  $\mu$ L de PBS 1x, sendo colocados 200  $\mu$ L de amostra em placas de 96 poços para cada painel de citometria. As células foram contadas em câmara de Neubauer, incubadas com corante de viabilidade, centrifugadas e adicionado os anticorpos de superfície específicos de cada painel. Após a marcação com os anticorpos de superfície, as placas foram lavadas com PBS 1x, centrifugadas e as amostras do painel para identificação de monócitos foram incubadas 30 minutos, T.A., com o anticorpo CX3CR1. Em seguida foi realizada a lavagem com PBS 1x, centrifugação e fixação das células com formaldeído 4%. Após a incubação, as placas foram centrifugadas, foi adicionado PBS 1x em cada poço e as amostras foram transferidas para tubos de FACS para leitura no citômetro LRSFortessa seguida pela análise dos dados no software FlowJo e utilizando o pacote Cytokit no Rstudio (CHEN et al., 2016).

#### Painel para análises de sangue

Anticorpo	Fluorocromo	Titulação
<b>Painel Linfóide</b>		
CD3	BV570	1:200
CD4	PERCP	1:800

CD8	APC	1:800
CD27	PECy7	1:200
CD62L	PECF	1:800
CD69	Fitc	1:500
<b>Anticorpos</b> <b>Painel mielóide</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Titulação</b>
Ly6C	PE	1:800
CX3CR1	BV605	1:200
CD11b	PERCP	1:200
CD115	BV650	1:100
SiglecF	PECF	1:400
CD69	Fitc	1:500
Ly6G	BV570	1:200

### 3.12 Hemograma

Para análise hematológica, foi realizada a coleta do sangue da veia cava inferior em tubos de EDTA. O sangue foi passado no hemocítmetro Celltac MEK-6500K (Nihon Kohden) para determinação do hemograma.

### 3.13 Golgi

Os hemisférios previamente seccionados na espessura de 150  $\mu\text{m}$  e armazenados em PBS foram submetidos a técnica de Golgi para avaliação das espinhas dendríticas utilizando o *SliceGolgi Kit* (Bioenno Tech, LLC) de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante.

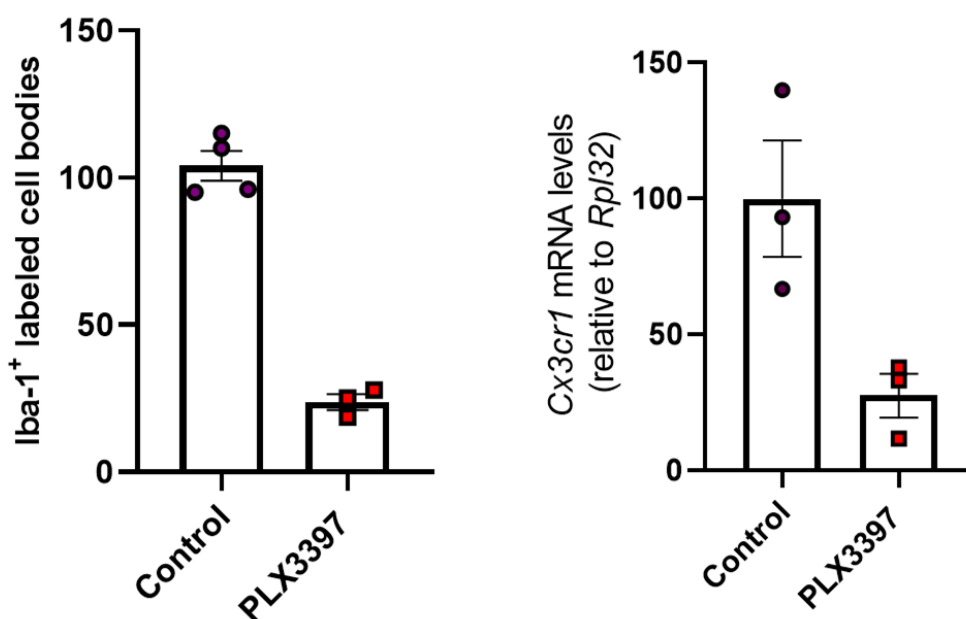
### **3.14 Análise estatística**

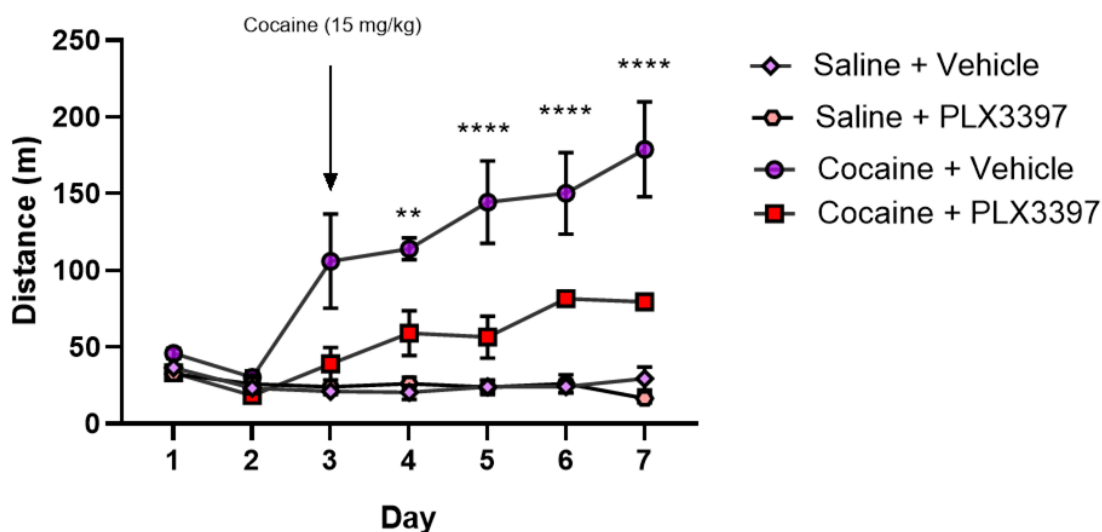
A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Prism 8.0 (GraphPad, CA, USA). Os dados comportamentais foram analisados pelo teste análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA) ou Two-way ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 O tratamento com PLX3397 durante 21 dias reduziu o número de microglias e protegeu contra a sensibilização comportamental induzida por cocaína

Para tentar replicar os dados da literatura e depletar todas as células, os animais foram tratados durante 21 dias com PLX3397 (50 mg/kg/dia, via oral). Usando este protocolo, houve uma depleção de aproximadamente 70% células microgliciais, conforme demonstrado pela análise de células Iba-1 e pela expressão de mRNA para CX3CR1. Portanto, concluímos que mesmo uma dose mais elevada de PLX3397 não foi suficiente para depletar completamente a micróglia nestes animais. Por fim, de forma similar ao nosso estudo anterior, o tratamento com PLX3397 por 21 dias também reduziu a sensibilização comportamental induzida pela cocaína (Fig 13).

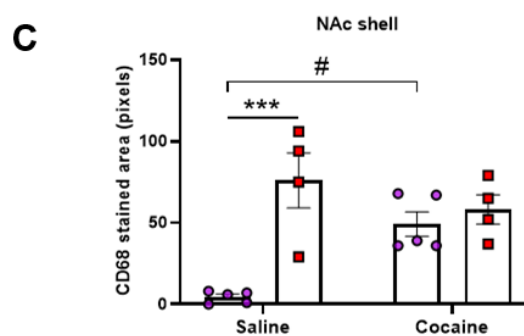
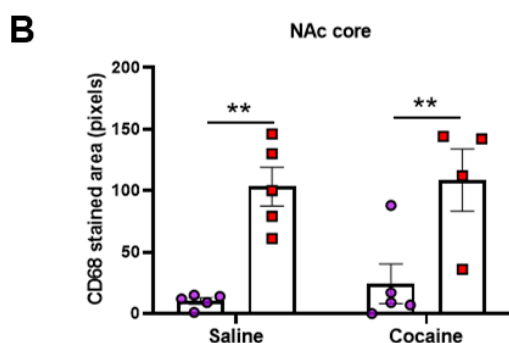
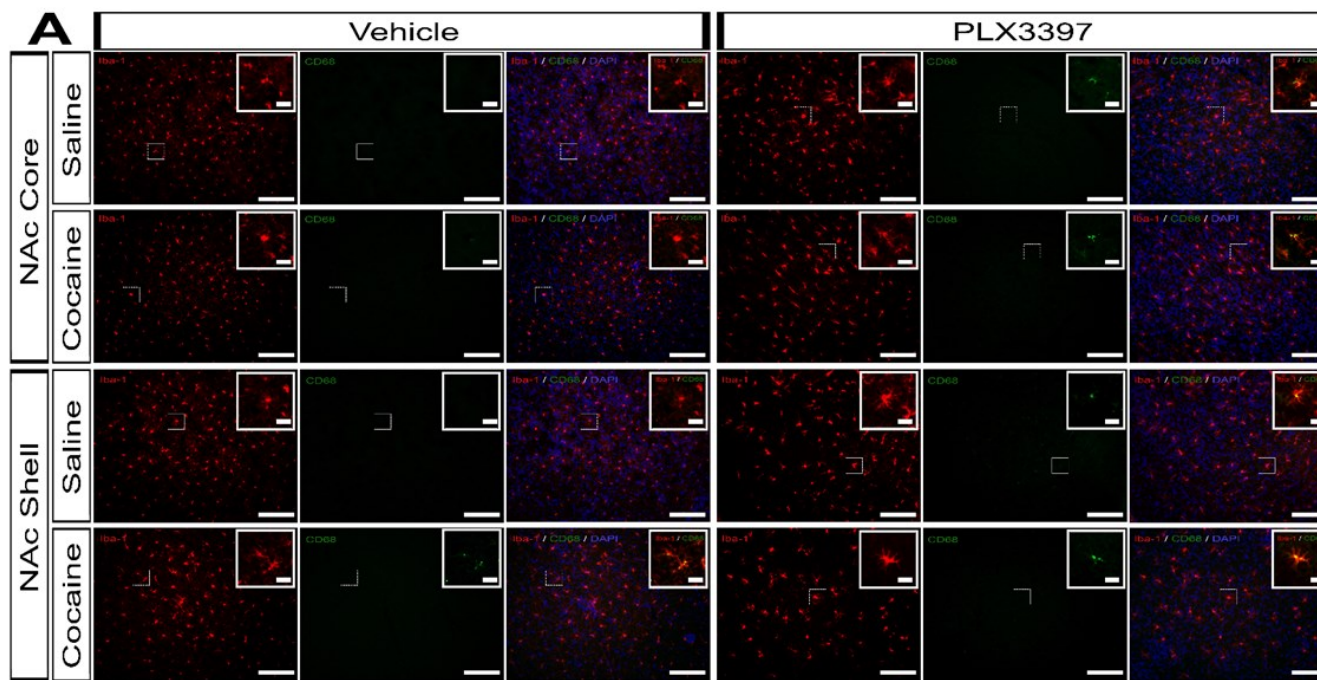




**Fig 13: Efeitos do tratamento com PLX3397 durante 21 dias no número de células Iba-1, na expressão de CX3CR1 e na sensibilização comportamental.** O tratamento com PLX3397 reduziu o número de células Iba-1<sup>+</sup> [(t=12.63, df=5; p<0.0001) e da expressão de CX3CR1 (t=3.170, df=4; p=0.0339), além de diminuir a sensibilização comportamental induzida pela cocaína [Fator tratamento  $F_{(3,11)}=33.71$ ), fator tempo ( $F_{(24,22)}=8.7$ ; p=0.001), interação ( $F_{(18,65)}=5.16$ ; p<0.0001). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*\*\*\*p<0,0001 e \*\*p<0,01 entre os grupos cocaína + veículo e cocaína + PLX3397.

#### 4.2 A depleção parcial da micróglia e a cocaína aumentam a expressão de CD68

Para avaliar se o tratamento com PLX3397 e cocaína induzem a ativação da micróglia, realizamos imunocoloração para CD68. Essa glicoproteína transmembrana é expressa durante o aumento de sua atividade fagocítica. No NAc core, apenas a inibição do CSF1R induziu um aumento de células CD68<sup>+</sup> (p < 0,0001). Por outro lado, no NAc shell, tanto a inibição da cocaína quanto a depleção parcial da micróglia aumentaram a expressão de CD68 (p = 0,0008 e p = 0,0052) (Fig 14).

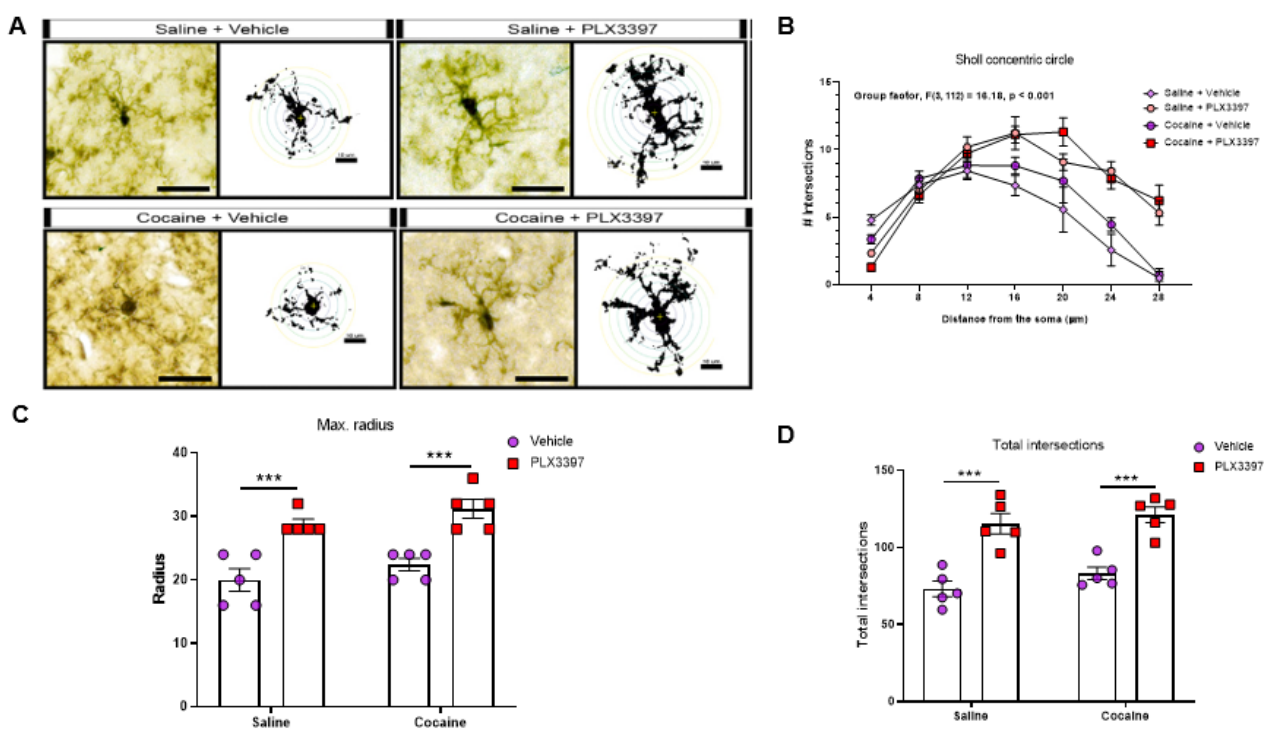


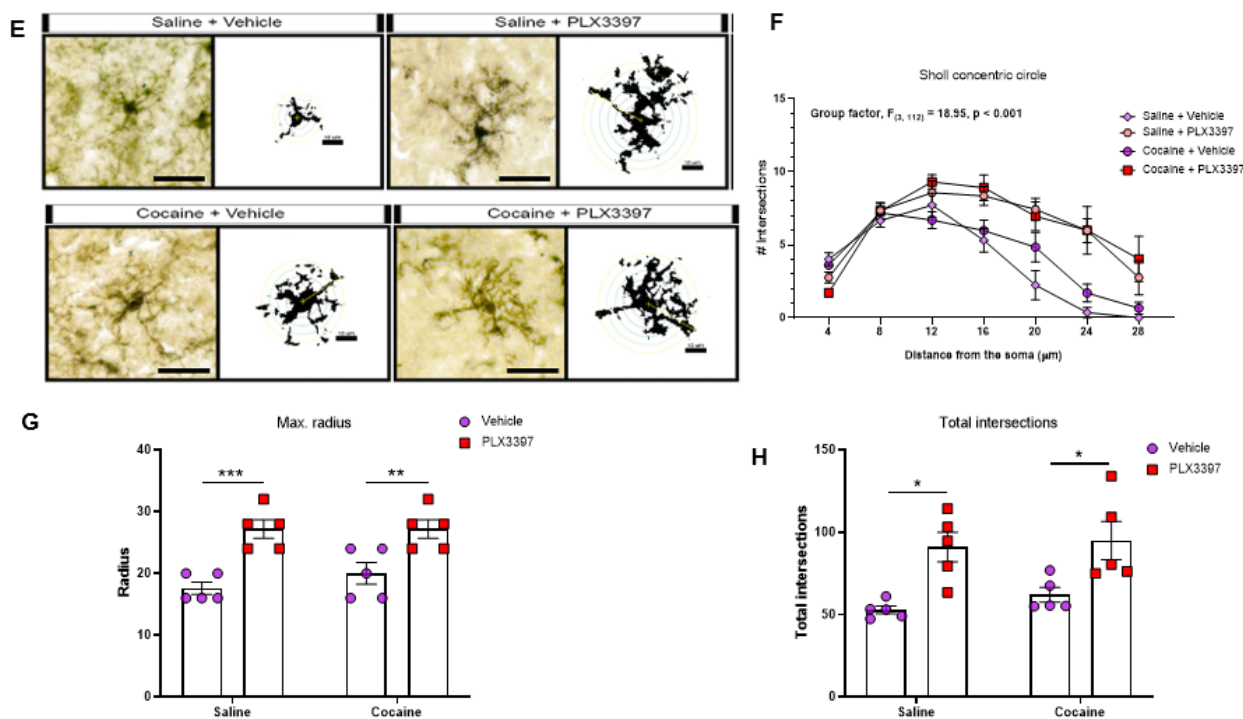
**Fig 14: Efeitos da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína na expressão de CD68<sup>+</sup>.** Imagens representativas da ativação da micróglia nos NAc core e shell (A). Expressão de CD68 no NAc core [fator cocaína ( $F_{(1,15)} = 0,36$ ;  $p = 0,5540$ ), fator depleção ( $F_{(1,15)} = 30,92$ ;  $p < 0,0001$ ) e interação ( $F_{(1,15)} = 0,07$ ;  $p < 0,07887$ )] (B) e NAc shell [fator cocaína ( $F_{(1,14)} = 2,04$ ;  $p = 0,1750$ ), fator de depleção ( $F_{(1,14)} = 18,14$ ;  $p = 0,0008$ ) e interação ( $F_{(1,14)} = 10,91$ ;  $p = 0,0052$ )] (C). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. # $p < 0,05$  diferença entre os grupos solução salina e cocaína. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação com o grupo tratado com PLX3397 ( $n = 5-7$  em cada grupo).

#### 4.3 A depleção parcial da micróglia induz alterações morfológicas nas células remanescentes

Como mudanças na morfologia microglial podem sugerir mudanças na função dessa célula (Helmut et al., 2011b; Pannell et al., 2014), utilizamos a análise de Sholl a fim de avaliar os efeitos da depleção parcial da micróglia e da cocaína sob morfologia

microglial. A análise de Sholl revelou um efeito significativo do PLX3397 na morfologia da micróglia do NAc. Em geral, a micróglia de camundongos tratados com PLX3397 apresentou aumento em suas ramificações, além de aumentar o número total de interseções na micróglia do NAc core e shell. Além disso, a depleção parcial da micróglia também aumentou o comprimento total do ramo (raio máximo) da micróglia remanescente dessas regiões (Fig 15).



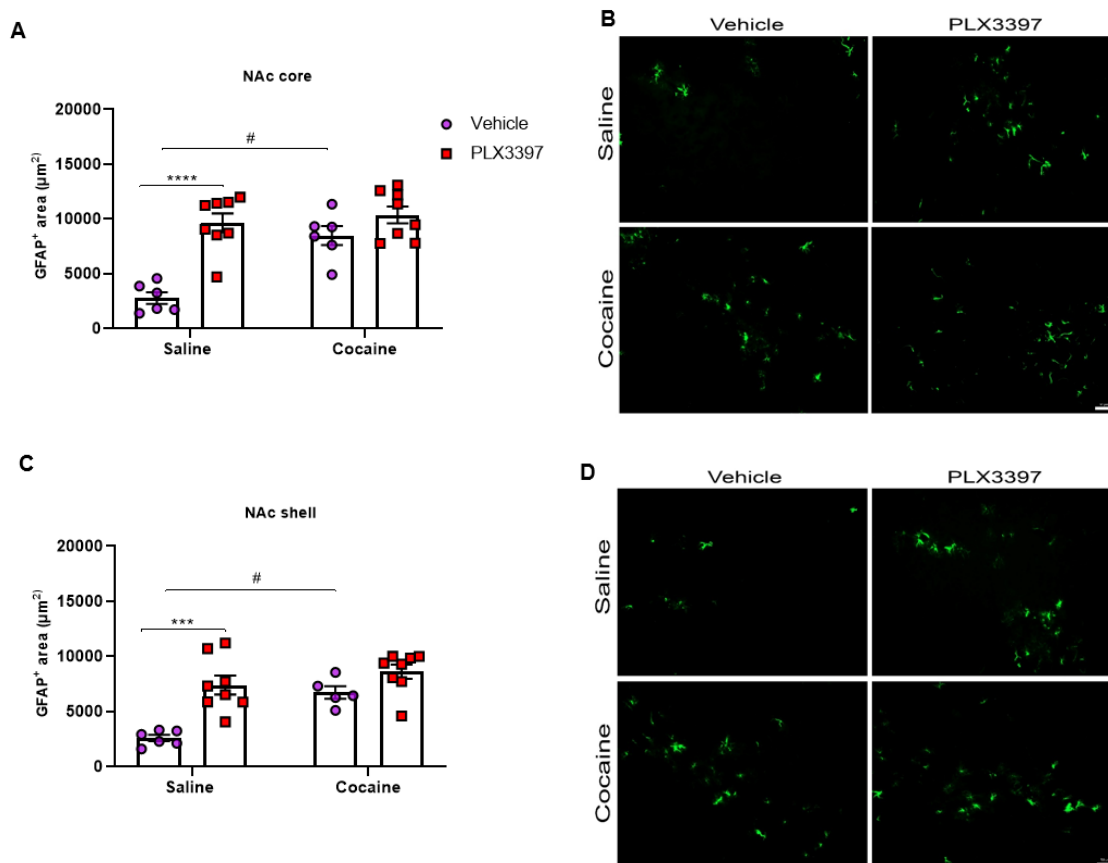


**Fig 15: Efeitos da depleção parcial da micróglia e da cocaína na morfologia das células.** Imagens representativas da morfologia da microglia no NAc core (A) NAc shell (F). Quantificação da ramificação microglial [NAc core - fator de raio ( $F_{(6,112)}=45,30$ ;  $p<0,0001$ ), fator tratamento ( $F_{(3,112)}=16,18$ ;  $p<0,0001$ ) e fator de interação ( $F_{(18,112)}=4,56$ ;  $p<0,0001$ ); NAc shell - fator de raio ( $F_{(6,112)}=6,11$ ;  $p<0,0001$ ), fator tratamento ( $F_{(3,112)}=18,95$ ;  $p<0,0001$ ) e fator de interação ( $F_{(18,112)}=3,16$ ;  $p<0,0001$ )] (B, G), número total de interseções [NAc core – fator cocaína ( $F_{(1,16)}=2,203$ ;  $p=0,1571$ ), fator depleção ( $F_{(1,16)}=56,83$ ;  $p<0,0001$ ) e interação ( $F_{(1,16)}=0,16$ ,  $p=0,6926$ ); NAc shell - fator cocaína ( $F_{(1,16)}=0,7361$ ;  $p=0,4036$ ), fator depleção ( $F_{(1,16)}=21,20$ ;  $p<0,0003$ ) e interação ( $F_{(1,16)}=0,11$ ,  $p=0,7365$ )] (C, H), comprimento total do ramo (raio máximo) [NAc core - fator cocaína ( $F_{(1,16)}=3,273$ ;  $p=0,0893$ ), fator depleção ( $F_{(1,16)}=44,00$ ;  $p<0,0001$ ) e interação ( $F_{(1,16)}=0,00$ ,  $p=0,999$ ); NAc shell - fator cocaína ( $F_{(1,16)}=0,6667$ ;  $p=0,4262$ ), fator depleção ( $F_{(1,16)}=32,67$ ;  $p=0,0001$ ) e interação ( $F_{(1,16)}=0,66$ ,  $p=0,4262$ )] (D, I) Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. # $p<0,05$  diferença entre os grupos solução salina e cocaína. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  e \*\*\*\* $p<0,0001$  em comparação com o grupo tratado com PLX3397 ( $n=4-5$  em cada grupo).

#### 4.4 A depleção parcial da micróglia e a cocaína aumentaram a expressão de GFAP

Uma vez que os astrócitos e a micróglia estabelecem uma modulação recíproca de suas funções, e há evidências de que a cocaína induz a astrogliose (Jha et al., 2019; Periyasamy et al., 2018), a imunomarcagem de GFAP foi realizada para quantificar essas células no NAc. Tanto no NAc core quanto no NAc shell a cocaína,

bem como o PLX3397, aumentaram a expressão de GFAP em comparação com o grupo de solução salina (Fig 16).



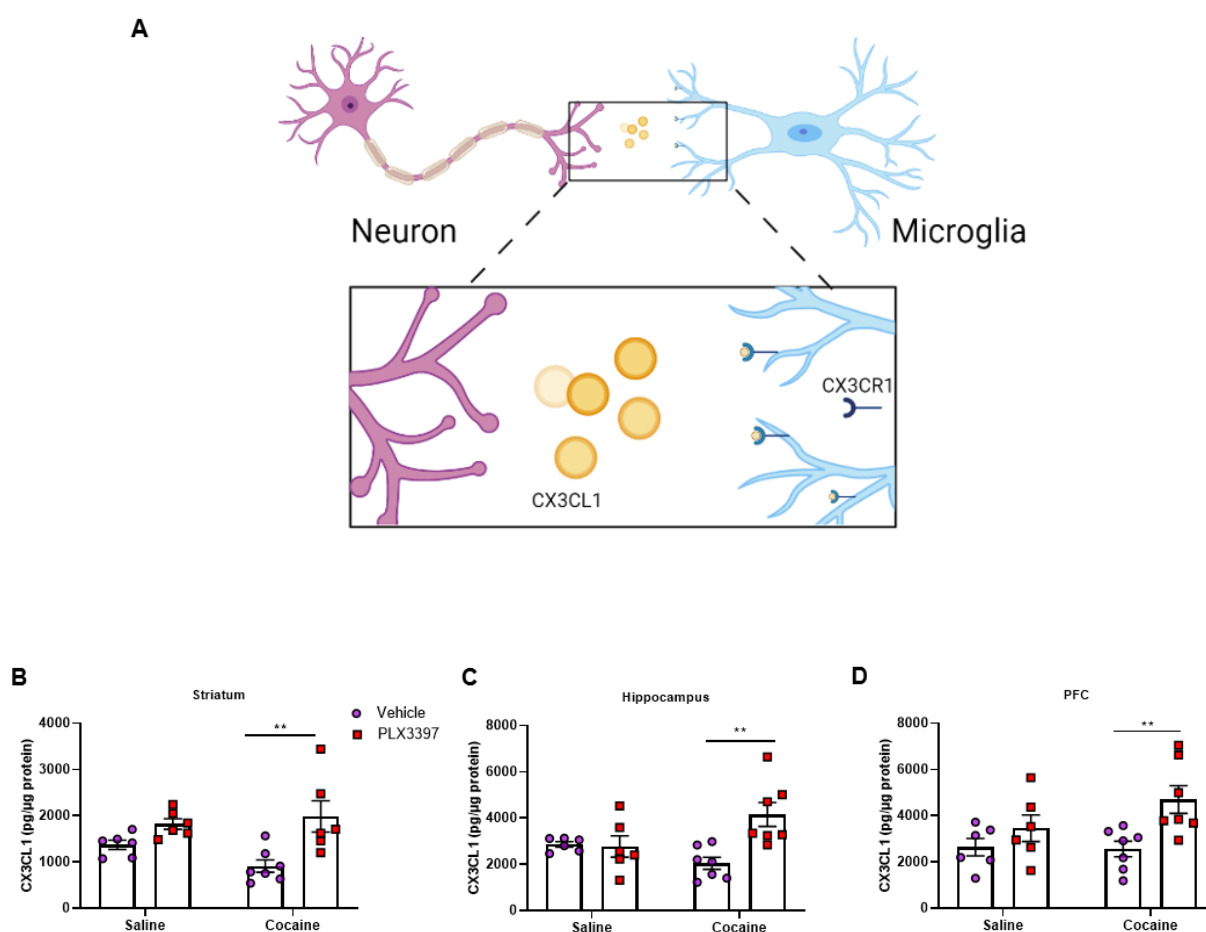
**Fig 16: Efeito da depleção parcial da micróglia da administração de cocaína na expressão de GFAP no NAc.** Quantificação da área GFAP<sup>+</sup> no núcleo NAc. Imagens representativas das células GFAP<sup>+</sup> no núcleo NAc core [fator cocaína ( $F_{(1,24)}=15,94$ ;  $p<0,001$ ), fator depleção ( $F_{(1,24)}=29,59$ ;  $p<0,0001$ ) e interação ( $F_{(1,24)}=9,596$ ;  $p=0,005$ )] (**A, B**) e no NAc shell [fator cocaína ( $F_{(1,23)}=14,34$ ;  $p=0,0010$ ) depleção ( $F_{(1,23)}=22,39$ ;  $p<0,0001$ ) e interação ( $F_{(1,23)}= 4,323$ ;  $p<0,05$ )] (**C, D**). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. # $p<0,05$  diferença entre os grupos solução salina e cocaína. \*\*\* $p<0,001$  e \*\*\* $p<0,001$  em comparação com o grupo tratado com PLX3397 (n= 6-8 em cada grupo).

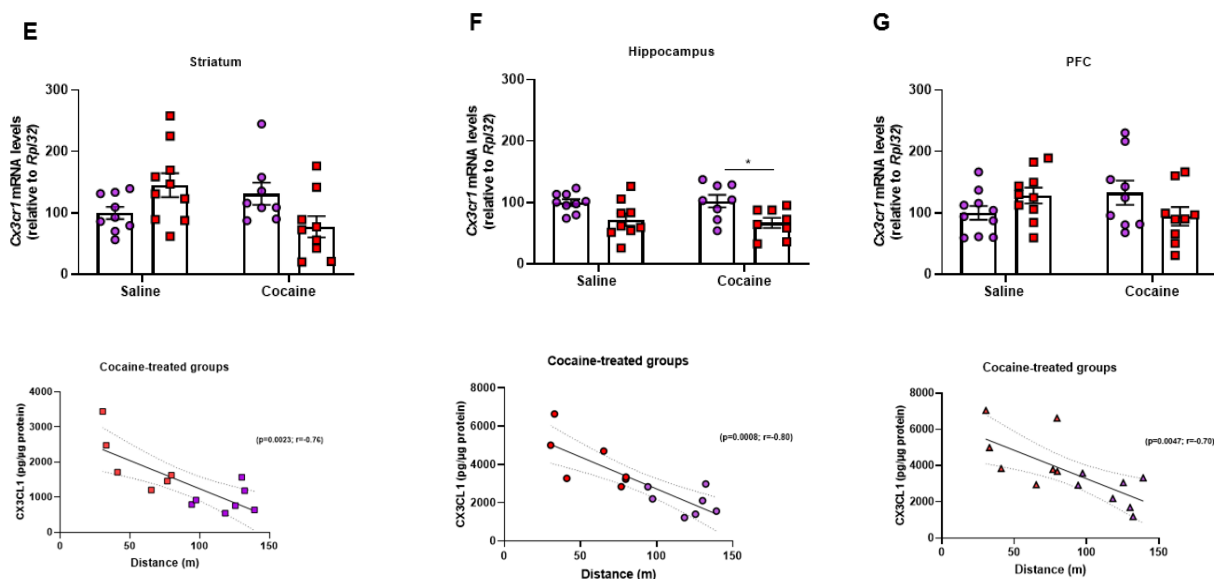
#### 4.5 A associação de cocaína e da depleção parcial da micróglia aumentaram os níveis de CX3CL1 e os níveis do mRNA de CX3CR1

A quimiocina CX3CL1, juntamente com seu receptor CX3CR1, são uma importante via de sinalização entre neurônios e células microgliais, regulando, entre outros, a plasticidade, a transmissão sináptica, o desenvolvimento e maturação neuronal e a neurogênese (Bolós et al., 2018; Rogers et al., 2011). No presente

estudo, observamos que a depleção parcial da micróglia aumentou a concentração de CX3CL1 no estriado, hipocampo e PFC dos animais tratados com cocaína.

Medimos ainda os níveis de mRNA de CX3CR1 (Cx3cr1) no hipocampo, PFC e estriado. No hipocampo, os níveis de mRNA de CX3CR1 foram diminuídos pela depleção parcial da micróglia. No estriado e no PFC, embora o teste post hoc não tenha revelado diferença nos níveis de mRNA do CX3CR1 entre os grupos, foi observada interação entre os dois fatores, o que sugere que o PLX3397 induziu efeitos opostos em animais tratados com solução salina e cocaína. Por fim, observamos que os níveis de CX3CL1 apresentaram uma correlação com sensibilização comportamental induzida pela cocaína (Fig 17).





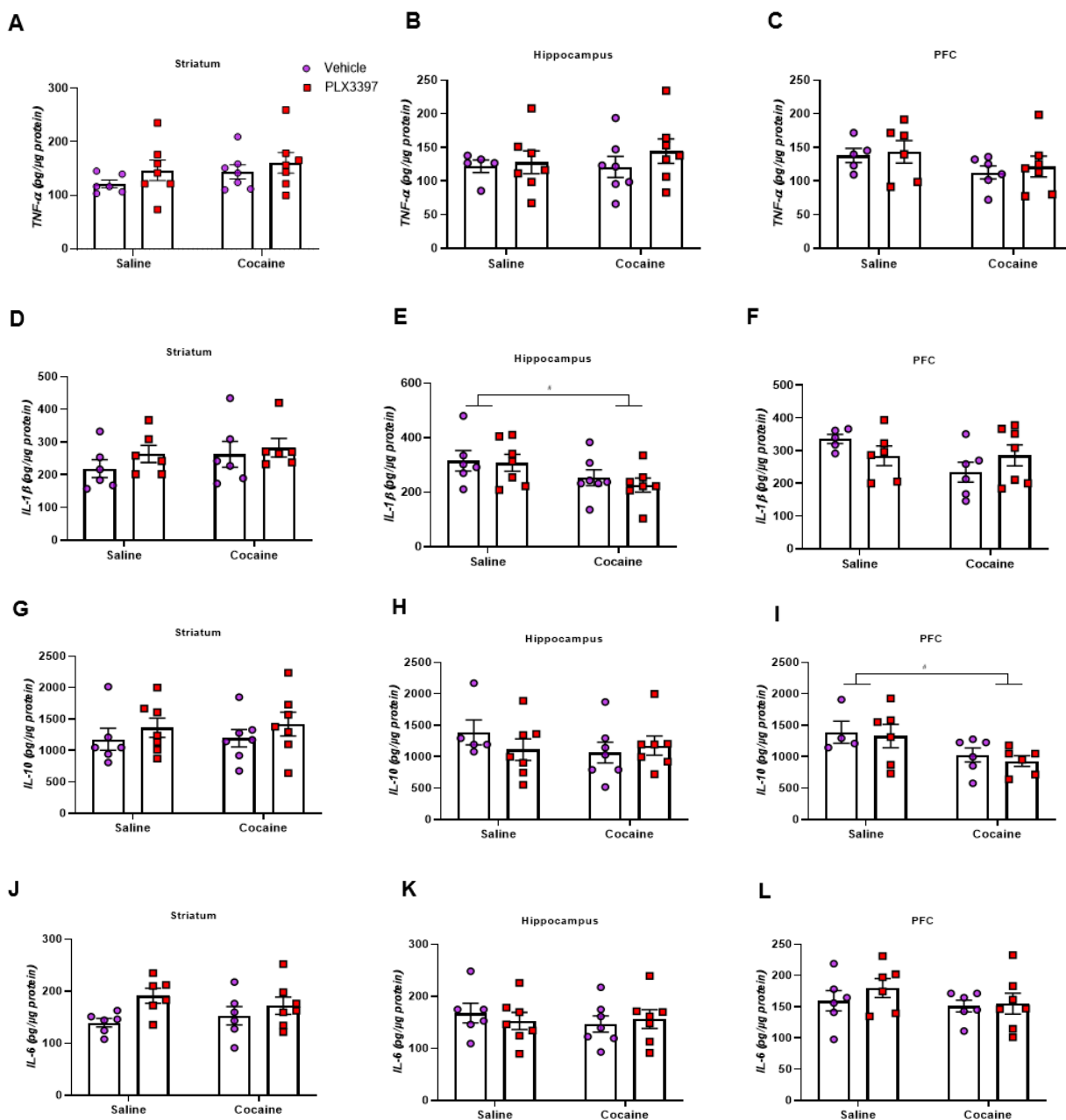
**Fig 17: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína nos níveis de CX3CL1 e na expressão de CX3CR1 no cérebro.** Quantificação de CX3CL1 no estriado [fator de cocaína ( $F_{(1,21)}=0,58$ ;  $p=0,4526$ ), fator depleção ( $F_{(1,21)}=15,35$ ;  $p=0,0008$ ) e fator interação ( $F_{(1,21)}=2,58$ ;  $p=0,1230$ )] (B), hipocampo [fator cocaína ( $F_{(1,22)}=0,55$ ;  $p=0,4641$ ), fator depleção ( $F_{(1,22)}=6,93$ ;  $p=0,0152$ ) e interação ( $F_{(1,22)}=8,23$ ;  $p=0,0089$ )] (C) e PFC [fator de cocaína ( $F_{(1,22)}=1,42$ ;  $p=0,2456$ ), fator depleção ( $F_{(1,22)}=9,17$ ;  $p=0,0062$ ) e interação ( $F_{(1,22)}=1,82$ ;  $p=0,1905$ )] (D) ( $n= 5-7$  em cada grupo). Quantificação de CX3CR1 no corpo estriado [fator de cocaína ( $F_{(1,32)}=1,16$ ;  $p=0,2896$ ), fator depleção ( $F_{(1,32)}=0,06$ ;  $p=0,8031$ ) e interação ( $F_{(1,34)}=5,08$ ;  $p=0,0307$ )] (E), hipocampo [fator cocaína ( $F_{(1,30)}=0,03$ ;  $p=0,8522$ ), fator depleção ( $F_{(1,30)}=13,03$ ;  $p=0,0011$ ) e interação ( $F_{(1,30)}=0,18$ ;  $p=0,6716$ )] (F) e PFC [fator de cocaína ( $F_{(1,34)}=0,00$ ;  $p=0,97$ ), fator depleção ( $F_{(1,34)}=0,11$ ;  $p=0,7390$ ) e interação ( $F_{(1,32)}=8,57$ ;  $p=0,0062$ )] (G) ( $n= 8-10$  em cada grupo). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p<0,05$  e \*\* $p<0,01$  em comparação com o grupo tratado com PLX3397.

#### 4.6 A depleção parcial da micróglia e a cocaína alteraram os níveis de citocinas de maneira região dependente

As citocinas são importantes no processo de aprendizagem e memória. Esses mediadores inflamatórios podem induzir vários efeitos, que vão desde a facilitação até danos aos processos sinápticos, dependendo dos níveis e condições (Levin and Godukhin, 2017). Portanto, avaliamos os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 no estriado, hipocampo e PFC de animais submetidos à sensibilização comportamental para melhor caracterizar essas citocinas em nosso modelo.

A cocaína diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo e os níveis de IL-10 no PFC de animais tratados com veículo ou PLX3397, enquanto a depleção parcial da micróglia aumentou os níveis de IL-6 no estriado. Nenhuma dessas citocinas foi

alterada nas demais regiões avaliadas. Finalmente, nem a cocaína nem a depleção de micróglia alteraram os níveis de TNF no estriado, hipocampo e no PFC (Fig 18).



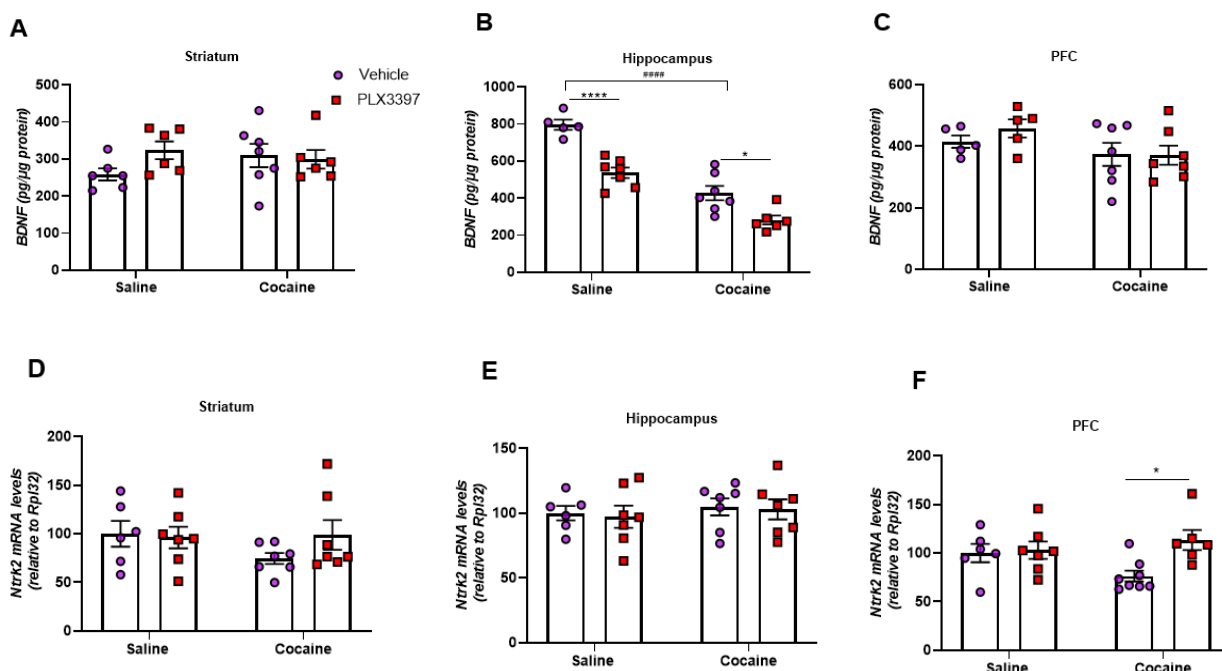
**Fig 18: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína nos níveis de citocinas no cérebro.** Quantificação de TNF (A, B e C), IL-1 $\beta$  (D, E e F), IL-10 (G, H e I) e IL-6 (J, K e L) no estriado, hipocampo e PFC, respectivamente. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. #P<0,05 diferença entre os grupos solução salina e cocaína (n= 4-7 em cada grupo). Tabela com valores de F em anexo.

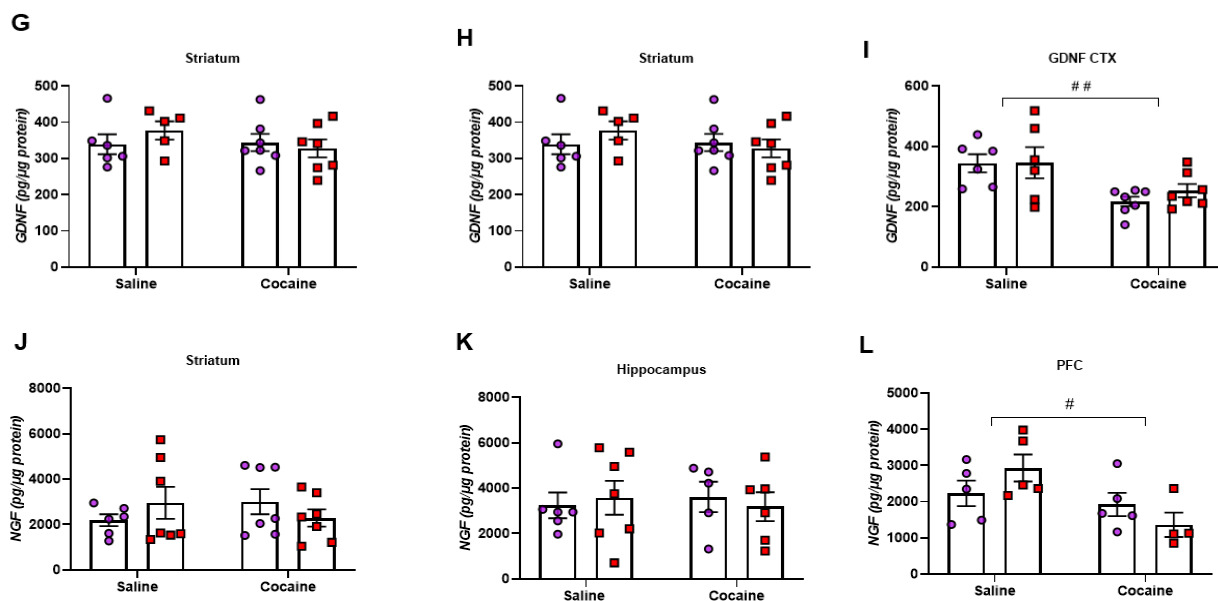
#### 4.7 A depleção parcial da micróglia e a cocaína alteraram os fatores neurotróficos e os níveis de mRNA de TrkB de maneira região dependente

Para melhor compreender o papel da micróglia nas alterações neuroplásticas induzidas pela cocaína, avaliamos os níveis dos fatores neurotróficos BDNF, GDNF e NGF e os níveis de mRNA de TrkB (Ntrk2) no PFC, no estriado e hipocampo de animais submetidos à sensibilização comportamental.

A cocaína reduziu os níveis de BDNF no hipocampo. Além disso, a depleção parcial da micróglia diminuiu os níveis de BDNF tanto nos grupos de animais tratados com solução salina quanto nos grupos tratados com cocaína. Além disso, os animais que tiveram sua micróglia parcialmente depletada e que foram tratados com cocaína apresentaram níveis mais baixos de BDNF quando comparados aos tratados apenas com cocaína. Ademais, os níveis de CX3CL1 apresentaram correlação entre a sensibilização comportamental induzida pela cocaína.

A depleção parcial da micróglia também evitou a diminuição dos níveis de mRNA de TrkB no PFC induzido pela cocaína. No entanto, não encontramos diferença nos níveis de BDNF no PFC e no estriado, bem como nos níveis de mRNA de TrkB no hipocampo e no estriado. A cocaína também diminuiu os níveis de GDNF e NGF no PFC (Fig. 19). No entanto, nem a depleção parcial da cocaína nem a micróglia alteraram o GDNF e o NGF nas outras regiões.

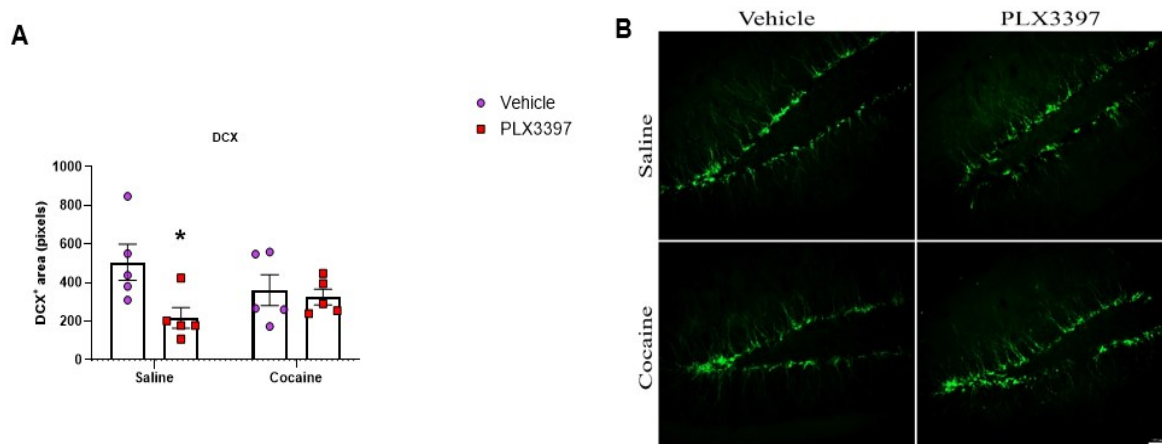




**Fig 19: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína nos níveis neurotróficos e na expressão de mRNA de TrkB no cérebro.** Quantificação de BDNF (A-C), GDNF (G-I) e NGF (J-L) no estriado, hipocampo e PFC, respectivamente. Quantificação da expressão de mRNA de TrkB no corpo estriado (D), hipocampo (E) e PFC (F). Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e #### $p < 0,0001$  diferença entre os grupos solução salina e cocaína. \* $P < 0,05$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$  em comparação com o grupo tratado com PLX3397 (n= 4-7 em cada grupo).

#### 4.8 A depleção parcial da micróglia reduziu a expressão de células DCX+ apenas em animais que não foram tratados com cocaína

A micróglia pode remodelar a neurogênese no hipocampo adulto (Diaz-Aparicio et al., 2020) e a interrupção da sinalização da micróglia reduz a maturação dos neurônios e aumenta o comportamento semelhante ao transtorno por uso de opioides (Rivera et al., 2019). Isto, juntamente com os efeitos do PLX3397 na sinalização do BDNF e CX3CL1-CX3CR1 no hipocampo, levam à hipótese de que a depleção parcial da micróglia poderia alterar a neurogênese nesta região. Para examinar os efeitos da exposição à cocaína e da depleção da micróglia na proliferação de novos neurônios, foi realizada coloração com DCX. A depleção parcial da micróglia diminuiu a área corada com DCX<sup>+</sup> em animais tratados com solução salina, mas não em animais tratados com cocaína (Fig. 20).

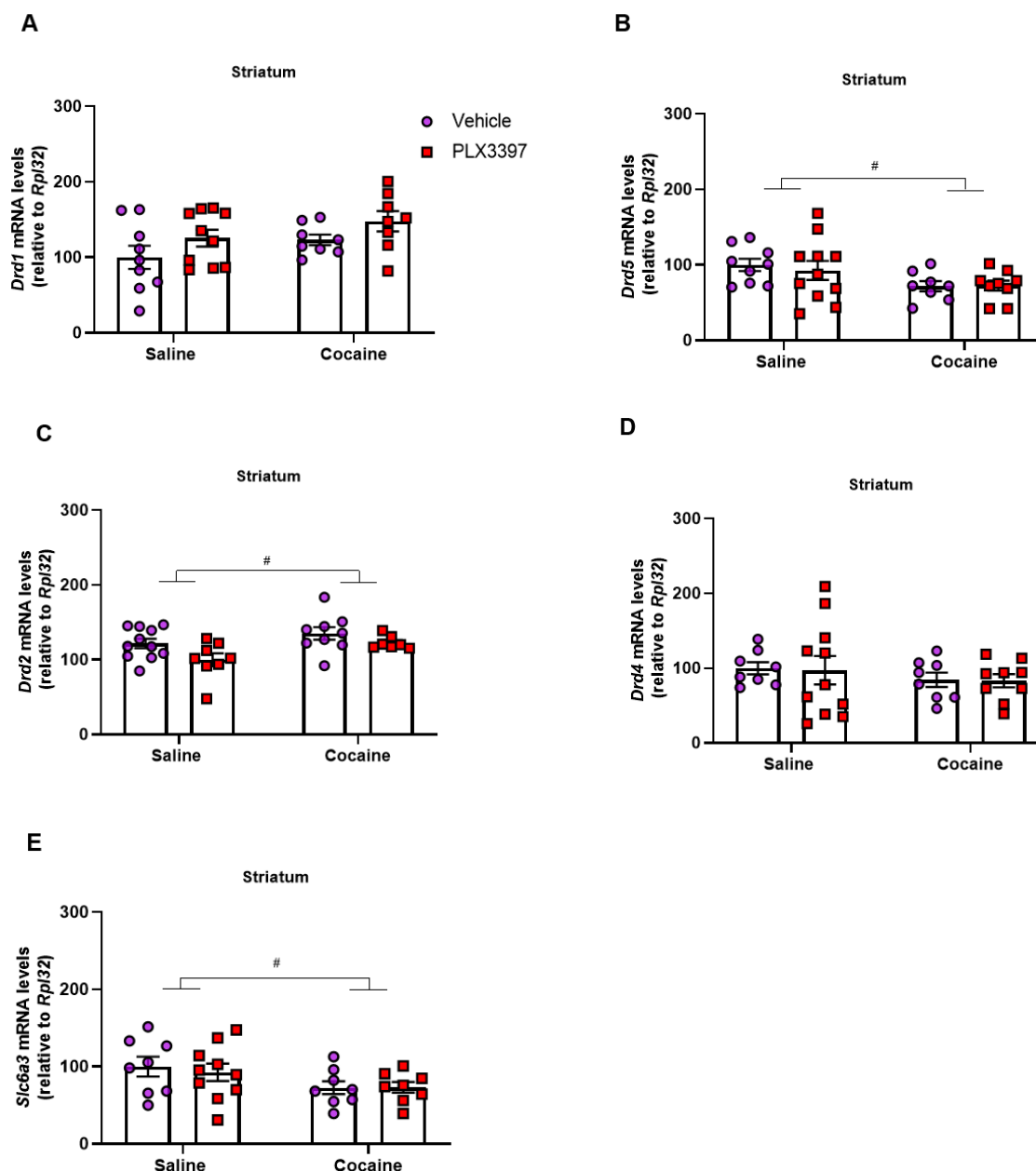


**Fig 20: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína na expressão de células DCX+.** As células foram avaliadas no giro denteado do hipocampo [fator cocaína ( $F_{(1,16)}=0,06$ ;  $p=0,8003$ ); fator depleção ( $F_{(1,16)}=5,25$ ;  $p=0,0358$ ) e interação ( $F_{(1,16)}=3,18$ ,  $p=0,0931$ )]. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. \* $P<0,05$  em comparação com o grupo tratado com PLX3397 ( $n= 5$  em cada grupo).

#### 4.9 A depleção parcial da cocaína e da micróglia podem alterar a via dopaminérgica

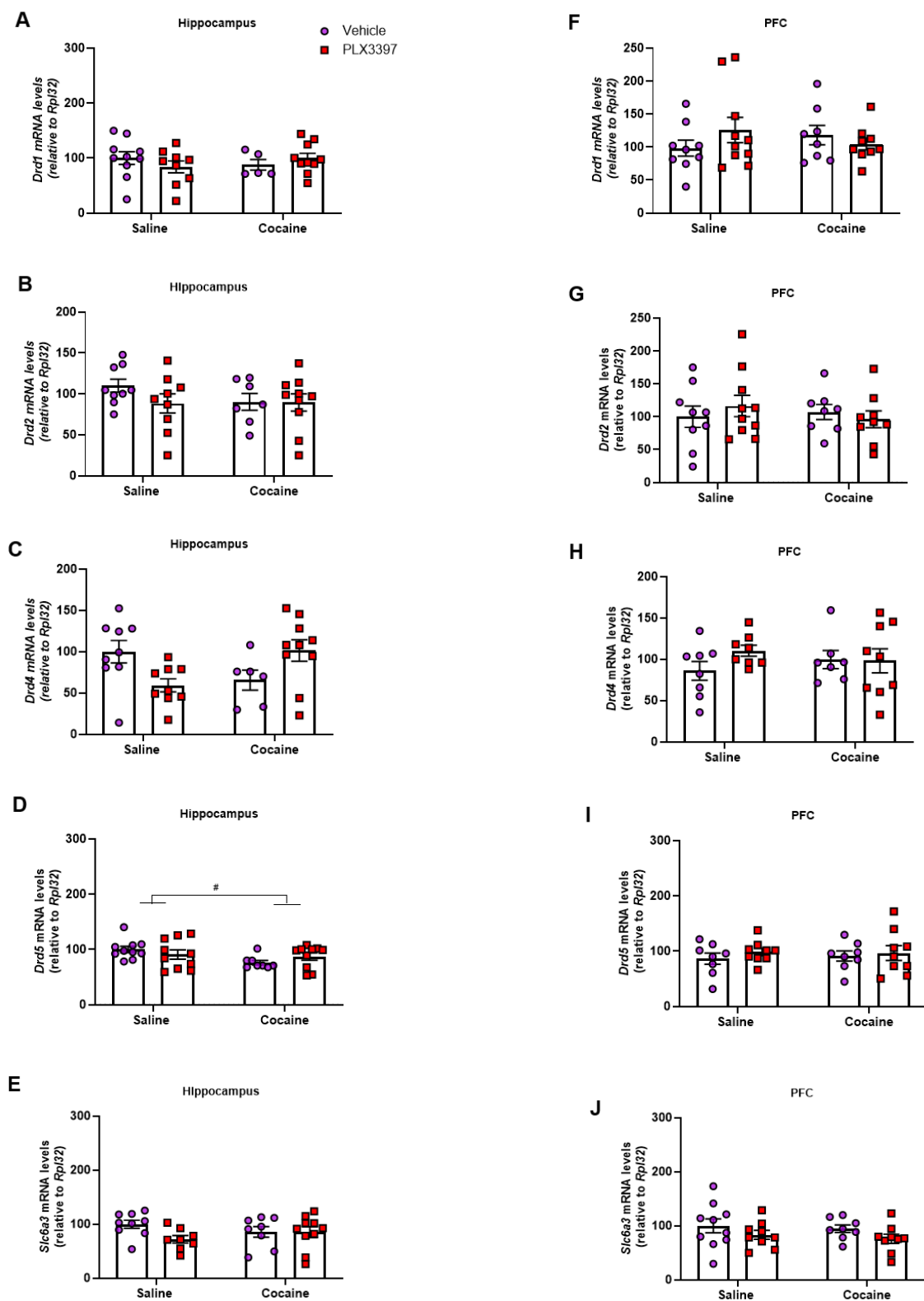
As drogas de abuso aumentam os níveis de dopamina no NAc, sendo este considerado o principal mecanismo neurobiológico da adicção (Di Chiara e Imperato, 1988; Reynolds e Bada, 2003; Volkow et al., 2004). Além disso, a ativação da micróglia pela dopamina parece importante nas alterações comportamentais induzidas pela cocaína (Lewitus et al., 2016; Linker et al., 2020). Nesse sentido, avaliamos os níveis de mRNA dos receptores dopaminérgicos D1 (Drd1), D2 (Drd2), D4 (Drd4) e D5 (Drd5) e DAT (Slc6a3) no estriado, PFC e hipocampo de animais submetidos à sensibilização comportamental.

No estriado, embora a cocaína tenha aumentado os níveis de mRNA de D2, a depleção parcial da micróglia diminuiu a expressão deste receptor. A cocaína diminuiu os níveis de mRNA de D5 e DAT. Finalmente, houve um aumento nos níveis de mRNA de D1 após depleção parcial da micróglia. Não encontramos diferença nos níveis de mRNA de D4 (Fig 21).



**Fig 21: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína na expressão de receptores de dopamina e transportador de dopamina.** Quantificação da expressão de D1 (A), D5 (B), D2 (C), D4 (D) e DAT (E) no corpo estriado. # $P < 0,05$  diferença entre os grupos solução salina e cocaína ( $n = 8-11$  em cada grupo). Tabela com valores de F em anexo.

No hipocampo, a cocaína diminuiu os níveis de mRNA de D5. Embora nenhuma diferença tenha sido observada no teste post hoc, observamos uma interação entre os fatores cocaína e depleção parcial da micróglia nos níveis de mRNA de D4 nesta região. Os níveis de mRNA de D1, D2 e DAT não foram alterados no hipocampo. Finalmente, não foram observadas diferenças nos níveis de mRNA de D1, D2, D4, D5 e DAT no PFC (Fig 22).



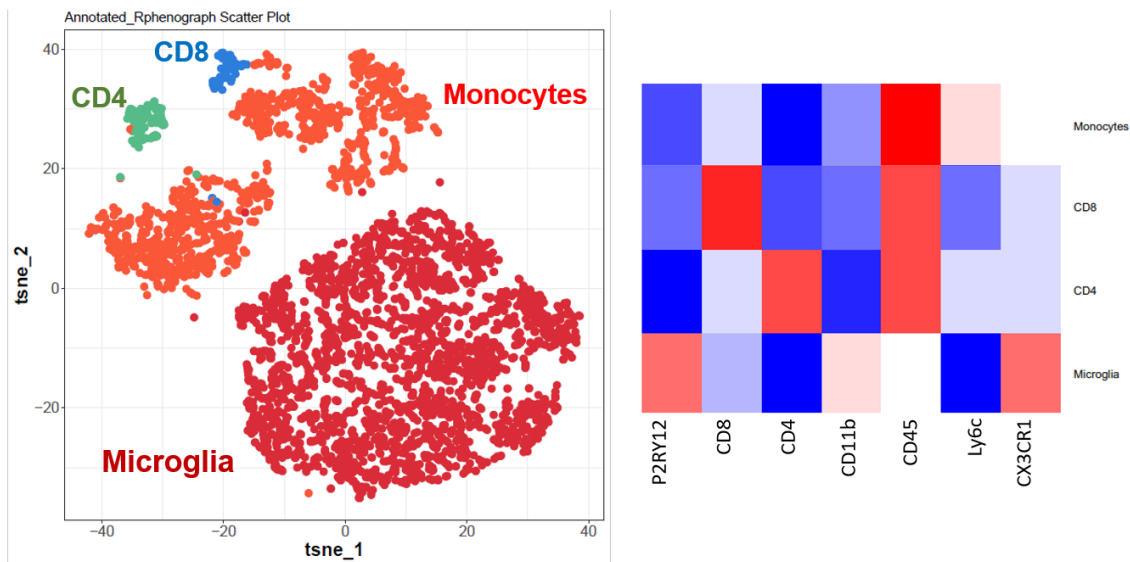
**Fig 22: Efeito da depleção parcial da micróglia e da administração de cocaína na expressão de receptores e transportadores de dopamina. Quantificação da expressão de D1 (A,**

B), D2 (C, D), D4 (E, F), D5 (G, H) e DAT (I, J) no hipocampo e PFC. #P<0,05 diferença entre os grupos solução salina e cocaína (n= 7-10 em cada grupo).

#### 4.10 Papel do receptor TLR4 nas alterações imunológicas induzidas pela cocaína

##### 4.10.1 Cocaína e MPLA aumentam o número total de células imunológicas do cérebro

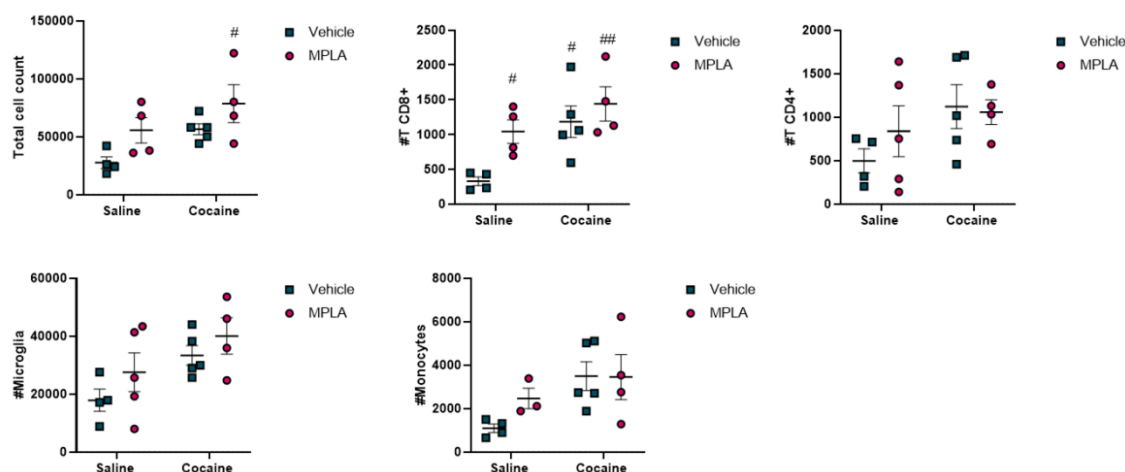
Para avaliar os efeitos da cocaína e do MPLA nas células imunológicas, foi realizada a análise da população celular no cérebro, a partir do nível de expressão dos marcadores de superfície celular. Para avaliar a população de micróglia e monócitos infiltrados, foram utilizados os marcadores CD45, CD11b, CX3CR1, Ly6C e P2ry12, sendo a micróglia (CD45<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>CX3CR1<sup>hi</sup>CD44<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup>P2ry12<sup>+</sup>) e os monócitos (LiveCD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>Ly6C<sup>hi</sup>P2ry12<sup>-</sup>). Além disso, também avaliamos a população de linfócitos TCD8 e TCD4, utilizando as marcações CD45 + CD8 e CD45 + CD4, respectivamente (Fig 23).



**Fig 23:** Análises de clusters das populações celulares identificadas no cérebro pelo tSNE e heatmap evidenciando os níveis de expressão de cada marcador de superfície, de acordo com as populações

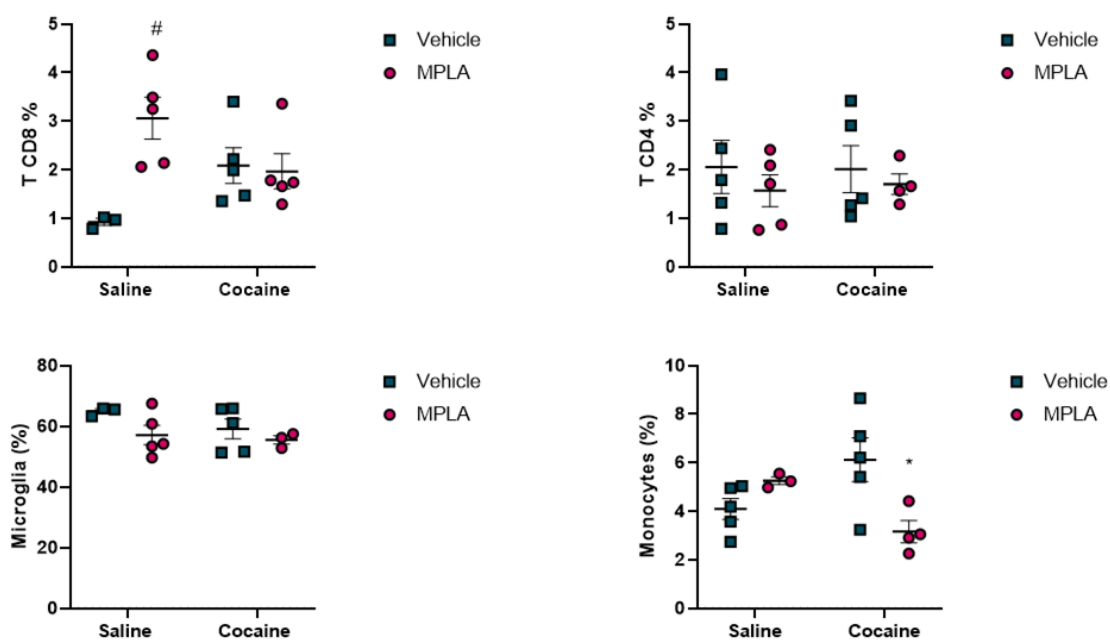
Observamos que tanto a cocaína quanto o MPLA são capazes de aumentar o número total de células. Além disso, os dois tratamentos aumentaram o número de linfócitos TCD8, porém não houve efeito no número de linfócitos TCD4. Em relação

às células mieloides, observamos que a cocaína é capaz de aumentar o número de micróglia e monócitos infiltrados (Fig 24).



**Fig 24: Quantificação do número total de células imunológicas no cérebro.** Número absoluto de células totais (A), de linfócitos T CD8+ (B), de linfócitos T CD4+ (C), de células microgliais (D) e monócitos infiltrados (E). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. # $p < 0.05$  e ## $p < 0.01$  em relação ao grupo controle. (n= 4-5 por grupo).

Também avaliamos a frequência destas células. Observamos que o MPLA é capaz de aumentar a frequência de linfócitos TCD8 apenas em animais que receberam veículo, e não teve efeito nos linfócitos TCD4. Por outro lado, observamos que apenas animais tratados com MPLA + cocaína apresentam uma diminuição na frequência de linfócitos. Não foram observadas alterações na frequência da micróglia (Fig 25). Nesse sentido, podemos observar que há um recrutamento celular significativo.



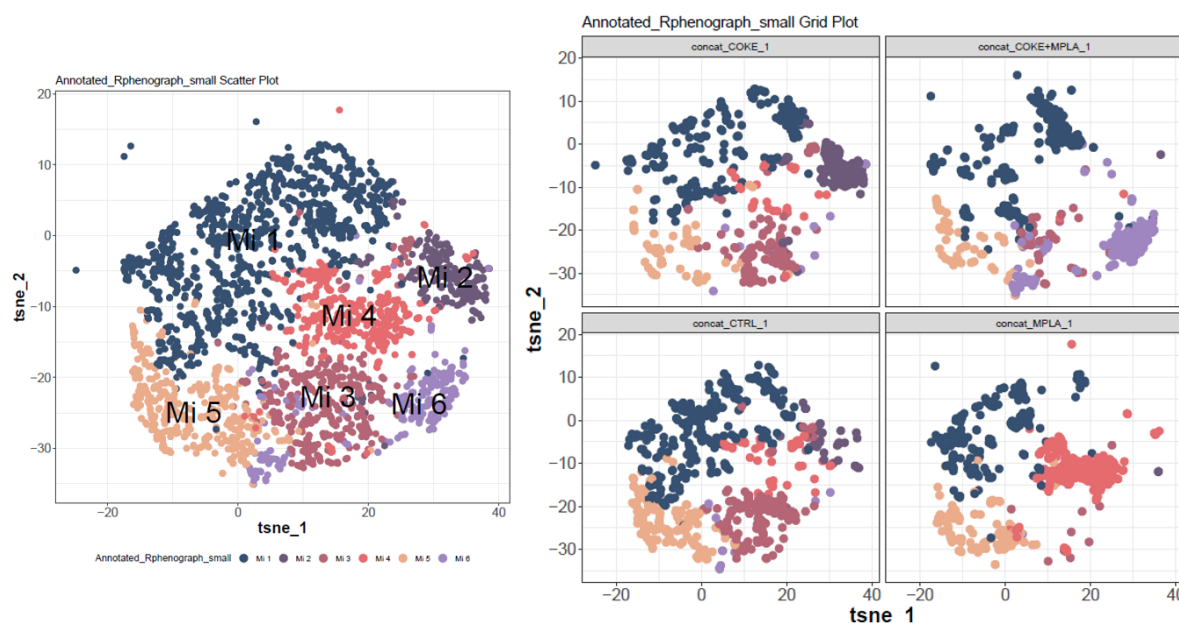
**Fig 25: Quantificação da frequência células imunológicas no cérebro.** Frequência de linfócitos T CD8+ (A), de linfócitos T CD4+ (B), de células microgliais (C) e monócitos infiltrados (D). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. # $p < 0.05$  em relação ao grupo controle e \* $p < 0.05$  entre os grupos veículo + cocaína e MPLA + cocaína. (n= 4-5 por grupo).

#### 4.10.2 Cocaína e MPLA alteram o fenótipo microglial

A micróglia possui diversos receptores que lhes permite detectar alterações no seu ambiente, por isso sua morfologia e seu perfil molecular são dinâmicos e plásticos, resultando em muitos estados celulares diferentes. Nesse sentido, a identificação da microglia baseada na expressão de diferentes proteínas específicas é uma excelente ferramenta para avaliar sua identidade transcricional e são comumente empregados como “marcadores microgliais”.

A análise de *cluster* por tSNE identificou os 6 tipos microgliais, que expressam de forma diferente os marcadores P2RY12, CD11c, SingleH, CD44, CD11b, CD45, CD62L e CX3CR1. De forma interessante, a micróglia M1 é expressa em todos os grupos. A micróglia M5 é expressa apenas nos animais controle e MPLA, ou seja, o tratamento com cocaína inibe a presença da micróglia M5. Por outro lado, a micróglia M3 é expressa apenas em animais controle ou cocaína, indicando que este fenótipo microglial não ocorre na presença do MPLA. Além disso, a micróglia M2, M4 e M6 são

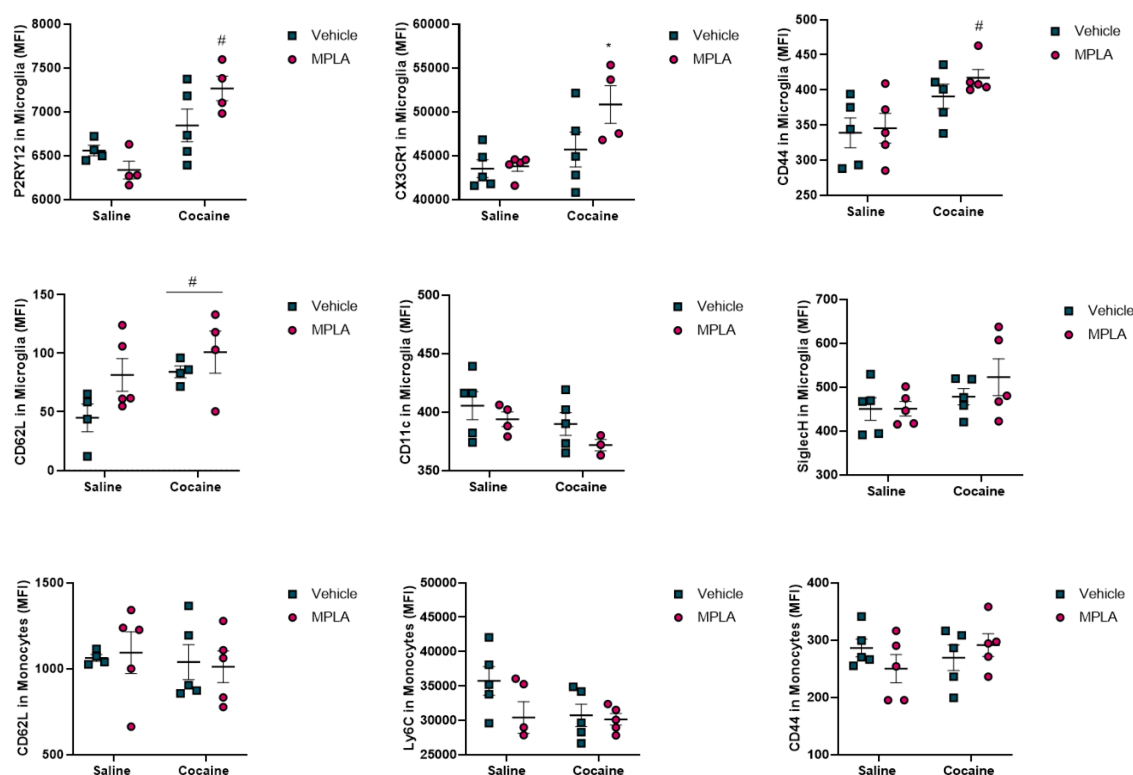
expressas apenas nos grupos cocaína, MPLA e cocaína + MPLA, respectivamente (Fig 26).



**Fig 26: Análises de clusters das populações microgliais identificadas no cérebro pelo tSNE.** Análise de cluster em todos os grupos juntos e em cada tratamento separadamente.

Ao quantificarmos a expressão dessas proteínas, observamos que a cocaína aumentou a expressão de P2RY12 nas células microgliais, sendo que há um efeito oposto entre os grupos tratados apenas com MPLA e MPLA + cocaína. Além disso, a cocaína também aumentou a expressão CX3CR1 na micróglia, sendo que este efeito foi mais pronunciado nos animais tratados com MPLA. Por fim, a cocaína aumentou a expressão de CD44 e de CD62L.

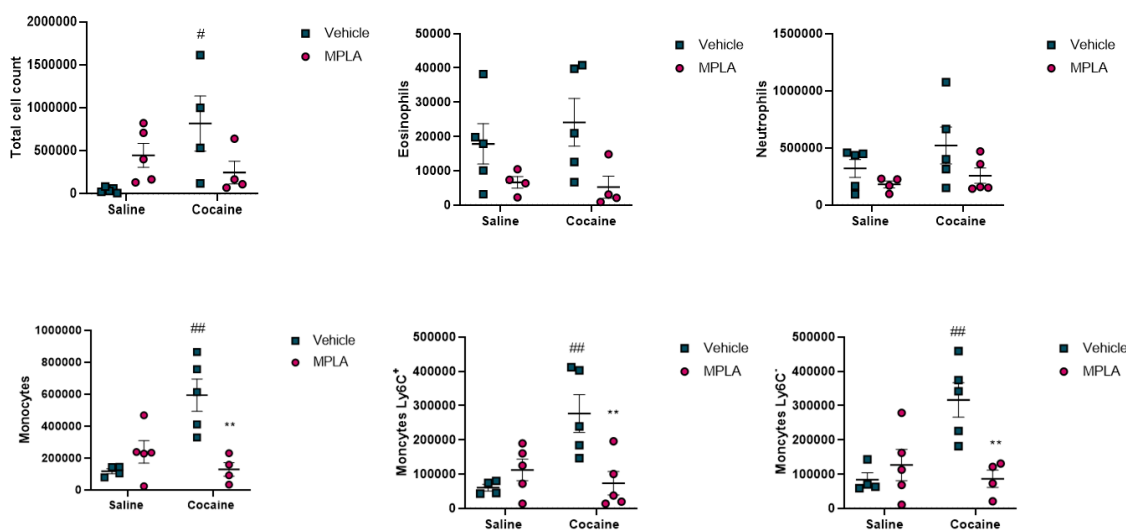
Não houve diferença na expressão de CD11b e SinglecH nas células microgliais, bem como também não houve diferença na expressão de Ly6C, CD44 e nem CD62L nos monócitos infiltrados (Fig 27).



**Fig 27: Avaliação do fenótipo das células mielóides do cérebro.** Quantificação de P2RY12 (A), CX3CR1 (B), CD44 (C), CD62L (D), CD11c (E) e SingleH (F) nas células microgliais. Quantificação de CD62L (G), Ly6C (H) e CD44 (I) nos monócitos infiltrados. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. # $p < 0.05$  em relação ao grupo controle, \* $p < 0.05$  entre os grupos veículo + cocaína e MPLA + cocaína (n= 4-5 por grupo).

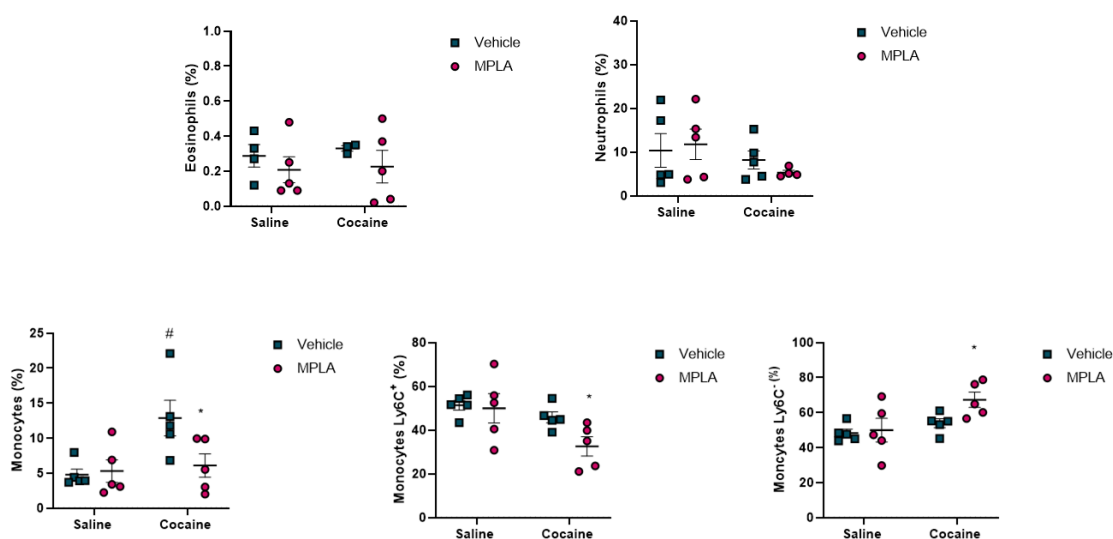
#### 4.10.3 Cocaína induz aumento e alterações na população de células mielóides da periferia, sendo esse efeito prevenido pelo MPLA

Também avaliamos a população de células mielóides na periferia. Primeiramente, observamos que a cocaína aumenta o número total de células mielóides nos animais tratados com cocaína + veículo, mas não nos animais tratados com cocaína + MPLA. Em relação às diferentes populações de células mielóides, observamos que a cocaína aumentou o número total de monócitos, bem como aumentando a população de monócitos Ly6C<sup>+</sup> e Ly6C<sup>-</sup>. De forma interessante, o MPLA também foi capaz de reverter essas alterações induzidas pela cocaína. Por outro lado, o MPLA diminuiu o número de eosinófilos, além de ter uma tendência ( $p=0.06$ ) em diminuir o número de neutrófilos (Fig 28).



**Fig 28: Quantificação do número total de células mieloides no sangue.** Número absoluto de células totais (A), de eosinófilos (B), de neutrófilos (C), de monócitos totais (D), de monócitos Ly6C<sup>+</sup> (E) e monócitos Ly6C<sup>-</sup> (F). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. # $p < 0.05$  e ## $p < 0.01$  em relação ao grupo controle, \* $p < 0.05$  em ( $n = 4-5$  por grupo).

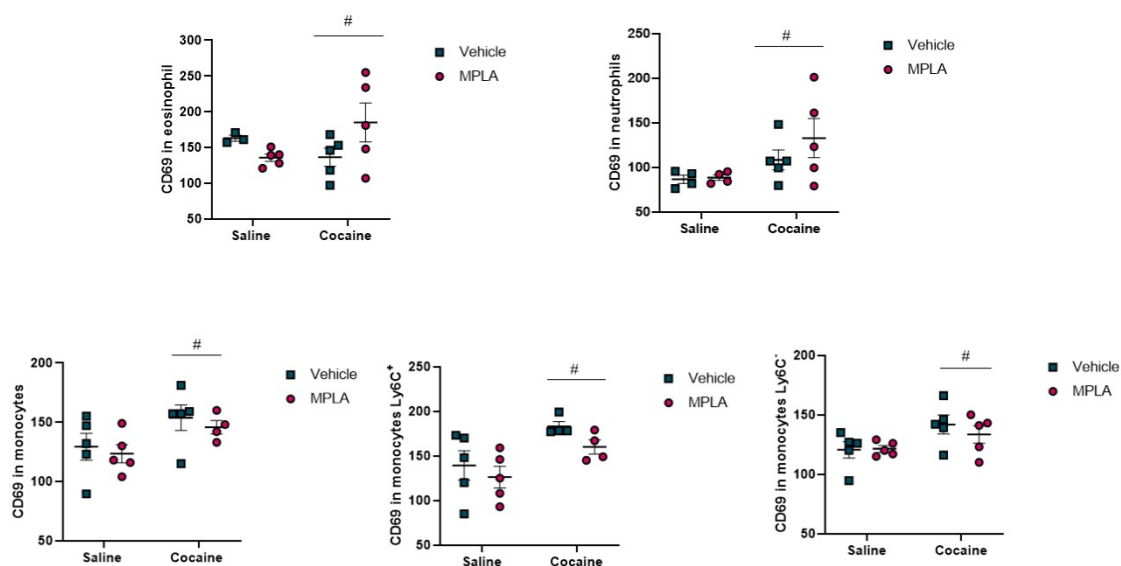
Em relação a frequência, observamos que a cocaína aumentou a frequência total de monócitos, enquanto o MPLA foi capaz de reverter esse efeito. De forma interessante, em relação às subpopulações, o MPLA diminuiu a frequência de monócitos Ly6C<sup>+</sup> e aumentou a frequência de monócitos Ly6C<sup>-</sup> (Fig 29).



**Fig 29: Quantificação da frequência de células mieloides no sangue.** Frequência de de eosinófilos (A), de neutrófilos (B), de monócitos totais (C), de monócitos Ly6C<sup>+</sup> (D) e monócitos Ly6C<sup>-</sup> (E).

(E). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. # $p < 0.05$  em relação ao grupo controle, \* $p < 0.05$  em (n= 4-5 por grupo).

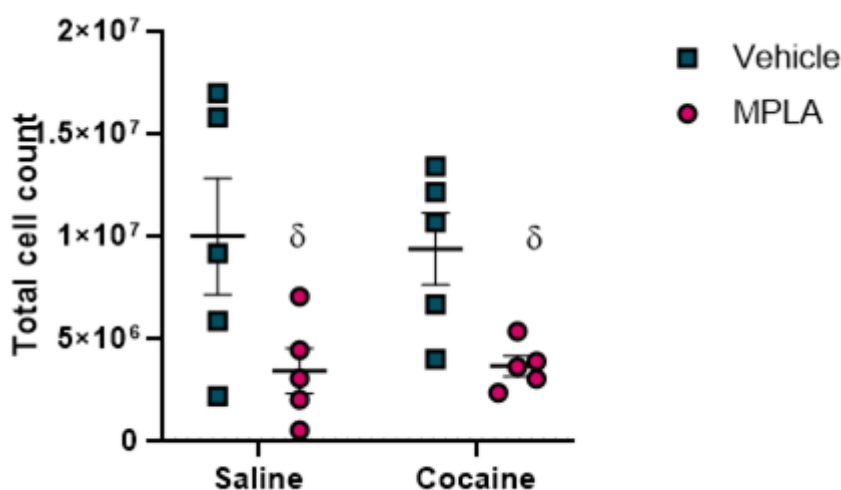
Por fim, a cocaína aumentou a expressão de CD69 em todas as 5 populações celulares avaliadas. Porém não houve nenhum efeito do tratamento do MPLA (Fig 30).



**Fig 30: Quantificação de CD69 de células mieloides no sangue.** Quantificação de CD69 nos eosinófilos (A), neutrófilos (B), monócitos totais (C), monócitos Ly6C<sup>+</sup> (D) e monócitos Ly6C<sup>-</sup> (E). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. # $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. (n= 4-5 por grupo).

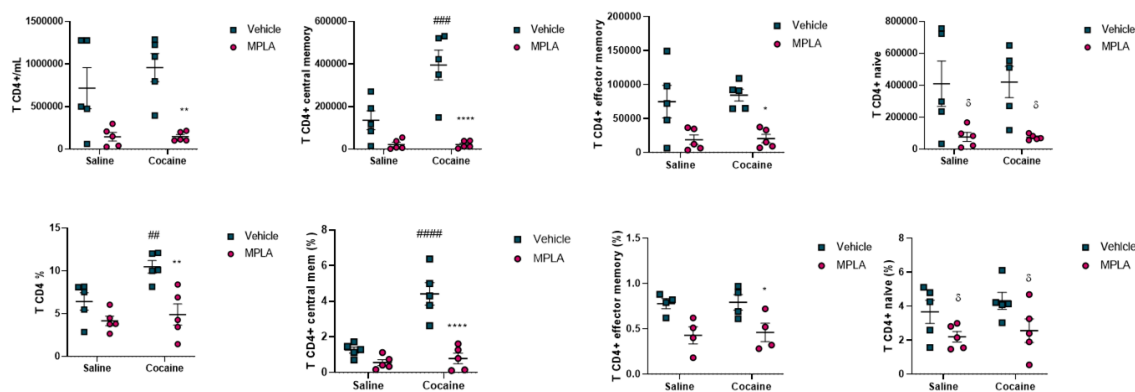
#### 4.10.4 Cocaína induz aumento e alterações na população de células linfóides da periferia, sendo esse efeito prevenido pelo MPLA

Por fim, avaliamos a população de células linfóides na periferia. O MPLA diminuiu o número total de células linfóides, sendo que a cocaína não teve nenhum efeito (Fig 31).



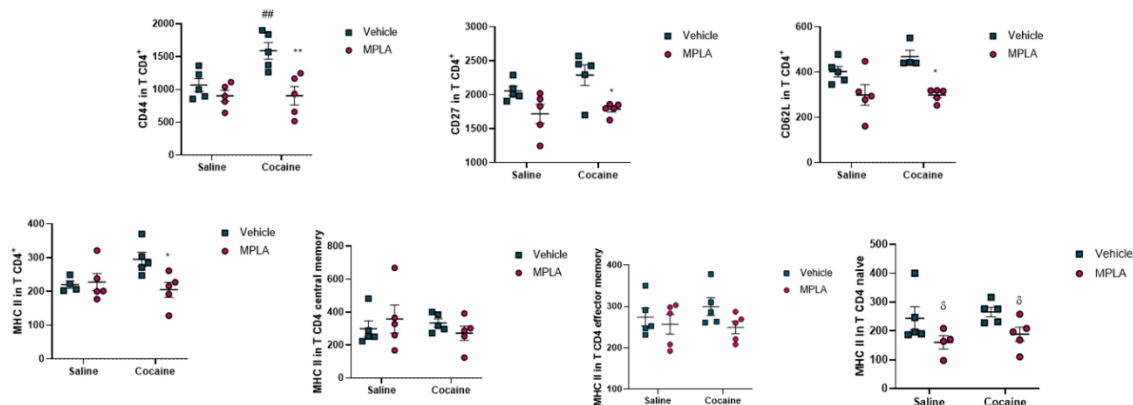
**Fig 31: Quantificação do número total de células linfóides no sangue.** Número absoluto de células totais. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $\delta p < 0.05$  em relação ao grupo controle. (n= 4-5 por grupo).

Em relação a cada tipo celular, observamos que a cocaína aumentou o número e a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> da memória central, sendo esse efeito revertido pelo MPLA. Além disso, o MPLA diminuiu o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, bem como sua frequência, além de diminuir o número e a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> da memória efetora e naive (Fig 32).



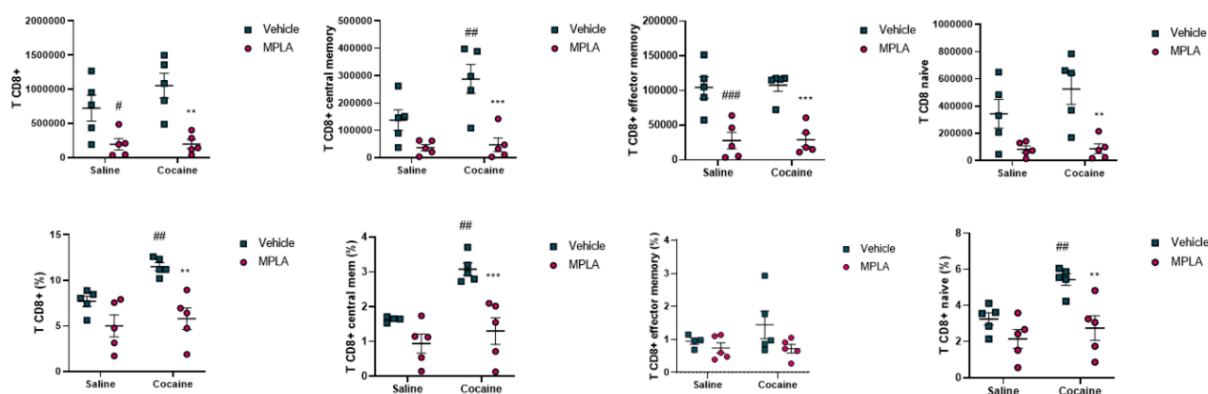
**Fig 32: Quantificação do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue.** Número total de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A), linfócitos T CD4<sup>+</sup> da memória central (B), linfócitos T CD4<sup>+</sup> da memória efetora (C), linfócitos T CD4<sup>+</sup> naive (D). Frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (E), linfócitos T CD4<sup>+</sup> da memória central (F), linfócitos T CD4<sup>+</sup> da memória efetora (G), linfócitos T CD4<sup>+</sup> naive (H). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $\delta p < 0.05$  e  $### p < 0.001$  em relação ao grupo controle,  $* p < 0.05$ ,  $** p < 0.01$  e  $**** p < 0.0001$  entre os grupos veículo + cocaína e MPLA + cocaína (n= 4-5 por grupo).

Em relação aos marcadores, a cocaína aumentou a expressão de CD44, sendo esse efeito revertido pelo MPLA. O MPLA também diminuiu a expressão de CD27, CD62L e MHC II apenas dos linfócitos T CD4 naíve (Fig 33).



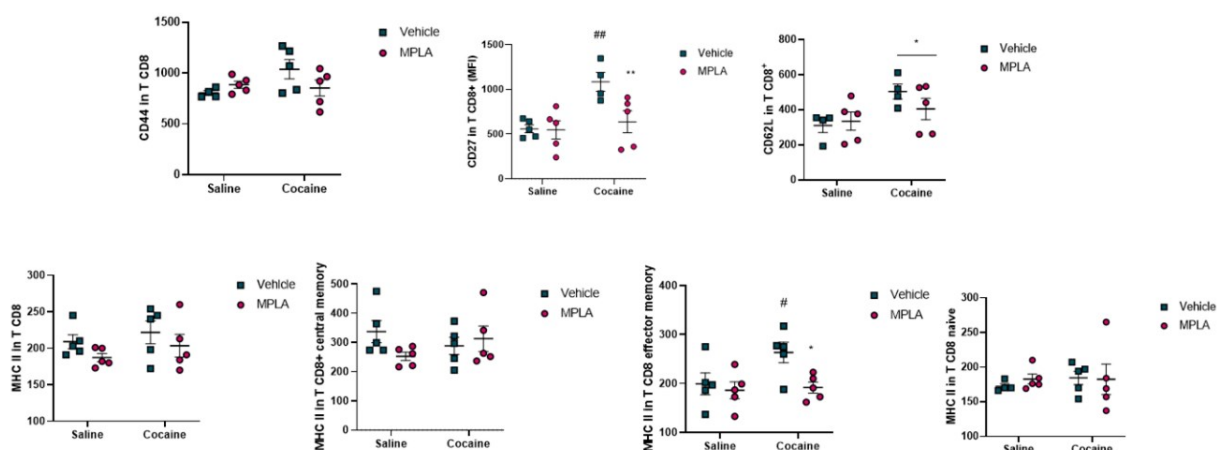
**Fig 33: Expressão de marcadores de ativação e memória em linfócitos T CD4+.** Quantificação da expressão de CD44 (A), CD27 (B) e CD62L (C) na população total de linfócitos T CD4+. Quantificação da expressão de MHC na população total de linfócitos T CD4+ (D), linfócitos T CD4+ da memória central (E), linfócitos T CD4+ da memória efetora (F), linfócitos T CD4+ naíve (G). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $\delta p < 0.05$  e  $### p < 0.001$  em relação ao grupo controle,  $* p < 0.05$ ,  $** p < 0.01$  e  $**** p < 0.0001$  entre os grupos veículo + cocaína e MPLA + cocaína (n= 4-5 por grupo).

Na população de linfócitos T CD8+, de forma geral, observamos que o MPLA diminui o número e a frequência dos linfócitos T CD8+ totais, de memória efetora, de memória central e naíve. A cocaína só tem efeito no número e na frequência de linfócitos T CD8+ da memória central, e na frequência de T CD8+ total e naíve (Fig 34).



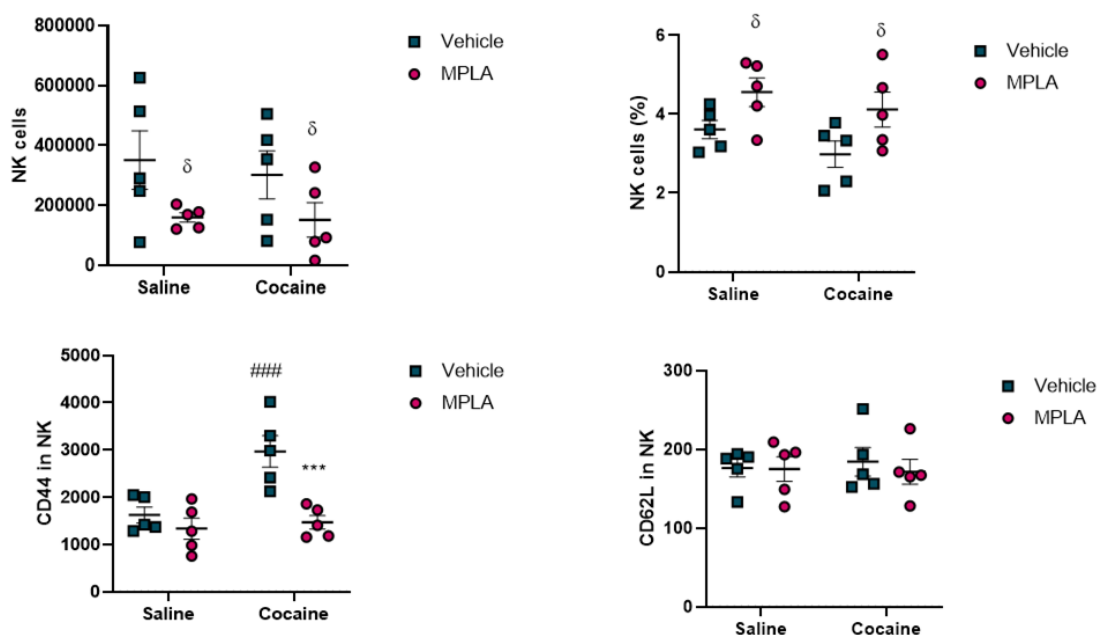
**Fig 34: Quantificação do número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue.** Número total de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (A), linfócitos T CD8<sup>+</sup> da memória central (B), linfócitos T CD8<sup>+</sup> da memória efetora (C), linfócitos T CD8<sup>+</sup> naive (D). Frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (E), linfócitos T CD8<sup>+</sup> da memória central (F), linfócitos T CD8<sup>+</sup> da memória efetora (G), linfócitos T CD8<sup>+</sup> naive (H). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $\delta p < 0.05$  e  $### p < 0.001$  em relação ao grupo controle,  $* p < 0.05$ ,  $** < p < 0.01$  e  $**** p < 0.0001$  entre os grupos veículo + cocaína e MPLA + cocaína (n= 4-5 por grupo).

A cocaína aumentou a expressão de CD27 e CD62L, além da expressão de MHC II nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> da memória efetora. Porém o MPLA só teve efeito protetor na expressão de CD27 e MHC II (Fig 35).



**Fig 35: Expressão de marcadores de ativação e memória em linfócitos T CD8<sup>+</sup>.** Quantificação da expressão de CD44 (A), CD27 (B) e CD62L (C) na população total de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Quantificação da expressão de MHC na população total de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (D), linfócitos T CD8<sup>+</sup> da memória central (E), linfócitos T CD8<sup>+</sup> da memória efetora (F), linfócitos T CD8<sup>+</sup> naive (G). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM.  $\delta p < 0.05$  e  $### p < 0.001$  em relação ao grupo controle,  $* p < 0.05$ ,  $** < p < 0.01$  e  $**** p < 0.0001$  entre os grupos veículo + cocaína e MPLA + cocaína (n= 4-5 por grupo).

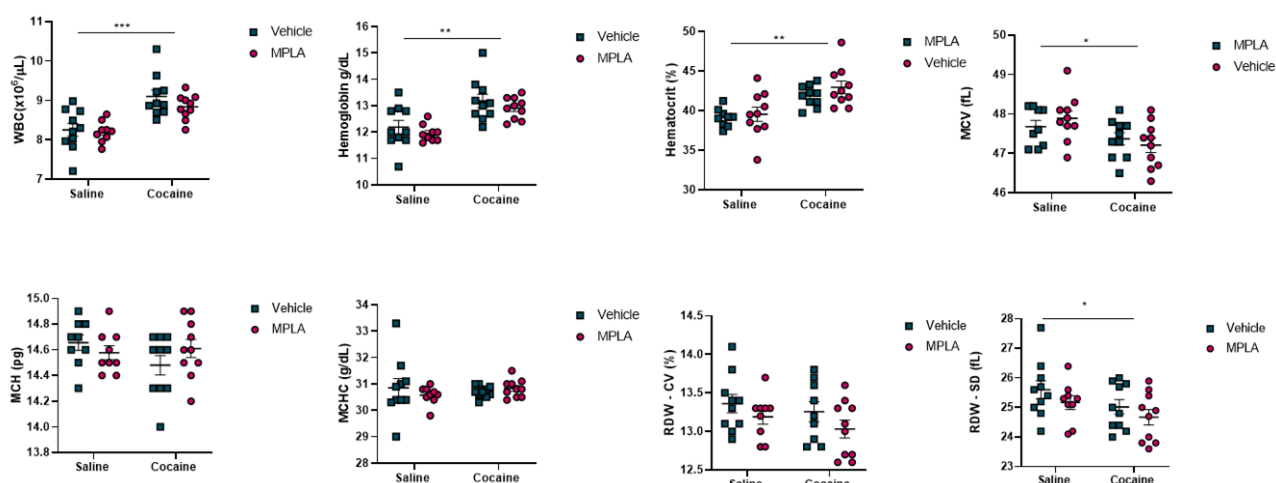
Por fim, avaliamos a população de células NK. O MPLA diminuiu o número de células NK, porém aumentou a frequência. Além disso, a cocaína aumentou a expressão de CD44, sendo este efeito revertido pelo MPLA (Fig 36).



**Fig 36: Avaliação de células NK no sangue.** Quantificação do número total de células NK (A), da frequência de células NK (B), da expressão de CD44 (C) e da expressão de CD62L (D). Os resultados estão expressos como média ± SEM. δ $p < 0.05$  e ### $p < 0.001$  em relação ao grupo controle, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.0001$  entre os grupos veículo + cocaína e MPLA + cocaína (n= 4-5 por grupo).

#### 4.10.5 Cocaína altera os parâmetros hematológicos

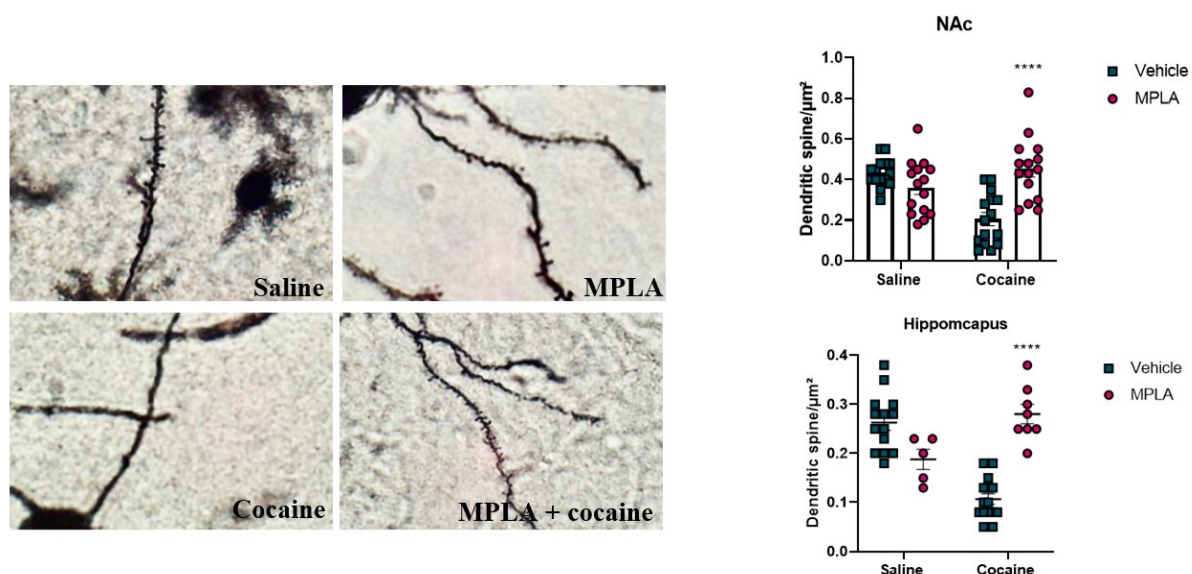
Foi realizado o hemograma para avaliação dos parâmetros hematológicos. Observamos que a cocaína aumenta o número de hemácias, a hemoglobina e o hematócrito desses animais, além de diminuir o volume corpuscular médio. Porém o MPLA não teve nenhum efeito nesses parâmetros (Fig 37).



**Fig 37: Avaliação do hemograma.** Avaliação das hemácias (A), hemoglobina (B), hematócrito (C), volume corpuscular médio (D), hemoglobina corpuscular média (E), concentração de hemoglobina corpuscular média (F) e tamanho dos eritrócitos (G e H). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo controle. (n=10 por grupo).

#### 4.11 Cocaína diminui o número de espinhas dendríticas, sendo esse efeito revertido pelo MPLA

Para avaliar o papel do TLR4 nas alterações sinápticas induzidas pela cocaína, utilizamos a técnica de golgi para avaliar o número de espinhas dendríticas. Observamos que a cocaína diminuiu o número de espinhas dendríticas no NAc e no hipocampo, sendo que esse efeito foi revertido pelo tratamento com MPLA (Fig 38).



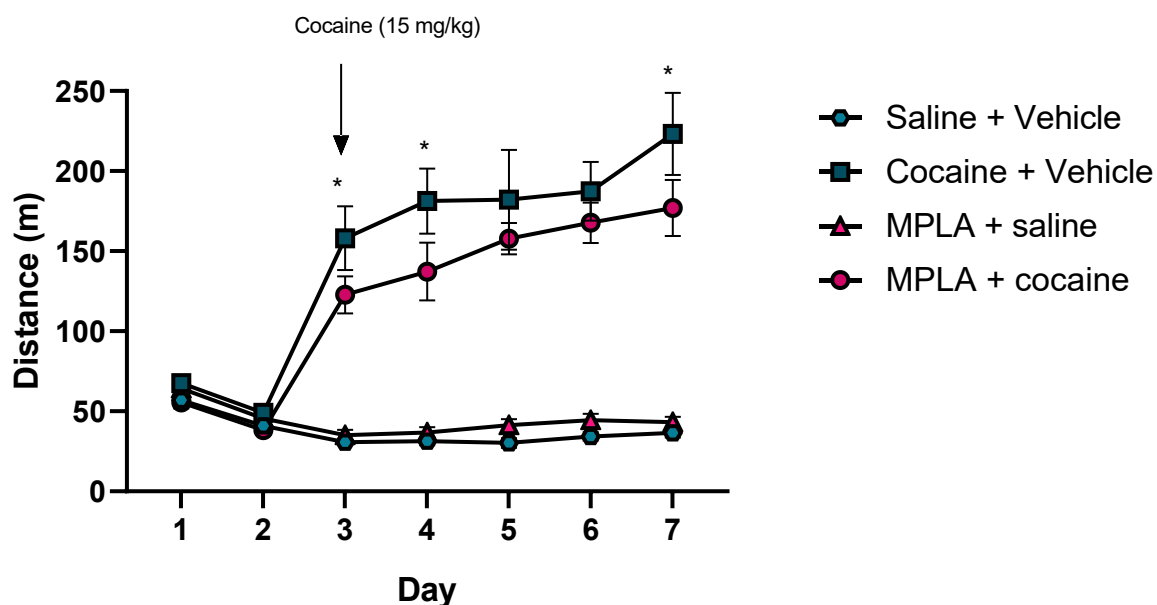
**Fig 38: Avaliação do número de espinhas dendríticas.** Figura representativa das espinhas dendríticas em cada grupo e quantificação do número de espinhas dendríticas no núcleo accumbens e no hipocampo. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $p < 0.0001$  entre os grupos veículo + cocaína e MPLA + cocaína (n= 15 por grupo).

## **4.12 Participação do receptor TLR4 nas alterações comportamentais induzidas por cocaína**

### **4.12.1 Pré-tratamento com MPLA, um agonista fraco do receptor TLR4, diminui a hiperlocomoção induzida por cocaína**

Até o momento, havíamos demonstrado que a micróglia participa das alterações induzidas pela cocaína. Dessa forma, resolvemos investigar vias que controlam a atividade dessas células e o processo neuroinflamatório. Inicialmente, avaliamos o papel de TLR4 nesse contexto. Dessa forma, com o objetivo de avaliar a participação deste receptor na sensibilização comportamental induzida por cocaína, os animais foram tratados com MPLA (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou veículo durante o protocolo experimental da sensibilização comportamental, nos dias de habituação. Ou seja, a ativação do TLR4 ocorreu antes da primeira dose de cocaína.

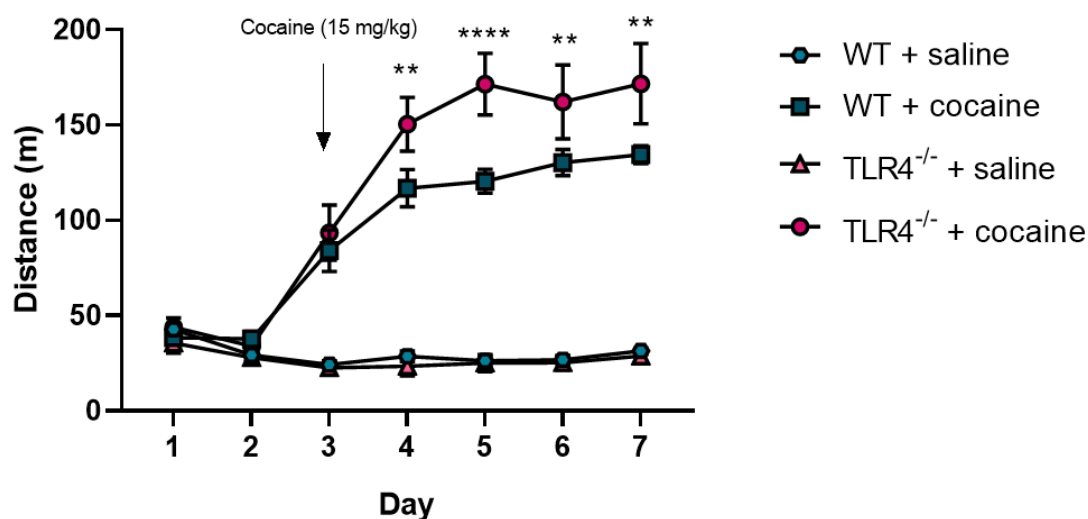
A cocaína aumentou a atividade locomotora dos animais ao longo dos dias ( $p < 0,05$  entre os grupos cocaína + veículo e salina + veículo; e  $p < 0,05$  entre o grupo cocaína + veículo no dia 3 e no dia 7). O tratamento com o MPLA reduziu a hiperlocomoção induzida por cocaína nos dias 3, 4 e 7 ( $p < 0,05$  entre os grupos cocaína + veículo e cocaína + MPLA) (Fig 39).



**Fig 39: Efeitos do MPLA, um agonista tendencioso do TLR4, na sensibilização comportamental.** Distância total percorrida por animais tratados com salina e cocaína no teste de sensibilização comportamental [fator tratamento ( $F_{(18,235)}=28,54$ ;  $p<0,0001$ ), fator tempo ( $F_{(6,235)}=18,10$ ;  $p<0,0001$ ), interação ( $F_{(18,235)}=14,41$ ;  $p<0,0001$ )].  $N=9-11$  por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*\* $p<0,01$  e \* $p<0,05$  entre os grupos cocaína + veículo e cocaína + MPLA na sensibilização comportamental. ##### $p<0,0001$  entre os grupos cocaína + veículo e salina + veículo.

#### 4.12.2 Animais $TLR4^{-/-}$ apresentam um aumento da sensibilização comportamental induzida por cocaína

Com o objetivo de confirmar o resultado obtido com o tratamento com MPLA, camundongos  $TLR4^{-/-}$  foram submetidos a sensibilização comportamental. Novamente, a cocaína aumentou a atividade locomotora dos animais ao longo dos dias ( $p<0,0001$  entre os grupos WT + cocaína e WT + salina; e  $p<0,05$  entre o grupo WT cocaína entre os dias 3 e 7). Nesse experimento, observamos que os animais  $TLR4^{-/-}$  apresentam um aumento da atividade locomotora em relação aos animais WT nos dias 4, 5 e 7 ( $p<0,05$ ) (Fig 40).

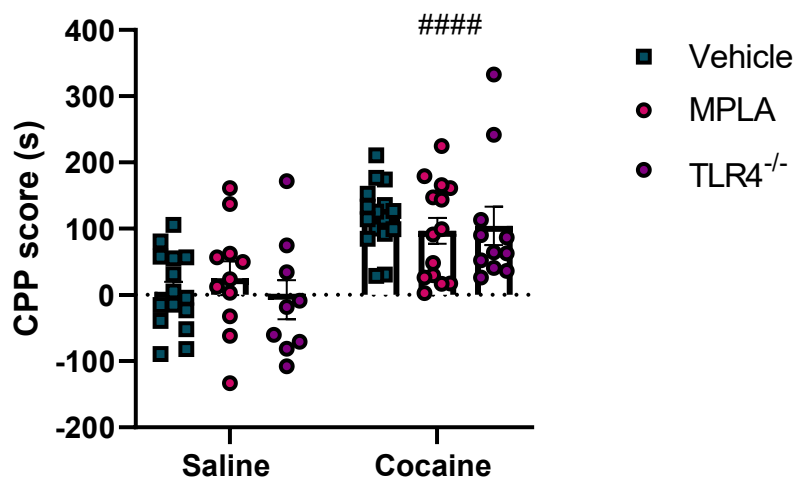


**Fig. 40. Avaliação de animais TLR4<sup>-/-</sup> na sensibilização comportamental.** Distância total percorrida por animais tratados com salina e cocaína no teste de sensibilização comportamental [fator tratamento e genótipo ( $F_{(6,188)}=30,92$ ;  $p<0,0001$ ), fator tempo ( $F_{(3,188)}=206,4$ ;  $p<0,0001$ ), interação ( $F_{(18,188)}=14,19$ ;  $p<0,0001$ )]. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*\*\* $p<0,001$  e \*\*\*\* $p<0,0001$  entre os grupos WT + cocaína e TLR4<sup>-/-</sup> + cocaína. N=5-10 por grupo.

#### 4.12.3 Pré-tratamento com MPLA não foi capaz de alterar a CPP induzida por cocaína

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor TLR4 na CPP induzida por cocaína, os animais foram tratados com MPLA (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou veículo durante dois dias consecutivos, começando um dia antes do protocolo experimental. A cocaína aumentou a taxa de preferência do compartimento pareado com a droga ( $p<0,0001$  entre os grupos salina + veículo e cocaína + veículo). Porém o pré-tratamento com MPLA não alterou a taxa de preferência.

Além disso, animais TLR4<sup>-/-</sup> também foram submetidos ao CPP, para corroborar os dados dos animais tratados com MPLA. Não houve diferença na taxa de preferência entre animais TLR4<sup>-/-</sup> e animais WT (Fig 41).

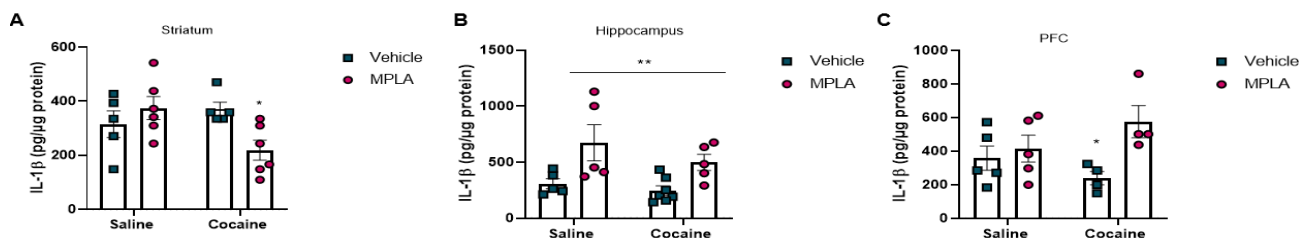


**Fig 41: Efeitos do MPLA, um agonista tendencioso do TLR4 na CPP.** Taxa de preferência de animais tratados com salina e cocaína na CPP [fator cocaína ( $F_{(1,52)}=27.36$ ;  $p<0,0001$ ), fator MPLA ( $F_{(1,52)}=0.001892$ ;  $p=0,9655$ ), interação ( $F_{(1,52)}=0.001892$ ;  $p=0,2332$ ] e fator cocaína ( $F_{(1,37)}=0.18$ ;  $p=0.67$ ), fator MPLA ( $F_{(1,37)}=0.04$ ;  $p=0,8382$ ), interação ( $F_{(1,52)}=0.001892$ ;  $p=0,2332$ ).  $N=4-16$  por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Newman-Keuls. ##### $p<0,0001$  entre os grupos cocaína e salina.

#### 4.13 MPLA alterou os níveis cerebrais de IL-1 $\beta$

Devido ao papel da IL-1 $\beta$  nos processos de plasticidade sináptica, decidimos avaliar os níveis dessa citocina no estriado, no hipocampo e no PFC de animais submetidos a sensibilização comportamental.

No estriado e no PFC, observamos que o MPLA reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  nos animais tratados com cocaína ( $p=0.01$ ). Já no hipocampo, o MPLA aumentou os níveis de IL-1 $\beta$  em ambos os grupos ( $p=0,002$ ) (Fig 42).



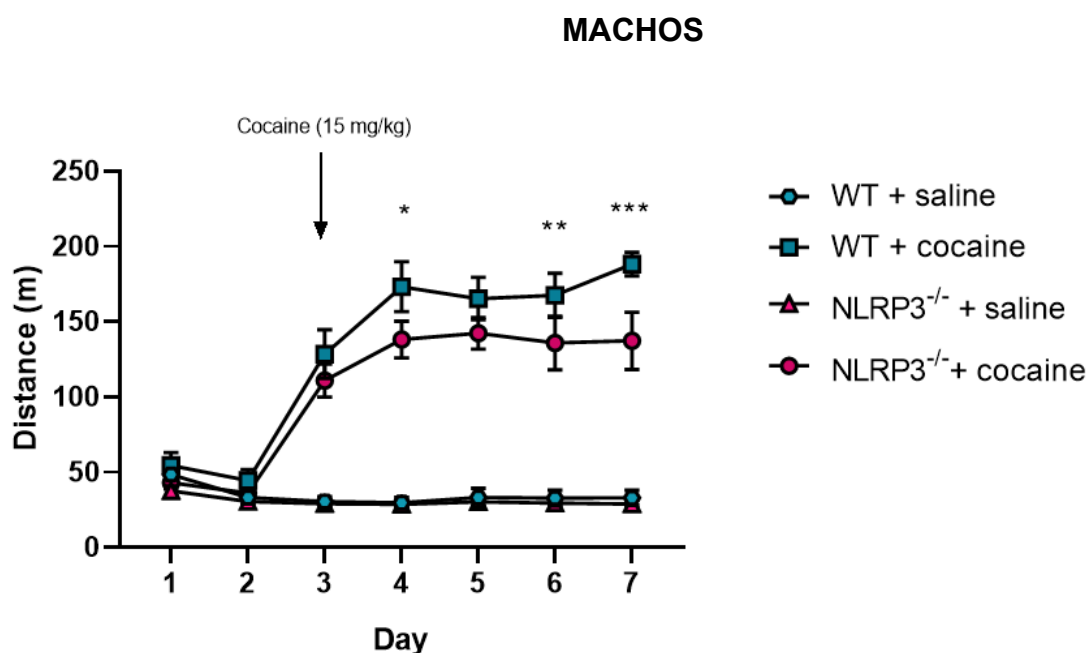
**Fig. 42. Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$ .** Quantificação de IL-1 $\beta$  no estriado [fator cocaína ( $F_{(1,18)}=1.53$ ;  $p=0.23$ ), fator MPLA ( $F_{(1,18)}=1.34$ ;  $p=0,8382$ ), interação ( $F_{(1,18)}=6.96$ ;  $p=0,016$ ), hipocampo

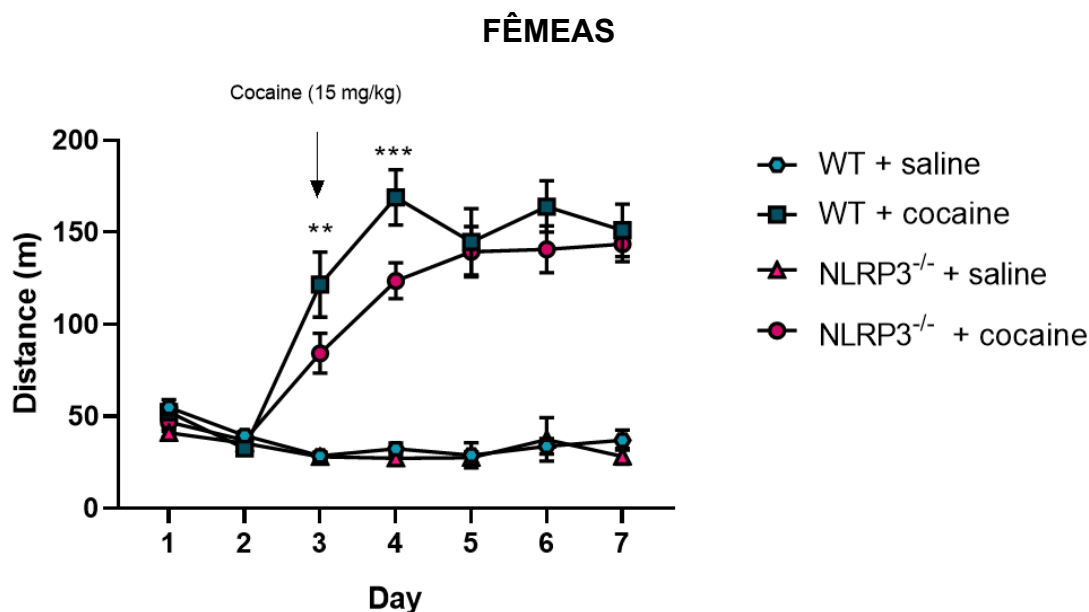
[fator cocaína ( $F_{(1,18)}=1.820$ ;  $p=0.194$ ), fator MPLA ( $F_{(1,18)}=12.44$ ;  $p=0.0024$ ), interação ( $F_{(1,18)}=0.443$ ;  $p=0.514$ ] e PFC [fator cocaína ( $F_{(1,14)}=0.074$ ;  $p=0.789$ ), fator MPLA ( $F_{(1,14)}=6.62$ ;  $p=0.0021$ ), interação ( $F_{(1,14)}=3.382$ ;  $p=0.087$ ], respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*\* $p<0,01$  e \* $p<0,05$  entre os grupos cocaína + veículo e cocaína + MPLA.

#### 4.14 Participação da via NLRP3/CASP1 nas alterações comportamentais induzidas por cocaína

##### 4.14.1 Animais NLRP3<sup>-/-</sup> apresentam uma diminuição na sensibilização comportamental induzida por cocaína

Para avaliar o papel da IL-1 $\beta$  na sensibilização comportamental induzida por cocaína, machos e fêmeas NLRP3<sup>-/-</sup> foram submetidos a este protocolo experimental. A cocaína aumentou a atividade locomotora ( $p<0,0001$ ) em ambos os sexos. Camundongos machos NLRP3<sup>-/-</sup> apresentaram uma redução da atividade locomotora dos dias 4, 6 e 7 ( $p<0,05$ ), enquanto as fêmeas NLRP3<sup>-/-</sup> apresentaram uma redução da atividade locomotora nos dias 3 e 4 ( $p<0,05$ ) em comparação aos respectivos controles tratados com cocaína (Fig 43).

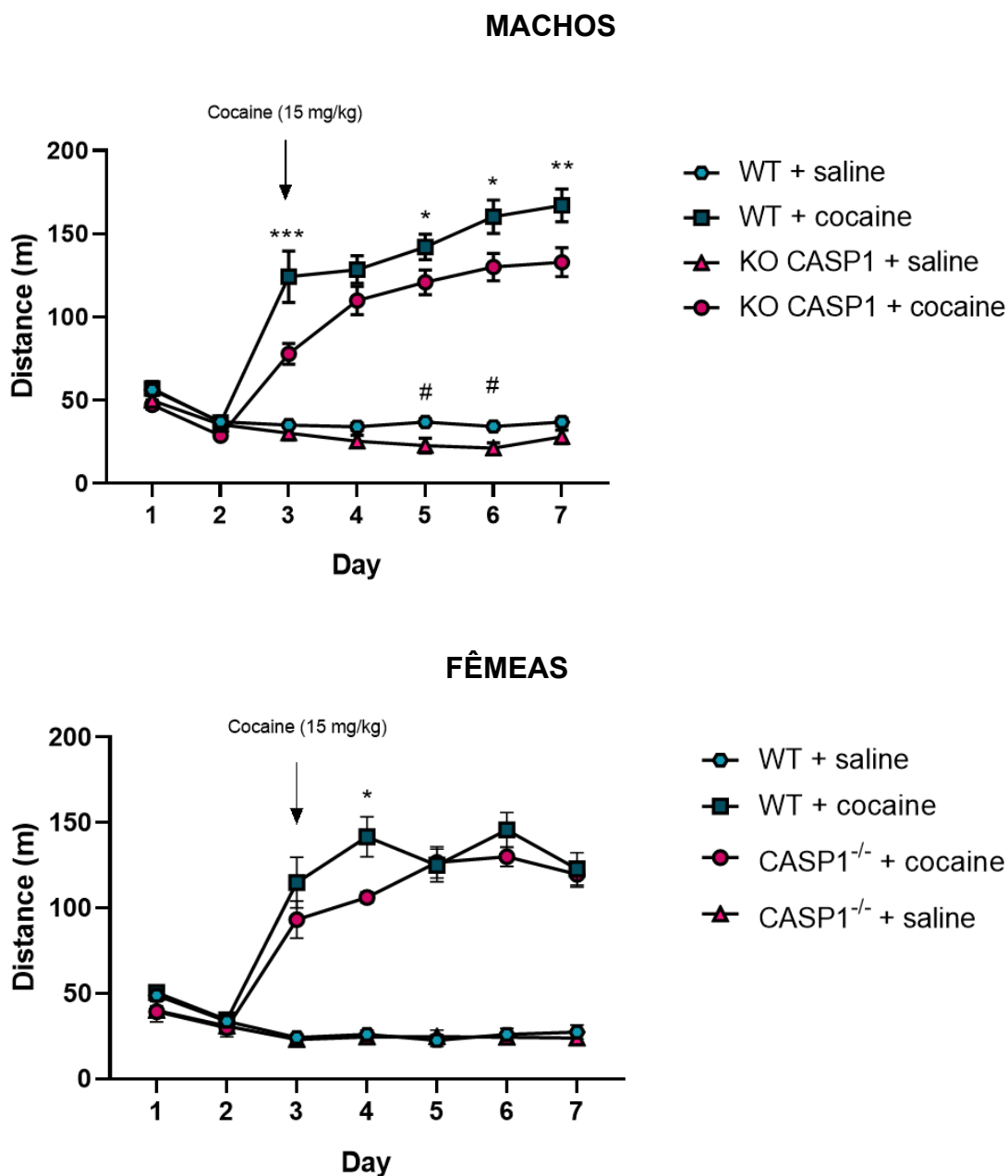




**Fig. 43. Avaliação de animais NLRP3<sup>-/-</sup> na sensibilização comportamental. (A)** Distância total percorrida por animais machos tratados com salina e cocaína no teste de sensibilização comportamental [fator tratamento e genótipo ( $F_{(3,70)}=135,3$ ;  $p<0,0001$ ), fator tempo ( $F_{(6,70)}=31,57$ ;  $p<0,0001$ ), interação ( $F_{(18,70)}=7,577$ ;  $p<0,0001$ )]. N=8 por grupo. **(B)** Distância total percorrida por animais fêmeas tratadas com salina e cocaína no teste de sensibilização comportamental [fator tratamento e genótipo ( $F_{(3,161)}=147,0$ ;  $p<0,0001$ ), fator tempo ( $F_{(6,161)}=21,28$ ;  $p<0,0001$ ), interação ( $F_{(18,161)}=11,37$ ;  $p<0,0001$ )]. N=6-8 por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$  e \* $p<0,05$  entre os grupos WT + cocaína e NLRP3<sup>-/-</sup> + cocaína.

#### 4.14.2 Animais CASP1<sup>-/-</sup> apresentam uma diminuição na sensibilização comportamental induzida por cocaína

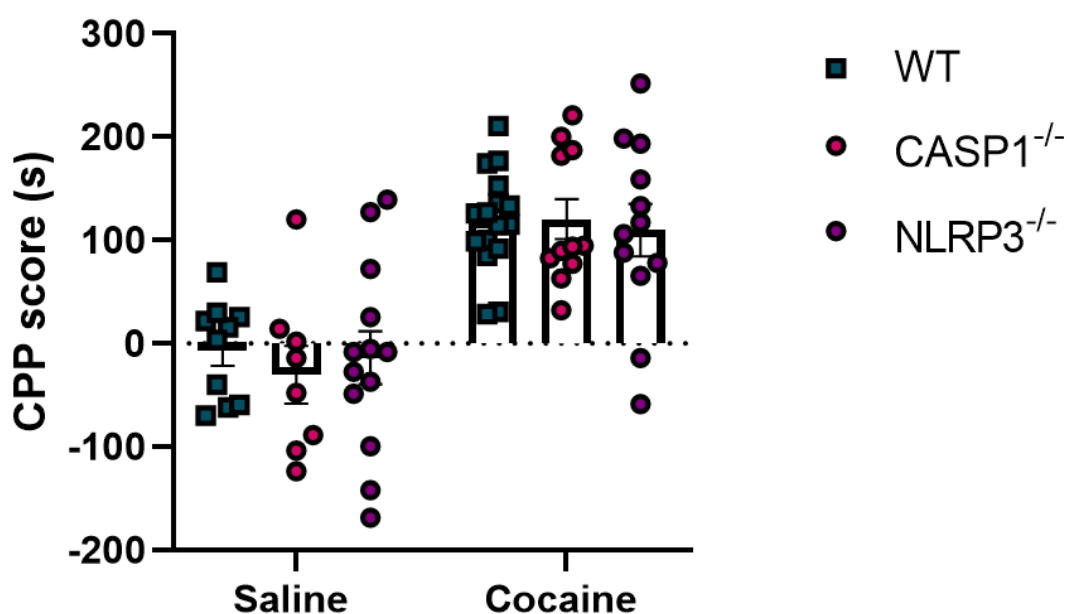
Para corroborar o papel da IL-1 $\beta$  na sensibilização comportamental induzida por cocaína, machos e fêmeas CASP1<sup>-/-</sup> foram submetidos a este protocolo experimental. A cocaína aumentou a atividade locomotora ( $p<0,0001$ ) em ambos os sexos. Camundongos machos CASP1<sup>-/-</sup> apresentaram uma redução da atividade locomotora dos dias 3, 6 e 7 ( $p<0,05$ ), enquanto as fêmeas CASP1<sup>-/-</sup> apresentaram uma redução da atividade locomotora apenas no dia 4 ( $p<0,05$ ) em comparação aos respectivos controles tratados com cocaína (Fig 44).



**Fig. 44. Avaliação de animais  $CASP1^{-/-}$  na sensibilização comportamental.** (A) Distância total percorrida por animais machos tratados com salina e cocaína no teste de sensibilização comportamental [fator tratamento e genótipo ( $F_{(6,275)}=35,14$ ;  $p<0,0001$ ), fator tempo ( $F_{(18,275)}=270,4$ ;  $p<0,0001$ ), interação ( $F_{(3,270)}=35,14$ ;  $p<0,0001$ )].  $N=8-12$  por grupo. (B) Distância total percorrida por animais fêmeas tratadas com salina e cocaína no teste de sensibilização comportamental [fator tratamento e genótipo ( $F_{(3,252)}=14,26$ ;  $p<0,0001$ ), fator tempo ( $F_{(6,252)}=21,85$ ;  $p<0,0001$ ), interação ( $F_{(18,252)}=14,26$ ;  $p<0,0001$ )].  $N=9-14$  por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$  e \* $p<0,05$  entre os grupos WT + cocaína e  $CASP1^{-/-}$  + cocaína.

#### 4.14.3 Animais NLRP3<sup>-/-</sup> e CASP1<sup>-/-</sup> e não apresentam diferenças na CPP induzido pela cocaína

Com o objetivo de avaliar a participação da via NLRP3/CASP1/IL-1 $\beta$  na CPP induzida por cocaína, animais NLRP3<sup>-/-</sup> e CASP1<sup>-/-</sup> ou WT foram submetidos a este protocolo experimental. A cocaína aumentou a taxa de preferência do compartimento pareado com a droga ( $p < 0,0001$  entre os grupos salina + veículo e cocaína + veículo). Porém a deleção genética de NLRP3 e CASP1 não alterou esse comportamento induzido pelo psicoestimulante. (Fig 45).

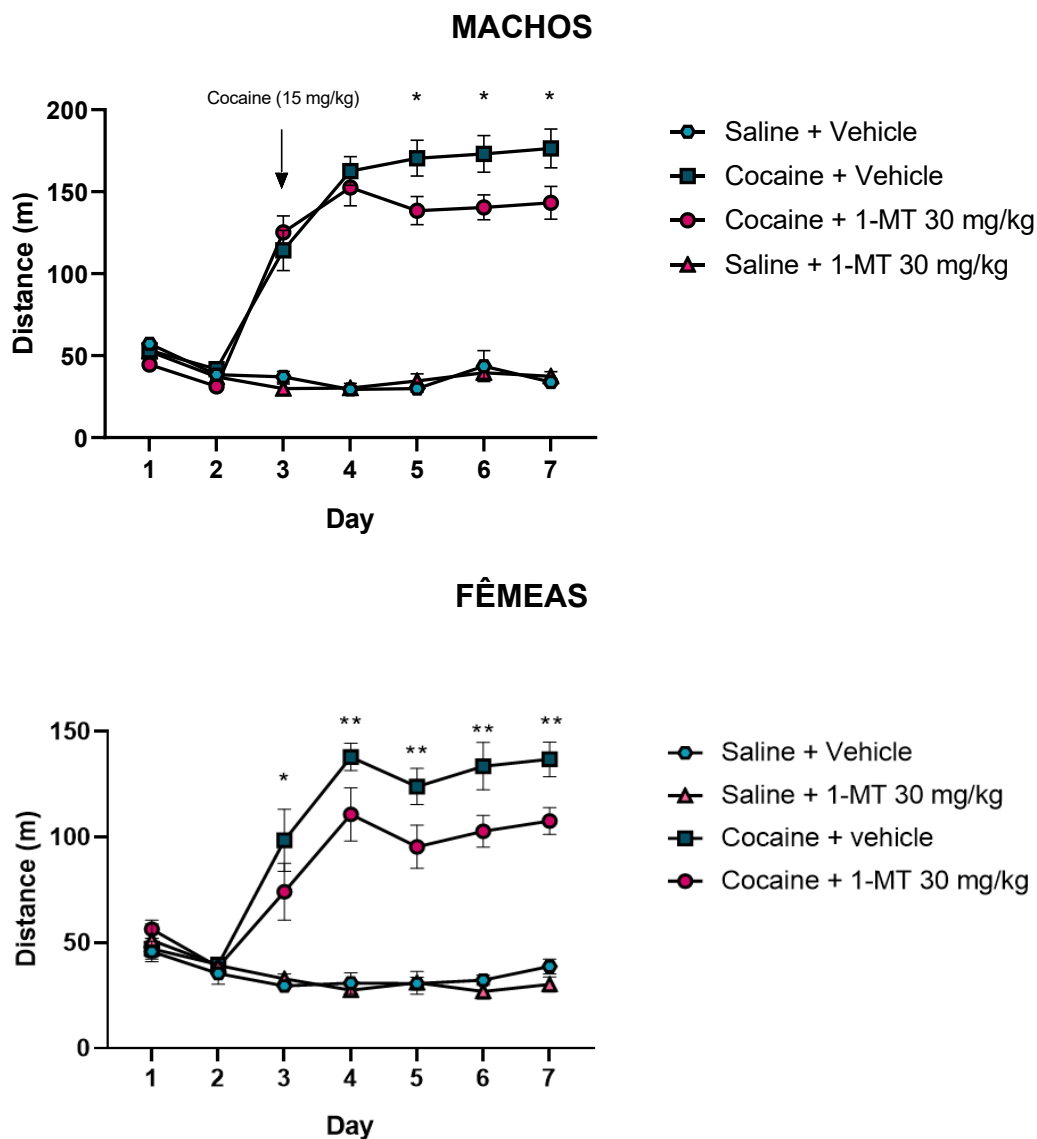


**Fig. 45. Avaliação de animais NLRP3<sup>-/-</sup> e CASP1<sup>-/-</sup> na CPP.** Taxa de preferência de animais tratados com salina e cocaína na CPP [fator cocaína ( $F_{(1,41)}=34.32$ ;  $p < 0,0001$ ), fator genótipo CASP1<sup>-/-</sup> ( $F_{(1,41)}=0.37$ ;  $p=0,54$ ), interação ( $F_{(1,41)}=0.489$ ;  $p=0,0488$ ) e [fator cocaína ( $F_{(1,47)}=37.20$ ;  $p < 0,0001$ ), fator genótipo NLRP3<sup>-/-</sup> ( $F_{(1,47)}=0.156$ ;  $p=0,694$ ), interação ( $F_{(1,47)}=0.0015$ ;  $p=0,96$ )]. N=9-15 por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Newman-Keuls. ##### $p < 0,0001$  entre os grupos cocaína + veículo e salina + veículo no CPP.

## 4.15 Participação da via IDO nas alterações comportamentais induzidas por cocaína

### 4.15.1 O tratamento com 1-MT, inibidor da IDO, diminuiu a sensibilização comportamental induzida por cocaína em camundongos machos e fêmeas

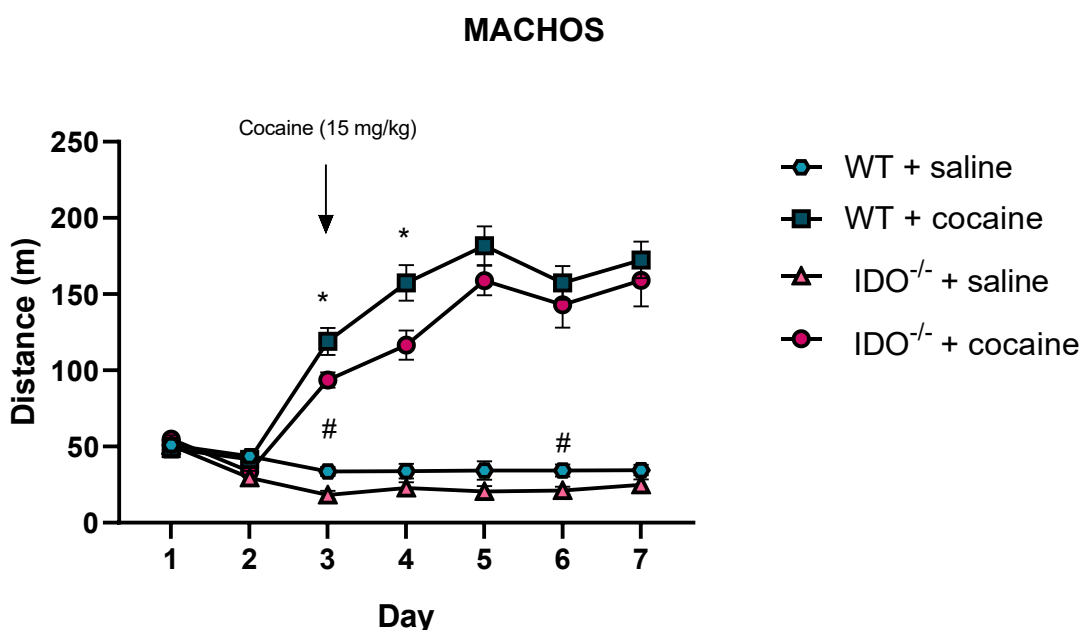
Para avaliar o papel da IDO na sensibilização comportamental induzida por cocaína, camundongos machos e fêmeas foram tratados com 1-MT (30 mg/kg) ou veículo, todos os 7 dias do protocolo experimental, 30 min antes do início do experimento. A cocaína aumentou a atividade locomotora dos animais de ambos os sexos ( $p < 0,0001$ ). Em relação aos machos, esse efeito foi reduzido pelo 1-MT nos dias 5, 6 e 7 ( $p < 0,05$ ). Já em relação às fêmeas, o 1-MT foi capaz de reduzir os efeitos da cocaína todos os dias (Fig 46).



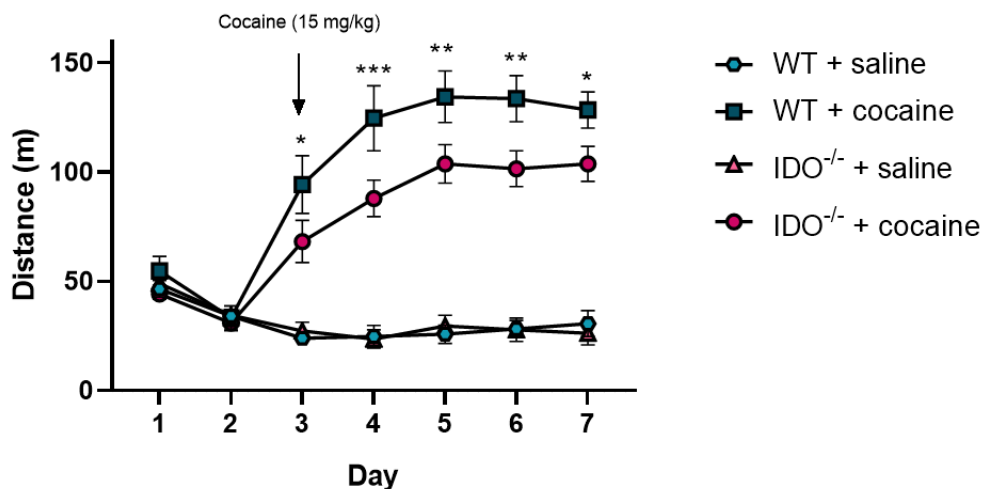
**Fig. 46. Avaliação de animais tratados com 1-MT na sensibilização comportamental. (A)** Distância total percorrida por animais machos tratados com salina e cocaína no teste de sensibilização comportamental [fator tratamento e genótipo ( $F_{(6,243)}=302,6$ ;  $p<0,0001$ ), fator tempo ( $F_{(3,243)}=302,6$ ;  $p<0,0001$ ), interação ( $F_{(18,243)}=18,243$ ;  $p<0,0001$ )]. N=8-12 por grupo. **(B)** Distância total percorrida por animais fêmeas tratadas com salina e cocaína no teste de sensibilização comportamental [fator tratamento e genótipo ( $F_{(6,141)}=12,55$ ;  $p<0,0001$ ), fator tempo ( $F_{(18,141)}=8,293$ ;  $p<0,0001$ ), interação ( $F_{(3,141)}=118,1$ ;  $p<0,0001$ )]. N=4-7 por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*\* $p<0,01$  e \* $p<0,05$  entre os grupos WT + cocaína e 1-MT<sup>-</sup> + cocaína.

#### 4.15.2 Camundongos IDO<sup>-/-</sup> machos e fêmeas apresentam uma diminuição da resposta aguda a cocaína na sensibilização comportamental

Para corroborar os experimentos do tratamento com 1-MT, camundongos IDO<sup>-/-</sup> machos e fêmeas foram submetidos a sensibilização comportamental induzida por cocaína. A cocaína aumentou a atividade locomotora em ambos os sexos ( $p<0,0001$ ). Camundongos IDO<sup>-/-</sup> machos apresentaram uma diminuição da resposta à cocaína nos dias 2 e 3 ( $p<0,05$ ). É importante ressaltar que camundongos IDO<sup>-/-</sup> machos aparentam ter uma locomoção basal menor que os camundongos WT, uma vez que nos dias 3 e 6 houve diferença estatística entre os grupos WT + salina e IDO<sup>-/-</sup> + salina. As fêmeas IDO<sup>-/-</sup> apresentaram uma menor atividade locomotora durante todo o teste comportamental (Fig 47).



## FÊMEAS

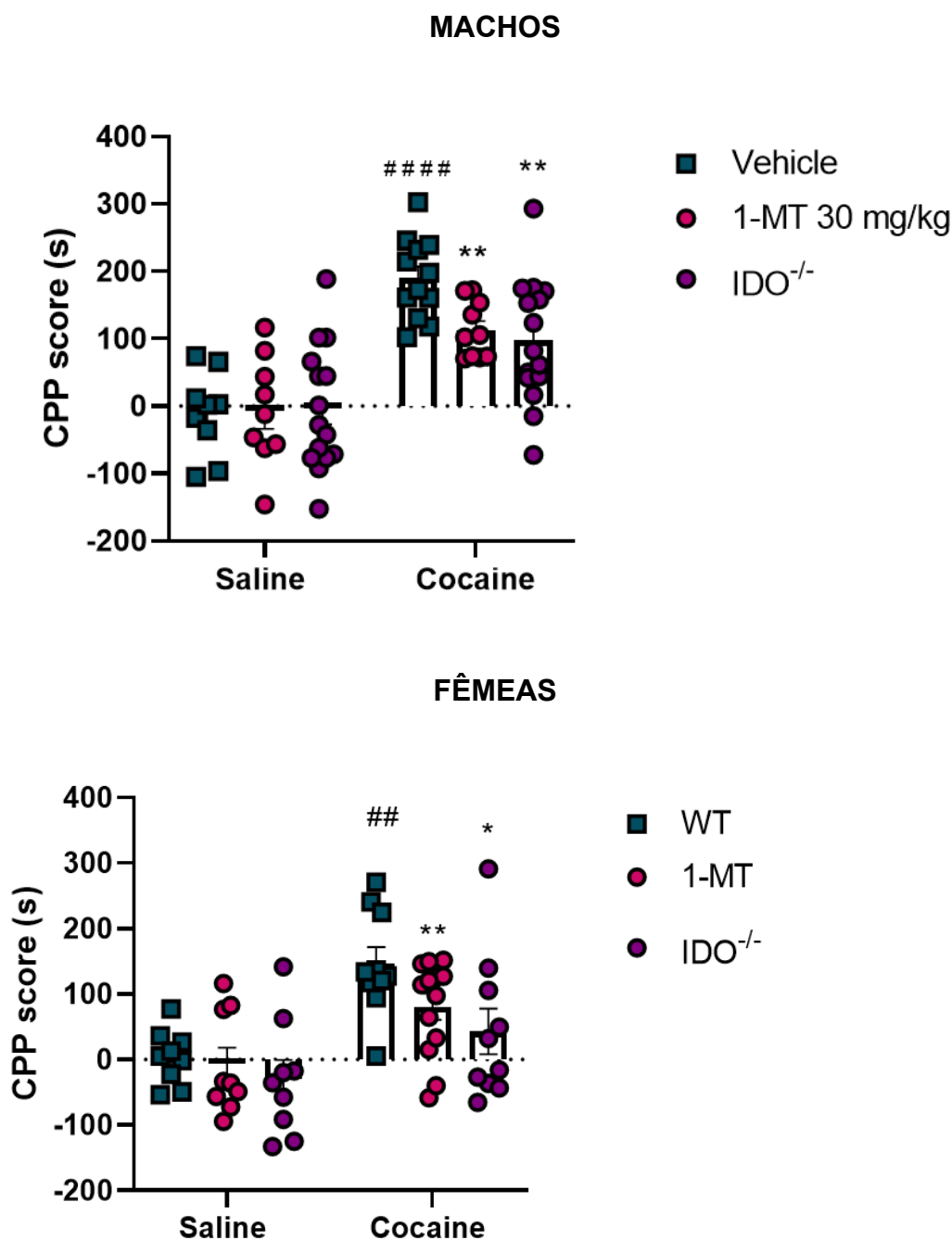


**Fig. 47 Avaliação de animais IDO<sup>-/-</sup> na sensibilização comportamental. (A)** Distância total percorrida por animais machos tratados com salina e cocaína no teste de sensibilização comportamental [fator tratamento e genótipo ( $F_{(6,257)}=31,90$ ;  $p<0,0001$ ), fator tempo ( $F_{(6,257)}=238,8$ ;  $p<0,0001$ ), interação ( $F_{(18,257)}=17,61$ ;  $p<0,0001$ )]. N=8-12 por grupo. **(B)** Distância total percorrida por animais fêmeas tratadas com salina e cocaína no teste de sensibilização comportamental [fator tratamento e genótipo ( $F_{(3,244)}=147,0$ ;  $p<0,0001$ ), fator tempo ( $F_{(6,244)}=16,62$ ;  $p<0,0001$ ), interação ( $F_{(18,244)}=10,71$ ;  $p<0,0001$ )]. N=7-11 por grupo. os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Newman-Keuls. \*\* $p<0,01$  e \* $p<0,05$  entre os grupos WT + cocaína e IDO<sup>-/-</sup> + cocaína.

#### 4.15.3 Camundongos machos e fêmeas tratados com 1-MT ou IDO<sup>-/-</sup> apresentam uma diminuição da taxa de preferência induzida por cocaína

Para avaliar o papel da IDO na CPP induzida por cocaína, camundongos machos e fêmeas foram tratados com 1-MT (30 mg/kg) ou veículo, todos os 8 dias do protocolo experimental, 30 min antes do início do experimento. A cocaína aumentou a taxa de preferência ( $p<0,0001$ ), efeito que foi reduzido pelo tratamento com 1-MT tanto nos camundongos machos quanto fêmeas ( $p<0,05$ ).

Além disso, para corroborar os experimentos do tratamento com 1-MT, camundongos machos e fêmeas IDO<sup>-/-</sup> foram submetidos a CPP induzida por cocaína. A cocaína aumentou a taxa de preferência em ambos os sexos ( $p<0,01$ ). Camundongos IDO<sup>-/-</sup> machos e fêmeas apresentaram uma diminuição da taxa de preferência induzida cocaína em comparação aos WT ( $p<0,01$ ) (Fig 48).



**Fig. 48. Avaliação de camundongos  $IDO^{-/-}$  na CPP. (A)** Taxa de preferência de animais machos tratados com salina e cocaína na CPP [fator cocaína ( $F_{(1,36)}=66.06$ ;  $p<0,0001$ ), fator 1-MT ( $F_{(1,36)}=3.394$ ;  $p=0,00737$ ), interação ( $F_{(1,36)}=4.171$ ;  $p=0,048$ ) e [fator cocaína ( $F_{(1,47)}=42.01$ ;  $p<0,0001$ ), fator  $IDO^{-/-}$  ( $F_{(1,47)}=3.352$ ;  $p=0,0735$ ), interação ( $F_{(1,47)}=4.617$ ;  $p=0,0368$ ].  $N=12-16$  por grupo. **(B)** Taxa de preferência de animais fêmeas tratadas com salina e cocaína na CPP [fator cocaína ( $F_{(1,36)}=34.32$ ;  $p<0,0001$ ), fator 1-MT ( $F_{(1,36)}=4.8666$ ;  $p=0,03$ ), interação ( $F_{(1,36)}=2.871$ ;  $p=0,09$ ) e [fator cocaína ( $F_{(1,33)}=18.99$ ;  $p<0,0001$ ), fator genótipo ( $F_{(1,33)}=8.267$ ;  $p=0,007$ ), interação ( $F_{(1,33)}=2.582$ ;  $p=0,1176$ ].  $N=9-13$  por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de

Newman-Keuls. \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  entre os grupos cocaína + veículo e cocaína + 1-MT ou IDO<sup>-/-</sup> no CPP ##### $p < 0,0001$  entre os grupos cocaína + veículo e salina + veículo no CPP.

## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, demonstramos que a micróglia e algumas vias de sinalização associadas a respostas imunológicas modulam as alterações comportamentais, bioquímicas e histológicas induzidas por cocaína.

Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo, demonstramos que a depleção parcial de micróglia reduziu a sensibilização induzida por cocaína, sem alterar a CPP. Além disso, demonstramos que as células remanescentes apresentavam uma maior razão corpo celular / tamanho da célula, o que sugeriria uma maior ativação celular. Assim, com o objetivo de refinar a análise relacionada ao número de células e à ativação microglial, realizamos tanto a análise de sholl, um importante método para verificação de aspectos morfológicos das células, quanto a avaliação de CD68, um marcador de células com atividade fagocítica. Observamos um aumento na expressão de CD68 tanto em camundongos tratados com PLX3397 quanto tratados com cocaína, o que sugere um estado alterado de ativação microglial em animais submetidos à depleção parcial ou exposição à cocaína. De forma semelhante, Bennet et al. (2018) e Spiller et al. (2018) também observaram uma regulação positiva de CD68 em animais tratados com PLX3397 (Bennett et al., 2018; Spiller et al., 2018), enquanto Liao e colaboradores (2016) também encontraram um aumento de CD68 após 7 dias de tratamento com a cocaína. Com relação à análise de sholl, observamos que, além do número de células do grupo tratado com o PLX3397 e cocaína ser menor que o tratado apenas com a droga de abuso (dados prévios), os parâmetros morfológicos também são diferentes. O PLX aumentou o número de interseções e o comprimento dos ramos.

A micróglia possui um amplo espectro de fenótipos (Ransohoff, 2016; Sankowski et al., 2019), sendo que modificações morfológicas estão relacionadas a alterações na função da célula (Helmut et al., 2011b; Pannell et al., 2014; Scheffel et al., 2012). É possível que as características bioquímicas das células remanescentes fossem distintas, uma vez que essas possuem moléculas importantes para a fagocitose dos

restos das células depletadas. Isso sugere que as células restantes provavelmente estão desempenhando um papel diferente no NAc de camundongos tratados com PLX3397.

Curiosamente, a astrogliose foi observada nos mesmos grupos em que houve microgliose, o que sugere que a depleção da micróglia pode afetar a atividade de outras células. Na verdade, o papel dos astrócitos no processo de adicção precisa ser melhor investigado em estudos futuros, uma vez que estas células também apresentam uma heterogeneidade na morfologia, identidade molecular e funções (Nguyen et al., 2020).

A alteração do padrão de ativação microglial poderia estar associada à alteração na produção de mediadores inflamatórios. De fato, a cocaína diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-10 no hipocampo e no PFC, respectivamente. Uma vez que um aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  prejudica a memória dependente do hipocampo, mesmo pequenas alterações dessa citocina induzidas pela cocaína podem induzir um aumento de LTP nesta região (Werneburg et al., 2017). Além disso, os usuários de cocaína apresentam níveis séricos de IL-10 mais baixos (Moreira et al., 2016). Apesar dos resultados, não podemos descartar o papel dessas citocinas e das outras que não apresentaram diferenças nos níveis, pois esses resultados podem ser decorrentes do momento em que esses mediadores foram avaliados. Considerando que as citocinas possuem cinéticas diferentes e também existe uma interação entre elas (Khandare et al., 2017; Kumolosasi et al., 2014; Walter and Crews, 2017), é possível que sua contribuição para o comportamento de sensibilização tenha sido anterior ao momento em que foram avaliados.

A via CX3CL1-CX3CR1 é importante para a neuroinflamação, plasticidade sináptica e neurogênese uma vez que pode contribuir para as alterações neuronais induzidas por cocaína (Linker et al., 2020; Montesinos et al., 2020). No presente estudo, o grupo tratado com cocaína que apresentava depleção parcial da micróglia revelou níveis aumentados de CX3CL1 em comparação com o grupo tratado apenas com cocaína. De forma interessante, houve uma correlação entre os níveis de CX3CL1 e a sensibilização comportamental. Além disso, o receptor (CX3CR1) foi reduzido no hipocampo. Num estudo em que 30% das células foram depletadas, não foi observada diferença na expressão de CX3CR1 (Bennett et al., 2018). Por outro

lado, a depleção de 90% das células com PLX3397 diminuiu a expressão de CX3CR1 (Coleman et al., 2020; Walter and Crews, 2017). O aumento do CX3CL1 poderia ser um efeito compensatório em resposta à redução do CX3CR1, o que poderia manter a sinalização. A modulação desta via pode contribuir para a compreensão dos efeitos do PLX3397 no modelo de sensibilização. Foi demonstrado que a aplicação de CX3CL1 no hipocampo prejudica a LTP e a transmissão glutamatérgica (Bertollini et al., 2006; Maggi et al., 2009; Ragozzino et al., 2006), enquanto a deficiência de CX3CR1 prejudica a plasticidade sináptica (Garré et al., 2017; Rogers et al., 2011). O comprometimento desta via de sinalização observado em animais tratados com PLX3397 poderia levar a uma redução nas alterações sinápticas e comportamentais induzidas pela cocaína. No entanto, o papel desta via na adicção por cocaína precisa ser mais investigado em estudos futuros.

Além das citocinas, fatores neurotróficos estão altamente envolvidos na plasticidade sináptica e poderiam explicar, pelo menos em parte, o papel da micróglia na adicção por cocaína. Observamos que a cocaína reduziu os níveis de BDNF no hipocampo. Corroborando os nossos resultados, foi demonstrado que a administração repetida de cocaína leva a uma redução deste fator neurotrófico no hipocampo (Harvey et al., 2019; Zilkha et al., 2014). Embora os efeitos da cocaína nos níveis deste mediador sejam complexos e específicos da região (Li and Wolf, 2015), sabe-se que a sinalização BDNF-TrkB está envolvida em eventos plásticos associados às drogas, como a indução da formação de espinhas dendríticas (Anderson et al., 2017; Ka et al., 2016; Lobo et al., 2010; Otis et al., 2014). Nesse contexto, a diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo induzida pela cocaína no presente estudo poderia estar relacionada à função sináptica aberrante (Anderson et al., 2017; Rich et al., 2019).

É importante mencionar que a micróglia é uma fonte importante de BDNF, especialmente após a exposição à cocaína (Cotto et al., 2018), e como observamos que a depleção parcial da microglia reduziu os níveis de BDNF tanto nos grupos de cocaína ou salina, é possível que a redução desse fator neurotrófico tenha contribuído para o comprometimento das alterações plásticas induzidas pela cocaína, o que poderia explicar a diminuição da sensibilização comportamental encontrada no presente estudo.

Como mencionado anteriormente, o papel da sinalização TrkB-BDNF pode variar dependendo da região no contexto da dependência de drogas (Anderson et al., 2017; Ka et al., 2016; Lobo et al., 2010; Otis et al., 2014), embora isso não seja totalmente compreendido. No PFC, observamos que a cocaína diminuiu os níveis de mRNA de TrkB, um efeito que foi evitado pela depleção parcial da micróglia. A administração de cocaína diminuiu os níveis de BDNF e a densidade sináptica no PFC, afetando a sinalização glutamatérgica corticoestriatal. Além disso, a microinfusão de BDNF nesta região pode restaurar essa sinalização e reverter alterações comportamentais induzidas pela cocaína (Barry and McGinty, 2017; Berglind et al., 2009; Fumagalli et al., 2007; Go et al., 2016; Rasakham et al., 2014). Nesse sentido, a reversão dos níveis de BDNF induzidos pela depleção parcial da micróglia poderia contribuir para a redução da sensibilização comportamental.

A cocaína diminuiu os níveis de GDNF e NGF no PFC, porém poucos estudos investigaram a participação dessas neurotrofinas na SUD. Já foi demonstrado que a administração de cocaína diminuiu os níveis de GDNF, enquanto a infusão deste fator na VTA reverteu a CPP (Green-Sadan et al., 2003; Messer et al., 2000), e a autoadministração induzida por cocaína (Green-Sadan et al., 2003; Messer et al., 2000). Além disso, a cocaína inibiu o crescimento de neuritos induzidos por NGF em células P12 via D1 (Zachor et al., 1994, 2000). Por fim, usuários de cocaína apresentam uma diminuição nos níveis séricos de NGF (Angelucci et al., 2007).

O papel da neurogênese na SUD ainda não é muito bem compreendido. Assim, para investigar melhor as alterações induzidas pela depleção de cocaína e micróglia, avaliamos células DCX<sup>+</sup>. Em condições fisiológicas, a micróglia é responsável pelo suporte trófico para a neurogênese do hipocampo adulto (Yang et al., 2016). Nesse sentido, a diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo induzida pela depleção parcial da micróglia encontrada no presente estudo pode levar à diminuição das células DCX<sup>+</sup> apenas em animais tratados com solução salina, uma vez que a interrupção da sinalização do BDNF está associada à diminuição da neurogênese (Miao et al., 2018; Shih et al., 2016). De acordo com nossos dados, foi observada uma diminuição no número total de neuroblastos após depleção parcial da micróglia pela toxina diftérica (Kreisel et al., 2019). Contudo, a falta de efeito da depleção da micróglia nos animais tratados com cocaína sugere que outros mecanismos podem estar envolvidos como as alterações na sinalização CX3CR1-CX3CL1 nestes animais.

Por fim, avaliamos alguns componentes do sistema dopaminérgico devido à sua importância no transtorno por uso de cocaína. Essa droga de abuso diminuiu a expressão de D5 no estriado e no hipocampo, além de diminuir a expressão de DAT no estriado. O efeito da cocaína na expressão de DAT também foi avaliada por outros estudos que sugeriram que esta diminuição pode estar relacionada com o comportamento de busca pela droga (Ferris et al., 2015; Sharpe et al., 1991; Siciliano et al., 2016). Além disso, a sinalização da dopamina através do receptor D5 é importante para alterações comportamentais induzidas pela cocaína (Freeman et al., 2010; Karlsson et al., 2008). No entanto, o papel do DAT e do D5 na adicção ainda não está muito bem estabelecido.

A cocaína aumentou a expressão de D2 no estriado, enquanto a depleção parcial da micróglia teve o efeito oposto. O aumento dos receptores D2 induzido por drogas de abuso também foi demonstrado em outros estudos (Briand et al., 2007; Novak et al., 2010). Da mesma forma, o knockdown ou bloqueio farmacológico de D2 pode diminuir as alterações comportamentais induzidas pela cocaína (Chausmer et al., 2002; Linker et al., 2020; Reguilón et al., 2017; Welter et al., 2007).

Dessa forma, a cascata de sinalização de D2, juntamente com CX3CL1, são necessárias para o aumento da autoadministração de cocaína e da ativação microglial induzida pela nicotina (Linker et al., 2020). Além disso, a sinalização BDNF-TrkB em neurônios que expressam preferencialmente D2 é necessária para comportamentos que caracterizam a adicção (Castrén and Antila, 2017). Nesse contexto, as alterações na expressão de D2, nos níveis de CX3CL1 e BDNF induzidas pela associação entre depleção parcial da micróglia e cocaína encontradas no presente estudo, poderiam estar relacionadas com a diminuição da sensibilização comportamental nesses animais. Assim, nossos resultados corroboram a literatura, demonstrando o importante papel da micróglia nas alterações comportamentais e neurais induzidas pela cocaína.

A atividade das células microgliais pode modificar os mecanismos moleculares e as alterações comportamentais induzidas pelos psicoestimulantes. A inibição da ativação microglial pela minociclina, um antibiótico tetraciclina amplamente utilizado como inibidor microglial, reverte a sensibilização comportamental, a CPP e a liberação de dopamina no NAc induzidas pela cocaína (Chen et al., 2009; Northcutt et al., 2015).

Além disso, a minociclina também altera a recompensa da cocaína após a exposição à nicotina e à morfina (Linker et al., 2020; Taylor et al., 2016). O ibudilast, um inibidor da PDE4 e modulador glial, reduz a procura e o craving por cocaína em ratos e humanos (Metz et al., 2017; Mu et al., 2021; Poland et al., 2016). Além disso, no presente estudo observamos que a depleção da micróglia com o inibidor de CSF-1 PLX3397 diminuiu as alterações comportamentais induzidas pela cocaína. No entanto, o papel da micróglia na adicção induzida por cocaína necessita de mais estudos, pois alguns resultados são controversos. Por exemplo, a redução do número microglial e da atividade induzida pela minociclina, PLX3397, GW2580 ou Mac-1-saporina não teve efeito na CPP induzida pela cocaína (Lo Iacono et al., 2018; Taylor et al., 2016).

Estudos avaliaram a capacidade dos psicoestimulantes ativarem, de forma direta, os receptores TLR, uma família de PPRs presentes na micróglia. Estes podem promover a translocação de fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B, para o núcleo e consequente ativação dessas células e liberação de fatores neurotróficos ou citocinas que modificam elementos pré e pós sinápticos (Prieto and Cotman, 2017; Russo et al., 2009; K. Zhang et al., 2020). Por exemplo, a ativação do receptor TLR4 induz a produção de diferentes citocinas inflamatórias, como, por exemplo, a IL-1 $\beta$ , que é produzida na sua forma inativa, a pró-IL-1 $\beta$ . Sua maturação, seguida de sua secreção, necessita da ativação do complexo NLRP3, que leva a maturação da caspase-1 e esta, conseqüentemente, promove a maturação de pró-IL-1 $\beta$  para IL-1 $\beta$ . Nesse sentido, estudos recentes demonstraram que a cocaína aumenta a expressão de NLRP3 e a formação de IL-1 $\beta$  nas células microgliais (Liu et al., 2020; J. Yang et al., 2020). Além disso, processos neuroinflamatórios são capazes de ativar a via IDO, cujos metabólitos promovem alterações nas vias glutamatérgica e dopaminérgica, e consequente alterações comportamentais (Lucido et al., 2021). A ativação da via TLR4/NF-KB e do inflamassoma são capazes de modular a ativação da IDO microglial, levando a comportamento tipo-depressivo (Hemmati et al., 2019b; J. Zhang et al., 2020; S. Zhang et al., 2020). Nesse sentido, alguns poucos estudos demonstraram a possível participação desta via no transtorno por uso de álcool e cocaína (Vengeliene et al., 2016).

Estudos *in silico* que avaliaram por *docking* e ligação competitiva, demonstraram que a cocaína é capaz de se ligar diretamente no complexo domínio

do fator de diferenciação mielóide clássico 2 (MD-2)/TLR4 (Northcutt et al., 2015). De forma adicional, a exposição à cocaína aumenta a expressão de TLR4 em células microgliais BV-2 de maneira dose dependente (Periyasamy et al., 2018), bem como os demais componentes da via desse receptor – MyD88, IRAK1, TRAF6 e NF-κB. Além disso, a expressão cerebral de TLR4 é maior em camundongos que autoadministraram cocaína do que naqueles que o fazem com solução salina (Brown et al., 2018a; Periyasamy et al., 2018), indicando uma regulação positiva da sinalização de TLR4 pela exposição à cocaína. Além de mediar a ativação microglial e a liberação de citocinas após o tratamento com cocaína, a ativação de TLR4 pela cocaína também é importante para o aumento dos níveis de dopamina no NAc induzido por este psicoestimulante (Brown et al., 2018a; de Oliveira et al., 2016; Northcutt et al., 2015; Periyasamy et al., 2018). Nesse sentido, uma vez que a sensibilização comportamental é caracterizada por neuroadaptações principalmente do sistema dopaminérgico da via mesocorticolímbica, a modulação da sinalização de TLR4 parece ser extremamente importante para essa alteração comportamental induzida pela cocaína. De fato, a deleção do TLR4 diminuiu a atividade dos neurônios dopaminérgicos e diminuiu expressão da tirosina hidroxilase (TH) no VTA, que regula a concentração de dopamina no NAc, além de alterar a fosforilação de DARPP 32 e os níveis de BDNF nas regiões límbicas (Femenia et al., 2018; Li et al., 2021).

No presente estudo, demonstramos que a modulação do receptor TLR4 participa da sensibilização comportamental induzida pela cocaína, mas não da CPP. A pré-ativação do receptor TLR4, utilizando um agonista tendencioso, foi capaz de reduzir a sensibilização comportamental. Além disso, utilizando ferramentas genéticas, demonstramos que o nocauteamento do receptor TLR4 aumentou a sensibilização comportamental, o que corrobora nossos dados farmacológicos.

O antagonismo dos receptores TLR4 pelo uso de (+)-naloxona e (+)-naltrexona inibiram o desenvolvimento de CPP e autoadministração de cocaína, respectivamente (Northcutt et al., 2015). A injeção intra-VTA de LPS de *Rhodobacter sphaeroides*, um antagonista de TLR4, também diminuiu a procura de cocaína em um modelo de comportamento semelhante à recaída (Brown et al., 2018a). Além disso, dependendo da dose, camundongos TLR4<sup>-/-</sup> não desenvolvem CPP e hiperlocomoção aguda induzida pela cocaína (Kashima and Grueter, 2017), enquanto camundongos C3H/HeJ que possuem uma mutação que impede a ativação da via TLR4-NFκB

apresentam uma diminuição de autoadministração de cocaína (Northcutt et al., 2015). Por outro lado, a ativação de TLR4 pelo LPS resultou em sensibilização locomotora induzida pela cocaína com uma dose sub efetiva de cocaína (Tortorelli et al., 2015). A ativação de TLR4 através da injeção de LPS na VTA também foi suficiente para restabelecer a procura de cocaína (Brown et al., 2018b). A exendina-4, um análogo do peptídeo 1 semelhante ao glucagon, diminuiu o TLR4, o TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , bem como o CPP induzido pela cocaína (Zhu et al., 2021). Além disso, vesículas extracelulares carregadas com miR-124 inibiram a sinalização de TLR4 mediada por cocaína e a ativação microglial (Chivero et al., 2020).

Apesar dos dados parecerem contraditórios, uma vez que o MPLA teve efeito protetor apesar de ativar o receptor TLR4, é importante ressaltar que “como” aquele receptor está sendo ativado ou inibido é crucial para a resposta intracelular que será desencadeada. O MPLA, por ser um agonista tendencioso, possui menor atividade de sinalização MyD88 dependente, enquanto a sinalização TRIF dependente é semelhante a resposta LPS (Cekic et al., 2009; Mata-Haro et al., 2007). Portanto, o MPLA apresenta respostas imunes substancialmente menos pró-inflamatórias que o LPS devido à diferença na magnitude dos níveis de citocinas, apesar delas apresentarem a mesma cinética (Mata-Haro et al., 2007), o que pode conferir ao MPLA um efeito neuroprotetor. Por exemplo, o MPLA suprime a ativação de NLRP3 (Embry et al., 2011).

Corroborando nosso resultado, Lewitus et al. (2016) demonstraram que a administração de MPLA durante o período de abstinência da cocaína é capaz de diminuir a hiperlocomoção induzida durante a reexposição (Lewitus et al., 2016). O tratamento com MPLA, em camundongos tratados com morfina, imitou a plasticidade sináptica que ocorre durante o período de abstinência ao reduzir a relação AMPA/NMDA (Valentinova et al., 2019). De forma interessante, a ativação do receptor TLR4 utilizando o MPLA também foi neuroprotetora em modelos de doenças de Alzheimer e Parkinson. Um efeito oposto ao observado quando o TLR4 é ativado pelo seu agonista pleno, o LPS (Michaud et al., 2013; Venezia et al., 2017). Também observamos que animais TLR4<sup>-/-</sup> apresentam um aumento da sensibilização comportamental induzida pela cocaína. De forma semelhante, Lewitus et al. (2016) demonstraram que animais TNF<sup>-/-</sup> também apresentam um aumento da sensibilização

comportamental induzida pela cocaína, o que poderia ser justificado pela perda da neuroproteção induzida pela ativação microglia (Lewitus et al., 2016).

A diminuição da neuroinflamação mediada pelo TLR4 parece ser o mecanismo de ativação de outras substâncias para proteção contra alterações comportamentais induzidas por psicoestimulantes. Experimentos *in silico* mostraram que, semelhantes à cocaína, METH e AMPH são capazes de se ligar no complexo TLR4/MD-2 (Wang et al., 2019; X. Zhang et al., 2020). Na linhagem celular microglial BV2, a ativação induzida por METH e a liberação de citocinas foram mediadas pela via TLR4-NF- $\kappa$ B (Wan et al., 2017; T. Yang et al., 2020; Yu et al., 2019). Nesse sentido, a exposição ao METH aumenta a expressão de TLR4, bem como os demais componentes dessa sinalização como NF- $\kappa$ B, MAPK, p-p65, p-p38, Peli1 (Wan et al., 2017; T. Yang et al., 2020; Yu et al., 2019). Além disso, Wires et al. (2012) demonstraram que o METH pode aumentar a expressão de NF- $\kappa$ B na linhagem celular microglial CHME-5 (Wires et al., 2012), além de alterar a morfologia das células NR-9460, o METH também pode alterar a distribuição do TLR4 nas superfícies dessas células semelhantes à microglia (Vargas et al., 2020).

O aumento da ativação da sinalização TLR4 após exposição ao METH também foi encontrado *in vivo*. Yang et al. (2020) descobriram que a administração repetida de METH leva à ativação microglial e à regulação positiva de TLR4, TRIF, Peli1 e expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$  no cérebro de camundongos (T. Yang et al., 2020). Da mesma forma, Xie et al., (2018) encontraram aumento de TLR4, MyD88, TRAF6, NF $\kappa$ B, PARP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no corpo estriado de ratos (Xie et al., 2018). Da mesma forma, o tratamento com METH aumentou a expressão de TLR4 em astrócitos cultivados (Du et al., 2017), enquanto o silenciamento da expressão desse receptor usando siRNA eliminou a expressão de IL-1 $\beta$  e IL-18 induzida pela droga (Du et al., 2017). As evidências *in vivo* são consistentes com esses achados, pois camundongos pré-tratados com o inibidor de TLR4 TAK-242 mostraram expressão significativamente diminuída de IL-1 $\beta$  e IL-18 no corpo estriado induzido por METH (Du et al., 2017).

Significativamente, o bloqueio da expressão de TLR4 inibiu a neuroinflamação induzida por METH, o que poderia estar relacionado a alterações comportamentais induzidas pela droga (Du et al., 2017). Por exemplo, (+)-naloxona, um antagonista não opioide de TLR4, bloqueou a ativação microglial induzida por METH e a expressão de

IL-6 e aumentou a NAc dopamina e CPP induzida por METH (Wang et al., 2019). A injeção do antagonista clássico de TLR4, LPS-RS, também bloqueou o aumento na liberação de dopamina no NAc induzido por METH (Wang et al., 2019). Além disso, a minociclina inibiu a ativação microglial, bem como o aumento da expressão do TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$ , melhorando a memória de reconhecimento e o aprendizado espacial e os prejuízos de memória no teste de reconhecimento de objetos no labirinto aquático de Morris, respectivamente, induzidos por METH (Lwin et al., 2021; Sriram et al., 2006). Além disso, o ibudilast, o seu análogo amino AV1013 e a minociclina – que bloqueiam a atividade microglial – reduziram a autoadministração de METH (Snider et al., 2013). Outro estudo também mostrou que tanto o ibudilast quanto o AV1013 também bloquearam o desenvolvimento da sensibilização comportamental induzida pelo METH (Snider et al., 2012). Curiosamente, a minociclina bloqueou o desenvolvimento de hipersensibilidade locomotora às anfetaminas em outros modelos neuroinflamatórios (Drouin-Ouellet et al., 2011; Giovanoli et al., 2016). A minociclina preveniu o aumento da ativação microglial induzido pelo MDMA, outra anfetamina, bem como a ativação do NF- $\kappa$ B e a liberação de IL-1 $\beta$  no hipocampo, estriado e córtex frontal (Orio et al., 2010; Zhang et al., 2006).

Outros receptores da família TLR podem estar associados à ativação da micróglia mediada pela cocaína. A exposição de células microgliais à cocaína resultou no aumento da expressão de TLR2 com indução concomitante de ativação celular (Liao et al., 2016). Foi demonstrado que a cocaína induz a formação de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse do retículo endoplasmático e subsequente translocação do fator de transcrição ATF4 para o núcleo, o que induz a expressão de TLR2. Curiosamente, a sinalização ativada por este receptor poderia ser ainda mais estimulada pela cocaína, o que induziria a ativação da micróglia (Liao et al., 2016). A depleção farmacológica ou genética do TLR3 reduz alterações comportamentais induzidas pela cocaína, como CPP, autoadministração, atividade locomotora e vias necessárias para a ativação do NF- $\kappa$ B (Zhu et al., 2018). Por exemplo, o METH alterou a expressão de diferentes citocinas em macrófagos humanos, interferindo na via de sinalização TLR9 dependente de MyD88 (Burns and Ciborowski, 2016).

Os efetores da via TLR4 também podem desempenhar um papel nas alterações que ocorrem após a administração de cocaína. A administração crônica de cocaína aumenta os níveis do p105, um precursor da subunidade p50 de NF- $\kappa$ B, da

subunidade inibitória I $\kappa$ B-g p70 e da subunidade ativa do fator de transcrição NF- $\kappa$ B p65 (Ang et al., 2001).

A ativação do NF- $\kappa$ B aumenta o número de espinhas dendríticas nos neurônios do NAc. Por outro lado, a inibição do NF- $\kappa$ B impede o aumento das espinhas dendríticas após a administração de cocaína. Além disso, a inibição do NF $\kappa$ B bloqueia os efeitos recompensadores da cocaína e a capacidade da exposição anterior à cocaína de aumentar a preferência de um animal pela cocaína (Russo et al., 2009).

Foi demonstrado que o NF- $\kappa$ B está envolvido nas mudanças estruturais que medeiam a aprendizagem baseada na recompensa da cocaína em camundongos (Ang et al., 2001; Russo et al., 2009). De fato, a regulação positiva de múltiplos mediadores pró-inflamatórios e a ativação da micróglia foram detectadas em modelos animais de abuso de cocaína, o que poderia estar associado à ativação desse fator de transcrição (Bravo et al., 2023; da Silva et al., 2023).

A ativação da via TLR4 culmina na liberação de citocinas inflamatórias, como, por exemplo IL-1 $\beta$ , que está relacionada com processos de plasticidade sináptica e alterações comportamentais (Hoshino et al., 2021; Takemiya et al., 2017). Além disso, estudos recentes fornecem o envolvimento de outra família de PPRs na ativação microglial induzida pela cocaína, os receptores NLRs, mais especificamente o domínio NLRP3. Buscando entender o papel da via IL-1 $\beta$  nas alterações comportamentais induzidas pela cocaína, utilizamos animais CASP1<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>, uma vez que estas sinalizações são de extrema importância para a ativação da citocina de interesse. No presente estudo, observamos que animais CASP1<sup>-/-</sup> e NALP<sup>-/-</sup> apresentaram uma diminuição da sensibilização comportamental induzida pela cocaína. Chivero et al. (2021) demonstraram que o bloqueio farmacológico do NLRP3, bem como o silenciamento genético reverteu as alterações neurais e gliais induzidas pela cocaína (Chivero et al., 2021).

Além disso, camundongos KO para o CX3CR1, um receptor que no SNC é expresso exclusivamente por células microgliais, apresentaram um aumento da hiperlocomoção aguda e da CPP induzida pela cocaína, o que estava associado a maior atividade do NLRP3 nesses animais (Guo et al., 2021). Ademais, a inibição do aumento de IL-1 $\beta$  induzida pela cocaína na área tegmental ventral bloqueia o desenvolvimento da CPP e da autoadministração induzidas por este psicoestimulante (Northcutt et al., 2015). Assim, a ativação dessa sinalização neuroinflamatória nas

células microgлияis parece estar envolvida nas alterações comportamentais induzidas pela cocaína. De fato, estudos já têm demonstrado a participação dessa via em processos de neurotransmissão e plasticidade sináptica. Por exemplo, a injeção intracerebral de IL-1 $\beta$  induz aumentos significativos nos níveis de dopamina (Shintani et al., 1993), além de modificar processos de LTP (Schmid et al., 2009). Além disso, animais NLRP3<sup>-/-</sup> apresentam uma diminuição da ativação de neurônios piramidais na região CA1, particularmente na via colateral de Schaffer. Nesse sentido, a ausência dessa sinalização nos animais NLRP3<sup>-/-</sup> e CASP1<sup>-/-</sup> poderia estar relacionada com a diminuição das alterações neurais que caracterizam a sensibilização comportamental induzida pela cocaína observada no presente estudo (Komleva et al., 2021)

A ativação de D1 na micróglia induz a degradação do inflamassoma NLRP3 e preveniu a inflamação dependente do inflamassoma NLRP3 (T. Wang et al., 2018; Yan et al., 2015). A via NLRP3-Caspase-1 é um regulador negativo da LTP mediada por AMPAR (Lu et al., 2006). O inibidor do inflamassoma NLRP3 atenuou os déficits de LTP do hipocampo induzidos pelo envelhecimento, bem como elevou a expressão superficial de AMPAR e os níveis fosforilados de CaMKII e CREB (Wang et al., 2022). Além disso, as células microgлияis podem modular a plasticidade sináptica nos neurônios D1 após a exposição à cocaína, o que está relacionado com a sensibilização comportamental por esta droga (Lewitus et al., 2016).

Além disso, a ativação da micróglia e a liberação de marcadores inflamatórios induzidos por METH é mediada pelo NLRP3, o que foi prevenido pela inibição do NLRP3 (Du et al., 2019). METH aumentou a expressão de NLRP3 e a clivagem da caspase-1 no hipocampo de camundongos e na cultura de células semelhantes à micróglia (Du et al., 2019). METH também parece aumentar NLRP3, caspase-1 e IL-1  $\beta$  no cérebro de usuários de METH (Mahmoudiasl et al., 2019). É importante ressaltar que o bloqueio da expressão de TLR4 também bloqueou o aumento da caspase-1 induzido pelo METH (Du et al., 2017). A inibição da sinalização de IL-1 $\beta$  pode proteger contra alterações de memória induzidas por METH. Além disso, a quimiocina CCL7, que pode atuar como inibidor microglial, atenuou a CPP induzida pela METH através da sinalização do receptor D1 (Li et al., 2017; Saika et al., 2018).

A ativação dos receptores TLR4 e NLRP3, assim como as citocinas inflamatórias, são capazes de ativar a enzimaIDO, que participa do metabolismo do triptofano (Hemmati et al., 2019b; J. Zhang et al., 2020; S. Zhang et al., 2020). De forma simplificada, a ativação dessa enzima converte a produção do triptofano em

quinurenina, que é convertida em ácido quinolínico através da via da enzima quinurenina 3-monooxigenase (KMO), sendo esta ativada em contextos de neuroinflamação (Mithaiwala et al., 2021).

Diversos estudos demonstram que a ativação dessa via altera processos de neurotransmissão, levando a diversas desordens neurológicas e psiquiátricas (Lucido et al., 2021). No presente estudo, observamos que a inibição dessa via com o inibidor da IDO, o 1-MT, foi capaz de reverter a sensibilização comportamental e a CPP induzidas por cocaína em camundongos machos e fêmeas. Com o objetivo de corroborar os dados farmacológicos, também utilizamos camundongos machos e fêmeas IDO<sup>-/-</sup>. Na sensibilização comportamental, em relação aos machos, observamos que animais IDO<sup>-/-</sup> apresentam uma menor resposta aguda à cocaína que os animais WT, porém não houve diferença na resposta final, sendo esta uma resposta diferente dos animais tratados com o inibidor. Em relação às fêmeas, tanto os animais tratados com o 1-MT quanto os animais IDO<sup>-/-</sup> apresentam uma menor atividade locomotora durante todo o tratamento com cocaína.

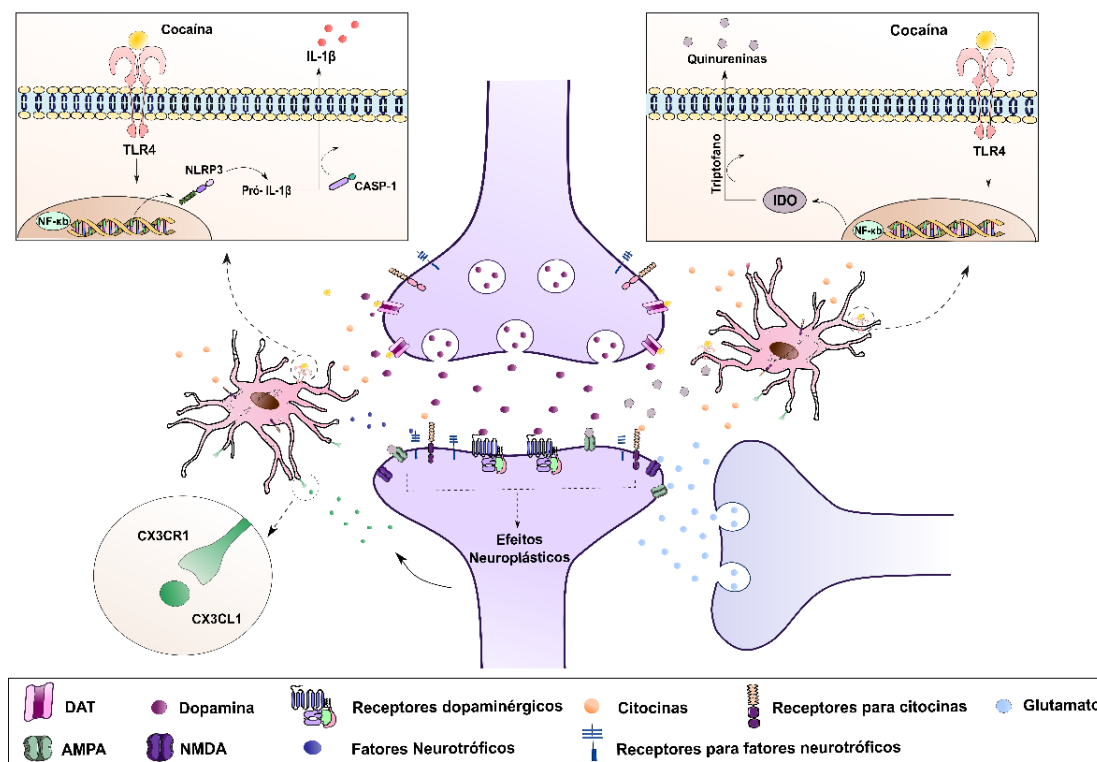
O ácido quinolínico, um dos principais metabólitos da via, atua como agonista do receptor NMDA (Saito et al., 1992), enquanto o ácido cinabarinico, outro metabólito da via, atua como agonista alostérico do receptor mGluR4 (Fazio et al., 2012). Assim, as disfunções na via glutamatérgica que ocorrem como consequente ativação dessa via poderiam estar relacionadas com as alterações neurais e comportamentais induzidas pela cocaína, uma vez que alterações na neurotransmissão glutamatérgica no PFC e no NAc parecem mediar comportamentos de busca pela droga, recaída, abstinência, entre outros (Fischer et al., 2021). Nesse sentido, estudos utilizando o RO 61-8048, um inibidor da KMO, demonstraram que esta droga é capaz de diminuir o comportamento de busca durante a reexposição a cocaína, apesar de não ter efeito autoadministração (Secci et al., 2017; Vengeliene et al., 2016). Além disso, Parkar et al., (2009) demonstraram que indivíduos com histórico de abuso de cocaína apresentam alterações no metabolismo do triptofano (Patkar et al., 2009).

Em suma, a compreensão do papel da micróglia e de suas citocinas na remodelação de circuitos neuronais, neurogênese, morte celular programada, plasticidade sináptica, sobrevivência e proliferação celular tem contribuído para a o entendimento de sua participação no neurodesenvolvimento e em doenças do SNC (Wu et al., 2015). Nesse sentido, estudos demonstram o importante papel da

neuroinflamação no desenvolvimento e progressão de diversas doenças neurológicas e psiquiátricas, ampliando então o leque de alvos farmacológicos no tratamento dessas patologias (Fatoba et al., 2020). Apesar disso, poucos estudos buscaram compreender qual seria o papel da neuroinflamação no transtorno por uso de substâncias. No presente trabalho, observamos que a manipulação de diferentes pontos de importantes vias inflamatórias é capaz de reverter ou piorar as alterações comportamentais induzidas pela cocaína. Dessa forma, nosso estudo contribui para um melhor entendimento da neuroinflamação na neurobiologia do abuso de drogas.

## **6. CONCLUSÃO**

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a cocaína é capaz de gerar uma neuroinflamação, ativando a micróglia e alterando as concentrações de citocinas e fatores neurotróficos. Nesse sentido, a modulação da atividade microglial se mostrou capaz de proteger das alterações moleculares e comportamentais que acontecem após a administração de cocaína. Além disso, nosso estudo sugere que a sinalização do receptor TLR4, da via NLRP3/CASP1/IL-1 $\beta$  e da via IDO parecem ser importantes vias de sinalização que modulam as alterações comportamentais induzidas pela cocaína (Fig 49). Porém são necessários mais estudos para uma melhor compreensão do papel da neuroinflamação no transtorno por uso de cocaína.



**Fig. 49: A cocaína pode, direta ou indiretamente, ativar a micróglia.** A cocaína aumenta dopaminérgicos e glutamatérgicos, levando à plasticidade neural. Além de induzir a liberação neuronal de ligantes que medeiam a ativação das células microgliais, como o CX3CL1. Em paralelo, uma ativação direta poderia ocorrer através da ligação da cocaína ao receptor microglial TLR4, levando a liberação de neurotrofinas e citocinas. Nesse sentido, a ativação do TLR4 poderia induzir a translocação do NF-κB para o núcleo e promover a liberação de diferentes citocinas, que, por sua vez, podem modular tanto a plasticidade sináptica quanto atividade neuronal. Por exemplo, liberação de IL-1B pela micróglia modula a sensibilização comportamental induzida pela cocaína.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, R.R., Madruga, C.S., Ribeiro, M., Pinsky, I., Caetano, R., Laranjeira, R., 2014. Prevalence of Cocaine Use in Brazil: Data from the II Brazilian National Alcohol and Drugs Survey (BNADS). *Addict. Behav.* 39, 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2013.10.019>
- Accogli, T., Hibos, C., Vegran, F., 2023. Canonical and non-canonical functions of NLRP3. *J. Adv. Res.* 53, 137–151. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2023.01.001>
- Anderson, E.M., Wissman, A.M., Chemplanikal, J., Buzin, N., Guzman, D., Larson, E.B., Neve, R.L., Nestler, E.J., Cowan, C.W., Self, D.W., 2017. BDNF-TrkB controls cocaine-induced dendritic spines in rodent nucleus accumbens

- dissociated from increases in addictive behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 9469–9474. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1702441114>
- Andrianarivelo, A., Saint-Jour, E., Walle, R., Trifilieff, P., Vanhoutte, P., 2019. Modulation and functions of dopamine receptor heteromers in drugs of abuse-induced adaptations. *Neuropharmacology* 152, 42–50. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2018.12.003>
- Ang, E., Chen, J., Zagouras, P., Magna, H., Holland, J., Schaeffer, E., Nestler, E.J., 2001. Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *J. Neurochem.* 79, 221–224. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2001.00563.X>
- Angelucci, F., Ricci, V., Pomponi, M., Conte, G., Mathé, A.A., Attilio Tonali, P., Bria, P., 2007. Chronic heroin and cocaine abuse is associated with decreased serum concentrations of the nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J. Psychopharmacol.* 21, 820–825. <https://doi.org/10.1177/0269881107078491>
- Araki, T., Ikegaya, Y., Koyama, R., 2020. The effects of microglia- and astrocyte-derived factors on neurogenesis in health and disease. *Eur. J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1111/ejn.14969>
- Araos, P., Vidal, R., O’Shea, E., Pedraz, M., García-Marchena, N., Serrano, A., Suárez, J., Castilla-Ortega, E., Ruiz, J.J., Campos-Cloute, R., Santín, L.J., Rodríguez de Fonseca, F., Pavón, F.J., Colado, M.I., 2019. Serotonin is the main tryptophan metabolite associated with psychiatric comorbidity in abstinent cocaine-addicted patients. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-53312-0>
- Argilli, E., Sibley, D.R., Malenka, R.C., England, P.M., Bonci, A., 2008. Mechanism and Time Course of Cocaine-Induced Long-Term Potentiation in the Ventral Tegmental Area. *J. Neurosci.* 28, 9092. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1001-08.2008>
- Aw, E., Zhang, Y., Carroll, M., 2020. Microglial responses to peripheral type 1 interferon. *J. Neuroinflammation* 17. <https://doi.org/10.1186/S12974-020-02003-Z>
- Bahraoui, E., Serrero, M., Planès, R., 2020. HIV-1 Tat - TLR4/MD2 interaction drives the expression of IDO-1 in monocytes derived dendritic cells through NF- $\kappa$ B dependent pathway. *Sci. Rep.* 10. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-64847-Y>
- Bailey, B.J., 1996. Looking back at a century of cocaine - Use and abuse. *Laryngoscope.* <https://doi.org/10.1097/00005537-199606000-00003>
- Barry, S.M., McGinty, J.F., 2017. Role of Src Family Kinases in BDNF-Mediated Suppression of Cocaine-Seeking and Prevention of Cocaine-Induced ERK, GluN2A, and GluN2B Dephosphorylation in the Prelimbic Cortex. *Neuropsychopharmacology* 42, 1972–1980. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.114>
- Bellinger, F.P., Madamba, S., Siggins, G.R., 1993. Interleukin 1 beta inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. *Brain Res.* 628, 227–234. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90959-Q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90959-Q)
- Bender, B.N., Torregrossa, M.M., 2020. Molecular and circuit mechanisms regulating

- cocaine memory. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 3745–3768. <https://doi.org/10.1007/S00018-020-03498-8>
- Bennett, R.E., Bryant, A., Hu, M., Robbins, A.B., Hopp, S.C., Hyman, B.T., 2018. Partial reduction of microglia does not affect tau pathology in aged mice. *J. Neuroinflammation* 15, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1348-5>
- Berglind, W.J., Whitfield, T.W., Lalumiere, R.T., Kalivas, P.W., Mcginty, J.F., 2009. A single intra-PFC infusion of BDNF prevents cocaine-induced alterations in extracellular glutamate within the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 29, 3715–3719. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5457-08.2009>
- Bertollini, C., Ragozzino, D., Gross, C., Limatola, C., Eusebi, F., 2006. Fractalkine/CX3CL1 depresses central synaptic transmission in mouse hippocampal slices. *Neuropharmacology* 51, 816–821. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.05.027>
- Bertot, C., Groc, L., Avignone, E., 2019. Role of CX3CR1 Signaling on the Maturation of GABAergic Transmission and Neuronal Network Activity in the Neonate Hippocampus. *Neuroscience* 406, 186–201. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2019.03.006>
- Bobadilla, A.C., Heinsbroek, J.A., Gipson, C.D., Griffin, W.C., Fowler, C.D., Kenny, P.J., Kalivas, P.W., 2017. Corticostriatal plasticity, neuronal ensembles, and regulation of drug-seeking behavior, in: *Progress in Brain Research*. Elsevier B.V., pp. 93–112. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2017.07.013>
- Bolós, M., Perea, J.R., Terreros-Roncal, J., Pallas-Bazarra, N., Jurado-Arjona, J., Ávila, J., Llorens-Martín, M., 2018. Absence of microglial CX3CR1 impairs the synaptic integration of adult-born hippocampal granule neurons. *Brain. Behav. Immun.* 68, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.002>
- Bravo, J., Magalhães, C., Andrade, E.B., Magalhães, A., Summavielle, T., 2023. The impact of psychostimulants on central and peripheral neuro-immune regulation: a scoping review of cytokine profiles and their implications for addiction. *Front. Cell. Neurosci.* 17. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2023.1109611>
- Bregin, A., Mazitov, T., Aug, I., Philips, M.A., Innos, J., Vasar, E., 2019. Increased sensitivity to psychostimulants and GABAergic drugs in Lsamp-deficient mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 183, 87–97. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2019.05.010>
- Briand, L.A., Flagel, S.B., Seeman, P., Robinson, T.E., 2007. Cocaine self-administration produces a persistent increase in dopamine D2 High receptors. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.01.002>
- Brown, K.T., Levis, S.C., O'Neill, C.E., Northcutt, A.L., Fabisiak, T.J., Watkins, L.R., Bachtell, R.K., 2018a. Innate immune signaling in the ventral tegmental area contributes to drug-primed reinstatement of cocaine seeking. *Brain. Behav. Immun.* 67, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.08.012>
- Brown, K.T., Levis, S.C., O'Neill, C.E., Northcutt, A.L., Fabisiak, T.J., Watkins, L.R., Bachtell, R.K., 2018b. Innate immune signaling in the ventral tegmental area contributes to drug-primed reinstatement of cocaine seeking. *Brain. Behav. Immun.* 67, 130–138. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2017.08.012>

- Brown, M.T.C., Bellone, C., Mameli, M., Labouè Be, G., Bocklisch, C., Né Dicte Balland, B., Dahan, L., Lujá, R., Deisseroth, K., Lü Scher, C., n.d. Drug-Driven AMPA Receptor Redistribution Mimicked by Selective Dopamine Neuron Stimulation. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015870>
- Broz, P., Dixit, V.M., 2016. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2016 167 16, 407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., Kagan, J.C., 2015. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 257–290. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032414-112240>
- Burns, A., Ciborowski, P., 2016. Acute exposure to methamphetamine alters TLR9-mediated cytokine expression in human macrophage. *Immunobiology* 221, 199–207. <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2015.09.006>
- Castrén, E., Antila, H., 2017. Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Mol. Psychiatry.* <https://doi.org/10.1038/mp.2017.61>
- Cekic, C., Casella, C.R., Eaves, C.A., Matsuzawa, A., Ichijo, H., Mitchell, T.C., 2009. Selective Activation of the p38 MAPK Pathway by Synthetic Monophosphoryl Lipid A. *J. Biol. Chem.* 284, 31982–31991. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.046383>
- Chausmer, A.L., Elmer, G.I., Rubinstein, M., Low, M.J., Grandy, D.K., Katz, J.L., 2002. Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D2 receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 163, 54–61. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1142-y>
- Chen, H., Uz, T., Manev, H., 2009. Minocycline affects cocaine sensitization in mice. *Neurosci. Lett.* 452, 258–261. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2009.01.078>
- Chivero, E.T., Liao, K., Niu, F., Tripathi, A., Tian, C., Buch, S., Hu, G., 2020. Engineered Extracellular Vesicles Loaded With miR-124 Attenuate Cocaine-Mediated Activation of Microglia. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 573. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00573/BIBTEX>
- Chivero, E.T., Sil, S., Singh, S., Thangaraj, A., Gordon, L., Evah-Nzoughe, G.B., Ferguson, N., Callen, S., Buch, S., 2021. Protective Role of *Lactobacillus rhamnosus* Probiotic in Reversing Cocaine-Induced Oxidative Stress, Glial Activation and Locomotion in Mice. *J. Neuroimmune Pharmacol.* <https://doi.org/10.1007/S11481-021-10020-9>
- Ciesielska, A., Matyjek, M., Kwiatkowska, K., 2021. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 1233–1261. <https://doi.org/10.1007/S00018-020-03656-Y>
- Coleman, L.G., Zou, J., Crews, F.T., 2020. Microglial depletion and repopulation in brain slice culture normalizes sensitized proinflammatory signaling. *J. Neuroinflammation* 17, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1678-y>
- Cotto, B., Li, H., Tuma, R.F., Ward, S.J., Langford, D., 2018. Cocaine-mediated activation of microglia and microglial MeCP2 and BDNF production. *Neurobiol. Dis.* 117, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.017>
- Crocq, M.A., 2007. Historical and cultural aspects of man's relationship with addictive

- drugs. *Dialogues Clin. Neurosci.* 9, 355.  
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2007.9.4/MACROCQ>
- Cunningham, A.J., Murray, C.A., O'Neill, L.A.J., Lynch, M.A., O'Connor, J.J., 1996. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci. Lett.* 203, 17–20.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12252-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12252-4)
- Da, L., Teixeira, S., 2016. IMPACTO ECONÔMICO DA LEGALIZAÇÃO DAS DROGAS NO BRASIL.
- da Silva, M.C.M., Iglesias, L.P., Candelario-Jalil, E., Khoshbouei, H., Moreira, F.A., de Oliveira, A.C.P., 2023. Role of Microglia in Psychostimulant Addiction. *Curr. Neuropharmacol.* 21, 235–259.  
<https://doi.org/10.2174/1570159X21666221208142151>
- de Oliveira, A.C.P., Yousif, N.M., Bhatia, H.S., Hermanek, J., Huell, M., Fiebich, B.L., 2016. Poly(I: C) Increases the expression of mPGES-1 and COX-2 in rat primary microglia. *J. Neuroinflammation* 13, 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12974-015-0473-7/FIGURES/5>
- Di Chiara, G., Imperato, A., 1988. 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.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Diaz-Aparicio, I., Paris, I., Sierra-Torre, V., Plaza-Zabala, A., Rodríguez-Iglesias, N., Márquez-Ropero, M., Beccari, S., Huguet, P., Abiega, O., Alberdi, E., Matute, C., Bernales, I., Schulz, A., Otrókocsi, L., Sperlagh, B., Happonen, K.E., Lemke, G., Maletic-Savatic, M., Valero, J., Sierra, A., 2020. Microglia Actively Remodel Adult Hippocampal Neurogenesis through the Phagocytosis Secretome. *J. Neurosci.* 40, 1453–1482. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0993-19.2019>
- Douma, E.H., de Kloet, E.R., 2020. Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 108, 48–77.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2019.10.015>
- Drouin-Ouellet, J., Brownell, A.L., Saint-Pierre, M., Fasano, C., Emond, V., Trudeau, L.E., Lévesque, D., Cicchetti, F., 2011. Neuroinflammation is associated with changes in glial mGluR5 expression and the development of neonatal excitotoxic lesions. *Glia* 59, 188–199. <https://doi.org/10.1002/GLIA.21086>
- Du, L., Shen, K., Bai, Y., Chao, J., Hu, G., Zhang, Y., Yao, H., 2019. Involvement of NLRP3 inflammasome in methamphetamine-induced microglial activation through miR-143/PUMA axis. *Toxicol. Lett.* 301, 53–63.  
<https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2018.10.020>
- Du, S.H., Qiao, D.F., Chen, C.X., Chen, S., Liu, C., Lin, Z., Wang, H., Xie, W.B., 2017. Toll-like receptor 4 mediates methamphetamine-induced neuroinflammation through caspase-11 signaling pathway in astrocytes. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 409. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00409/FULL>
- El-Zayat, S.R., Sibaii, H., Mannaa, F.A., 2019. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull. Natl. Res. Cent.* 2019 431 43, 1–12.  
<https://doi.org/10.1186/S42269-019-0227-2>

- Embry, C.A., Franchi, L., Nunez, G., Mitchell, T.C., 2011. Mechanism of Impaired NLRP3 Inflammasome Priming by Monophosphoryl Lipid A. *Sci. Signal.* 4. <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2001486>
- Fatoba, O., Itokazu, T., Yamashita, T., 2020. Microglia as therapeutic target in central nervous system disorders. *J. Pharmacol. Sci.* 144, 102–118. <https://doi.org/10.1016/J.JPHS.2020.07.004>
- Fazio, F., Lionetto, L., Molinaro, G., Bertrand, H.O., Acher, F., Ngomba, R.T., Notartomaso, S., Curini, M., Rosati, O., Scarselli, P., Di Marco, R., Battaglia, G., Bruno, V., Simmaco, M., Pin, J.P., Nicoletti, F., Goudet, C., 2012. Cinnabarinic acid, an endogenous metabolite of the kynurenine pathway, activates type 4 metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* 81, 643–656. <https://doi.org/10.1124/MOL.111.074765>
- Femenia, T., Qian, Y., Arentsen, T., Forssberg, H., Diaz Heijtz, R., 2018. Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. *Brain. Behav. Immun.* 69, 273–282. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2017.11.022>
- Ferrini, F., De Koninck, Y., 2013. Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plast.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/429815>
- Ferris, M.J., Calipari, E.S., Rose, J.H., Siciliano, C.A., Sun, H., Chen, R., Jones, S.R., 2015. A single amphetamine infusion reverses deficits in dopamine nerve-terminal function caused by a history of cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 40, 1826–1836. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.45>
- Fischer, K.D., Knackstedt, L.A., Rosenberg, P.A., 2021. Glutamate homeostasis and dopamine signaling: Implications for psychostimulant addiction behavior. *Neurochem. Int.* 144. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2020.104896>
- Fitzgerald, K.A., Kagan, J.C., 2020. Toll-like Receptors and the control of immunity. *Cell* 180, 1044. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.041>
- Fox, H.C., D'Sa, C., Kimmerling, A., Siedlarz, K.M., Tuit, K.L., Stowe, R., Sinha, R., 2012. Immune system inflammation in cocaine dependent individuals: implications for medications development. *Hum. Psychopharmacol.* 27, 156–166. <https://doi.org/10.1002/HUP.1251>
- Frank, M.G., Fonken, L.K., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2019. Microglia: Neuroimmune-sensors of stress. *Semin. Cell Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.01.001>
- Freeman, W.M., Lull, M.E., Patel, K.M., Brucklacher, R.M., Morgan, D., Roberts, D.C.S., Vrana, K.E., 2010. Gene expression changes in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens following abstinence from cocaine self-administration. *BMC Neurosci.* 11, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-29>
- Fumagalli, F., Di Pasquale, L., Caffino, L., Racagni, G., Riva, M.A., 2007. Repeated exposure to cocaine differently modulates BDNF mRNA and protein levels in rat striatum and prefrontal cortex. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2756–2763. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05918.x>
- Gao, F., Liu, Z., Ren, W., Jiang, W., 2014. Acute lipopolysaccharide exposure facilitates epileptiform activity via enhanced excitatory synaptic transmission and

- neuronal excitability in vitro. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 10, 1489. <https://doi.org/10.2147/NDT.S65695>
- Garré, J.M., Silva, H.M., Lafaille, J.J., Yang, G., 2017. CX3CR1+ monocytes modulate learning and learning-dependent dendritic spine remodeling via TNF- $\alpha$ . *Nat. Med.* 23, 714–722. <https://doi.org/10.1038/nm.4340>
- Geraghty, A.C., Gibson, E.M., Ghanem, R.A., Greene, J.J., Ocampo, A., Goldstein, A.K., Ni, L., Yang, T., Marton, R.M., Paşca, S.P., Greenberg, M.E., Longo, F.M., Monje, M., 2019. Loss of Adaptive Myelination Contributes to Methotrexate Chemotherapy-Related Cognitive Impairment. *Neuron* 103, 250-265.e8. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.04.032>
- Giovanoli, S., Engler, H., Engler, A., Richetto, J., Feldon, J., Riva, M.A., Schedlowski, M., Meyer, U., 2016. Preventive effects of minocycline in a neurodevelopmental two-hit model with relevance to schizophrenia. *Transl. Psychiatry* 6, e772. <https://doi.org/10.1038/TP.2016.38>
- Go, B.S., Barry, S.M., McGinty, J.F., 2016. Glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex mediates the suppressive effect of intra-prelimbic cortical infusion of BDNF on cocaine-seeking. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26, 1989–1999. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.10.002>
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M.H., Clohisey, S., Kenneth Baillie, J., Stevens, M.P., Freeman, T.C., Summers, K.M., McColl, B.W., 2016. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat. Neurosci.* 2016 19, 504–516. <https://doi.org/10.1038/nn.4222>
- Green-Sadan, T., Kinor, N., Roth-Deri, I., Geffen-Aricha, R., Schindler, C.J., Yadid, G., 2003. Transplantation of glial cell line-derived neurotrophic factor-expressing cells into the striatum and nucleus accumbens attenuates acquisition of cocaine self-administration in rats. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2093–2098. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02943.x>
- Grueter, B.A., Rothwell, P.E., Malenka, R.C., 2012. Integrating synaptic plasticity and striatal circuit function in addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 545–551. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2011.09.009>
- Guo, M.L., Chivero, E.T., Callen, S.E., Buch, S., 2021. NLRP3 Inflammasome Is Involved in Cocaine-Mediated Potentiation on Behavioral Changes in CX3CR1-Deficient Mice. *J. Pers. Med.* 11. <https://doi.org/10.3390/JPM11100963>
- Haroon, E., Raison, C.L., Miller, A.H., 2011. Psychoneuroimmunology Meets Neuropsychopharmacology: Translational Implications of the Impact of Inflammation on Behavior. *Neuropsychopharmacol.* 2011 37, 137–162. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.205>
- Harvey, E., Blurton-Jones, M., Kennedy, P.J., 2019. Hippocampal BDNF regulates a shift from flexible, goal-directed to habit memory system function following cocaine abstinence. *Hippocampus* 29, 1101–1113. <https://doi.org/10.1002/hipo.23127>
- Heilig, M., MacKillop, J., Martinez, D., Rehm, J., Leggio, L., Vanderschuren, L.J.M.J., 2021. Addiction as a brain disease revised: why it still matters, and the need for consilience. *Neuropsychopharmacol.* 2021 46, 1715–1723. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-00950-y>

- Helmut, K., Hanisch, U.K., Noda, M., Verkhratsky, A., 2011a. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Helmut, K., Hanisch, U.K., Noda, M., Verkhratsky, A., 2011b. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Hemmati, S., Sadeghi, M.A., Mohammad Jafari, R., Yousefi-Manesh, H., Dehpour, A.R., 2019a. The antidepressant effects of GM-CSF are mediated by the reduction of TLR4/NF-KB-induced IDO expression. *J. Neuroinflammation* 16, 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12974-019-1509-1/FIGURES/4>
- Hemmati, S., Sadeghi, M.A., Mohammad Jafari, R., Yousefi-Manesh, H., Dehpour, A.R., 2019b. The antidepressant effects of GM-CSF are mediated by the reduction of TLR4/NF-KB-induced IDO expression. *J. Neuroinflammation* 16, 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12974-019-1509-1/FIGURES/4>
- Hendawy, N., Salaheldin, T.H., Abuelezz, S.A., 2023. PCSK9 Inhibition Reduces Depressive like Behavior in CUMS-Exposed Rats: Highlights on HMGB1/RAGE/TLR4 Pathway, NLRP3 Inflammasome Complex and IDO-1. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 18, 195. <https://doi.org/10.1007/S11481-023-10060-3>
- Hoffmann, H.M., Crouzin, N., Moreno, E., Raivio, N., Fuentes, S., McCormick, P.J., Ortiz, J., Vignes, M., 2017. Long-Lasting Impairment of mGluR5-Activated Intracellular Pathways in the Striatum After Withdrawal of Cocaine Self-Administration. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 20, 72. <https://doi.org/10.1093/IJNP/PYW086>
- Hoshino, K., Uchinami, Y., Uchida, Y., Saito, H., Morimoto, Y., 2021. Interleukin-1 $\beta$  Modulates Synaptic Transmission and Synaptic Plasticity During the Acute Phase of Sepsis in the Senescence-Accelerated Mouse Hippocampus. *Front. Aging Neurosci.* 13, 32. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2021.637703/BIBTEX>
- Ito, R., Robbins, T.W., Everitt, B.J., 2004. Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat. Neurosci.* 7, 389–397. <https://doi.org/10.1038/nn1217>
- Jarvis, R., Tamashiro-Orrego, A., Promes, V., Tu, L., Shi, J., Yang, Y., 2020. Cocaine Self-administration and Extinction Inversely Alter Neuron to Glia Exosomal Dynamics in the Nucleus Accumbens. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 581. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00581/BIBTEX>
- Jeon, S.A., Lee, E., Hwang, I., Han, B., Park, S., Son, S., Yang, J., Hong, S., Kim, C.H., Son, J., Yu, J.W., 2017. NLRP3 Inflammasome Contributes to Lipopolysaccharide-induced Depressive-Like Behaviors via Indoleamine 2,3-dioxygenase Induction. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 20, 896–906. <https://doi.org/10.1093/IJNP/PYX065>
- Jha, M.K., Jo, M., Kim, J.H., Suk, K., 2019. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist* 25, 227–240. <https://doi.org/10.1177/1073858418783959>
- Jhamandas, K.H., Boegman, R.J., Beninger, R.J., Miranda, A.F., Lipic, K.A., 2000. Excitotoxicity of quinolinic acid: modulation by endogenous antagonists. *Neurotox. Res.* 2, 139–155. <https://doi.org/10.1007/BF03033790>

- Ka, M., Kook, Y.H., Liao, K., Buch, S., Kim, W.Y., 2016. Transactivation of TrkB by Sigma-1 receptor mediates cocaine-induced changes in dendritic spine density and morphology in hippocampal and cortical neurons. *Cell Death Dis.* 7. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2016.319>
- Kalivas, P.W., Volkow, N.D., 2005. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry* 162, 1403–1413. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.162.8.1403>
- Karlsson, R.M., Hefner, K.R., Sibley, D.R., Holmes, A., 2008. Comparison of dopamine D1 and D5 receptor knockout mice for cocaine locomotor sensitization. *Psychopharmacology (Berl)*. 200, 117–127. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1165-0>
- Kashima, D.T., Grueter, B.A., 2017. Toll-like receptor 4 deficiency alters nucleus accumbens synaptic physiology and drug reward behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 8865–8870. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1705974114/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., He, Y., 2019. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/IJMS20133328>
- Kendler, K.S., Ohlsson, H., Sundquist, J., Sundquist, K., 2019. A contagion model for within-family transmission of drug abuse. *Am. J. Psychiatry* 176, 239–248. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2018.18060637>
- Khandare, A. V., Bobade, D., Deval, M., Patil, T., Saha, B., Prakash, D., 2017. Expression of negative immune regulatory molecules, pro-inflammatory chemokine and cytokines in immunopathology of ECM developing mice. *Acta Trop.* 172, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.025>
- Köks, S., 2015. Experimental models on effects of psychostimulants, in: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc., pp. 107–129. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.03.002>
- Komleva, Y.K., Lopatina, O.L., Gorina, I. V., Shuvaev, A.N., Chernykh, A., Potapenko, I. V., Salmina, A.B., 2021. NLRP3 deficiency-induced hippocampal dysfunction and anxiety-like behavior in mice. *Brain Res.* 1752. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2020.147220>
- Kondo, S., Kohsaka, S., Okabe, S., 2011. Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo. *Mol. Brain* 4, 27. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-27>
- Koob, G.F., 1992. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 177–184. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90060-J](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90060-J)
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2016. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The lancet. Psychiatry* 3, 760. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Kreisel, T., Wolf, B., Keshet, E., Licht, T., 2019. Unique role for dentate gyrus microglia in neuroblast survival and in VEGF-induced activation. *Glia* 67, 594–618. <https://doi.org/10.1002/glia.23505>

- Kumolosasi, E., Salim, E., Jantan, I., Ahmad, W., 2014. Kinetics of intracellular, extracellular and production of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Trop. J. Pharm. Res.* 13, 536–543. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i4.8>
- Lacagnina, M.J., Rivera, P.D., Bilbo, S.D., 2017. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.121>
- Lee, K.W., Kim, Y., Kim, A.M., Helmin, K., Nairn, A.C., Greengard, P., 2006. Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3399. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0511244103>
- Leshner, A.I., 1997. Addiction Is a Brain Disease, and It Matters. *Science* (80-. ). 278, 45–47. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.278.5335.45>
- Levin, S.G., Godukhin, O. V., 2017. Modulating effect of cytokines on mechanisms of synaptic plasticity in the brain. *Biochem*. <https://doi.org/10.1134/S000629791703004X>
- Lewis, M., 2018. Brain Change in Addiction as Learning, Not Disease. *N. Engl. J. Med.* 379, 1551–1560. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1602872>
- Lewitus, G.M., Konefal, S.C., Greenhalgh, A.D., Pribiag, H., Augereau, K., Stellwagen, D., 2016. Microglial TNF- $\alpha$  Suppresses Cocaine-Induced Plasticity and Behavioral Sensitization. *Neuron* 90, 483–491. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.030>
- Li, D., Wu, M., 2021. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021 61 6, 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>
- Li, J., Deng, G., Wang, H., Yang, M., Yang, R., Li, X., Zhang, X., Yuan, H., 2017. Interleukin-1 $\beta$  pre-treated bone marrow stromal cells alleviate neuropathic pain through CCL7-mediated inhibition of microglial activation in the spinal cord. *Sci. Reports* 2017 71 7, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep42260>
- Li, X., Wolf, M.E., 2015. Multiple faces of BDNF in cocaine addiction. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.018>
- Li, Y., Chen, L., Zhao, W., Sun, L., Zhang, R., Zhu, S., Xie, K., Feng, X., Wu, X., Sun, Z., Shu, G., Wang, S., Gao, P., Zhu, X., Wang, L., Jiang, Q., 2021. Food reward depends on TLR4 activation in dopaminergic neurons. *Pharmacol. Res.* 169. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2021.105659>
- Liao, K., Guo, M., Niu, F., Yang, L., Callen, S.E., Buch, S., 2016. Cocaine-mediated induction of microglial activation involves the ER stress-TLR2 axis. *J. Neuroinflammation* 13. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0501-2>
- Lim, S.H., Park, E., You, B., Jung, Y., Park, A.R., Park, S.G., Lee, J.R., 2013. Neuronal Synapse Formation Induced by Microglia and Interleukin 10. *PLoS One* 8, e81218. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0081218>
- Linker, K.E., Elabd, M.G., Tawadrous, P., Cano, M., Green, K.N., Wood, M.A., Leslie, F.M., 2020. Microglial activation increases cocaine self-administration following adolescent nicotine exposure. *Nat. Commun.* 11, 1–14.

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-14173-3>

- Little, K.Y., Ramssen, E., Welchko, R., Volberg, V., Roland, C.J., Cassin, B., 2009. Decreased brain dopamine cell numbers in human cocaine users. *Psychiatry Res.* 168, 173–180. <https://doi.org/10.1016/J.PSYCHRES.2008.10.034>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.C., 2017. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2017 21 2, 1–9. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, Y., Dai, Y., Li, Q., Chen, C., Chen, H., Song, Y., Hua, F., Zhang, Z., 2020. Beta-amyloid activates NLRP3 inflammasome via TLR4 in mouse microglia. *Neurosci. Lett.* 736, 135279. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2020.135279>
- Lo Iacono, L., Catale, C., Martini, A., Valzania, A., Viscomi, M.T., Chiurchiù, V., Guatteo, E., Bussone, S., Perrone, F., Di Sabato, P., Aricò, E., D'Argenio, A., Troisi, A., Mercuri, N.B., Maccarrone, M., Puglisi-Allegra, S., Casella, P., Carola, V., 2018. From Traumatic Childhood to Cocaine Abuse: The Critical Function of the Immune System. *Biol. Psychiatry* 84, 905–916. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.05.022>
- Lobo, M.K., Covington, H.E., Chaudhury, D., Friedman, A.K., Sun, H.S., Damez-Werno, D., Dietz, D.M., Zaman, S., Koo, J.W., Kennedy, P.J., Mouzon, E., Mogri, M., Neve, R.L., Deisseroth, K., Han, M.H., Nestler, E.J., 2010. Cell Type Specific Loss of BDNF Signaling Mimics Optogenetic Control of Cocaine Reward. *Science* 330, 385. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1188472>
- Lu, C., Wang, Y., Furukawa, K., Fu, W., Ouyang, X., Mattson, M.P., 2006. Evidence that caspase-1 is a negative regulator of AMPA receptor-mediated long-term potentiation at hippocampal synapses. *J. Neurochem.* 97, 1104–1110. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.03800.X>
- Lucido, M.J., Bekhbat, M., Goldsmith, D.R., Treadway, M.T., Haroon, E., Felger, J.C., Miller, A.H., 2021. Aiding and Abetting Anhedonia: Impact of Inflammation on the Brain and Pharmacological Implications. *Pharmacol. Rev.* 73, 1084–1117. <https://doi.org/10.1124/PHARMREV.120.000043>
- Lüscher, C., Bellone, C., 2008. Cocaine-evoked synaptic plasticity: a key to addiction? *Nat. Neurosci.* 2008 117 11, 737–738. <https://doi.org/10.1038/nn0708-737>
- Lwin, T., Yang, J.L., Ngampramuan, S., Viwatpinyo, K., Chanchaen, P., Veschsanit, N., Pinyomahakul, J., Govitrapong, P., Mukda, S., 2021. Melatonin ameliorates methamphetamine-induced cognitive impairments by inhibiting neuroinflammation via suppression of the TLR4/MyD88/NF $\kappa$ B signaling pathway in the mouse hippocampus. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 111, 110109. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2020.110109>
- Maggi, L., Trettel, F., Scianni, M., Bertollini, C., Eusebi, F., Fredholm, B.B., Limatola, C., 2009. LTP impairment by fractalkine/CX3CL1 in mouse hippocampus is mediated through the activity of adenosine receptor type 3 (A3R). *J. Neuroimmunol.* 215, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.07.016>
- Mahmoudiasl, G.R., Abbaszadeh, H.A., Rezaei-Tavirani, M., Abdollahifar, M.A., Sadeghi, Y., Khoramgah, M.S., Niknazar, S., Darabi, S., 2019. Postmortem Study of Molecular and Histological Changes in the CA1 Hippocampal Region of Chronic Methamphetamine User. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* 18, 2067.

<https://doi.org/10.22037/IJPR.2019.15483.13123>

- Martin, C.S., Chung, T., Langenbucher, J.W., 2014. Historical and Cultural Perspectives on Substance Use and Substance Use Disorders 1. <https://doi.org/10.1093/OXFORDHB/9780199381678.013.001>
- Mata-Haro, V., Cekic, C., Martin, M., Chilton, P.M., Casella, C.R., Mitchell, T.C., 2007. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* (80- ). 316, 1628–1632. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1138963/SUPPL\\_FILE/MATA-HARO.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1138963/SUPPL_FILE/MATA-HARO.SOM.PDF)
- McClung, C.A., Nestler, E.J., 2003. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and  $\Delta$ FosB. *Nat. Neurosci.* 2003 6:11, 1208–1215. <https://doi.org/10.1038/nn1143>
- Messer, C.J., Eisch, A.J., Carlezon, W.A., Whisler, K., Shen, L., Wolf, D.H., Westphal, H., Collins, F., Russell, D.S., Nestler, E.J., 2000. Role for GDNF in biochemical and behavioral adaptations to drugs of abuse. *Neuron* 26, 247–257. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81154-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81154-X)
- Metz, V.E., Jones, J.D., Manubay, J., Sullivan, M.A., Mogali, S., Segoshi, A., Madera, G., Johnson, K.W., Comer, S.D., 2017. Effects of Ibudilast on the Subjective, Reinforcing, and Analgesic Effects of Oxycodone in Recently Detoxified Adults with Opioid Dependence. *Neuropsychopharmacology* 42, 1825. <https://doi.org/10.1038/NPP.2017.70>
- Miao, H., Li, R., Han, C., Lu, I., Zhang, H., 2018. Minocycline promotes posthemorrhagic neurogenesis via M2 microglia polarization via upregulation of the TrkB/BDNF pathway in rats. *J. Neurophysiol.* 120, 1307–1317. <https://doi.org/10.1152/jn.00234.2018>
- Michaud, J.P., Hallé, M., Lampron, A., Thériault, P., Préfontaine, P., Filali, M., Tribout-Jover, P., Lantaigne, A.M., Jodoin, R., Cluff, C., Brichard, V., Palmantier, R., Pilorget, A., Larocque, D., Rivest, S., 2013. Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1941–1946. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1215165110/SUPPL\\_FILE/PNAS.201215165SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1215165110/SUPPL_FILE/PNAS.201215165SI.PDF)
- Mithaiwala, M.N., Santana-Coelho, D., Porter, G.A., O'connor, J.C., 2021. Neuroinflammation and the Kynurenine Pathway in CNS Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells* 10. <https://doi.org/10.3390/CELLS10061548>
- Montesinos, J., Castilla-Ortega, E., Sánchez-Marín, L., Montagud-Romero, S., Araos, P., Pedraz, M., Porrás-Perales, Ó., García-Marchena, N., Serrano, A., Suárez, J., Baixeras, E., Rodríguez-Arias, M., Santín, L.J., Miñarro, J., Guerri, C., Rodríguez de Fonseca, F., Pavón, F.J., 2020. Cocaine-induced changes in CX3CL1 and inflammatory signaling pathways in the hippocampus: Association with IL1 $\beta$ . *Neuropharmacology* 162, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107840>
- Moreira, F.P., Medeiros, J.R.C., Lhullier, A.C., Souza, L.D. de M., Jansen, K., Portela,

- L.V., Lara, D.R., Silva, R.A. da, Wiener, C.D., Oses, J.P., 2016. Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. *Drug Alcohol Depend.* 158, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.11.024>
- Morin-Brureau, M., Milior, G., Royer, J., Chali, F., LeDuigou, C., Savary, E., Blugeon, C., Jourdren, L., Akbar, D., Dupont, S., Navarro, V., Baulac, M., Bielle, F., Mathon, B., Clemenceau, S., Miles, R., 2018. Microglial phenotypes in the human epileptic temporal lobe. *Brain* 141, 3343–3360. <https://doi.org/10.1093/brain/awy276>
- Mu, L., Liu, X., Yu, H., Hu, M., Friedman, V., Kelly, T.J., Zhao, L., Liu, Q. song, 2021. Ibudilast attenuates cocaine self-administration and prime- and cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropharmacology* 201. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2021.108830>
- Muscat, S.M., Deems, N.P., Butler, M.J., Scaria, E.A., Bettles, M.N., Cleary, S.P., Bockbrader, R.H., Maier, S.F., Barrientos, R.M., 2023. Selective TLR4 Antagonism Prevents and Reverses Morphine-Induced Persistent Postoperative Cognitive Dysfunction, Dysregulation of Synaptic Elements, and Impaired BDNF Signaling in Aged Male Rats. *J. Neurosci.* 43, 155–172. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1151-22.2022>
- Nestler, E.J., 2012. Transcriptional Mechanisms of Drug Addiction. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 10, 136. <https://doi.org/10.9758/CPN.2012.10.3.136>
- Nguyen, P.T., Dorman, L.C., Pan, S., Vainchtein, I.D., Han, R.T., Nakao-Inoue, H., Taloma, S.E., Barron, J.J., Molofsky, A.B., Kheirbek, M.A., Molofsky, A. V., 2020. Microglial Remodeling of the Extracellular Matrix Promotes Synapse Plasticity. *Cell* 182, 388–403.e15. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.05.050>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1110647>
- Northcutt, A.L., Hutchinson, M.R., Wang, X., Baratta, M. V., Hiranita, T., Cochran, T.A., Pomrenze, M.B., Galer, E.L., Kopajtic, T.A., Li, C.M., Amat, J., Larson, G., Cooper, D.C., Huang, Y., O'Neill, C.E., Yin, H., Zahniser, N.R., Katz, J.L., Rice, K.C., Maier, S.F., Bachtell, R.K., Watkins, L.R., 2015. DAT isn't all that: Cocaine reward and reinforcement require Toll-like receptor 4 signaling. *Mol. Psychiatry* 20, 1525–1537. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.177>
- Novak, G., Seeman, P., Foll, B. Le, 2010. Exposure to nicotine produces an increase in dopamine D2 High receptors: A possible mechanism for dopamine hypersensitivity. *Int. J. Neurosci.* 120, 691–697. <https://doi.org/10.3109/00207454.2010.513462>
- Nutt, D., King, L.A., Saulsbury, W., Blakemore, C., 2007. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet.* [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60464-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60464-4)
- Orio, L., Llopis, N., Torres, E., Izco, M., O'Shea, E., Colado, M.I., 2010. A study on the mechanisms by which minocycline protects against MDMA ('ecstasy')-induced neurotoxicity of 5-HT cortical neurons. *Neurotox. Res.* 18, 187–199. <https://doi.org/10.1007/S12640-009-9120-3>
- Otis, J.M., Fitzgerald, M.K., Mueller, D., 2014. Infralimbic BDNF/TrkB enhancement of

- GluN2B currents facilitates extinction of a cocaine-conditioned place preference. *J. Neurosci.* 34, 6057–6064. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4980-13.2014>
- Otis, J.M., Fitzgerald, M.K., Yousuf, H., Burkard, J.L., Drake, M., Mueller, D., 2018. Prefrontal neuronal excitability maintains cocaine-associated memory during retrieval. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 119. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2018.00119/BIBTEX>
- Ouzir, M., Errami, M., 2016. Etiological theories of addiction: A comprehensive update on neurobiological, genetic and behavioural vulnerability. *Pharmacol. Biochem. Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.06.005>
- Pannell, M., Szulzewsky, F., Matyash, V., Wolf, S.A., Kettenmann, H., 2014. The subpopulation of microglia sensitive to neurotransmitters/neurohormones is modulated by stimulation with LPS, interferon- $\gamma$ , and IL-4. *Glia* 62, 667–679. <https://doi.org/10.1002/glia.22633>
- Paolicelli, R.C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M.E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G.C., Butovsky, O., Carson, M.J., Castellano, B., Colonna, M., Cowley, S.A., Cunningham, C., Davalos, D., De Jager, P.L., de Strooper, B., Denes, A., Eggen, B.J.L., Eyo, U., Galea, E., Garel, S., Ginhoux, F., Glass, C.K., Gokce, O., Gomez-Nicola, D., González, B., Gordon, S., Graeber, M.B., Greenhalgh, A.D., Gressens, P., Greter, M., Gutmann, D.H., Haass, C., Heneka, M.T., Heppner, F.L., Hong, S., Hume, D.A., Jung, S., Kettenmann, H., Kipnis, J., Koyama, R., Lemke, G., Lynch, M., Majewska, A., Malcangio, M., Malm, T., Mancuso, R., Masuda, T., Matteoli, M., McColl, B.W., Miron, V.E., Molofsky, A.V., Monje, M., Mracsko, E., Nadjar, A., Neher, J.J., Neniskyte, U., Neumann, H., Noda, M., Peng, B., Peri, F., Perry, V.H., Popovich, P.G., Pridans, C., Priller, J., Prinz, M., Ragozzino, D., Ransohoff, R.M., Salter, M.W., Schaefer, A., Schafer, D.P., Schwartz, M., Simons, M., Smith, C.J., Streit, W.J., Tay, T.L., Tsai, L.H., Verkhratsky, A., von Bernhardi, R., Wake, H., Wittamer, V., Wolf, S.A., Wu, L.J., Wyss-Coray, T., 2022. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* 110, 3458–3483. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2022.10.020>
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., Gan, W.B., 2013a. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155, 1596–1609. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.11.030>
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., Gan, W.B., 2013b. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155, 1596–1609. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.11.030>
- Pascoli, V., Turiault, M., Lüscher, C., 2011. Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481, 71–76. <https://doi.org/10.1038/NATURE10709>
- Pascual, O., Achour, S. Ben, Rostaing, P., Triller, A., Bessis, A., 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1111098109>

- Patkar, A.A., Rozen, S., Mannelli, P., Matson, W., Pae, C.U., Krishnan, K.R., Kaddurah-Daouk, R., 2009. Alterations in tryptophan and purine metabolism in cocaine addiction: A metabolomic study. *Psychopharmacology (Berl)*. 206, 479–489. <https://doi.org/10.1007/S00213-009-1625-1/FIGURES/3>
- Periyasamy, P., Liao, K., Kook, Y.H., Niu, F., Callen, S.E., Guo, M.L., Buch, S., 2018. Cocaine-Mediated Downregulation of miR-124 Activates Microglia by Targeting KLF4 and TLR4 Signaling. *Mol. Neurobiol.* 55, 3196–3210. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0584-5>
- Poland, R.S., Hahn, Y.K., Knapp, P.E., Beardsley, P.M., Bowers, M.S., 2016. Ibudilast attenuates expression of behavioral sensitization to cocaine in male and female rats. *Neuropharmacology* 109, 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.024>
- Potter, M.C., Elmer, G.I., Bergeron, R., Albuquerque, E.X., Guidetti, P., Wu, H.Q., Schwarcz, R., 2010. Reduction of Endogenous Kynurenic Acid Formation Enhances Extracellular Glutamate, Hippocampal Plasticity, and Cognitive Behavior. *Neuropsychopharmacol.* 2010 358 35, 1734–1742. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.39>
- Prieto, G.A., Cotman, C.W., 2017. Cytokines and cytokine networks target neurons to modulate long-term potentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.03.005>
- Prinz, M., Jung, S., Priller, J., 2019. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* 179, 292–311. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.08.053>
- Pulipparacharuvil, S., Renthal, W., Hale, C.F., Taniguchi, M., Xiao, G., Kumar, A., Russo, S.J., Sikder, D., Dewey, C.M., Davis, M.M., Greengard, P., Nairn, A.C., Nestler, E.J., Cowan, C.W., 2008. Cocaine regulates MEF2 to control synaptic and behavioral plasticity. *Neuron* 59, 621–633. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2008.06.020>
- Ragozzino, D., Di Angelantonio, S., Trettel, F., Bertollini, C., Maggi, L., Gross, C., Charo, I.F., Limatola, C., Eusebi, F., 2006. Chemokine fractalkine/CX3CL1 negatively modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 26, 10488–10498. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3192-06.2006>
- Ransohoff, R.M., 2016. A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. *Nat. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Rasakham, K., Schmidt, H.D., Kay, K., Huizenga, M.N., Calcagno, N., Christopher Pierce, R., Spires-Jones, T.L., Sadri-Vakili, G., 2014. Synapse density and dendritic complexity are reduced in the prefrontal cortex following seven days of forced abstinence from cocaine self-administration. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102524>
- Reguilón, M.D., Montagud-Romero, S., Ferrer-Pérez, C., Roger-Sánchez, C., Aguilar, M.A., Miñarro, J., Rodríguez-Arias, M., 2017. Dopamine D2 receptors mediate the increase in reinstatement of the conditioned rewarding effects of cocaine induced by acute social defeat. *Eur. J. Pharmacol.* 799, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.01.039>

- Research, I. of M. (US) C. on O. in D.A., 1996. Drug Abuse Research in Historical Perspective.
- Reshef, R., Kudryavitskaya, E., Shani-Narkiss, H., Isaacson, B., Rimmerman, N., Mizrahi, A., Yirmiya, R., 2017. The role of microglia and their CX3CR1 signaling in adult neurogenesis in the olfactory bulb. *Elife* 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.30809>
- Rich, M.T., Huang, Y.H., Torregrossa, M.M., 2019. Plasticity at Thalamo-amygdala Synapses Regulates Cocaine-Cue Memory Formation and Extinction. *Cell Rep.* 26, 1010-1020.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.105>
- Rivera, P.D., Hanamsagar, R., Kan, M.J., Tran, P.K., Stewart, D., Jo, Y.C., Gunn, M., Bilbo, S.D., 2019. Removal of microglial-specific MyD88 signaling alters dentate gyrus doublecortin and enhances opioid addiction-like behaviors. *Brain. Behav. Immun.* 76, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.010>
- Rodríguez-Gómez, J.A., Kavanagh, E., Engskog-Vlachos, P., Engskog, M.K.R., Herrera, A.J., Espinosa-Oliva, A.M., Joseph, B., Hajji, N., Venero, J.L., Burguillos, M.A., 2020. Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/CELLS9071717>
- Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B.A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., Gemma, C., 2011. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 31, 16241–16250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011>
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., Schwartz, M., 2007. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* 9, 1081–1088. <https://doi.org/10.1038/NCB1629>
- Ross, S., Peselow, E., 2009. The neurobiology of addictive disorders. *Clin. Neuropharmacol.* 32, 269–276. <https://doi.org/10.1097/WNF.0B013E3181A9163C>
- Russo, S.J., Wilkinson, M.B., Mazei-Robison, M.S., Dietz, D.M., Maze, I., Krishnan, V., Renthal, W., Graham, A., Birnbaum, S.G., Green, T.A., Robison, B., Lesselyong, A., Perrotti, L.I., Bolaños, C.A., Kumar, A., Clark, M.S., Neumaier, J.F., Neve, R.L., Bhakar, A.L., Barker, P.A., Nestler, E.J., 2009. Nuclear factor κB signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J. Neurosci.* 29, 3529–3537. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6173-08.2009>
- Saal, D., Dong, Y., Bonci, A., Malenka, R.C., 2003. Drugs of Abuse and Stress Trigger a Common Synaptic Adaptation in Dopamine Neurons. *Neuron* 37, 577–582. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00021-7)
- Saika, F., Kiguchi, N., Wakida, N., Kobayashi, D., Fukazawa, Y., Matsuzaki, S., Kishioka, S., 2018. Upregulation of CCL7 and CCL2 in reward system mediated through dopamine D1 receptor signaling underlies methamphetamine-induced place preference in mice. *Neurosci. Lett.* 665, 33–37. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2017.11.042>
- Saito, K., Markey, S.P., Heyes, M.P., 1992. Effects of immune activation on quinolinic acid and neuroactive kynurenines in the mouse. *Neuroscience* 51, 25–39. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90467-G](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90467-G)

- Salazar, F., Awuah, D., Negm, O.H., Shakib, F., Ghaemmaghami, A.M., 2017. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase-aryl hydrocarbon receptor pathway in the TLR4-induced tolerogenic phenotype in human DCs. *Sci. Reports* 2017 7 1 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep43337>
- Sankowski, R., Böttcher, C., Masuda, T., Geirsdottir, L., Sagar, Sindram, E., Seredenina, T., Muhs, A., Scheiwe, C., Shah, M.J., Heiland, D.H., Schnell, O., Grün, D., Priller, J., Prinz, M., 2019. Mapping microglia states in the human brain through the integration of high-dimensional techniques. *Nat. Neurosci.* 22, 2098–2110. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0532-y>
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., Stevens, B., 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691–705. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2012.03.026>
- Scheffel, J., Regen, T., Van Rossum, D., Seifert, S., Ribes, S., Nau, R., Parsa, R., Harris, R.A., Boddeke, H.W.G.M., Chuang, H.N., Pukrop, T., Wessels, J.T., Jürgens, T., Merkler, D., Brück, W., Schnaars, M., Simons, M., Kettenmann, H., Hanisch, U.K., 2012. Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia. *Glia* 60, 1930–1943. <https://doi.org/10.1002/glia.22409>
- Schmid, A.W., Lynch, M.A., Herron, C.E., 2009. The effects of IL-1 receptor antagonist on beta amyloid mediated depression of LTP in the rat CA1 in vivo. *Hippocampus* 19, 670–676. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20542>
- Schwarz, J.M., Smith, S.H., Bilbo, S.D., 2013. FACS analysis of neuronal-glial interactions in the nucleus accumbens following morphine administration. *Psychopharmacology (Berl)*. 230, 525–535. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3180-z>
- Secci, M.E., Auber, A., Panlilio, L. V., Redhi, G.H., Thorndike, E.B., Schindler, C.W., Schwarcz, R., Goldberg, S.R., Justinova, Z., 2017. Attenuating Nicotine Reinforcement and Relapse by Enhancing Endogenous Brain Levels of Kynurenic Acid in Rats and Squirrel Monkeys. *Neuropsychopharmacol.* 2017 428 42, 1619–1629. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.21>
- Sharpe, L.G., Pilotte, N.S., Mitchell, W.M., De Souza, E.B., 1991. Withdrawal of repeated cocaine decreases autoradiographic [<sup>3</sup>H]mazindol-labelling of dopamine transporter In rat nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.* 203, 141–144. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90804-Y](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90804-Y)
- Shih, Y.H., Tsai, S.F., Huang, S.H., Chiang, Y.T., Hughes, M.W., Wu, S.Y., Lee, C.W., Yang, T.T., Kuo, Y.M., 2016. Hypertension impairs hippocampus-related adult neurogenesis, CA1 neuron dendritic arborization and long-term memory. *Neuroscience* 322, 346–357. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.045>
- Shintani, F., Kanba, S., Nakaki, T., Nibuya, M., Kinoshita, N., Suzuki, E., Yagi, G., Kato, R., Asai, M., 1993. Interleukin-1 beta augments release of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the rat anterior hypothalamus. *J. Neurosci.* 13, 3574–3581. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-08-03574.1993>
- Siciliano, C.A., Fordahl, S.C., Jones, S.R., 2016. Cocaine self-administration produces

- long-lasting alterations in dopamine transporter responses to cocaine. *J. Neurosci.* 36, 7807–7816. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4652-15.2016>
- Simmons, S.C., Wheeler, K., Mazei-Robison, M.S., 2019. Determination of circuit-specific morphological adaptations in ventral tegmental area dopamine neurons by chronic morphine. *Mol. Brain* 12, 10. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0435-6>
- Sinha, R., 2011. New findings on biological factors predicting addiction relapse vulnerability. *Curr. Psychiatry Rep.* <https://doi.org/10.1007/s11920-011-0224-0>
- Sipe, G.O., Lowery, R.L., Tremblay, M., Kelly, E.A., Lamantia, C.E., Majewska, A.K., 2016. Microglial P2Y<sub>12</sub> is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nat. Commun.* 2016 7 1 7, 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms10905>
- Smith, H.R., Beveridge, T.J.R., Nader, S.H., Nader, M.A., Porrino, L.J., 2019. Regional elevations in microglial activation and cerebral glucose utilization in frontal white matter tracts of rhesus monkeys following prolonged cocaine self-administration. *Brain Struct. Funct.* 224, 1417–1428. <https://doi.org/10.1007/S00429-019-01846-4>
- Smith, L.N., Penrod, R.D., Taniguchi, M., Cowan, C.W., 2016. Assessment of cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. *J. Vis. Exp.* 2016. <https://doi.org/10.3791/53107>
- Snider, S.E., Hendrick, E.S., Beardsley, P.M., 2013. Glial cell modulators attenuate methamphetamine self-administration in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 701, 124–130. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2013.01.016>
- Snider, S.E., Vunck, S.A., Van Den Oord, E.J.C.G., Adkins, D.E., McClay, J.L., Beardsley, P.M., 2012. The glial cell modulators, ibudilast and its amino analog, AV1013, attenuate methamphetamine locomotor activity and its sensitization in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 679, 75–80. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2012.01.013>
- Spiller, K.J., Restrepo, C.R., Khan, T., Dominique, M.A., Fang, T.C., Canter, R.G., Roberts, C.J., Miller, K.R., Ransohoff, R.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., 2018. Microglia-mediated recovery from ALS-relevant motor neuron degeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathy. *Nat. Neurosci.* 21, 329–340. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0083-7>
- Sriram, K., Miller, D.B., O'Callaghan, J.P., 2006. Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Neurochem.* 96, 706–718. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2005.03566.X>
- Stellwagen, D., Malenka, R.C., 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . *Nat.* 2006 4407087 440, 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/nature04671>
- Stratoulis, V., Venero, J.L., Tremblay, M.-È., Joseph, B., 2019. Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J.* 38, e101997. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2019101997>
- Sullivan, R.J., Hagen, E.H., 2002. Psychotropic substance-seeking: evolutionary pathology or adaptation? *Addiction* 97, 389–400. <https://doi.org/10.1046/J.1360->

0443.2002.00024.X

- Takemiya, T., Fumizawa, K., Yamagata, K., Iwakura, Y., Kawakami, M., 2017. Brain interleukin-1 facilitates learning of a water maze spatial memory task in Young Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 202. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2017.00202/BIBTEX>
- Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y.M., Cabrera-Pastor, A., Felipo, V., 2018. Hyperammonemia alters membrane expression of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors in hippocampus by enhancing activation of the IL-1 receptor: Underlying mechanisms. *J. Neuroinflammation* 15, 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12974-018-1082-Z/FIGURES/8>
- Taylor, A.M.W., Castonguay, A., Ghogha, A., Vayssiere, P., Pradhan, A.A.A., Xue, L., Mehrabani, S., Wu, J., Levitt, P., Olmstead, M.C., De Koninck, Y., Evans, C.J., Cahill, C.M., 2016. Neuroimmune Regulation of GABAergic Neurons Within the Ventral Tegmental Area During Withdrawal from Chronic Morphine. *Neuropsychopharmacology* 41, 949. <https://doi.org/10.1038/NPP.2015.221>
- Taylor, A.M.W., Castonguay, A., Taylor, A.J., Murphy, N.P., Ghogha, A., Cook, C., Xue, L., Olmstead, M.C., de Koninck, Y., Evans, C.J., Cahill, C.M., 2015. Microglia disrupt mesolimbic reward circuitry in chronic pain. *J. Neurosci.* 35, 8442–8450. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4036-14.2015>
- Taylor, S.B., Lewis, C.R., Olive, M.F., 2013. The neurocircuitry of illicit psychostimulant addiction: acute and chronic effects in humans. *Subst. Abuse Rehabil.* 4, 29. <https://doi.org/10.2147/SAR.S39684>
- Tomasoni, R., Morini, R., Lopez-Atalaya, J.P., Corradini, I., Canzi, A., Rasile, M., Mantovani, C., Pozzi, D., Garlanda, C., Mantovani, A., Menna, E., Barco, A., Matteoli, M., 2017. Lack of IL-1R8 in neurons causes hyperactivation of IL-1 receptor pathway and induces MECP2-dependent synaptic defects. *Elife* 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.21735>
- Tortorelli, L.S., Engelke, D.S., Lunardi, P., Mello e Souza, T., Santos-Junior, J.G., Gonçalves, C.A., 2015. Cocaine counteracts LPS-induced hypolocomotion and triggers locomotor sensitization expression. *Behav. Brain Res.* 287, 226–229. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2015.03.054>
- Ullah, M.O., Sweet, M.J., Mansell, A., Kellie, S., Kobe, B., 2016. TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *J. Leukoc. Biol.* 100, 27–45. <https://doi.org/10.1189/JLB.2RI1115-531R>
- Valentinova, K., Tchenio, A., Trusel, M., Clerke, J.A., Lalive, A.L., Tzanoulinou, S., Matera, A., Moutkine, I., Maroteaux, L., Paolicelli, R.C., Volterra, A., Bellone, C., Mameli, M., 2019. Morphine withdrawal recruits lateral habenula cytokine signaling to reduce synaptic excitation and sociability. *Nat. Neurosci.* 2019 227 22, 1053–1056. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0421-4>
- Vargas, A.M., Rivera-Rodriguez, D.E., Martinez, L.R., 2020. Methamphetamine alters the TLR4 signaling pathway, NF- $\kappa$ B activation, and pro-inflammatory cytokine production in LPS-challenged NR-9460 microglia-like cells. *Mol. Immunol.* 121, 159. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2020.03.013>

- Venezia, S., Refolo, V., Polissidis, A., Stefanis, L., Wenning, G.K., Stefanova, N., 2017. Toll-like receptor 4 stimulation with monophosphoryl lipid A ameliorates motor deficits and nigral neurodegeneration triggered by extraneuronal  $\alpha$ -synucleinopathy. *Mol. Neurodegener.* 12. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0195-7>
- Vengeliene, V., Cannella, N., Takahashi, T., Spanagel, R., 2016. Metabolic shift of the kynurenine pathway impairs alcohol and cocaine seeking and relapse. *Psychopharmacology (Berl)*. 233, 3449–3459. <https://doi.org/10.1007/S00213-016-4384-9/FIGURES/5>
- Volkow, N.D., Blanco, C., 2023a. Substance use disorders: a comprehensive update of classification, epidemiology, neurobiology, clinical aspects, treatment and prevention. *World Psychiatry* 22, 203–229. <https://doi.org/10.1002/WPS.21073>
- Volkow, N.D., Blanco, C., 2023b. Substance use disorders: a comprehensive update of classification, epidemiology, neurobiology, clinical aspects, treatment and prevention. *World Psychiatry* 22, 203–229. <https://doi.org/10.1002/WPS.21073>
- Volkow, N.D., Koob, G.F., McLellan, A.T., 2016. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N. Engl. J. Med.* 374, 363–371. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1511480>
- Volkow, N.D., Michaelides, M., Baler, R., 2019a. The neuroscience of drug reward and addiction. *Physiol. Rev.* 99, 2115–2140. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00014.2018/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0041929170003.JPEG>
- Volkow, N.D., Michaelides, M., Baler, R., 2019b. The neuroscience of drug reward and addiction. *Physiol. Rev.* 99, 2115–2140. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00014.2018/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0041929170003.JPEG>
- Walter, T.J., Crews, F.T., 2017. Microglial depletion alters the brain neuroimmune response to acute binge ethanol withdrawal. *J. Neuroinflammation* 14, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0856-z>
- Wan, F., Zang, S., Yu, G., Xiao, H., Wang, J., Tang, J., 2017. Ginkgolide B Suppresses Methamphetamine-Induced Microglial Activation Through TLR4-NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in BV2 Cells. *Neurochem. Res.* 42, 2881–2891. <https://doi.org/10.1007/S11064-017-2309-6>
- Wang, C., Yue, H., Hu, Z., Shen, Y., Ma, J., Li, J., Wang, X.D., Wang, Liang, Sun, B., Shi, P., Wang, Lang, Gu, Y., 2020. Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination. *Science (80- )*. 367, 688–694. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAZ2288/SUPPL\\_FILE/AAZ2288S5.MP4](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAZ2288/SUPPL_FILE/AAZ2288S5.MP4)
- Wang, J., Jia, Y., Li, G., Wang, B., Zhou, T., Zhu, L., Chen, T., Chen, Y., 2018. The Dopamine Receptor D3 Regulates Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 21, 448. <https://doi.org/10.1093/IJNP/PYY005>
- Wang, J., Lai, S., Li, G., Zhou, T., Wang, B., Cao, F., Chen, T., Zhang, X., Chen, Y., 2020. Microglial activation contributes to depressive-like behavior in dopamine D3 receptor knockout mice. *Brain. Behav. Immun.* 83, 226–238.

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.10.016>

- Wang, T., Nowrangi, D., Yu, L., Lu, T., Tang, J., Han, B., Ding, Y., Fu, F., Zhang, J.H., 2018. Activation of dopamine D1 receptor decreased NLRP3-mediated inflammation in intracerebral hemorrhage mice. *J. Neuroinflammation* 15, 2. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1039-7>
- Wang, T., Ruan, B., Wang, J., Zhou, Z., Zhang, X., Zhang, C., Zhao, H., Yang, Y., Yuan, D., 2022. Activation of NLRP3-Caspase-1 pathway contributes to age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity. *Neurochem. Int.* 152, 105220. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2021.105220>
- Wang, X., Northcutt, A.L., Cochran, T.A., Zhang, X., Fabisiak, T.J., Haas, M.E., Amat, J., Li, H., Rice, K.C., Maier, S.F., Bachtell, R.K., Hutchinson, M.R., Watkins, L.R., 2019. Methamphetamine Activates Toll-Like Receptor 4 to Induce Central Immune Signaling within the Ventral Tegmental Area and Contributes to Extracellular Dopamine Increase in the Nucleus Accumbens Shell. *ACS Chem. Neurosci.* 10, 3622–3634. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.9B00225>
- Weinhard, L., Di Bartolomei, G., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N.L., Neniskyte, U., Exiga, M., Vadisiute, A., Raggioli, A., Schertel, A., Schwab, Y., Gross, C.T., 2018a. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/S41467-018-03566-5>
- Weinhard, L., Di Bartolomei, G., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N.L., Neniskyte, U., Exiga, M., Vadisiute, A., Raggioli, A., Schertel, A., Schwab, Y., Gross, C.T., 2018b. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03566-5>
- Welter, M., Vallone, D., Samad, T.A., Meziane, H., Usiello, A., Borrelli, E., 2007. Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6840–6845. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610790104>
- Werneburg, S., Feinberg, P.A., Johnson, K.M., Schafer, D.P., 2017. A microglia-cytokine axis to modulate synaptic connectivity and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.002>
- Wires, E.S., Alvarez, D., Dobrowolski, C., Wang, Y., Morales, M., Karn, J., Harvey, B.K., 2012. Methamphetamine activates nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) and induces human immunodeficiency virus (HIV) transcription in human microglial cells. *J. Neurovirol.* 18, 400–410. <https://doi.org/10.1007/S13365-012-0103-4>
- Wolf, M.E., Ferrario, C.R., 2010. AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 185. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2010.01.013>
- Wright, W.J., Dong, Y., 2020. Psychostimulant-Induced Adaptations in Nucleus Accumbens Glutamatergic Transmission. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A039255>
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B.A., Stevens, B., 2015. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol.*

<https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.008>

- Xiao, L., Yan, J., Feng, D., Ye, S., Yang, T., Wei, H., Li, T., Sun, W., Chen, J., 2021. Critical Role of TLR4 on the Microglia Activation Induced by Maternal LPS Exposure Leading to ASD-Like Behavior of Offspring. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 634837. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.634837/BIBTEX>
- Xie, X.L., Zhou, W.T., Zhang, K.K., Chen, L.J., Wang, Q., 2018. METH-Induced Neurotoxicity Is Alleviated by Lactulose Pretreatment Through Suppressing Oxidative Stress and Neuroinflammation in Rat Striatum. *Front. Neurosci.* 12. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00802>
- Yan, Y., Jiang, W., Liu, L., Wang, X., Ding, C., Tian, Z., Zhou, R., 2015. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 160, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.047>
- Yang, J., Qi, F., Gu, H., Zou, J., Yang, Y., Yuan, Q., Yao, Z., 2016. Neonatal BCG vaccination of mice improves neurogenesis and behavior in early life. *Brain Res. Bull.* 120, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.10.012>
- Yang, J., Wise, L., Fukuchi, K.I., 2020. TLR4 Cross-Talk With NLRP3 Inflammasome and Complement Signaling Pathways in Alzheimer's Disease. *Front. Immunol.* 11, 724. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00724/BIBTEX>
- Yang, T., Zang, S., Wang, Y., Zhu, Y., Jiang, L., Chen, X., Zhang, X., Cheng, J., Gao, R., Xiao, H., Wang, J., 2020. Methamphetamine induced neuroinflammation in mouse brain and microglial cell line BV2: Roles of the TLR4/TRIF/Peli1 signaling axis. *Toxicol. Lett.* 333, 150–158. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2020.07.028>
- Yli-Karjanmaa, M., Larsen, K.S., Fenger, C.D., Kristensen, L.K., Martin, N.A., Jensen, P.T., Breton, A., Nathanson, L., Nielsen, P.V., Lund, M.C., Carlsen, S.L., Gramsbergen, J.B., Finsen, B., Stubbe, J., Frich, L.H., Stolp, H., Brambilla, R., Anthony, D.C., Meyer, M., Lambertsen, K.L., 2019. TNF deficiency causes alterations in the spatial organization of neurogenic zones and alters the number of microglia and neurons in the cerebral cortex. *Brain. Behav. Immun.* 82, 279–297. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2019.08.195>
- Yu, G., Song, Y., Xie, C., Tao, L., Wan, F., Jiang, L., Wang, J., Tang, J., 2019. MiR-142a-3p and miR-155-5p reduce methamphetamine-induced inflammation: Role of the target protein Peli1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 370, 145–153. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2019.03.019>
- Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., Hu, H., 2020. Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020 51 5, 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>
- Yuan, T., Mameli, M., O'Connor, E.C., Dey, P.N., Verpelli, C., Sala, C., Perez-Otano, I., Lüscher, C., Bellone, C., 2013. Expression of Cocaine-Evoked Synaptic Plasticity by GluN3A-Containing NMDA Receptors. *Neuron* 80, 1025–1038. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2013.07.050/ATTACHMENT/90AEB4F8-EEEEB-4C8C-A7D3-7BE29CB67B6F/MMC1.PDF>
- Zachor, D., Cherkes, J.K., Fay, C.T., Ocrant, I., 1994. Cocaine differentially inhibits neuronal differentiation and proliferation in vitro. *J. Clin. Invest.* 93, 1179–1185. <https://doi.org/10.1172/JCI117071>

- Zachor, D.A., Moore, J.F., Brezaussek, C.M., Theibert, A.B., Percy, A.K., 2000. Cocaine inhibition of neuronal differentiation in NGF-induced PC12 cells is independent of ras signaling. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 765–772. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00051-4](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00051-4)
- Zaparte, A., Schuch, J.B., Viola, T.W., Baptista, T.A.S., Beidacki, A.S., do Prado, C.H., Sanvicente-Vieira, B., Bauer, M.E., Grassi-Oliveira, R., 2019. Cocaine Use Disorder Is Associated With Changes in Th1/Th2/Th17 Cytokines and Lymphocytes Subsets. *Front. Immunol.* 10, 2435. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02435>
- Zhang, J., Yi, S., Li, Y., Xiao, C., Liu, C., Jiang, W., Yang, C., Zhou, T., 2020. The antidepressant effects of asperosaponin VI are mediated by the suppression of microglial activation and reduction of TLR4/NF- $\kappa$ B-inducedIDO expression. *Psychopharmacology (Berl)*. 237, 2531–2545. <https://doi.org/10.1007/S00213-020-05553-5>
- Zhang, K., Lin, W., Zhang, J., Zhao, Y., Wang, X., Zhao, M., 2020. Effect of Toll-like receptor 4 on depressive-like behaviors induced by chronic social defeat stress. *Brain Behav.* 10. <https://doi.org/10.1002/BRB3.1525>
- Zhang, L., Shirayama, Y., Shimizu, E., Iyo, M., Hashimoto, K., 2006. Protective effects of minocycline on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity in serotonergic and dopaminergic neurons of mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* 544, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2006.05.047>
- Zhang, Lei, Huang, L., Lu, K., Liu, Y., Tu, G., Zhu, M., Ying, L., Zhao, J., Liu, N., Guo, F., Zhang, Lin, Zhang, Lu, 2017. Cocaine-induced synaptic structural modification is differentially regulated by dopamine D1 and D3 receptors-mediated signaling pathways. *Addict. Biol.* 22, 1842–1855. <https://doi.org/10.1111/adb.12462>
- Zhang, S., Zong, Y., Ren, Z., Hu, J., Wu, X., Xiao, H., Qin, S., Zhou, G., Ma, Y., Zhang, Y., Yu, J., Wang, K., Lu, G., Liu, Q., 2020. Regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase in hippocampal microglia by NLRP3 inflammasome in lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors. *Eur. J. Neurosci.* 52, 4586–4601. <https://doi.org/10.1111/EJN.15016>
- Zhang, X., Wang, Y., Wang, H., Li, H., Zhang, T., Peng, Y., Wang, X., 2020. Exploring Methamphetamine Nonenantioselectively Targeting Toll-like Receptor 4/Myeloid Differentiation Protein 2 by in Silico Simulations and Wet-Lab Techniques. *J. Chem. Inf. Model.* 60, 1607–1613. [https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.9B01040/SUPPL\\_FILE/CI9B01040\\_SI\\_002.ZIP](https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.9B01040/SUPPL_FILE/CI9B01040_SI_002.ZIP)
- Zhou, L.J., Peng, J., Xu, Y.N., Zeng, W.J., Zhang, J., Wei, X., Mai, C.L., Lin, Z.J., Liu, Y., Murugan, M., Eyo, U.B., Umpierre, A.D., Xin, W.J., Chen, T., Li, M., Wang, H., Richardson, J.R., Tan, Z., Liu, X.G., Wu, L.J., 2019. Microglia are Indispensable for Synaptic Plasticity in the Spinal Dorsal Horn and Chronic Pain. *Cell Rep.* 27, 3844. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.05.087>
- Zhu, C., Tao, H., Rong, S., Xiao, L., Li, X., Jiang, S., Guo, B., Wang, L., Ding, J., Gao, C., Chang, H., Sun, T., Wang, F., 2021. Glucagon-Like Peptide-1 Analog Exendin-4 Ameliorates Cocaine-Mediated Behavior by Inhibiting Toll-Like Receptor 4 Signaling in Mice. *Front. Pharmacol.* 12.

<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.694476>

- Zhu, R., Bu, Q., Fu, D., Shao, X., Jiang, L., Guo, W., Chen, B., Liu, B., Hu, Z., Tian, J., Zhao, Y., Cen, X., 2018. Toll-like receptor 3 modulates the behavioral effects of cocaine in mice. *J. Neuroinflammation* 15, 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12974-018-1130-8/FIGURES/6>
- Zilkha, N., Feigin, E., Barnea-Ygael, N., Zangen, A., 2014. Induction of depressive-like effects by subchronic exposure to cocaine or heroin in laboratory rats. *J. Neurochem.* 130, 575–582. <https://doi.org/10.1111/jnc.12753>
- Zunszain, P.A., Anacker, C., Cattaneo, A., Choudhury, S., Musaelyan, K., Myint, A.M., Thuret, S., Price, J., Pariante, C.M., 2012. Interleukin-1 $\beta$ : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 37, 939–949. <https://doi.org/10.1038/NPP.2011.277>

# ANEXO 1



OPEN **Inhibition of CSF1R, a receptor involved in microglia viability, alters behavioral and molecular changes induced by cocaine**

Maria Carolina Machado da Silva<sup>1</sup>, Giovanni Freitas Gomes<sup>1</sup>, Heliana de Barros Fernandes<sup>2,3</sup>, Aristóboles Mendes da Silva<sup>3</sup>, Antônio Lúcio Teixeira<sup>5</sup>, Fabrício A. Moreira<sup>4</sup>, Aline Silva de Miranda<sup>2</sup> & Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira<sup>1</sup>\*

*Current Neuropharmacology*, 2023, 21, 235-259

235

REVIEW ARTICLE

## Role of Microglia in Psychostimulant Addiction

Maria Carolina Machado da Silva<sup>1,3</sup>, Lia Parada Iglesias<sup>2</sup>, Eduardo Candelario-Jalil<sup>3</sup>, Habibeh Khoshbouei<sup>3</sup>, Fabrício Araujo Moreira<sup>2</sup> and Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Neuropharmacology Laboratory, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Neuropsychopharmacology Laboratory, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <sup>3</sup>Department of Neuroscience, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL, USA

## Evaluation of Brain Cytokines and the Level of Brain-Derived Neurotrophic Factor in an Inflammatory Model of Depression

Janine Karina Hideko Alfenas Horita<sup>a</sup> Maria Carolina Machado da Silva<sup>a</sup>  
Carolina Zaniboni Ferrari<sup>a</sup> Erica Leandro Marciano Vieira<sup>b</sup> Fabricio A. Moreira<sup>a</sup>  
Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira<sup>a</sup> Helton José Reis<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <sup>b</sup>Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Journal of Neuroimmunology 354 (2021) 577534



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

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



Serotonin and dopamine receptors profile on peripheral immune cells from patients with temporal lobe epilepsy

Érica Leandro Marciano Vieira<sup>a,1</sup>, Maria Carolina Machado da Silva<sup>b,1</sup>, Ana Paula Gonçalves<sup>c</sup>,  
Gabriela Lopes Martins<sup>b</sup>, Antônio Lúcio Teixeira<sup>d,e</sup>, Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira<sup>b,c,s,1</sup>,  
Helton José Reis<sup>b,c,s,1</sup>

<sup>a</sup> Centre for Addiction and Mental Health – CAMH, Toronto M5T 1R8, Canada

<sup>b</sup> Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa BH, Belo Horizonte 30260-070, Brazil

<sup>e</sup> Neuropsychiatry Program and Immuno-Psychiatry Lab, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, UT Health Houston, 1941 East Road, Houston, TX 77054, USA



# ANEXO 2

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## International Immunopharmacology

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

## A new lipophilic amino alcohol, chemically similar to compound FTY720, attenuates the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by PI3K/Akt pathway inhibition



Luan Cristian da Silva<sup>a,\*</sup>, Isabel Vieira de Assis Lima<sup>a</sup>, Maria Carolina Machado da Silva<sup>b</sup>, Taís Arthur Corrêa<sup>c</sup>, Viviane Passos de Souza<sup>a</sup>, Mauro Vieira de Almeida<sup>d</sup>, Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira<sup>b</sup>, Ana Paula Ferreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Federal University de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

<sup>c</sup> Department of Exact and Earth Sciences, State University of Minas Gerais, Frutal 38200-000, Brazil

<sup>d</sup> Department of Chemistry, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Brazil


Pharmacological Reports

<https://doi.org/10.1007/s43440-021-00301-8>

ARTICLE



## Cannabidiol prevents lipopolysaccharide-induced sickness behavior and alters cytokine and neurotrophic factor levels in the brain

Pedro Augusto Lopes Tito<sup>1,2</sup> · Túlio César de Souza Bernardino<sup>1,2</sup> · Paula Maria Quaglio Bellozi<sup>1,2</sup> · Maria Carolina Machado da Silva<sup>2</sup> · Aline Silva de Miranda<sup>3</sup> · Érica Leandro Marciano Vieira<sup>1,4</sup> · Fabrício A. Moreira<sup>1,2</sup> · Andrés Palotás<sup>5,6,7</sup> · Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira<sup>1,2</sup> · Helton José Reis<sup>1,2</sup> 



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

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

Research article

## Neurochemical abnormalities in the hippocampus of male rats displaying audiogenic seizures, a genetic model of epilepsy



Rodrigo Ribeiro dos Santos<sup>a,b</sup>, Túlio C. Bernardino<sup>b</sup>, Maria Carolina Machado da Silva<sup>b</sup>, Antônio C.P. de Oliveira<sup>b</sup>, Luciana E. Drumond<sup>c</sup>, Daniela V. Rosa<sup>a</sup>, André R. Massensini<sup>c</sup>, Márcio F.D. Moraes<sup>c</sup>, Maria C. Doretto<sup>c</sup>, Marco A. Romano-Silva<sup>a</sup>, Helton J. Reis<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Saúde Mental, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Av Alfredo Balena 190, CEP 30130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av Antonio Carlos 6627, Campus Pampulha, CEP 30190-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup> Núcleo de Neurociências, Departamento de Biofísica e Fisiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av Antonio Carlos 6627, Campus Pampulha, CEP 30190-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Pharmacological Reports (2022) 74:1099–1106

<https://doi.org/10.1007/s43440-022-00391-y>

SHORT COMMUNICATION



## Cannabidiol effect in pentylenetetrazole-induced seizures depends on PI3K

Isabel Vieira de Assis Lima<sup>1</sup> · Hyorrana Priscila Pereira Pinto<sup>2</sup> · Paula Maria Quaglio Bellozi<sup>1</sup> · Maria Carolina Machado da Silva<sup>1</sup> · Luciano R. Vilela<sup>1</sup> · Fabrício A. Moreira<sup>1</sup> · Márcio Flávio Dutra Moraes<sup>2</sup> · Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira<sup>1</sup>

Received: 22 April 2022 / Revised: 8 July 2022 / Accepted: 13 July 2022 / Published online: 16 September 2022

© The Author(s) under exclusive licence to Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences 2022



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, & Immunity - Health

journal homepage: [www.editorialmanager.com/bbih/default.aspx](http://www.editorialmanager.com/bbih/default.aspx)



## Chronic infection by atypical *Toxoplasma gondii* strain induces disturbance in microglia population and altered behaviour in mice

Ramayana Morais de Medeiros Brito<sup>a,c</sup>, Maria Carolina Machado da Silva<sup>b</sup>,  
Flaviane Vieira-Santos<sup>a</sup>, Camila de Almeida Lopes<sup>a</sup>, Jorge Lucas Nascimento Souza<sup>a</sup>,  
Alexandre Lazoski Bastilho<sup>c</sup>, Heliana de Barros Fernandes<sup>d</sup>, Aline Silva de Miranda<sup>d</sup>,  
Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira<sup>b</sup>, Ricardo Wagner de Almeida Vitor<sup>e</sup>,  
Valter Ferreira de Andrade-Neto<sup>c</sup>, Lillian Lacerda Bueno<sup>a</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>a,\*\*</sup>,  
Luísa Mourão Dias Magalhães<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Immunobiology and Control of Parasites, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Neuropharmacology Laboratory, Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Malaria and Toxoplasmosis Biology, Department of Microbiology and Parasitology, Biosciences Centre, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Neurobiology, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>e</sup> Laboratory of Toxoplasmosis, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

[www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)

**scientific reports**



## OPEN Chronic hyperpalatable diet induces impairment of hippocampal-dependent memories and alters glutamatergic and fractalkine axis signaling

Roberta Ribeiro<sup>1</sup>, Emanuele Guimarães Silva<sup>3</sup>, Felipe Caixeta Moreira<sup>3</sup>,  
Giovanni Freitas Gomes<sup>5</sup>, Gabriela Reis Cussat<sup>1</sup>, Barbara Stehling Ramos Silva<sup>1</sup>,  
Maria Carolina Machado da Silva<sup>1</sup>, Heliana de Barros Fernandes<sup>4</sup>,  
Carolina de Sena Oliveira<sup>1</sup>, Leonardo de Oliveira Guarnieri<sup>2</sup>, Victoria Lopes<sup>5</sup>,  
Cláudia Natália Ferreira<sup>5</sup>, Ana Maria Caetano de Faria<sup>3</sup>, Tatiani Uceli Maioli<sup>3</sup>,  
Fabiola Mara Ribeiro<sup>3</sup>, Aline Silva de Miranda<sup>4</sup>, Grace Schenatto Pereira Moraes<sup>2</sup>,  
Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira<sup>1</sup> & Luciene Bruno Vieira<sup>1,✉</sup>

# ANEXO 3

**RELATÓRIO FINAL**  
**Chamada CNPq 16/2020**  
**Doutorado Sanduíche no Exterior - SWE**

**AUMENTO DO TNF MICROGLIAL INDUZIDO PELA  
METANFETAMINA E A LIBERAÇÃO REGULA A ATIVIDADE  
DOPAMINÉRGICA**

**MARIA CAROLINA MACHADO DA SILVA**

Relatório de pesquisa de doutorado sanduíche – Programa  
de Pós-graduação - Ciências Biológicas: Fisiologia e  
Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Orientador no Brasil: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de  
Oliveira

Orientadora no exterior: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Habibeh Khoshbouei

Co-orientador no exterior: Prof. Dr. Eduardo Candelario-  
Jalil

**Belo Horizonte, 2023**

## **PROJETOS DESENVOLVIDOS DURANTE O DOUTORADO SANDUÍCHE**

### **1. AUMENTO DO TNF MICROGLIAL INDUZIDO PELA METANFETAMINA E A LIBERAÇÃO REGULA A ATIVIDADE DOPAMINÉRGICA**

#### **1.1 INTRODUÇÃO**

A metanfetamina (METH) pertence à classe dos psicoestimulantes do tipo anfetamina e são usados clinicamente para tratar déficit de atenção, hiperatividade, obesidade e narcolepsia (White et al., 2018). No entanto, devido às suas propriedades psicoestimulantes e recompensadoras, a METH também é usada como droga recreativa, tornando-se um sério problema de saúde pública em todo o mundo. Na verdade, a METH é a segunda droga ilegal mais comumente usada (Stoneberg et al., 2017).

METH é um análogo de substrato de aminas biogênicas endógenas que levam ao aumento dos níveis de dopamina induzidos por meio de múltiplos mecanismos. Assim, após cruzar a BHE para o SNC, a METH ativa os circuitos de recompensa aumentando a neurotransmissão da dopamina nas vias mesolímbica e mesocortical (Miller et al., 2021).

Embora as alterações nos sistemas dopaminérgicos sejam consideradas a chave para as alterações neurobiológicas que regulam o comportamento motivado, é bem conhecido que as substâncias psicoativas também podem alterar outras vias moleculares, incluindo a ativação de células microgliais e aumento dos níveis de citocinas (Doggui et al., 2021; Stamatovich et al., 2021; Stolyarova et al., 2014). Uma única dose de METH aumenta os níveis de TNF- $\alpha$  e interleucina IL-6 mRNA no sistema de recompensa (Gonçalves et al., 2008). Curiosamente, em culturas de micróglia isolada, a liberação de dopamina ocorre de forma dependente da ativação da expressão de genes inflamatórios (Frank et al., 2016).

Estudos prévios já demonstraram que a ativação microglial modula o sistema de recompensa (Lo Iacono et al., 2018; Taylor et al., 2015), principalmente porque os neurônios

dopaminérgicos apresentam alta suscetibilidade a sinais neuroinflamatórios (Douma and de Kloet, 2020). Por exemplo, na via mesolímbica, o nocauteamento ou inibição farmacológica do receptor dopaminérgico D3 promove o aumento dos níveis de fatores neurotróficos, bem como aumento da ativação microglial e densidade sináptica, sendo este efeito inibido após o tratamento com minociclina – um inibidor da atividade microglial (Wang et al., 2018; J. Wang et al., 2020). Além disso, células microglias são capazes de alterar a morfologia e a funcionalidade dos neurônios dopaminérgicos, modificando a expressão dos receptores, do transportador de dopamina (DAT) e da tirosina hidroxilase (TH) (Catale et al., 2022; Kopec et al., 2018; Lo Iacono et al., 2018; Smith et al., 2020). Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a ativação microglial, seguida do aumento dos níveis de TNF são capazes de regular a neurotransmissão dopaminérgica dos circuitos de recompensa.

## 1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### **Animais**

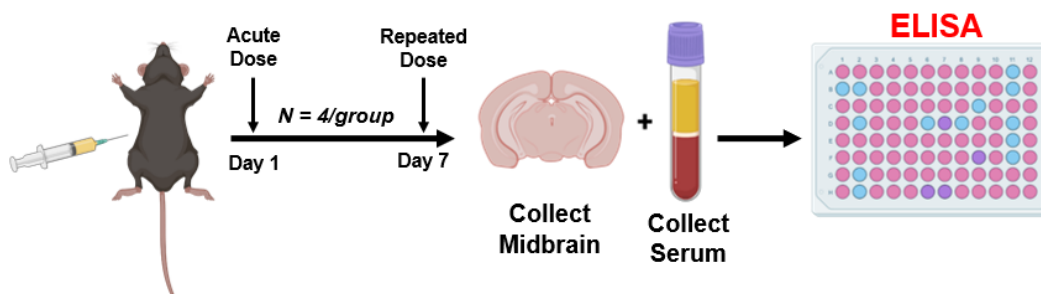
Camundongos machos C57BL/6J provindos do Jackson Laboratory foram usados para este estudo. Os camundongos foram alojados em um ciclo claro-escuro de 12 horas com acesso ad libitum a comida e água. Todos os procedimentos de experimentos com animais foram realizados de acordo com o Guia do NIH para o cuidado e uso de animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidados com Animais da Universidade da Flórida.

### **Avaliação dos níveis de TNF séricos e cerebrais**

Os animais foram tratados com salina, METH, UCB + METH e TNF para avaliação dos níveis de TNF cerebrais e séricos. Após 7 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e o sangue coletado por punção cardíaca terminal, coagulado por 30 minutos, centrifugado para separar o soro do sangue total e armazenado em alíquotas a -80 °C. Os tecidos do mesencéfalo foram individualmente homogeneizados em tampão de lise contendo inibidores de protease, centrifugados e sobrenadantes.

O homogenato foi coletado e dividido em alíquotas para armazenamento a -80 °C. Alíquotas de soro e cérebro foram usadas para ELISA de citocina baseada em beads detectadas

via citometria de fluxo para quantificar as concentrações de TNF na periferia (soro) e mesencéfalo (Figura 1). Os valores do homogeneizado mesencéfalo foram normalizados para as concentrações de proteína obtidas por meio do ensaio de proteína Bio-rad (baseado no método de Lowry).

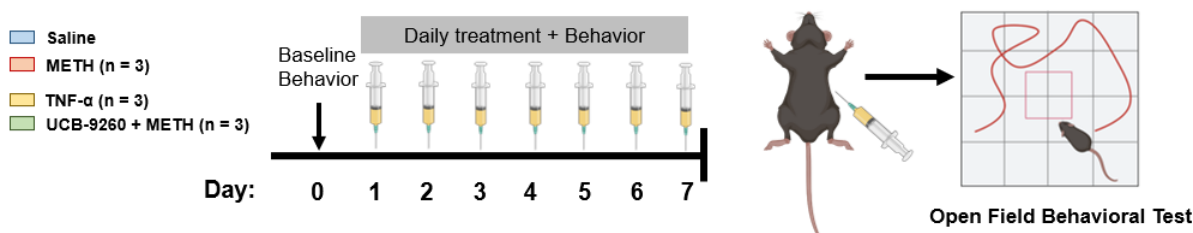


**Figura 1:** Imagem representativa do delineamento experimental para dosagem de TNF após administração de METH e UCB.

### Sensibilização comportamental

A sensibilização comportamental é caracterizada pelo aumento de um determinado comportamento como, por exemplo, a atividade locomotora, após a administração repetida de uma droga. Dessa forma, a sensibilização comportamental é um modelo de plasticidade sináptica entre o uso recreativo de uma droga e o uso abusivo (Köks, 2015).

Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e foi avaliada a distância total percorrida por 60 minutos durante 9 dias. Nos dias 1 e 2 os animais foram habituados no aparato. Do dia 3 ao dia 9, os animais foram tratados com veículo ou UCB 9260. Uma hora depois, os animais foram tratados com METH (2 mg/kg i.p.) ou solução salina, e imediatamente colocados no aparato (Figura 2).



**Figura 2:** Imagem representativa do delineamento experimental do teste de sensibilização comportamental.

## **Imunofluorescência**

Os animais anestesiados com isoflurano e perfundidos transcárdialmente com solução PBS (pH 7,4) seguida de PFA 4%. Os cérebros foram então pós-fixados em 4% de PFA por 24-48 horas a 4°C e armazenados em PBS. Os cérebros foram cortados em 40 µm usando um vibratomo (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). As fatias foram colocadas em tampão citrato 10 mM (pH 6) a 95–99 °C por 20 minutos seguidos de dois enxágues em PBS. Em seguida, as fatias foram bloqueadas e permeabilizadas em 10% de soro de cabra normal (Lampire Biological Products, Pipersville, PA) e 0,3% de Triton X-100 (Sigma) em PBS e incubadas a 37°C por 1 hora. Os cortes foram então transferidos para a solução de anticorpo primário contendo 0,3% de Triton X-100, 5% de soro normal de cabra e anti-Iba1, anti-TH, anti-GFAP e/ou anti-CD31. As fatias foram incubadas com anticorpos primários a 4 °C overnight e depois lavadas em PBS três vezes, 20 min cada. Em seguida, os tecidos foram incubados com anticorpos secundários por 1 hora em temperatura ambiente no escuro e depois lavadas com PBS. Por fim, as lâminas foram montadas e cobertas com Fluoromount G (Southern Biotechnology, Birmingham, AL).

## **Aquisição de imagens e análises morfométricas**

As imagens obtidas no eixo Z do estriado e VTA foram capturadas usando uma objetiva × 40 em um microscópio confocal de varredura a laser equipado com um sistema Nikon A1 (Nikon, Japão). As regiões estriado e VTA foram definidas usando o Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas e áreas ocupadas por neurônios TH positivos. Para todas as análises morfométricas, foi utilizado o software Image J. As projeções de intensidade máxima das células foram limitadas para criar uma máscara binária. Imagens binárias de 30-86 células microgliais individuais por região para cada cérebro de camundongo foram usadas para realizar a análise morfométrica (microglia incompletas e microglia com ramificações na margem foram excluídas). Para a análise de Sholl, uma linha foi traçada a partir do centro da soma estendendo-se até o ponto final do ramo mais longo. O plug-in de análise Sholl foi usado para desenhar círculos concêntricos a partir de 0 µm seguidos por círculos sucessivos de 1 µm, a fim

de identificar o número de interseções ao longo dos raios Sholl (Heindl et al., 2018; Xu et al., 2016). Para a análise do esqueleto, as imagens de micróglia individuais foram preparadas por redução de ruído para remover a fluorescência de fundo pixelada. Usando o plugin esqueleto, as imagens foram esqueletizadas para quantificar o número de ramificações e a soma dos comprimentos processados de cada micróglia individual (Morrison & Filosa, 2013). Territórios cobertos por células microgлияis individuais foram calculados no software ImageJ usando um limite convexo. As regiões de interesse (ROIs) foram desenhadas manualmente ao redor do soma da microglia e a área foi quantificada no ImageJ.

### **Regiões de contato entre células microgлияis e neurônios dopaminérgicos**

Imagens capturadas no confocal em 3D da VTA foram capturadas usando uma objetiva de imersão em óleo  $\times 40$  no microscópio confocal de varredura a laser (Nikon, Japão) de 3 a 4 seções para cada cérebro. Os sinais de imunofluorescência em cada imagem foram visualizados por tabelas de pesquisa de cores para enfatizar diferentes estruturas e linearizados por uma macro no software Element. Os contatos célula-célula foram identificados pela sobreposição de sinais de imunofluorescência Iba1 e TH neuronal usando o software Element. As áreas de sobreposição foram identificadas usando a ferramenta de processo de interseção no Element em máscaras binárias 3D dos dois sinais de imunofluorescência Iba1 e TH. A máscara 3D de células TH positivas foi usada para calcular as áreas TH. Para evitar o ruído causado pelo processamento da imagem, partículas menores que 3  $\mu\text{m}$  foram removidas das análises (Lana et al., 2019). Para a normalização dos dados, as áreas de contato do neurônio positivo microglia-TH foram calculadas e mostradas por áreas TH.

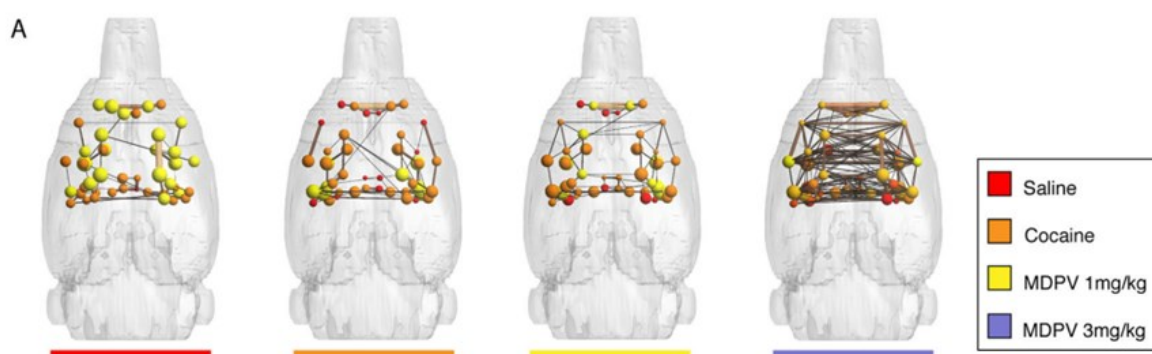
### **Avaliação da conectividade funcional e topologia das redes neurais**

Para determinar como o TNF modula a conectividade funcional e a topologia das redes neuronais induzidas pela metanfetamina, foi utilizada a análise de teoria dos grafos de imagens obtidas pela técnica de ressonância magnética funcional (*Functional Magnetic Resonance Imaging*, fMRI). Antes de serem submetidos aos protocolos experimentais, os animais foram fotografados sob sedação e sua respiração espontânea foi monitorada e registrada durante a aquisição de ressonância magnética (SA Instruments, Stony Brook, NY). A temperatura corporal foi mantida em 37–38 °C através de um sistema de recirculação de água quente (Biopac Systems, Inc). Foi realizada uma sequência de imagens de acordo com os parâmetros

necessários para avaliação da função da conectividade inicial. Em seguida, os animais foram tratados de acordo com seu respectivo grupo experimental. O protocolo foi realizado de acordo com estudos prévios do grupo da Prof<sup>a</sup> Khoshbouei e do Prof. Marcelo Febo, um colaborador do grupo.

### Análise das redes neurais

As redes de conectividade do cérebro serão analisadas usando o Brain Connectivity Toolbox for Matlab (Rubinov e Sporns, 2010) e os gráficos de conectividade simétricos serão organizados primeiro no Matlab. Os valores de pontuação z dos gráficos serão limitados para cada sujeito para criar matrizes com densidades iguais, além de serem normalizados pelo escore z mais alto. Iremos utilizar os parâmetros de rede de acordo com Perez et al., 2019. As redes cerebrais serão visualizadas pelo BrainNet Viewer e as análises dos nós como tamanho e cor serão dimensionados por sua força, e as bordas serão dimensionadas por z-scores (Fig. 10).



**Figura 3:** Imagem representativa das alterações de conectividade funcional induzidas por drogas de abuso (Adaptado de Perez et al., 2019).

## **2. RIPK2 É ESSENCIAL NAS RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS MICROGLIAIS APÓS ESTIMULAÇÃO COM O MDP, MAS NÃO A LPS**

### **2.1 INTRODUÇÃO**

O reconhecimento de padrões moleculares associados a micróbios pelo domínio 1 de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NOD1) e receptores NOD2 leva à interação entre a proteína quinase 2 serina/treonina que interage com o receptor (Ripk2, também conhecida como Rip2, RICK, CARDIAK e CARD3) e esses receptores imunes inatos através da interação do domínio de recrutamento de caspase (CARD)-CARD, seguida pela liberação de fatores pró-inflamatórios através da ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Kobayashi et al., 2002; Park et al., 2007). Como um mediador crítico que modula a via de sinalização pró-inflamatória, a inibição farmacológica, a deleção genética ou a degradação usando a quimera de Ripk2 visando a proteólise pode ser benéfica na redução da inflamação em diversas patologias.

A ativação da sinalização do Ripk2 também parece ser importante no processo de ativação microglial, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular que leva à produção de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e outras moléculas envolvidas na resposta imune no SNC (Kim et al., 2022; M. Wang et al., 2020). Neste contexto, compreender os mecanismos moleculares subjacentes à ativação microglial pode levar a avanços significativos no tratamento de doenças neuroinflamatórias e neurodegenerativas. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a inibição do Ripk2 seria capaz de diminuir a ativação microglial induzida por dois diferentes componentes da membrana das membranas de bactérias.

### **2.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **Cultura de células**

A linha celular microglial de camundongo SIM-A9 (passagem 5-40) foi cultivada em um frasco T75 com meio de crescimento completo composto por 84% de meio DMEM/F12 (Cat. No. SH30023.01; HyClone, Cytiva, Marlborough, MA), 10% de soro fetal bovino inativado (Cat. No. F4135, Sigma), 5% de soro de cavalo inativado pelo calor (Cat. No. 16050130, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) e 1% de penicilina-estreptomicina (Cat. No. 15140122; ThermoFisher Scientific) e mantida a 37 °C em uma incubadora de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram subcultivadas a cada 2-3 dias.

### **Tratamentos e colheita de cultura celular**

Para os experimentos atribuídos, as células foram semeadas a uma densidade de  $3,6 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em uma placa de 60 mm pré-revestida com 50 µg/mL de poli-D-lisina (Cat. No. P6407, MilliporeSigma, St. Louis, MO) com 4 mL de meio de crescimento e mantida a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de crescer durante a noite, as células foram incubadas por 4 horas com diferentes concentrações (0-10 µM) de Ripk2 protac – um inibidor do Ripk2 – para o experimento dose-resposta, ou diferentes períodos de incubações (0-24 h) com 1 µM de Ripk2 protac para o estudo de curso de tempo. Para otimizar a concentração do agonista de NOD2 usado nos estudos a seguir, as células foram expostas a várias concentrações (0 a 10 µg/mL) de muramil dipeptídeo (MDP, um componente da parede celular bacteriana) (Cat. No. tlr1-lmdp, InvivoGen, San Diego, CA) por 24 horas. Depois de confirmar a concentração ideal de MDP, as células foram tratadas com 100 ng/mL de MDP com diferentes tempos de incubação para determinar os níveis de proteínas fosforiladas envolvidas nas vias de sinalização NF-κB e p38 MAPK. Além disso, as células foram pré-tratadas com DMSO ou a concentração otimizada de Ripk2 protac (1 µM) por 4 horas seguidas por 20 horas de incubação de 100 ng/mL de MDP ou 10 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) (Cat. No. L9641, MilliporeSigma). No final de cada tempo de incubação, os meios foram colhidos para análise de viabilidade celular e as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) gelada e coletadas com 200 µL de tampão de lise por radioimunoprecipitação (RIPA) consistindo em 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1% de NP-40, 0,5% desoxicolato de sódio e 0,1% de SDS mais protease e coquetéis inibidores de fosfatase (Cat. N°s 78430 e 78428, respectivamente; ThermoFisher Scientific). Metade do volume dos lisados celulares foi usado para isolamento de RNA e a outra metade foi usada para extração de proteínas.

### **Análise de immunoblot**

Trinta microgramas de proteína foram desnaturados em tampão de amostra 2 × Laemmli (Cat. No. 1610737, Bio-Rad, Hercules, CA) contendo 4% de  $\beta$ -mercaptoetanol a 100 °C por 5 min antes de carregar em 4-20% SDS-poliacrilamida géis. Após a execução dos géis, eles foram transferidos para membranas de nitrocelulose e então bloqueados por 1 hora em temperatura ambiente com Intercept (TBS) Blocking Buffer (Cat. No. 927-60001, LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE). Depois disso, as membranas foram incubadas a 4 °C durante a noite com anticorpos primários anti-Ripk2 (1:1000; Cat. No. 4142; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-iNOS (1:1000; Cat. No. ab15323; Abcam, Cambridge, MA), anti-COX-2 (1:2000; Cat. No. ab15191; Abcam), anti-fosfo-NF- $\kappa$ B p65 (1:1000; Cat. No. 3033 ; Cell Signaling Technology), anti-fosfo-p38 MAPK (1:1000; Cat. No. 4631; Cell Signaling Technology), ou anti- $\beta$ -actina (1:5000; Cat. No. 664801; BioLegend, San Diego, CA) em Intercept T20 (TBS) Antibody Diluent (CAT#: 927-65001). As membranas foram então lavadas com TBST três vezes em intervalos de 5 min, incubadas com anticorpos secundários IRDye 800CW (1:30000; Li-Cor, Lincoln, NE) IRDye 680LT (1:40000; Li-Cor ) por 1 hora em temperatura ambiente. As bandas imunorreativas foram visualizadas e analisadas densitometricamente usando o scanner infravermelho Odyssey e o software Image Studio 2.0 (Li-Cor).

### **Extração de RNA**

A metade restante dos lisados celulares (~150 $\mu$ L) foi misturada com 1,0 mL de solução TRIzol (Cat. No. 15596026; ThermoFisher Scientific) para ser processada para isolamento de RNA. Resumidamente, 200  $\mu$ L de clorofórmio foram adicionados à mistura de lisados celulares/TRIzol e bem agitados no vórtice, incubados à temperatura ambiente por 3 min, depois centrifugados a 12.000  $\times$  g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa superior foi salva e misturada com um volume igual de etanol a 70%, agitado em vórtice antes de filtrar a mistura em uma coluna de sílica (Cat. No. SD5008; Bio Basic) a 12.000  $\times$  g por 1 min a 4 °C. Após a filtração, os ácidos nucleicos ligados à resina de sílica da coluna foram lavados com 250  $\mu$ L de tampão de lavagem A (tiocianato de guanidina 1,0 M, Tris 10 mM, pH 7,0) a 12.000  $\times$  g por 1 min. Para remoção de DNA, 75  $\mu$ L de mistura de digestão de DNase I (66  $\mu$ L de água livre de nuclease + 1,5  $\mu$ L de DNase I (Cat. No. 6344; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) + 7,5  $\mu$ L de 10X NEB DNase I Reaction Buffer (Cat. . No. B0303S; New England BioLabs® Inc., Ipswich, MA) foi adicionado ao leito de resina de sílica da coluna e deixado à temperatura ambiente por 15 min. A coluna foi

lavada novamente com a adição de 250  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem A e centrifugado a  $12.000 \times g$  por 1 min. O filtrado foi descartado e a coluna de sílica ligada com a amostra de RNA foi lavada com 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem B (10 mM Tris, pH 7,0 em 80% de etanol) e centrifugada a  $12.000 \times g$  por 1 min. Depois disso, a amostra de RNA foi lavada com o tampão de lavagem B novamente e centrifugada um tempo final a  $16.000 \times g$  por 2 min. A coluna de sílica foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga sem nuclease de 1,5 mL e adicione 50  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease (pré-aquecida a  $70^\circ\text{C}$ ), sentar-se à temperatura ambiente por 3 min e eluir o RNA a  $16.000 \times g$  por 2 min. A concentração e a pureza do RNA foram medidas por absorvância (proporção de 260/280) usando um leitor de placas de microvolume Take3 (Biotek Instruments, Winooski, VT).

### **PCR em tempo real**

As reações quantitativas de PCR em tempo real foram conduzidas em uma placa de 96 poços usando um CFX96 Touch Real-Time PCR System (Bio-Rad). Cada reação foi realizada em um volume de 10  $\mu\text{L}$  contendo 1  $\times$  Luna Universal One-Step Reaction Mix mais 1  $\times$  Luna WarmStart® RT Ezyme Mix (Cat. No. E3005; New England BioLabs® Inc.), 0,4  $\mu\text{M}$  de cada primer e 2  $\mu\text{L}$  de 10 ng/ $\mu\text{L}$  de RNA, utilizando as seguintes condições térmicas:  $55^\circ\text{C}$  por 10 min,  $95^\circ\text{C}$  por 1 min, seguido de 40 ciclos de  $95^\circ\text{C}$  por 10 segundos e  $60^\circ\text{C}$  por 30 segundos. Uma análise da curva de fusão ( $60^\circ\text{C}$  a  $95^\circ\text{C}$ ) foi realizada no final de cada PCR para confirmar ainda mais a especificidade dos amplicons. Foram utilizadas sequências de primers para Nos2, Ptgs2, Il-1 $\beta$ , Tnf $\alpha$ , Il6, Ccl2, Mmp9 e os housekeeping genes Cyc1 e Rltr2aiap. Cada amostra foi processada em duplicata e os valores do limiar de ciclo (Ct) foram normalizados pelos housekeeping genes Cyc1 e Rltr2aiap, uma vez que são universalmente estáveis e amplamente utilizados como genes de referência em várias condições.

## OUTRAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

1 - Escrita e publicação do artigo de revisão intitulado “Role of microglia in psychostimulant addiction” na revista *Current Neuropharmacology* (Impact Factor 7.7).

Neste artigo, descrevemos os estudos que demonstram como a cocaína e as anfetaminas modulam o número, a morfologia e a função da micróglia. Também descrevemos o efeito dessas substâncias na produção de mediadores inflamatórios e um possível envolvimento de algumas vias de sinalização molecular

2 - Escrita do artigo de revisão intitulado “Methamphetamine alters blood-brain barrier permeability via a TNF-dependent mechanism”

Neste trabalho, descrevemos os artigos que demonstram como a metanfetamina leva a uma ruptura da barreira hemato-encefálica e os modelos experimentais existentes que investigam a integridade da mesma. Além disso, abordamos o papel do TNF na adaptação e desregulação neuroimune induzida por metanfetamina. Este artigo está nas fases finais de correção e em breve será submetido para publicação.

## PARTICIPAÇÃO EM CURSOS E EVENTOS

\* 2022 UF Center for Addiction Research & Education Annual Symposium

\* Glia in Health and Disease em Long Island/New York - Cold Spring Harbor Laboratory.

Apresentação do trabalho “Modulation of TLR4 alter behavioral sensitization induced by cocaine, but no conditioned place preference.”

Fui agraciada com um Financial Aid pela Cold Spring Harbor Laboratory.

\* The Translational Neuroimmunology Conference: From Bench to Bedside and Back em Asheville/North Carolina.

Apresentação do trabalho “Sex differences in indoleamine 2,3-dioxygenase modulation of behavioral alterations induced by cocaine”.

Fui agraciada com o “FASEB's Translational Neuroimmunology Conference Travel Awards”.

\* Brain Immunology and Glia Scholars Symposium

Apresentação oral do trabalho “Role of neuroinflammation in behavioral and molecular changes induced by cocaine”.

Fui selecionada para participar do evento com todas as despesas pagas.

\* Curso: International Workshop on Confocal Microscopy and Stereology

Minha participação foi patrocinada pela MBF Biosciences.

\* Curso: IBRO-ICPBR Virtual Primate Neurobiology School

\* Curso: Modern Approaches to Behavioural Analysis - CAJAL Advanced Neuroscience Training Programme

\* Curso: aulas de inglês com professor particular oferecidos pela University of Florida

\*Seminários semanais do Mcknight Brain Institute

## PARECER FINAL

Durante o doutorado sanduíche, trabalhei no laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Habibeh Khoshbouei, que detém de uma vasta tecnologia para avaliar a neurotransmissão dopaminérgica, bem como a ativação de diferentes vias inflamatórias. Obviamente, no período de um ano, não tive a oportunidade de explorar toda a tecnologia do laboratório. Porém tive a oportunidade de trabalhar com tecnologias que, até onde sabemos, não existem no Brasil. Além disso, a participação dos seminários semanais do laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Habibeh Khoshbouei foram de extrema importância para meu crescimento profissional.

O laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Habibeh Khoshbouei está inserido no *Center for Addiction Research & Education (CARE) – Florida University*, sendo um este local um centro de referência no estudo da adicção, o que envolve estudos epidemiológicos e de neurociência celular e molecular, desenvolvimento de medicamentos e testes clínicos. Nesse contexto, também tive a oportunidade de participar de eventos científicos como seminários e palestras ministrados por grandes pesquisadores da área de drogas de abuso, o que trouxe uma grande contribuição intelectual para a minha formação.

O Prof. Dr. Calendario-Jalil, o qual já é um colaborador antigo do nosso grupo de pesquisa no Brasil, se tornou meu co-orientador no exterior. Dessa forma, tive a oportunidade de desenvolver um estudo *in vitro* em seu laboratório. Apesar da cultura de células microgliciais ser uma tecnologia extremamente presente no Brasil, eu ainda não tinha experiência com estudos *in vitro*. Além disso, também pude colaborar com outros projetos desenvolvidos no laboratório dele.

Como eu estava no exterior, tive a oportunidade de participar de eventos muito importantes como o curso no Cold Spring Harbor Laboratory, o congresso da FASEB e minha visita na University of Virginia. A participação nesses eventos me trouxe muito conhecimento científico e também muitas oportunidades de networking com vários professores de diversas universidades do exterior.

Por fim, pude concorrer a bolsa de pós doc do CAPES print para alunos com 1 ano de experiência no exterior. Fui contemplada com a bolsa e irei trabalhar no desenvolvimento do primeiro centro de vetores virais do Brasil, sob supervisão do Prof. Dr. Vinicius Ribas. Inclusive, o centro já está sendo divulgado em rede nacional (<https://noticias.r7.com/minas-gerais/mg-record/videos/ufmg-tera-laboratorio-para-produzir-medicamentos-contra-doencas->

[raras-17022023](https://ufmg.br/comunicacao/noticias/ufmg-tera-laboratorio-unico-no-brasil-para-producao-de-terapias-para-doencas-raras); <https://ufmg.br/comunicacao/noticias/ufmg-tera-laboratorio-unico-no-brasil-para-producao-de-terapias-para-doencas-raras>). Por uma feliz coincidência, o Vector Core Lab – um dos primeiros laboratórios a trabalharem com vetores virais no tratamento de doenças raras – fica localizado na mesma cidade em que eu estava fazendo o doutorado sanduíche. Dessa forma, tive o imenso prazer de visitar o Vector Core Lab e conhecer o Prof. Vinci Chiodo, estabelecendo uma colaboração entre os laboratórios, o que irá ajudar muito o desenvolvimento do futuro centro de vetores virais do ICB.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Catale, C., Lo Iacono, L., Martini, A., Heil, C., Guatteo, E., Mercuri, N.B., Viscomi, M.T., Palacios, D., Carola, V., 2022. Early Life Social Stress Causes Sex- and Region-Dependent Dopaminergic Changes that Are Prevented by Minocycline. *Mol. Neurobiol.* 2022 596 59, 3913–3932. <https://doi.org/10.1007/S12035-022-02830-6>
- Doggui, R., Elsayy, W., Conti, A.A., Baldacchino, A., 2021. Association between chronic psychoactive substances use and systemic inflammation: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 125, 208–220. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2021.02.031>
- Douma, E.H., de Kloet, E.R., 2020. Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 108, 48–77. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2019.10.015>
- Frank, M.G., Adhikary, S., Sobesky, J.L., Weber, M.D., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2016. The danger-associated molecular pattern HMGB1 mediates the neuroinflammatory effects of methamphetamine. *Brain. Behav. Immun.* 51, 99–108. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2015.08.001>
- Gonçalves, J., Martins, T., Ferreira, R., Milhazes, N., Borges, F., Ribeiro, C.F., Malva, J.O., Macedo, T.R., Silva, A.P., 2008. Methamphetamine-induced early increase of IL-6 and TNF-alpha mRNA expression in the mouse brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1139, 103–111. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1432.043>
- Kim, S.W., Oh, S.A., Seol, S.I., Davaanyam, D., Lee, J.K., 2022. Cytosolic HMGB1 Mediates LPS-Induced Autophagy in Microglia by Interacting with NOD2 and Suppresses Its Proinflammatory Function. *Cells* 11. <https://doi.org/10.3390/CELLS11152410>
- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L.D., Galán, J.E., Núñez, G., Janeway, C.A., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nat.* 2002 4166877 416, 194–199. <https://doi.org/10.1038/416194a>
- Köks, S., 2015. Experimental models on effects of psychostimulants, in: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc., pp. 107–129. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.03.002>
- Kopec, A.M., Smith, C.J., Ayre, N.R., Sweat, S.C., Bilbo, S.D., 2018. Microglial dopamine

- receptor elimination defines sex-specific nucleus accumbens development and social behavior in adolescent rats. *Nat. Commun.* 2018 9, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06118-z>
- Lo Iacono, L., Catale, C., Martini, A., Valzania, A., Viscomi, M.T., Chiurchiù, V., Guatteo, E., Bussone, S., Perrone, F., Di Sabato, P., Aricò, E., D'Argenio, A., Troisi, A., Mercuri, N.B., Maccarrone, M., Puglisi-Allegra, S., Casella, P., Carola, V., 2018. From Traumatic Childhood to Cocaine Abuse: The Critical Function of the Immune System. *Biol. Psychiatry* 84, 905–916. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.05.022>
- Miller, D.R., Bu, M., Gopinath, A., Martinez, L.R., Khoshbouei, H., 2021. Methamphetamine Dysregulation of the Central Nervous System and Peripheral Immunity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 379, 372–385. <https://doi.org/10.1124/JPET.121.000767>
- Park, J.-H., Kim, Y.-G., McDonald, C., Kanneganti, T.-D., Hasegawa, M., Body-Malapel, M., Inohara, N., Núñez, G., 2007. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J. Immunol.* 178, 2380–2386. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.4.2380>
- Smith, B.L., Laaker, C.J., Lloyd, K.R., Hiltz, A.R., Reyes, T.M., 2020. Adolescent microglia play a role in executive function in male mice exposed to perinatal high fat diet. *Brain. Behav. Immun.* 84, 80. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2019.11.010>
- Stamatovich, S.N., Lopez-Gamundi, P., Suchting, R., Colpo, G.D., Walss-Bass, C., Lane, S.D., Schmitz, J.M., Wardle, M.C., 2021. Plasma pro- and anti-inflammatory cytokines may relate to cocaine use, cognitive functioning, and depressive symptoms in cocaine use disorder. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 47, 52–64. <https://doi.org/10.1080/00952990.2020.1828439>
- Stolyarova, A., Thompson, A.B., Barrientos, R.M., Izquierdo, A., 2014. Reductions in Frontocortical Cytokine Levels are Associated with Long-Lasting Alterations in Reward Valuation after Methamphetamine. *Neuropsychopharmacol.* 2015 40, 1234–1242. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.309>
- Stoneberg, D.M., Shukla, R.K., Magness, M.B., 2017. Global Methamphetamine Trends. <https://doi.org/10.1177/1057567717730104> 28, 136–161. <https://doi.org/10.1177/1057567717730104>
- Taylor, A.M.W., Castonguay, A., Taylor, A.J., Murphy, N.P., Ghogha, A., Cook, C., Xue, L., Olmstead, M.C., de Koninck, Y., Evans, C.J., Cahill, C.M., 2015. Microglia disrupt mesolimbic reward circuitry in chronic pain. *J. Neurosci.* 35, 8442–8450. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4036-14.2015>
- Wang, J., Jia, Y., Li, G., Wang, B., Zhou, T., Zhu, L., Chen, T., Chen, Y., 2018. The Dopamine Receptor D3 Regulates Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 21, 448. <https://doi.org/10.1093/IJNP/PYY005>
- Wang, J., Lai, S., Li, G., Zhou, T., Wang, B., Cao, F., Chen, T., Zhang, X., Chen, Y., 2020. Microglial activation contributes to depressive-like behavior in dopamine D3 receptor knockout mice. *Brain. Behav. Immun.* 83, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.10.016>

- Wang, M., Ye, X., Hu, J., Zhao, Q., Lv, B., Ma, W., Wang, W., Yin, H., Hao, Q., Zhou, C., Zhang, T., Wu, W., Wang, Y., Zhou, M., Zhang, C. hui, Cui, G., 2020. NOD1/RIP2 signalling enhances the microglia-driven inflammatory response and undergoes crosstalk with inflammatory cytokines to exacerbate brain damage following intracerebral haemorrhage in mice. *J. Neuroinflammation* 17. <https://doi.org/10.1186/S12974-020-02015-9>
- White, T.L., Monnig, M.A., Walsh, E.G., Nitenson, A.Z., Harris, A.D., Cohen, R.A., Porges, E.C., Woods, A.J., Lamb, D.G., Boyd, C.A., Fekir, S., 2018. Psychostimulant drug effects on glutamate, Glx, and creatine in the anterior cingulate cortex and subjective response in healthy humans. *Neuropsychopharmacology* 43, 1498. <https://doi.org/10.1038/S41386-018-0027-7>

# ANEXO 4

<b>A depleção parcial da micróglia e a cocaína alteraram os níveis de citocinas de maneira região dependente - Fig. 18</b>						
	<b>Fator cocaína</b>		<b>Fator depleção</b>		<b>Interação</b>	
<b>A</b> <i>Striatum</i>	$F_{(1,23)}$	p	$F_{(1,23)}$	p	$F_{(1,23)}$	p
Two-way ANOVA	1.27	0.2701	1.75	0.1982	0.07	0.7847
<b>B</b> <i>HIP</i>	$F_{(1,22)}$	p	$F_{(1,22)}$	p	$F_{(1,22)}$	p
Two-way ANOVA	0.22	0.6376	0.80	0.3808	0.28	0.6008
<b>C</b> <i>PFC</i>	$F_{(1,20)}$	p	$F_{(1,20)}$	p	$F_{(1,20)}$	p
Two-way ANOVA	2.78	0.1109	0.25	0.6210	0.01	0.9126
<b>D</b> <i>Striatum</i>	$F_{(1,20)}$	p	$F_{(1,20)}$	p	$F_{(1,20)}$	p
Two-way ANOVA	1.06	0.3151	1.12	0.3017	0.16	0.6923
<b>E</b> <i>HIP</i>	$F_{(1,23)}$	p	$F_{(1,23)}$	p	$F_{(1,23)}$	p
Two-way ANOVA	5.47	0.0284	0.33	0.5707	0.1	0.7469
<b>F</b> <i>PFC</i>	$F_{(1,20)}$	p	$F_{(1,20)}$	p	$F_{(1,20)}$	p
Two-way ANOVA	2.87	0.1054	0.00	0.9936	3.04	0.0961
<b>G</b> <i>Striatum</i>	$F_{(1,23)}$	p	$F_{(1,23)}$	p	$F_{(1,23)}$	p
Two-way ANOVA	0.05	0.8235	1.52	0.2295	0.01	0.8994
<b>H</b> <i>HIP</i>	$F_{(1,22)}$	p	$F_{(1,22)}$	p	$F_{(1,22)}$	p
Two-way ANOVA	0.57	0.4560	0.21	0.6449	1.24	0.2766
<b>I</b> <i>PFC</i>	$F_{(1,18)}$	p	$F_{(1,18)}$	p	$F_{(1,18)}$	p
Two-way ANOVA	6.94	0.0168	0.30	0.5889	0.01	0.9001
<b>J</b> <i>Striatum</i>	$F_{(1,21)}$	p	$F_{(1,21)}$	p	$F_{(1,21)}$	p
Two-way ANOVA	0.03	0.8459	5.73	0.0260	1.17	0.2898
<b>K</b> <i>HIP</i>	$F_{(1,23)}$	p	$F_{(1,23)}$	p	$F_{(1,23)}$	p
Two-way ANOVA	0.25	0.6216	0.02	0.8692	0.50	0.4847
<b>L</b> <i>PFC</i>	$F_{(1,21)}$	p	$F_{(1,21)}$	p	$F_{(1,21)}$	p
Two-way ANOVA	1.21	0.2823	0.65	0.4269	0.29	0.5934

<b>A depleção parcial da cocaína e da micróglia podem alterar a via dopaminérgica - Fig. 21</b>						
	<b>Fator cocaína</b>		<b>Fator depleção</b>		<b>Interação</b>	
<b>A</b> <i>Striatum</i>	$F_{(1,31)}$	p	$F_{(1,31)}$	p	$F_{(1,31)}$	p
Two-way ANOVA	3.41	0.0742	4.15	0.0502	0.001	0.9704
<b>B</b>	$F_{(1,33)}$	p	$F_{(1,33)}$	p	$F_{(1,33)}$	p

<i>Striatum</i>						
Two-way ANOVA	6.20	0.0179	0.12	0.7292	0.16	0.6852
<b>C</b> <i>Striatum</i>	F <sub>(1,31)</sub>	p	F <sub>(1,31)</sub>	p	F <sub>(1,31)</sub>	p
Two-way ANOVA	6.15	0.0187	5.50	0.0255	0.43	0.5127
<b>D</b> <i>Striatum</i>	F <sub>(1,32)</sub>	p	F <sub>(1,32)</sub>	p	F <sub>(1,32)</sub>	p
Two-way ANOVA	1.13	0.2943	0.018	0.8913	0.002	0.9568
<b>E</b> <i>Striatum</i>	F <sub>(1,30)</sub>	p	F <sub>(1,30)</sub>	p	F <sub>(1,30)</sub>	p
Two-way ANOVA	5.04	0.0322	0.11	0.7424	0.14	0.7046

<b>A depleção parcial da micróglia e a cocaína alteraram os fatores neurotróficos e os níveis de mRNA de TrkB de maneira região dependente – Fig. 19</b>						
	<b>Fator cocaína</b>		<b>Fator depleção</b>		<b>Interação</b>	
<b>A</b> <i>Striatum</i>	F <sub>(1,21)</sub>	p	F <sub>(1,21)</sub>	p	F <sub>(1,21)</sub>	p
Two-way ANOVA	0.27	0.6058	1.15	0.2946	2.17	0.1555
<b>B</b> <i>HIP</i>	F <sub>(1,21)</sub>	p	F <sub>(1,21)</sub>	p	F <sub>(1,21)</sub>	p
Two-way ANOVA	97.38	<0,0001	41.00	<0,0001	3.22	0.0868
<b>C</b> <i>PFC</i>	F <sub>(1,20)</sub>	p	F <sub>(1,20)</sub>	p	F <sub>(1,20)</sub>	p
Two-way ANOVA	3.81	0.0650	0.37	0.5455	0.48	0.4937
<b>D</b> <i>Striatum</i>	F <sub>(1,23)</sub>	p	F <sub>(1,23)</sub>	p	F <sub>(1,23)</sub>	p
Two-way ANOVA	0.93	0.34	0.75	0.3940	1.41	0.2458
<b>E</b> <i>HIP</i>	F <sub>(1,23)</sub>	p	F <sub>(1,23)</sub>	p	F <sub>(1,23)</sub>	p
Two-way ANOVA	0.51	0.4797	0.10	0.7518	0.003	0.9541
<b>F</b> <i>PFC</i>	F <sub>(1,23)</sub>	p	F <sub>(1,23)</sub>	p	F <sub>(1,23)</sub>	p
Two-way ANOVA	0.62	0.4371	5.52	0.0265	4.04	0.0563
<b>G</b> <i>Striatum</i>	F <sub>(1,21)</sub>	p	F <sub>(1,21)</sub>	p	F <sub>(1,21)</sub>	p
Two-way ANOVA	0.76	0.3920	0.18	0.6720	1.10	0.3051
<b>H</b> <i>HIP</i>	F <sub>(1,22)</sub>	p	F <sub>(1,22)</sub>	p	F <sub>(1,22)</sub>	p
Two-way ANOVA	2.04	0.1666	0.59	0.4489	0.36	0.5501
<b>I</b> <i>PFC</i>	F <sub>(1,22)</sub>	p	F <sub>(1,22)</sub>	p	F <sub>(1,22)</sub>	p
Two-way ANOVA	12.46	0.0019	0.36	0.5498	0.30	0.5891
<b>J</b> <i>Striatum</i>	F <sub>(1,23)</sub>	p	F <sub>(1,23)</sub>	p	F <sub>(1,23)</sub>	p
Two-way ANOVA	0.02	0.8870	0.001	0.9696	2.04	0.1665
<b>K</b> <i>HIP</i>	F <sub>(1,20)</sub>	p	F <sub>(1,20)</sub>	p	F <sub>(1,20)</sub>	p
Two-way ANOVA	0.002	0.9872	0.005	0.9438	0.31	0.5827
<b>L</b> <i>PFC</i>	F <sub>(1,15)</sub>	p	F <sub>(1,15)</sub>	p	F <sub>(1,15)</sub>	p
Two-way ANOVA	7.19	0.0171	0.03	0.8449	3.21	0.0930

<b>A depleção parcial da cocaína e da micróglia podem alterar a via dopaminérgica Fig. 22</b>						
	<b>Fator cocaína</b>		<b>Fator depleção</b>		<b>Interação</b>	
<b>A</b> <i>HIP</i>	$F_{(1,30)}$	p	$F_{(1,30)}$	p	$F_{(1,30)}$	p
Two-way ANOVA	0.02	0.8740	0.03	0.8557	1.61	0.2133
<b>B</b> <i>HIP</i>	$F_{(1,31)}$	p	$F_{(1,31)}$	p	$F_{(1,31)}$	p
Two-way ANOVA	0.78	0.3818	1.17	0.2871	1.01	0.3211
<b>C</b> <i>HIP</i>	$F_{(1,30)}$	p	$F_{(1,30)}$	p	$F_{(1,30)}$	p
Two-way ANOVA	0.09	0.7585	0.03	0.8456	9.71	0.0040
<b>D</b> <i>HIP</i>	$F_{(1,34)}$	p	$F_{(1,34)}$	p	$F_{(1,34)}$	p
Two-way ANOVA	4.32	0.0452	0.02	0.8837	2.33	0.1355
<b>E</b> <i>HIP</i>	$F_{(1,31)}$	p	$F_{(1,31)}$	p	$F_{(1,31)}$	p
Two-way ANOVA	0.004	0.9461	2.59	0.1174	2.40	0.1314
<b>F</b> <i>PFC</i>	$F_{(1,32)}$	p	$F_{(1,32)}$	p	$F_{(1,32)}$	p
Two-way ANOVA	0.002	0.9585	0.23	0.6339	1.94	0.1724
<b>G</b> <i>PFC</i>	$F_{(1,32)}$	p	$F_{(1,32)}$	p	$F_{(1,32)}$	p
Two-way ANOVA	0.19	0.6596	0.03	0.8572	0.87	0.3554
<b>H</b> <i>PFC</i>	$F_{(1,28)}$	p	$F_{(1,28)}$	p	$F_{(1,28)}$	p
Two-way ANOVA	0.002	0.9575	0.97	0.3322	1.22	0.2782
<b>I</b> <i>PFC</i>	$F_{(1,30)}$	p	$F_{(1,30)}$	p	$F_{(1,30)}$	p
Two-way ANOVA	0.02	0.8828	0.72	0.4028	0.10	0.7436
<b>J</b> <i>PFC</i>	$F_{(1,32)}$	p	$F_{(1,32)}$	p	$F_{(1,32)}$	p
Two-way ANOVA	0.41	0.5241	3.21	0.0824	0.01	0.91