

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ADICÇÃO INDUZIDA POR COCAÍNA E NICOTINA**

Magda Luciana de Paula Rosa

Belo Horizonte
2021

Magda Luciana de Paula Rosa

**ESTUDO DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ADICÇÃO INDUZIDA POR COCAÍNA E NICOTINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Aline Silva de Miranda

Co-orientadores:

Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Belo Horizonte

2021

043

Rosa, Magda Luciana de Paula.

Estudo da inflamação em modelo experimental de adicção induzida por cocaína e nicotina em modelo comportamental de preferência condicionada ao lugar [manuscrito] / Magda Luciana de Paula Rosa. - 2021.

95 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa Dra Aline Silva de Miranda. Co-orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Comportamento de Procura de Droga. 3. Cocaína. 4. Nicotina. 5. Citocinas. 6. Mediadores da Inflamação. 7. Fatores de Crescimento Neural. I. Miranda, Aline Silva de. II. Moreira, Fabrício de Araújo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ATA DE DEFESA DE TESE DA ALUNA

MAGDA LUCIANA DE PAULA ROSA

Realizou-se, no dia 30 de novembro de 2021, às 14:00 horas, Sala Virtual, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 89ª defesa de tese, intitulada *ESTUDO DA INFLAMAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ADIÇÃO INDUZIDA POR COCAÍNA E NICOTINA EM MODELO COMPORTAMENTAL DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR*, apresentada por MAGDA LUCIANA DE PAULA ROSA, número de registro 2017712528, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Aline Silva de Miranda - Orientadora (UFMG), Prof(a). Fabricio de Araujo Moreira (UFMG), Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (UFMG), Prof(a). Erica Leandro Marciano Vieira (CAMH), Prof(a). Victor Rodrigues Santos (UFMG), Prof(a). Mariléia Chaves Andrade (UNIMONTES). A Comissão considerou a tese: Aprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 30 de novembro de 2021.

Carlos Magno Machado Dias - Secretário(a)

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Prof(a). Aline Silva de Miranda (Doutora)

Prof(a). Fabricio de Araujo Moreira (Doutor)

Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (Doutora)

Prof(a). Erica Leandro Marciano Vieira (Doutora)

Prof(a). Victor Rodrigues Santos (Doutor)

Prof(a). Mariléia Chaves Andrade (Doutora)



Documento assinado **Aline Silva de, Servidor** em 30/11/2021, às 18:49, conforme horário oficial fundamento no [Decreto nº, de 13 de novembro](#)



Documento assinado **Milene Alvares, Servidor** em 30/11/2021, às 19:53, conforme horário oficial fundamento no [Decreto nº, de 13 de novembro](#)



Documento assinado **Érica Leandro Martins, Usuária** , em 02/12/2021, às 16:35, conforme horário com fundamento no [Decreto nº, de 13 de novembro](#)



Documento assinado **Victor Rodrigues, Professor do Magistério** em 10/12/2021, às 10:24, conforme Brasília, com fundamento no [Decreto nº, de 13 de novembro](#)



Documento assinado **Fabricio de Araujo, Professor do Magistério** em 10/12/2021, às 22:08, conforme de Brasília, com fundamento no [Decreto nº, de 13 de novembro](#)



Documento assinado **Marileia Chaves, Usuário** , em 31/01/2022, às 16:14, conforme horário oficial fundamento no [Decreto nº, de 13 de novembro](#)

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1100946** e o código CRC **FB098621**.



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia Conceição Machado no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciência Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Ao Afonso, à Clara e à Nina, amores da minha vida.

**“Antes, sozinho, não podias... – Agora, recorreste à Senhora, e, com Ela, que fácil!”
São Josemaria Escrivá**

AGRADECIMENTOS

À Aline Silva de Miranda, que além da orientação paciente, generosa e brilhante, me recebeu de braços abertos mesmo com todas as minhas limitações e não poupou esforços para a concretização desse estudo;

Ao professor Fabrício pela orientação generosa, por disponibilizar os recursos necessários para o desenvolvimento do estudo;

Ao professor Antônio Lúcio Teixeira Júnior pelas contribuições que enriqueceram o trabalho;

À Laila pela competência e generosidade em me ensinar o protocolo comportamental;

Ao Rodrigo pela disponibilidade em ajudar, pelos ensinamentos e alegria durante os experimentos.

À Carol e a Bruna pelo convívio afetuoso e por toda a ajuda durante o doutorado;

A todos do Laboratório de Neurobiologia Conceição Machado.

À Érica pelo carinho e direcionamento durante minha volta para UFMG.

À Léia que sempre está por perto me auxiliando pelos caminhos da pesquisa.

Ao Afonso pela paciência, amor e amizade, seu apoio é fundamental para mim.

Às minhas filhas, Clara e Nina, por me ensinarem a ser melhor todos os dias. A alegria de vocês faz a minha.

Aos meus pais, Lia e Mércio, exemplos de fé, dedicação e coragem, pelo apoio e incentivo constantes e por me ensinarem a importância da busca incessante pela verdade. Saudade enorme.

A Deus que tudo criou, por seu amor misericordioso, e à Nossa Senhora da Piedade que me guia e ilumina pelos caminhos da vida.

A todos que contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

O transtorno por uso de substância (adicção) é uma doença crônica caracterizada por uma incapacidade de regular o comportamento de busca por drogas. A liberação de dopamina no núcleo accumbens é conhecida por ser essencial para os efeitos de reforço da cocaína. A nicotina também estimula o sistema dopaminérgico mesolímbico (sistema de recompensa) que desempenha um papel importante na busca de drogas. Estudos demonstraram que o uso dessas drogas pode interferir na produção e liberação de citocinas, sugerindo uma relação entre inflamação e adicção. O entendimento dessa relação pode ser importante na busca de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de tratamentos. Assim, o presente estudo teve por objetivo investigar o papel de mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos em modelo comportamental de preferência condicionada ao lugar (PCL), induzida pela administração de cocaína e nicotina, em camundongos. Inicialmente, foram testados dois aparatos que diferiam em si pela quantidade de compartimentos. O condicionamento induzido por cocaína foi demonstrado em ambos. Porém, os níveis cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) de citocinas e fatores neurotróficos (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , CX3CL1, BDNF, GDNF e NGF) foi diferente dependendo do número de compartimentos em cada aparato. De maneira geral, os níveis se encontraram aumentados nos grupos salina condicionados no aparato de três compartimentos, quando comparado ao mesmo grupo condicionado no aparato de dois compartimentos, sugerindo que a escolha do aparato a ser utilizado em estudos de PCL pode influenciar os resultados da pesquisa. Quando comparados os grupos salina e cocaína, condicionados no aparato de três compartimentos, o grupo cocaína apresentou uma redução nos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, GDNF no córtex pré-frontal e CX3CL1 no estriado. Os experimentos para análise dos níveis de mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos em camundongos submetidos a PCL induzida por nicotina, foi realizada em aparato de três compartimentos. Foram observados níveis periféricos aumentados de IL-6 e IL-10, níveis de NGF aumentados e diminuição de GDNF no hipocampo em camundongos tratados com nicotina. No estriado observou-se uma diminuição dos níveis de IL-1 β , IL-10 e GDNF. Posteriormente, o tratamento com ácido clavulânico (AC) em animais condicionados com cocaína foi analisado. As doses utilizadas do AC não impediram o condicionamento por cocaína, quando administradas trinta minutos antes das injeções da droga ou quando administradas em pré-tratamento de três dias. Possivelmente, os mecanismos envolvidos no aumento da expressão de GLT-1 pelo AC devem requerer mais dias de pré-tratamento. Esses resultados fornecem evidências sobre o papel das citocinas e fatores neurotróficos na PCL induzida por cocaína e por nicotina. Estratégias terapêuticas podem ser desenvolvidas com a compreensão dos mecanismos inflamatórios e neurotróficos relacionados a adicção em modelo comportamental de preferência condicionada ao lugar.

Palavras-chave: preferência condicionada ao lugar, cocaína, nicotina, citocinas, fatores neurotróficos.

ABSTRACT

Substance use disorder (addiction) is a chronic illness characterized by an inability to regulate drug-seeking behavior. The release of dopamine in the nucleus accumbens is known to be essential for the enhancing effects of cocaine. Nicotine also stimulates the mesolimbic dopaminergic system (reward system) which plays an important role in drug seeking. Studies have shown that the use of these drugs can interfere with the production and release of cytokines, suggesting a relationship between inflammation and addiction. Understanding this relationship can be important in the search for new therapeutic targets and treatment development. Thus, the present study aimed to investigate the role of inflammatory mediators and neurotrophic factors in a behavioral model of conditioned place preference (CPP), induced by the administration of cocaine and nicotine, in mice. Initially, two apparatuses that differed by the number of compartments were tested. Cocaine-induced conditioning was demonstrated in both. However, brain levels (prefrontal cortex, hippocampus and striatum) of cytokines and neurotrophic factors (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , CX3CL1, BDNF, GDNF and NGF) were different depending on the number of compartments in each apparatus. In general, the levels were found to be increased in the saline groups conditioned in the three-compartment apparatus, when compared to the same group conditioned in the two-compartment apparatus, suggesting that the choice of apparatus to be used in CPP studies may influence the research results. When comparing the saline and cocaine groups, conditioned in the three-compartment apparatus, the cocaine group showed a reduction in the levels of IL-1 β , IL-6, IL-10, GDNF in the prefrontal cortex and CX3CL1 in the striatum. The experiments to analyze the levels of inflammatory mediators and neurotrophic factors in mice subjected to nicotine-induced CPP were performed in a three-compartment apparatus. Increased peripheral levels of IL-6 and IL-10, increased NGF levels and decreased GDNF in the hippocampus were observed in mice treated with nicotine. In the striatum there was a decrease in the levels of IL-1 β , IL-10 and GDNF. Subsequently, treatment with clavulanic acid (CA) in cocaine-conditioned animals was analyzed. The doses of CA used did not prevent cocaine conditioning, when administered thirty minutes before the drug injections or when administered in a three-day pre-treatment. Possibly, the mechanisms involved in the increase of GLT-1 expression by CA should require more days of pretreatment. These results provide evidence for the role of cytokines and neurotrophic factors in cocaine- and nicotine-induced CPP. Therapeutic strategies can be developed with an understanding of inflammatory and neurotrophic mechanisms related to addiction in a behavioral model of location-conditioned preference.

Keywords: Conditioned place preference, cocaine, nicotine, cytokines, neurotrophic factors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Ácido clavulânico
AMP – Monofosfato de adenosina
ANOVA – Análise de variância
ATV – Área tegmental ventral
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca²⁺ – Cálcio
CEBIO – Centro de Bioterismo
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CPF – Córtex pré-frontal
CX3CL1 - Quimiocina Fractalquina
CX3CR1 – Receptor da quimiocina fractalquina
CTX – Ceftriaxona
D1, D2, D3, D4 – receptores de dopamina
DA – Dopamina
DP – Desvio padrão
ELISA – Ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
GABA – Ácido Gama-Aminobutírico, neurotransmissor inibidor do sistema nervoso central
GDNF – Fator neurotrófico derivado de células gliais
GLT-1 – Transportador de glutamato 1
GLU – Glutamato
GluN2B – subunidade do complexo protéico NMDAR
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ – ácido sulfúrico
IL-1 β – Interleucina 1
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
i.p. – Intraperitoneal
kg – Quilograma
mg – Miligrama
mGluR5 – receptor metabotrópico do glutamato 5
Na⁺ – Sódio
NAc – Núcleo Accumbens

NaCl – Cloreto de sódio

ng – nanograma

NGF – Fator de crescimento nervoso

NMDA – N-metil-D-aspartato

NMDAR – Receptor NMDA

OPD – O-fenilenediamina

PBS – Tampão fosfato de sódio (Phosphate buffered saline)

PCL – Preferência condicionada ao lugar

r.p.m. – Rotações por minuto

SNC – Sistema Nervoso Central

TGluV – transportador de glutamato vesicular

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

FDA – Food and Drug Administration

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	10
2 INTRODUÇÃO	11
2.1 História da cocaína	12
2.2 História do Tabaco e descoberta da Nicotina	13
2.3 Neurobiologia da cocaína e da nicotina	14
2.3.1 Cocaína	14
2.3.2 Nicotina	15
2.4 A influência da sinalização imune nas funções do SNC e alterações provocadas pelo uso de cocaína e nicotina	19
2.4.1 Cocaína	20
2.4.2 Nicotina	20
2.5 A transmissão sináptica glutamatérgica	22
2.6 A exposição crônica à cocaína influencia a expressão do GLT-1	24
2.7 A ceftriaxona melhora os sintomas de toxidependência em modelos animais	24
2.8 O ácido clavulânico possui efeitos moduladores do SNC mais eficazes que a ceftriaxona	25
2.9 Modelo animal para estudo de processo de adicção	26
3. JUSTIFICATIVA	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 Geral	29
4.2 Específicos	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 Animais	30
5.2 Drogas	30
5.2.1 Experimentos com cocaína	30
5.2.1 Experimentos com nicotina	30
5.3 Análise do perfil inflamatório e neurotrófico	30
5.3.1 Preparação de extratos de tecidos	31
5.3.2 Medida dos níveis de citocinas e fatores neurotróficos do sobrenadante de extratos de tecidos por ELISA	31
5.4 Modelo comportamental	32

5.5 Delineamento experimental 1	32
5.5.1 Padronização dos aparatos de dois e três compartimentos	32
5.5.1.1 <i>Análise comportamental</i>	33
5.5.1.2 <i>Análise do perfil imunológico e neurotrófico</i>	35
5.6 Delineamento experimental 2	35
5.6.1 Experimentos utilizando nicotina	35
5.6.2 Efeito do tratamento com ácido clavulânico	35
5.6.2.1 <i>Análise Comportamental</i>	36
5.6.2.2 <i>Efeito das doses do ácido clavulânico na preferência condicionadas ao lugar</i>	37
5.6.2.3 <i>Efeito das doses do ácido clavulânico na atividade locomotora</i>	37
5.6.2.4 <i>Efeito do pré-tratamento com ácido clavulânico na preferência condicionada ao lugar</i>	38
5.7 Análise estatística	38
5.7.1 <i>Análise dos experimentos com cocaína</i>	38
5.7.2 <i>Análise dos experimentos com nicotina</i>	38
6 RESULTADOS	39
6.1 Artigo científico 1	39
6.2 Artigo científico 2	68
6.3 Análise da administração do ácido clavulânico na PCL induzida por cocaína	78
6.3.1 <i>Administração das doses do ácido clavulânico não induziu preferência condicionada ao lugar</i>	78
6.3.2 <i>Administração das doses do ácido clavulânico não alterou a atividade locomotora</i>	79
6.3.3 <i>Efeito da administração do ácido clavulânico em modelo de PCL induzido por cocaína</i>	80
6.3.4 <i>Efeito do pré-tratamento com ácido clavulânico em modelo de PCL induzido por cocaína</i>	81
7 DISCUSSÃO	82
8 CONCLUSÃO	84
PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO	95

1. APRESENTAÇÃO

O presente texto tem como objetivo demonstrar os resultados obtidos durante o doutorado, no qual foram analisados mediadores inflamatórios e neurotróficos relacionados a adicção por cocaína e nicotina, em modelo experimental de preferência condicionada ao lugar. Além disso, o efeito do AC como possível estratégia terapêutica também foi investigado.

Neste trabalho o interesse incidiu sobre os mediadores inflamatórios e neurotróficos envolvidos nas alterações comportamentais durante a preferência condicionada ao lugar (PCL) induzida pela administração de cocaína ou nicotina. Inicialmente, foi realizada a padronização do modelo de PCL utilizando dois aparatos diferenciados pelo número de compartimentos. Após a padronização e análise dos fatores inflamatórios e neurotróficos, o efeito do ácido clavulânico (AC), um fármaco com potencial êxito em aumentar a expressão do receptor de glutamato (GLT1), foi investigado como possível tratamento ao condicionamento induzido pela cocaína.

A tese foi estruturada em nove partes principais: i) Introdução; ii) Justificativa; iii) Objetivos; iv) Métodos; v) Resultados, sob a forma de um artigo a ser submetido em revista indexada, outro artigo publicado, e resultados adicionais ainda não publicados; vi) Discussão dos dados adicionais ainda não publicados; vii) Conclusões; viii) Perspectivas, contendo as próximas atividades a serem realizadas; ix) Referências e x) Anexo, contendo o parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.

2. INTRODUÇÃO

O transtorno por uso de substância (adição) é uma doença crônica caracterizada por uma incapacidade de regular o comportamento de busca por drogas. Mesmo quando longos períodos de abstinência são alcançados, o desejo pela droga persiste na retirada tardia, resultando em uma alta taxa de recaída¹. Esta doença é denominada “Transtorno por Uso de Substância” no “Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais V” que lista os critérios de diagnóstico². Globalmente, estima-se que 18,2 milhões de pessoas usaram cocaína em 2016. Há indicações de aumento do consumo de cocaína em muitos países da América do Norte e do Sul³. O uso do tabaco também é um grande problema de saúde pública, resultando em quase 7 milhões de mortes anuais em todo o mundo⁹⁴. A nicotina, um dos mais de 4.000 diferentes compostos da fumaça do tabaco, é o principal responsável por sua propriedade aditiva^{95,96,97}.

A dependência por cocaína é caracterizada como um transtorno recidivante crônico pelo qual os indivíduos adictos se envolvem persistentemente na busca e uso de drogas, apesar das profundas consequências negativas^{1,4}. Os resultados de estudos que utilizam modelos animais de dependência e recidiva indicam que a busca de drogas é mediada por alterações na plasticidade e na transmissão sináptica glutamatérgica do córtex pré-frontal (CPF) para o núcleo accumbens (NAc) induzida pela exposição crônica ao fármaco. A liberação de dopamina (DA) no NAc é conhecida por ser essencial para os efeitos de reforço da cocaína. No entanto, é a liberação de glutamato (GLU) para esta região que é mais fortemente implicada na reintegração da resposta à procura de cocaína¹. Especificamente, a transmissão sináptica glutamatérgica do CPF para o NAc mostrou-se necessária para a reintegração do comportamento de busca de drogas em modelos de recidiva em roedores⁵. A nicotina também estimula o sistema dopaminérgico mesolímbico (sistema de recompensa), aumentando a concentração de dopamina no NAc⁹⁸. Esta propriedade da nicotina é responsável por reforçar a mudança comportamental e a dependência causadas pela mesma⁹⁶.

Ao longo da introdução serão expostos tópicos relacionados ao funcionamento do sistema nervoso central quando exposto à cocaína e à nicotina para uma melhor contextualização do tema.

2.1 História da cocaína

A cocaína é o principal alcalóide encontrado nas variedades cultivadas da planta pertencente à família Erythroxylaceae, principalmente a espécie *Erythroxylum coca*, encontrada em países da América do Sul. A cocaína é um alcaloide tropano, extraída das folhas desta planta, que atua biologicamente como um inibidor da recaptção da serotonina, noradrenalina e DA. Os sistemas orgânicos e funções afetadas pelos usos agudos e crônicos da cocaína incluem: psicológico, neurológico, renal, cardíaco, pulmonar, gastrointestinal, obstétrico e otorrinolaringológicos. Estudos históricos do uso da coca mostraram que os sujeitos apresentavam pequenos aumentos de temperatura, pressão arterial e taxa metabólica depois de consumirem folhas de coca. O uso destas plantas por civilizações andinas em rituais, com propósitos sociais e fisiológicos, é relatado arqueologicamente há pelo menos 3000 anos^{6,7}.

Os primeiros relatos europeus sobre essa planta são de autoria de Américo Vespúcio, publicados em 1507⁸. Os conquistadores espanhóis do século XVI notaram que os incas usavam a coca para uma infinidade de propósitos, incluindo usos ritual, social e fisiológico. A função mais amplamente observada e divulgada da planta seria sua função em aumentar a capacidade de trabalho, incluindo a redução da fadiga corporal e o alívio da sede e da fome⁶. Em 1859, o princípio ativo foi isolado, das folhas da coca, por Albert Niemann, e foi denominado “cocaína”, caracterizada como uma substância cristalizada e com o gosto amargo comum a alcaloides. Apesar de ser uma descoberta de considerável importância, atraiu pouca atenção na época. Por outro lado, as folhas de coca começaram a ser adicionadas a tônicos e vinhos, vendidos em lojas e farmácias como estimulantes milagrosos na Europa e Estados Unidos⁹.

Apesar da grande popularização comercial da coca na década de 1880, a comunidade científica permanecia cética quanto a real eficácia da cocaína. Freud contribuiu de maneira decisiva para a divulgação da nova droga, quando, em 1884, publicou um livro chamado “Uber coca” (“Sobre coca”), no qual defendeu seu uso terapêutico como estimulante, afrodisíaco, anestésico local, exaustão nervosa, histeria entre outros^{8,9}. Mas foi Carl Koller, colega de Freud, quem descobriu que o olho humano se tornava insensível à dor com o uso de cocaína, representando o primeiro passo para a anestesia local. Após quatro anos de sua publicação original, Freud voltou atrás, rendendo-se às evidências de que a coca tinha uma série de inconvenientes, começando pelo seu potencial de criar dependência⁸.

O uso e comercialização de determinadas drogas, como a cocaína, foram limitados ou proibidos a partir do início do século XX em vários países. O surgimento de regulamentações e leis restritivas, como o tratado de Haia (1912), Harrison Act, de 1914, nos EUA, ou o Decreto-

lei Federal nº 4.292 de 6 de julho de 1921, no Brasil, tornaram a cocaína menos disponível para a população em geral, permitindo somente o uso médico para substâncias entorpecentes. No mesmo século, estudos demonstrando os mecanismos de ação destas drogas no sistema nervoso central (SNC) começaram a surgir^{8,10}.

2.2 História do Tabaco e descoberta da Nicotina

A entrada do tabaco na Europa aconteceu com a descoberta da América. Embora a nicotina tenha sido encontrada em amostras de cabelos, tecidos moles e amostras de ossos de múmias egípcias datadas de cerca de 1070 e 395 a.C, a explicação para essa descoberta pode ser o fato da nicotina estar presente em plantas, como *Belladonna* e *Nicotiana Africana*, existentes em regiões do Velho Mundo¹⁰³.

O cultivo de tabaco na América remonta ao ano 6.000 a.C, e seu uso na forma de enemas ou tabagismo, ao século I a.C. Propriedades terapêuticas e mágicas foram atribuídas a essa substância¹⁰³.

O diário de bordo das viagens de Cristóvão Colombo à América foi perdido. Porém, perdura a versão do frei Bartolomeu de las Casas que inclui parágrafos dos textos do diário de Colombo. Nele está escrito que, em apenas 3 dias após chegar ao novo continente (em 15 de outubro, 1492), Colombo recebe de um nativo folhas de uma planta que poderia ser o tabaco.

A primeira descrição da planta de tabaco na Europa foi atribuída a Gonzalo Fernández de Oviedo. Em sua História Geral e Natural das Índias, ele comenta em detalhes sobre as características da planta¹⁰³.

Jean Nicot (1530-1600) foi um diplomata que serviu como embaixador da França na corte de Portugal, onde o tabaco era conhecido desde o contato dos portugueses com as tribos indígenas do que viviam onde hoje é Brasil. Em meados do século XVI, Demião de Goes, arquivista do rei Português, já cultivava fumo nos jardins reais de Lisboa. Foi pelas mãos de Demião de Goes, que Nicot obteve amostras da planta e em 1560 ele enviou tabaco para sua soberana, Catarina de Médici, que o consumiu na forma de rapé para tratar enxaquecas¹⁰³.

Jean Liébault batizou a planta de tabaco com o nome de Nicotiana, em homenagem a Nicot. No entanto, parece ter sido o cosmógrafo real André Thevet (1502- 1590) o primeiro a introduzir e cultivar tabaco na França, no retorno da expedição do almirante francês Villegaignon ao Brasil em 1555. No final do século XVI o consumo do tabaco se espalhou pela Europa. Pelas mãos dos portugueses chegou à Índia, China e Japão¹⁰³.

A nicotina foi descoberta pelo químico alemão Karl Luis Reimann em 1828, e foi seu compatriota e também químico Adolf Pinner que, em 1893, determinou sua estrutura. A nicotina é o principal componente viciante do tabaco que motiva o uso continuado, apesar dos efeitos nocivos¹⁰³.

2.3 Neurobiologia da cocaína e da nicotina

2.3.1 Cocaína

O mecanismo de ação da cocaína consiste, principalmente, na inibição dos transportadores de membrana de monoaminas, particularmente DA no sistema mesolímbico cerebral^{11,12} (Fig. 1). Como consequência, os níveis de DA disponíveis na fenda sináptica aumentam consideravelmente e disfunções em vias dopaminérgicas parecem ser responsáveis pelos principais efeitos da cocaína. Ao longo das últimas décadas, estudos apontaram evidências do envolvimento da DA em diferentes processos fisiológicos, tais como recompensa, emoção, cognição, memória e atividade locomotora¹².

Os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (ATV) se projetam para o NAc, bem como para o CPF, hipocampo e amígdala^{13, 14} (Fig. 2). As vias que partem da ATV (mesocortical e mesolímbica) regulam o sistema de recompensa cerebral, cuja função evolutiva é de manutenção da vida e da espécie, estimulando comportamentos como alimentação e cópula, essenciais para tal fim¹⁵. As drogas de abuso, no caso a cocaína, direta ou indiretamente atuam nestas vias dopaminérgicas e estimulam este sistema de forma mais intensa que os estímulos naturais¹⁶.

Os efeitos da DA são mediados por receptores acoplados à proteína G que estão divididos em duas grandes famílias: D1 e D2. A família D1 é composta por receptores D1 e D5 e estes estimulam a atividade da enzima adenilato ciclase, amplificando a síntese de AMP cíclico (AMPC), resultando em uma série de eventos que culminam na transcrição de genes. Os receptores D2, D3 e D4, por sua vez, fazem parte da família D2 de receptores que inibem a adenilato ciclase¹⁷. Embora atuando diretamente na recaptção de DA, a cocaína interfere em longo prazo na expressão de receptores dopaminérgicos. Estudos em humanos demonstraram que o abuso de cocaína diminui os níveis de receptores D2 no estriado em cerca de 20%¹⁸ e esta diminuição pode durar de 3 a 4 meses¹⁹.

Notavelmente, o NAc também recebe entradas glutamatérgicas de regiões corticais e límbicas, como CPF, amígdala e hipocampo²⁰, estabelecendo assim o NAc como uma região convergente para a neurotransmissão de DA e glutamato (Fig. 2). Enquanto o NAc é a principal

região responsável pelos efeitos iniciais da cocaína, a transição do uso voluntário para compulsivo parece envolver uma mudança progressiva em direção ao estriado dorsal no controle do comportamento de busca por cocaína^{21,22,23}. Juntas, as projeções dopaminérgicas, glutamatérgicas, corticoestriatais e mesencefálicas-estriatais fornecem informações contextuais, controlam a impulsividade e o comportamento direcionado por metas, e regulam respostas motivacionais e emocionais aos estímulos a drogas^{24,25}.

2.3.2 Nicotina

As últimas descobertas revelaram que o vício criado por meio da nicotina é muito influente e semelhante ao vício em substâncias abusivas como a cocaína e a heroína⁹⁵.

A nicotina é transportada para os pulmões, pelas partículas de fumaça, onde é rapidamente absorvida pela circulação venosa pulmonar. A nicotina então entra na circulação arterial e se move rapidamente dos pulmões para o cérebro, onde se liga aos receptores colinérgicos nicotínicos (canais de íons controlados por ligante que normalmente se ligam à acetilcolina). A ligação da nicotina na interface entre duas subunidades do receptor abre o canal, permitindo a entrada de sódio ou cálcio. A entrada desses cátions na célula ativa ainda mais os canais de cálcio voltagem-dependentes, permitindo a entrada de mais cálcio. Um dos efeitos da entrada de cálcio em um neurônio é a liberação de neurotransmissores⁹⁹.

A dopamina, como previamente mencionado, é um neurotransmissor que sinaliza uma experiência prazerosa e é fundamental para os efeitos de reforço da nicotina e outras drogas de abuso¹⁰². Estudos mostraram que o bloqueio da liberação de dopamina no núcleo accumbens, por lesões ou com antagonistas, impedem a autoadministração de nicotina em ratos. A nicotina induz a liberação de dopamina na área mesolímbica, corpo estriado e córtex frontal (Figura 3) bem como aumenta a liberação de dopamina no núcleo accumbens por projeções que se originam da ATV⁹⁹. Os neurônios dopaminérgicos na ATV do mesencéfalo e na concha do núcleo accumbens são essenciais na recompensa induzida por drogas (essas regiões têm um papel nas percepções de prazer e recompensa)⁹⁹.

A nicotina também aumenta a liberação de glutamato, que facilita a liberação de dopamina, e a liberação de ácido γ -aminobutírico (GABA), que inibe a liberação de dopamina^{100, 101}. Com a exposição de longo prazo à nicotina, alguns receptores colinérgicos nicotínicos perdem a sensibilidade, mas outros não. Como resultado, o tônus inibitório mediado por GABA diminui enquanto a excitação mediada por glutamato persiste, aumentando assim a excitação de neurônios dopaminérgicos e aumentando a capacidade de resposta à nicotina⁹⁹.

Outra importante questão a ser considerada é a influência de mediadores imunológicos no fenômeno da adicção. Evidências sugerem que as citocinas desempenham um papel importante no desenvolvimento neuronal, na maturação, na sobrevivência e na regeneração do sistema nervoso²⁶. Estudos recentes que avaliaram os níveis séricos de interleucinas em indivíduos usuários de cocaína, bem como de nicotina, demonstraram alterações nas mesmas^{27,115,110,105}.

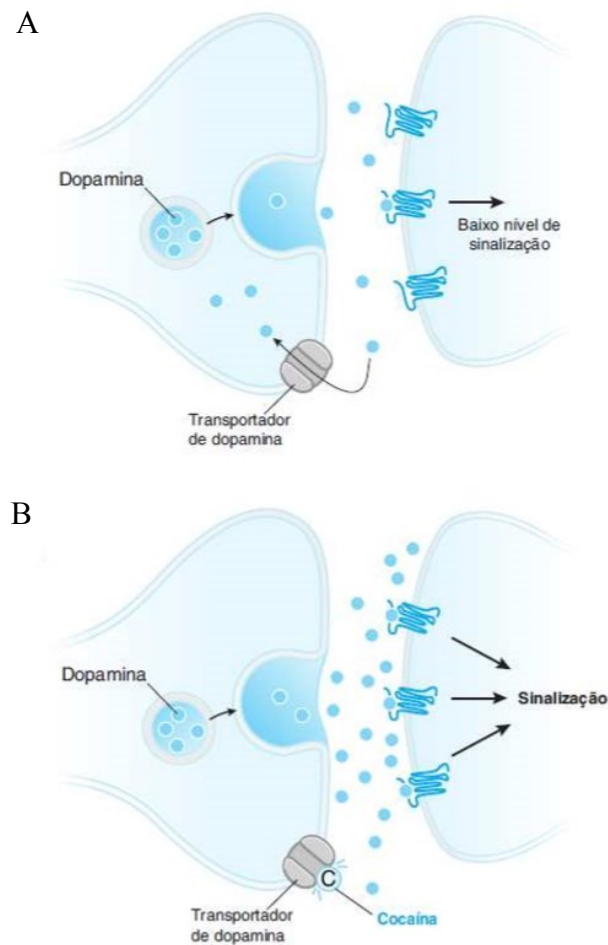


Figura 1. Efeito da cocaína na neurotransmissão dopaminérgica. (A) Neurotransmissão dopaminérgica normal. (B) Bloqueio da recaptação de dopamina pela cocaína promovendo acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica e aumento da sinalização pós-sináptica (Adaptado de Swift & Lewis, 2013).

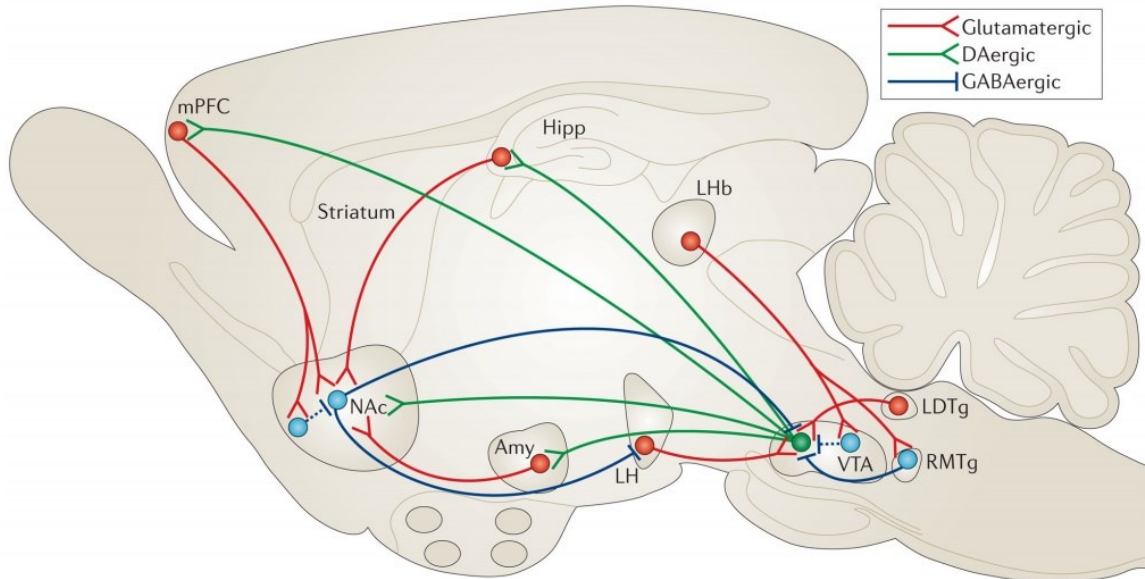


Figura 2. Circuito de recompensa ATV – Nac. Esquema simplificado das principais conexões dopaminérgicas, glutamatérgicas e GABAérgicas de e para a área tegmentar ventral (VTA) e nucleus accumbens (NAc) no cérebro de roedores. O circuito primário de recompensa inclui projeções dopaminérgicas da VTA ao NAc, que liberam dopamina em resposta a estímulos relacionados à recompensa (e em alguns casos à aversão). As várias entradas glutamatérgicas (em vermelho) controlam aspectos da percepção e da memória relacionadas à recompensa. (Adaptado de Russo & Nestler, 2014).

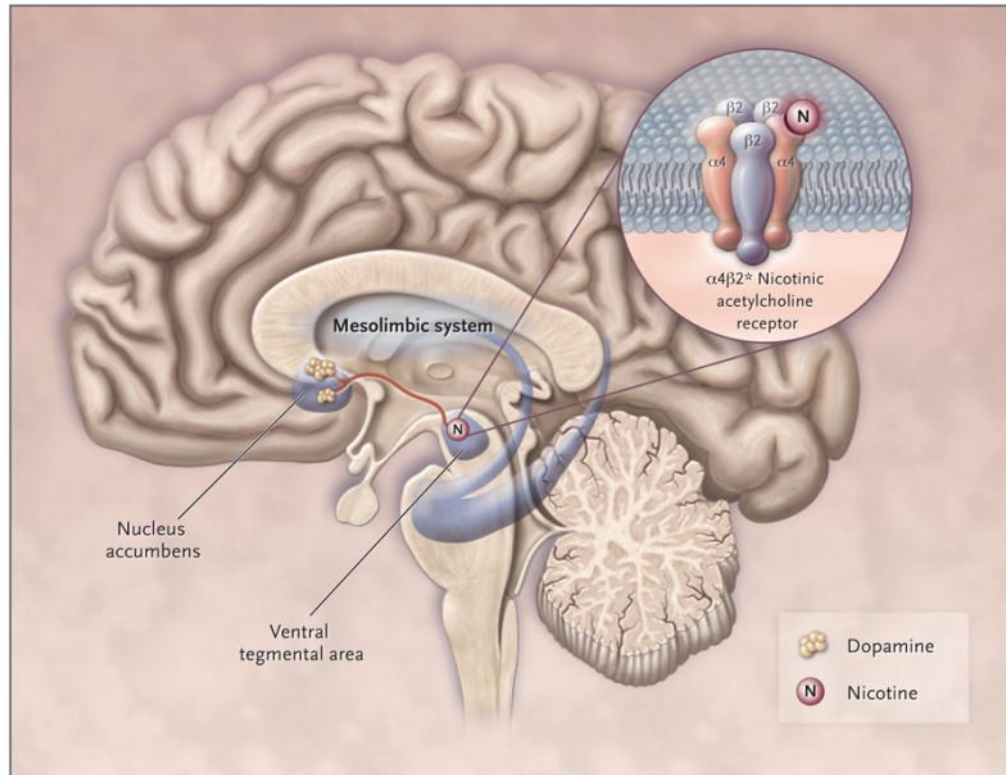


Figura 3. Papel do sistema dopaminérgico mesolímbico na atividade da nicotina. A nicotina ativa os receptores $\alpha 4 \beta 2^*$ na área tegmental ventral, resultando na liberação de dopamina na camada do núcleo accumbens (Adaptado de Benowitz, 2010).

2.4 A influência da sinalização imune nas funções do SNC e alterações provocadas pelo uso de cocaína e nicotina.

A sinalização imune central não pode ser pensada como um sistema paralelo separado da transmissão neuronal sináptica e comunicação neuronal. Estes dois sistemas estão interligados de uma forma complexa que ainda não foi plenamente elucidada³³.

A comunicação no SNC entre células neuronais e não neuronais imune-competentes, como a micróglia, contribuem para estados homeostáticos e patológicos. Esta sinalização imune central afeta profundamente todos os tipos de células dentro do SNC, contribuindo para respostas comportamentais alteradas. Isso ocorre através da liberação de fatores como citocinas e quimiocinas, bem como indiretamente através da modificação do meio extracelular de fatores neuroexcitatórios, por exemplo, via inibição de transportadores de glutamato glial³³.

As citocinas têm a função de estimular a resposta imune celular e desempenham um papel fundamental no controle e modulação de respostas inflamatórias locais e sistêmicas, visando a homeostase por meio de equilíbrio constante entre citocinas com perfil inflamatório e citocinas com perfil anti-inflamatório. A interleucina-6 (IL-6) é uma importante citocina, por vezes com papel pró-inflamatório, ativada no processo imune inato, resultando em ativação microglial. Por sua vez, a interleucina-10 (IL-10) é conhecida como um fator que inibe a síntese de citocinas, sendo um dos mais importantes agentes anti-inflamatórios endógenos produzidos pelo organismo²⁷.

Vários tipos de células no SNC são capazes de sinalização imune (comunicação por meio de moléculas imunológicas clássicas), sendo os astrócitos os mais abundantes. Além disso, os astrócitos desempenham um papel na manutenção da homeostase do GLU, que é de importância central para a atividade do SNC. O glutamato é importante para a função normal do SNC, porém, o GLU extracelular excessivo leva a um influxo de íons de cálcio nos neurônios, resultando em processo de excitotoxicidade e morte neuronal³³.

Além disso, a ativação dos receptores de glutamato aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias: interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-6. Assim, as interações entre as citocinas e GLU podem formar um ciclo de avanço para promover a neurotoxicidade³⁴.

Em condições fisiológicas, os astrócitos reprimem a ativação microglial através da liberação de citocinas e fatores neurotróficos. Por exemplo, os astrócitos suprimem a ativação microglial ao liberar as citocinas TGF- β ou IL-10. Por outro lado, IL-1 β e TNF- α estão envolvidas no desenvolvimento da inflamação do SNC, entre outros fatores, por induzir a

expressão de quimiocinas em astrócitos. Assim, os astrócitos podem mediar um aumento ou diminuição da inflamação, dependendo da citocina que é liberada³⁴.

2.4.1 Cocaína

Estudos recentes sugerem que o uso crônico e agudo da cocaína é capaz de ativar componentes da resposta imune inata, que incluem alterações na homeostase celular do fígado, coração e cérebro, levando a processos de toxicidade celular²⁷.

O uso de cocaína pode interferir na produção e liberação de citocinas, demonstrando seu papel na capacidade imunomoduladora. O abuso de psicoestimulantes está associado à ativação exagerada da resposta imune inata no SNC. Esta exposição à substância resulta no aumento de citocinas com perfil inflamatório em várias regiões do cérebro. Estudos mostraram que a ativação microglial, em resposta a psicoestimulantes, aumentou as citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, podendo gerar uma resposta celular que levará à produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias²⁷.

Estudos recentes avaliaram os níveis séricos de interleucinas em indivíduos usuários de cocaína. Esses indivíduos apresentaram níveis maiores de IL-6 e menores de IL-10 no soro, quando comparados aos indivíduos sem relato de uso de cocaína, sugerindo um estado inflamatório associado ao uso da droga. Em outro estudo realizado foi encontrado níveis salivares aumentados de IL-6, em homens dependentes da cocaína quando comparados ao grupo controle²⁷.

Curiosamente, outro estudo mostrou que indivíduos dependentes de cocaína em abstinência têm baixas concentrações de TNF α e IL-1 β . Concentrações plasmáticas de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF α e IL10) reduzidas em mulheres adictas também já foi relatado¹¹⁷.

O uso crônico de cocaína está associado a um aumento de IL-6 e a uma redução nos níveis circulantes de IL-10. A exposição aguda à cocaína, entretanto, parece ter um efeito oposto e reduzir os níveis de IL-6. A exposição aguda ou crônica à cocaína pode ser um fator que influencia e contribui com as diferenças observadas, aparentemente conflitantes, nos níveis de citocinas¹¹⁸.

2.4.2 Nicotina

Estudos experimentais em roedores expostos à nicotina mostraram aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios em diferentes regiões do cérebro^{115,110,105}, bem como maior ativação de astrócitos e microglia^{105,114}. Por outro lado, existem evidências que sugerem supressão da neuroinflamação induzida pela nicotina em modelos humanos e

experimentais de dependência¹¹⁰. Fatores neurotróficos também parecem desempenhar um papel no vício do tabagismo. Os estudos clínicos mostraram níveis séricos aumentados de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em fumantes em comparação com indivíduos não fumantes^{108,113}. Outro estudo clínico mostrou níveis séricos elevados de BDNF em fumantes com e sem dependência de nicotina em comparação com ex-fumantes e indivíduos que nunca fumaram¹⁰⁸. A nicotina também aumentou a expressão de NGF em neurônios da medula espinhal de embriões de camundongos¹⁰⁷.

Estudos sugerem uma associação entre a administração de nicotina e a resposta inflamatória em roedores. Ratos suíços que receberam administração intraperitoneal de nicotina por 30 dias exibiram ativação microglial e aumento dos níveis de TNF- α e NF- κ B no córtex cerebral¹⁰⁵. A administração de nicotina também induziu aumento dos níveis de IL-1 β e TNF- α e diminuição da expressão do BDNF no hipocampo de ratos que receberam nicotina por via subcutânea por 21 dias¹¹².

A exposição e a retirada da nicotina induziram alterações morfológicas microgliais, enquanto o aumento da expressão das citocinas IL-1 β e TNF- α foi encontrado no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos dois dias após a retirada da nicotina. Curiosamente, os ratos exibiram comprometimento cognitivo ao mesmo tempo¹⁰⁴. Em camundongos submetidos à administração contínua de nicotina por 14 dias, os níveis plasmáticos de TNF- α e IFN γ foram elevados no dia quatro após a retirada da nicotina. Essas diferenças não foram mais observadas no oitavo dia de retirada, quando os camundongos não apresentaram déficits no comportamento cognitivo. Esses dados sugerem que os déficits cognitivos induzidos pela abstinência de nicotina estão associados a níveis aumentados de citocinas inflamatórias¹¹⁶.

Estudos anteriores injetando nicotina por via intraperitoneal em camundongos revelaram aumento dos níveis séricos da IL-6^{111, 106}.

Esses resultados indicam que citocinas podem desempenhar um papel na fisiopatologia do abuso de cocaína e de nicotina. No entanto, estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos imunes envolvidos na adicção por essas drogas.

Apesar de relevante, estas e outras descobertas não explicam o quadro geral de atuação da cocaína e da nicotina no SNC. Ao longo das últimas décadas, o uso de modelos animais possibilitou o melhor entendimento de processos neurobiológicos envolvidos em inúmeras situações psiquiátricas ou não-psiquiátricas, como o uso e transtorno por uso de cocaína e nicotina. Além disso, são ferramentas importantes na busca de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de tratamentos.

Nos tópicos seguintes da introdução serão abordados os temas relacionados a transmissão sináptica glutamatérgica e influência da cocaína na expressão do GLT-1 que são necessários para um melhor entendimento sobre a escolha do ácido clavulânico (AC), que modela a expressão da proteína transportadora GLT-1, como uma abordagem farmacológica para tratamento da adicção por cocaína. O último tópico irá abordar a importância de modelos animais como ferramentas para o estudo de mecanismos neurobiológicos.

2.5 A transmissão sináptica glutamatérgica

O glutamato (GLU) é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso. A inativação do GLU sináptico é tratada pelo transportador de glutamato GLT-1. Estudos em animais mostraram que essa proteína é importante para a transmissão sináptica excitatória normal, enquanto sua disfunção está implicada em distúrbios neurológicos agudos e crônicos²⁸.

O cérebro é composto de uma rede complexa de neurônios, células gliais e vasos sanguíneos. Os astrócitos, um subconjunto de células gliais, preservam a homeostase do espaço extracelular através do armazenamento de potássio e GLU. Os astrócitos desempenham um papel central na transmissão sináptica glutamatérgica, fornecendo glutamina, o precursor do GLU, aos neurônios. Após um potencial de ação, os astrócitos agem para terminar a sinalização, eliminando o GLU da fenda sináptica através da expressão de transportadores de glutamato dependentes de Na^+ , em particular GLT-1. Uma vez removido da sinapse, o GLU é convertido em glutamina, que é então liberada por astrócitos no espaço extracelular onde pode ser absorvida por neurônios. Após a absorção, a enzima glutaminase converte a glutamina de volta ao GLU para que possa ser carregada em vesículas pelo transportador de glutamato vesicular (TGluV), reiniciando o ciclo da transmissão sináptica do GLU⁵ (Fig. 4).

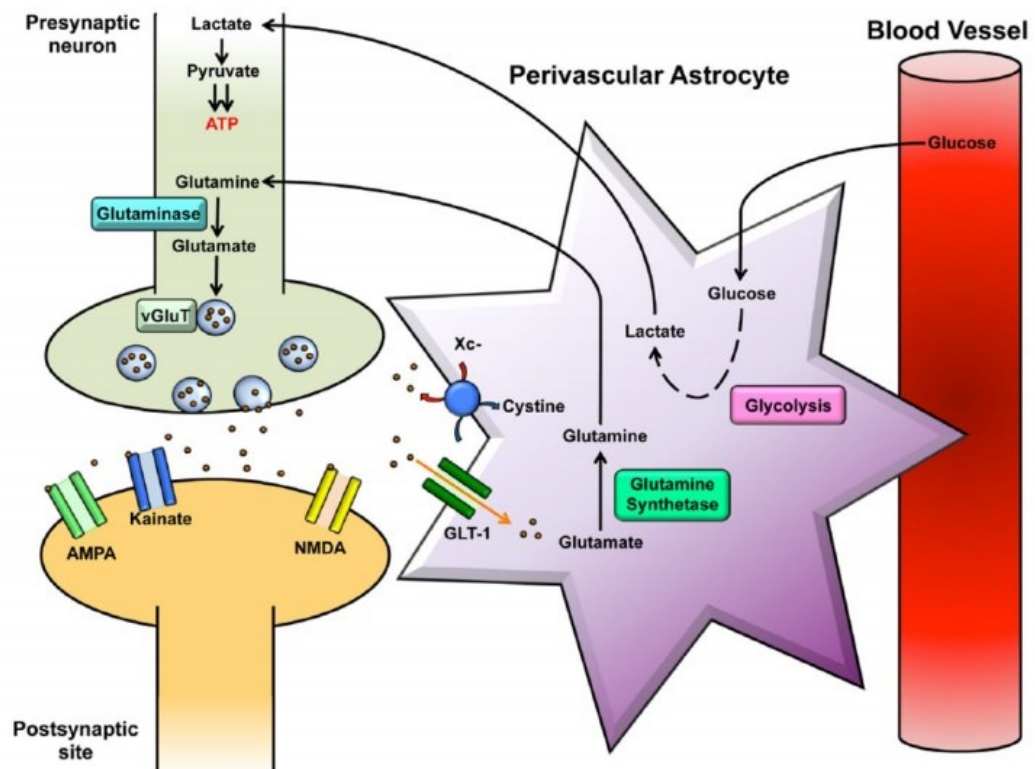


Figura 4. Esquema representativo da transmissão sináptica glutamatérgica. Os astrócitos fornecem suporte metabólico para os neurônios e regulam a produção e absorção de glutamato. Os astrócitos também participam do ciclo glutamato-glutamina. Após o efluxo de glutamato da fenda sináptica é absorvido por GLUT-1 em astrócitos e convertido em glutamina. A glutamina é então liberada pelos astrócitos e absorvida pelos neurônios, onde é convertida em glutamato e carregada nas sinapses para participar da próxima transmissão sináptica (Adaptado de Scofield & Kalivas, 2014).

2.6 A exposição crônica à cocaína influencia a expressão do GLT-1

O transportador GLT-1 é responsável por 90% da captação de GLU no cérebro e é o principal modo de transporte deste para os astrócitos. A exposição crônica à cocaína reduz a expressão do GLT-1 no NAc, fazendo com que a desregulação do GLT-1 seja uma resposta inadaptada consistente a exposição à droga. A expressão de GLT-1 é reduzida imediatamente após a auto-administração de cocaína, enquanto a retirada prolongada causa uma redução adicional da regulação. A inibição da captação de GLU, induzida pela droga, retarda a remoção do transmissor da fenda sináptica, ampliando potencialmente a magnitude da transmissão glutamatérgica. Além disso, a expressão reduzida de GLT-1 permite ao GLU liberado sinapticamente obter acesso a compartimentos não-sinápticos. Este transbordamento de GLU poderia ativar os receptores NMDA contendo mGluR5 e GluN2B produzindo aumento de íons Ca^{2+} e consequente potencialização sináptica, bem como um comportamento intensificado de busca de drogas. A conservação da desregulação do transportador GLT-1 no NAc, após a exposição a múltiplas classes de substâncias aditivas, aponta para uma disfunção glutamatérgica geral que contribui para os níveis elevados de GLU observados no NAc durante a reintegração da busca de drogas⁵.

Geralmente, as drogas de abuso mostraram potencializar a liberação de GLU no NAc além de inibir a remoção do neurotransmissor da fenda sináptica⁵.

Muitos antibióticos β -lactâmicos são estimuladores potentes da expressão GLT-1. Esta ação parece ser mediada pelo aumento da transcrição do gene *GLT1*. Em animais, o antibiótico β -lactâmico ceftriaxona (CTX) aumentou tanto a expressão cerebral do GLT-1 como a sua atividade bioquímica e funcional²⁸.

2.7 A ceftriaxona melhora os sintomas de toxicodependência em modelos animais

A ceftriaxona (CTX) melhora os sintomas de doenças do SNC em múltiplos modelos animais, incluindo esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, convulsão, doença de Huntington, depressão e toxicodependência. O mecanismo de CTX envolve o aumento da captação de GLU celular através da ativação do GLT-1. No contexto de drogas de abuso, estudos anteriores demonstraram que CTX reduz: dependência física e preferência condicionada ao lugar (PCL) resultante da exposição crônica à morfina, recaída para a procura de cocaína, efeitos reforçadores e motivacionais em camundongos e sensibilização locomotora para cocaína²⁹.

Estudos demonstraram que 5 dias de tratamento com CTX após autoadministração de cocaína restaurou os níveis basais de GLU no NAc em ratos. Também foi demonstrado que a CTX recuperou a reabsorção de GLU e atenuou o aumento do mesmo liberado sinapticamente, que acompanha a reintegração iniciada pela cocaína. Estes dados indicam que a CTX normaliza múltiplos aspectos da homeostase do GLU após a autoadministração de cocaína e, portanto, mantém o potencial para reduzir a recaída em adictos³⁰.

Assim a capacidade da CTX em melhorar a expressão de GLT-1 torna-a uma candidata para o tratamento do vício, pois múltiplas drogas de abuso reduzem a expressão dessas proteínas. Estudos recentes mostram que a inibição, mediada por CTX, de funções de busca de cocaína através da normalização da transmissão do GLU pode ser revertida bloqueando farmacologicamente GLT-1 no NAc. Além disso, o tratamento com CTX proporciona uma proteção duradoura de recidiva de cocaína em modelos de roedores quando é administrada semanas antes dos testes de reintegração. Tomados em conjunto, esses dados indicam que a inibição mediada pela CTX da busca de drogas ocorre através da normalização dos níveis de GLU extra sináptico, aumentando a captação do mesmo, e ordenando o seu excesso induzido por drogas no NAc⁵.

Apesar da sua eficácia pré-clínica promissora, a CTX possui propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas desfavoráveis, tais como baixa biodisponibilidade oral, penetrabilidade limitada da barreira hematoencefálica e atividade antibacteriana, que podem limitar sua utilidade terapêutica como uma medicação para o SNC. Uma alternativa para CTX seria o ácido clavulânico (AC), aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), que é normalmente administrado em associação com amoxicilina para superar a resistência por bactérias que secretam enzimas β -lactamases que inativam a maioria das penicilinas²⁹.

2.8 O ácido clavulânico possui efeitos moduladores do SNC mais eficazes que a ceftriaxona

O ácido clavulânico é estruturalmente semelhante à CTX com os dois compostos que possuem um fármacóforo central de β -lactama necessário para a ativação de transportadores GLT-1. A vantagem potencial do AC em relação à CTX é um perfil terapêutico mais desejável, incluindo uma maior biodisponibilidade oral, uma penetrabilidade cerebral aumentada e atividade antibacteriana insignificante^{29, 31}.

Estudos demonstraram que o AC possui fortes efeitos moduladores do SNC, diminuindo a ansiedade nos modelos de roedores e primatas. Outros achados sugerem que o AC é um agente

neuroprotetor em modelos *in vivo* de Parkinson. O ácido clavulânico facilmente transpassa a barreira hematoencefálica, permitindo o alcance de suas propriedades ao SNC³².

Recentemente foi relatado que o AC pode aumentar a expressão da proteína transportadora GLT-1 e reduzir o comportamento de reforço da cocaína, em camundongos, em doses cem vezes mais baixas do que a CTX. A maior potência relativa do AC em relação à CTX provavelmente está relacionada a um perfil farmacocinético mais favorável, incluindo a penetrabilidade cerebral aumentada²⁹.

2.9 Modelo animal para estudo de processo de adicção

Modelos animais são ferramentas valiosas para o estudo de mecanismos neurobiológicos subjacentes da doença, bem como para a identificação e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas³⁵. O desenvolvimento de modelos animais apropriados para condições humanas deve respeitar três critérios estabelecidos: as validades de constructo teórico, de face e preditiva. Neste sentido, avalia-se se os aspectos fisiopatológicos da doença são reproduzidos no modelo (constructo), capacidade do modelo em mimetizar sinais e sintomas observados nas doenças humanas (face) e a capacidade de fármacos utilizados para determinada condição em humanos induzirem resposta similar no modelo animal (preditiva)^{36, 37, 38}. Para estudar o Transtorno por Uso de Substâncias, o principal modelo existente é o de autoadministração, por mimetizar a administração voluntária de uma determinada droga e até mesmo a parcela de indivíduos que tornam-se adictos (16% no caso da cocaína)³⁹.

Com base no comportamento operante e utilizando a droga como um agente reforçador, normalmente os animais são treinados a realizar uma tarefa (apertar uma barra) a fim de receber uma quantidade de reforço (droga) pré-estabelecida que pode ou não mudar ao longo do tempo⁴⁰. Ainda que a motivação e a obtenção de droga variem significativamente entre humanos e animais, assume-se que a circuitaria química e anatômica cerebral é similar em ambas situações⁴⁰.

Outros modelos são amplamente utilizados no estudo dos efeitos da cocaína. É o caso da Preferência Condicionada ao Lugar (PCL ou “Conditioned Place Preference” – CPP, em inglês)⁴⁰. A PCL é realizada em uma caixa que varia em número de compartimentos, as mais utilizadas são as de dois ou três compartimentos distintos entre si. Um dos compartimentos é pareado com a droga (estímulo incondicionado) e o outro com veículo. Após repetidas administrações durante a fase de condicionamento, o animal poderá escolher livremente entre os lados da caixa no dia do teste. A medida de preferência condicionada é obtida no teste quando

o animal gasta mais tempo no compartimento que foi anteriormente pareado com a droga. Este mesmo procedimento pode ser utilizado tanto para avaliar a capacidade recompensadora de uma droga quanto a aversiva^{41,42}. Embora exista uma simplificação de que a PCL é baseada no condicionamento clássico (Pavloviano)⁴³, ao contrário deste, que depende da amígdala e do NAc, a PCL parece estar mais intimamente relacionada com o hipocampo⁴⁴.

O CPP possui uma grande vantagem que é a sua sensibilidade às manipulações que afetam a aquisição e a expressão da resposta condicionada. No entanto, as interpretações deste teste são limitadas pelo fato de não possibilitar a autoadministração da droga pelo animal. Outra limitação é que os circuitos neurais subjacentes ao CPP são apenas parcialmente compreendidos. Parecem envolver regiões do cérebro relacionadas a respostas recompensadoras, particularmente o sistema dopaminérgico mesolímbico, bem como estruturas subjacentes de aprendizagem contextual, como o hipocampo. Esta região do cérebro parece ser responsável pela formação de memórias relacionadas a drogas viciantes, possivelmente por meio de conexões eferentes com o sistema de recompensa do cérebro no estriado ventral¹¹⁹.

Apesar das limitações exibidas por todos os modelos disponíveis para o estudo da neurobiologia dos efeitos da cocaína, muito sobre as vias, sistemas e mecanismos envolvidos na etiologia do Transtorno por Uso de Substância podem ser esclarecidos experimentalmente.

3. JUSTIFICATIVA

O transtorno por uso de cocaína e nicotina, caracterizado pelo uso continuado da droga representa uma relevante questão de saúde pública. O desenvolvimento e a persistência de comportamentos aditivos parecem resultar de uma complexa interação entre sistemas nervoso central, mediadores imunológicos e ambiente cujos mecanismos precisos permanecem elusivos. Apesar do crescente interesse sobre as interações imunológicas nos transtornos relacionados ao humor, ansiedade e autismo, são poucos os trabalhos publicados examinando diretamente a ligação entre essas interações e as propriedades recompensadoras de drogas de abuso. De fato, estudos recentes demonstram evidências de que alterações imunológicas no SNC afetam a resposta comportamental às drogas de abuso.

Além disso, no caso da adicção por cocaína há uma escassez de intervenções terapêuticas para ajudar a reduzir as taxas de recaída. Assim, o transtorno por uso de cocaína ainda se encontra sem tratamento farmacológico adequado.

Buscando um entendimento integral sobre o condicionamento induzido por cocaína e nicotina, este trabalho propõe estudar a inflamação em modelo experimental de adicção induzida pela administração de cocaína e nicotina, em modelo experimental murino.

A hipótese desta pesquisa é que a administração das drogas citadas alteram a homeostase nas regiões envolvidas no sistema de recompensa gerando uma inflamação. Compreender os mecanismos imunológicos e fatores neurotróficos envolvidos, possibilita a regulação dos mesmos, sendo a pesquisa nessa área de grande relevância, pois contribui para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento do vício por cocaína e nicotina.

Sabe-se que a exposição crônica à cocaína reduz a expressão do GLT-1 em regiões do SNC, fazendo com que a desregulação do GLT-1 seja uma resposta inadaptada consistente a exposição à droga. Recentemente, evidências sugerem que o ácido clavulânico pode influenciar a expressão do receptor de glutamato GLT-1 e reduzir o comportamento de reforço da cocaína, em camundongos.

Diante do exposto, este estudo propõe compreender a relação entre adicção por cocaína e nicotina, inflamação em regiões importantes do cérebro utilizando o modelo de preferência condicionada ao lugar induzido por cocaína e nicotina. Propõe também, avaliar o papel do ácido clavulânico na reversão das alterações comportamentais provocadas pela administração de cocaína.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações inflamatórias e neurotróficas induzida pela administração por cocaína e nicotina em modelo experimental murinho utilizando o paradigma comportamental de preferência condicionada ao lugar.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Padronizar o modelo de PCL induzida por cocaína utilizando dois aparatos diferentes, de dois e três compartimentos.

4.2.2 Caracterizar o perfil inflamatório e neurotrófico em regiões importantes do sistema nervoso central, após a PCL induzida por cocaína, comparando o modelo com dois e três compartimentos.

4.2.3 Caracterizar o perfil inflamatório e neurotrófico em regiões importantes do sistema nervoso central associadas à adicção, após a PCL induzida por nicotina, em modelo com três compartimentos (Artigo publicado).

4.2.4 Avaliar os efeitos do ácido clavulânico em modelo comportamental de PCL e na atividade locomotora, induzidos por cocaína.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Camundongos da linhagem Swiss, machos, com aproximadamente 8 a 10 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais foram utilizados em todos os protocolos experimentais deste trabalho. Gaiolas plásticas foram utilizadas para alojar estes animais em uma sala com temperatura ambiente controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas (início às 6 horas) e livre acesso à água e comida. O protocolo realizado foi previamente submetido à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sendo aprovado sob o número 270/2018 (Anexo 1).

5.2 Drogas

5.2.1 Experimentos com cocaína

Os comportamentos de PCL foram induzidos com 10 mg/kg e/ou 20 mg/kg de cocaína (© Merck & Co., Inc.) diluída em solução salina (NaCl 0,9%). Além disso, foi administrado o ácido clavulânico (Clavulanato de Potássio da SIGMA), nas doses de 10mg/Kg e 50mg/Kg, diluído em salina (NaCl 0,9%), durante 3 dias alternados, durante a fase de aquisição da PCL induzida por cocaína. A cocaína e o ácido clavulânico foram administrados via intraperitoneal (i.p.). O grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%, i.p.).

5.2.2 Experimentos com nicotina

O sal de tartarato de hidrogênio de nicotina (0,5 mg / kg, Merck®) foi dissolvido em solução salina fisiológica (SAL, NaCl a 0,9%) e o pH foi ajustado para 7,4. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e injetadas por via intraperitoneal (ip) no volume de 1 mL / 100 g. Os ratos de controle recebem o mesmo volume de solução salina.

5.3 Análise do perfil inflamatório e neurotrófico

A análise do perfil inflamatório e neurotrófico foi realizada utilizando-se a técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Os parâmetros observados foram as medidas da concentração das seguintes citocinas em sobrenadante de tecidos do córtex pré-frontal,

hipocampo e estriado: IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , BDNF, GDNF, NGF e CX3CL1. Os métodos utilizados para a extração e processamento do tecido bem como a análise da concentração dos mediadores inflamatórios por ELISA estão descritos a seguir.

5.3.1 Preparação de extratos de tecidos

Os tecidos (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) foram retirados, imediatamente colocados em eppendorfs em gelo e posteriormente congelados em freezer à -70°C. O material foi processado, para posterior realização da técnica ELISA, adicionando-se tampão de extração de citocinas ao mesmo e posteriormente triturando-o utilizando um aparelho sonicador, até que fosse obtida uma solução homogênea. As amostras processadas foram centrifugadas a 13000 g por 10 minutos, a 4°C e os sobrenadantes coletados e estocados a -70°C para posterior medida de citocinas e fatores neurotróficos. Amostras de sangue também foram obtidas, centrifugadas a 1500 \times g por 10 min a 4 ° C, e o soro foi coletado e estocado a -70 ° C até o uso.

5.3.2 Medida dos níveis de citocinas e fatores neurotróficos do sobrenadante de extratos de tecidos por ELISA

As placas para a técnica ELISA foram sensibilizadas com 100 μ l/poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) reativos contra IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , BDNF, GDNF, NGF e CX3CL1, diluídos em tampão de cobertura, e mantidas por toda noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas, com tampão de lavagem, e feito o bloqueio, com tampão de bloqueio, à temperatura ambiente durante duas horas. Após esse tempo as placas foram lavadas e adicionados os sobrenadantes coletados dos extratos de tecidos (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) que foram incubados durante toda a noite a 4°C.

No dia seguinte, as placas foram lavadas e foram colocados 100 μ l/poço dos anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) de detecção, específicos para IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , BDNF, GDNF, NGF e CX3CL1, de camundongos, marcados com biotina e as placas foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) foi adicionada e incubada por trinta minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas através da incubação com substrato da peroxidase (H₂O₂) juntamente com um cromógeno (OPD) diluídos em tampão citrato

(100µl/poço). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄), as placas foram lidas no leitor automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando filtro de 490nm. Foram utilizadas curvas padrão obtidas a partir da diluição de concentrações conhecidas de citocinas recombinantes. Os resultados foram expressos em picograma por 100mg de tecido ou picograma por mililitro de soro.

5.4 Modelo comportamental

A preferência condicionada ao lugar é uma forma de condicionamento pavloviano usado rotineiramente para medir os efeitos motivacionais recompensadores ou aversivos de objetos ou experiências. A PCL é um procedimento que tem sido usado extensivamente para estudar os efeitos motivacionais de drogas de abuso em camundongos. Esse protocolo envolve três fases: habituação (ou pré-teste), condicionamento de uma associação entre a droga e um estímulo visual e o teste que oferece a escolha entre o estímulo associado à droga e uma sugestão neutra. Se a droga tem um significado motivacional, os animais gastam significativamente mais tempo na proximidade da sugestão associada à droga⁴¹.

5.5 Delineamento experimental 1

Primeiramente foi realizada a padronização dos aparatos de dois e três compartimentos para o modelo de PCL. Posteriormente, os resultados da padronização foram analisados para subsequente escolha do aparato mais adequado para o estudo.

5.5.1 Padronização dos aparatos de dois e três compartimentos

Na literatura são relatados vários protocolos sobre o modelo comportamental de PCL. São utilizando aparatos diferentes, com padrões, número de compartimentos, dias de experimento e tempo de sessão variados.

Com o intuito de esclarecer as diferenças entre os modelos de aparato e qual seria o mais adequado para o desenho experimental proposto, foi decidido comparar os aparatos de dois e três compartimentos, utilizando o protocolo de PCL já estabelecido por Moreira e colaboradores^{41, 63}.

5.5.1.1 *Análise comportamental*

Para induzir os comportamentos de PCL utilizamos duas doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg de cocaína.

A PCL, induzida por cocaína, foi avaliada em duas caixas de acrílico diferentes. A primeira contendo três compartimentos com dois lados de dimensões iguais, conectados por um corredor central e separados entre si por portas removíveis. As paredes e os assoalhos eram diferentes entre os lados por padrões de cor (Fig 5. A). A segunda caixa com dois compartimentos com dois lados de dimensões iguais, separados entre si por portas removíveis. As paredes e os assoalhos eram diferentes entre os lados por padrões de cor (Fig. 5. B). A intensidade da luz foi similar por todas as caixas. Os animais foram filmados com uma câmera e o tempo gasto individualmente dentro de cada lado foi analisado com o software ANY-maze (versão 4.5).

Os animais passaram por três fases distintas: habituação ou pré-teste, condicionamento e teste. O protocolo de PCL utilizado é contrabalanceado (cada animal recebe cocaína de um lado da caixa), randomizado (os animais são alocados aleatoriamente em um grupo experimental) e não enviesado (nenhum grupo experimental tem preferência por um lado da caixa). Para a caixa de três compartimentos, no pré-teste cada animal foi colocado no corredor central da caixa, com as portas que delimitam os dois lados abertas, sendo então permitida a livre exploração por toda a caixa durante 15 minutos. Para a caixa de dois compartimentos, no pré-teste os animais foram colocados em um dos lados escolhido previamente, sendo então permitida a livre exploração por toda a caixa durante 15 minutos. Os camundongos que gastaram mais que 70% do tempo explorando um dos lados foram excluídos do experimento. Nos sete dias seguintes, na fase de condicionamento, os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os diferentes grupos. Eles então receberam injeções, em dias alternados, de cocaína (10 mg/kg e 20 mg/kg) ou salina (NaCl 0,9%) imediatamente antes do confinamento de 30 minutos no lado da caixa correspondente. O grupo controle recebeu apenas salina em todos os dias de condicionamento. Por fim, o teste foi realizado no dia 8 da mesma forma que o procedimento de pré-teste fora realizado (Fig. 6). O resultado final foi apresentado como “taxa de preferência” e foi calculado subtraindo-se do tempo que cada animal despendeu no lado pareado com a droga no dia do teste, o tempo despendido neste mesmo lado no dia do pré-teste.

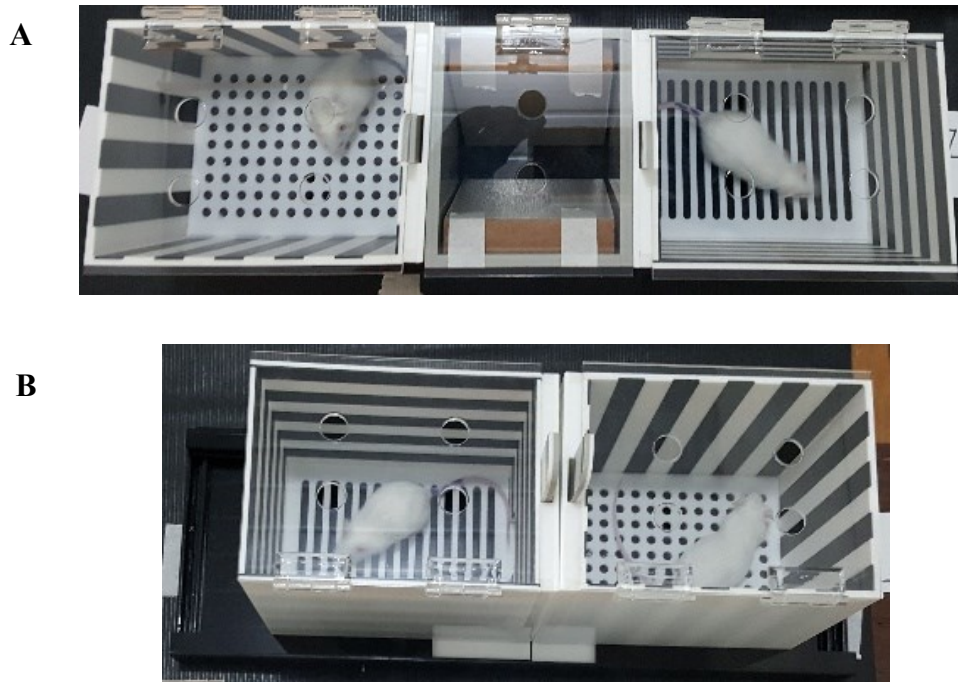


Figura 5. Figura representativa de diferentes aparatos para PCL, com assoalhos e paredes apresentando padrões diferenciados. Em (A) aparato com três compartimentos. Em (B) aparato de dois compartimentos.

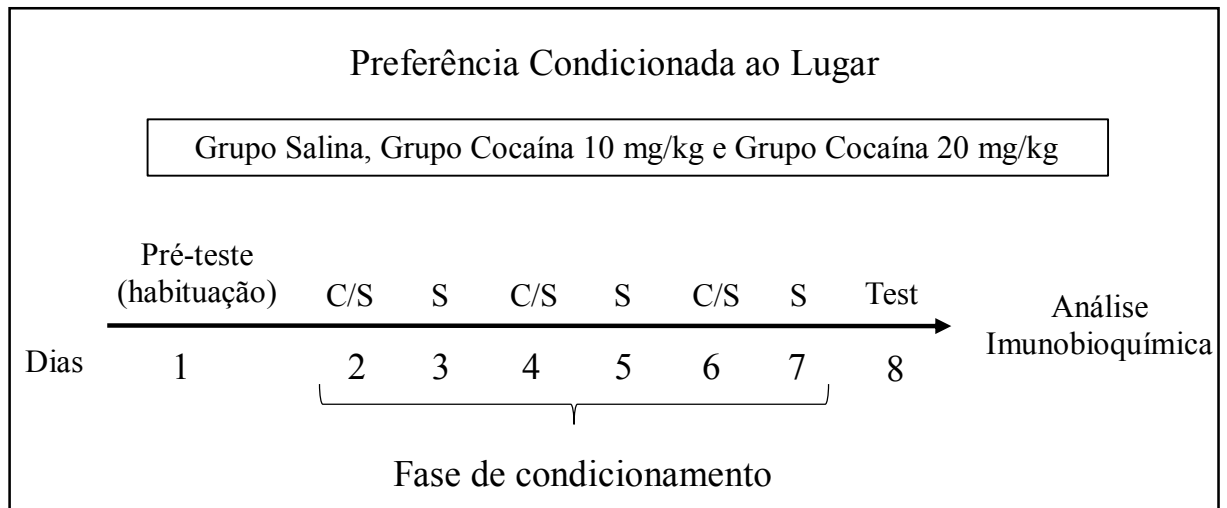


Fig. 6. Esquema representativo do delineamento experimental 1. Os grupos foram submetidos a preferência condicionada ao lugar. Após o teste comportamental, os cérebros dos camundongos foram dissecados e ensaios imunobioquímicos foram realizados (n=10 animais por grupo). C= cocaína, S= salina, C/S= cocaína ou salina.

5.5.1.2 Análise do perfil imunológico e neurotrófico

Com o intuito de analisar o papel das citocinas e dos fatores neurotróficos na PCL induzida pela cocaína, bem como a diferença entre os aparatos, se a presença de mais um compartimento influenciaria em âmbito molecular, o perfil imunológico dos grupos foi caracterizado medindo os níveis de citocinas e fatores neurotróficos, já especificados anteriormente. Para esse fim, no oitavo dia, logo após ao teste, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e os cérebros foram dissecados e armazenados a -70°C. Posteriormente foi realizada a técnica ELISA, como descrito no item 5.3.2, utilizando o sobrenadante dos tecidos das seguintes regiões: córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.

5.6 Delineamento experimental 2

Após a padronização dos aparatos, de posse dos resultados e análise dos mesmos, o aparato de três lugares foi escolhido como o mais adequado para o estudo, uma vez que este, demonstrou influenciar, além do aspecto comportamental, o inflamatório e neurotrófico. Assim os experimentos sobre nicotina bem como o tratamento com o ácido clavulânico foram realizados utilizando o aparato de três lugares.

5.6.1 Experimentos utilizando nicotina

Os experimentos para induzir a PCL utilizando nicotina, bem como para a caracterização do perfil inflamatório e neurotrófico, em regiões importantes do sistema nervoso central, após a PCL induzida por nicotina, estão descritos no artigo publicado.

5.6.2 Efeito do tratamento com ácido clavulânico

Para avaliar o efeito do ácido clavulânico em reduzir o comportamento condicionado induzido pela cocaína, duas doses de AC foram administradas. Os animais foram divididos em 6 grupos: salina (tratado com salina), AC10 (tratado com AC 10mg/kg), AC50 (tratado com AC 50 mg/kg), cocaína (tratado com cocaína 20mg/Kg), AC10+C (tratado com AC 10mg/kg e cocaína) e AC50+C (tratado com AC 50mg/kg e cocaína). Nos animais que foram tratados com AC e cocaína, a mesma era administrada 30 minutos depois do AC. Posteriormente os animais eram submetidos a PCL.

5.6.2.1 *Análise Comportamental*

A PCL induzida por cocaína foi avaliada em uma caixa de acrílico contendo três compartimentos com dois lados de dimensões iguais, conectados por um corredor central e separados entre si por portas removíveis. As paredes e os assoalhos eram diferentes entre os lados por padrões de cor. A intensidade da luz foi similar por toda a caixa. Os animais foram filmados com uma câmera e o tempo gasto individualmente dentro de cada lado foi analisado com o software ANY-maze (versão 4.5).

Os animais passaram por três fases distintas: habituação ou pré-teste, condicionamento e teste. O protocolo de PCL utilizado é contrabalanceado (cada animal recebe cocaína de um lado da caixa), randomizado (os animais são alocados aleatoriamente em um grupo experimental) e não enviesado (nenhum grupo experimental tem preferência por um lado da caixa). No pré-teste cada animal foi colocado no corredor central da caixa, com as portas que delimitam os dois lados abertas, sendo então permitida a livre exploração por toda a caixa durante 15 minutos. Os camundongos que gastaram mais que 70% do tempo explorando um dos lados foram excluídos do experimento. Nos sete dias seguintes, na fase de condicionamento, os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os diferentes grupos. Eles então receberam injeções, em dias alternados, de cocaína (20 mg/kg), ácido clavulânico (10mg/kg ou 50mg/kg) ou salina (NaCl 0,9%) imediatamente antes do confinamento de 30 minutos no lado da caixa correspondente. O grupo controle recebeu apenas salina em todos os dias de condicionamento. Durante esta fase, no grupo que recebia cocaína e ácido clavulânico como tratamento, o ácido clavulânico era administrado 30 minutos antes das injeções de cocaína. Por fim, o teste foi realizado no dia 8 (Fig. 7). O resultado final foi apresentado como “taxa de preferência” e foi calculado subtraindo-se do tempo que cada animal despendeu no lado pareado com a droga no dia do teste, o tempo despendido neste mesmo lado no dia do pré-teste.

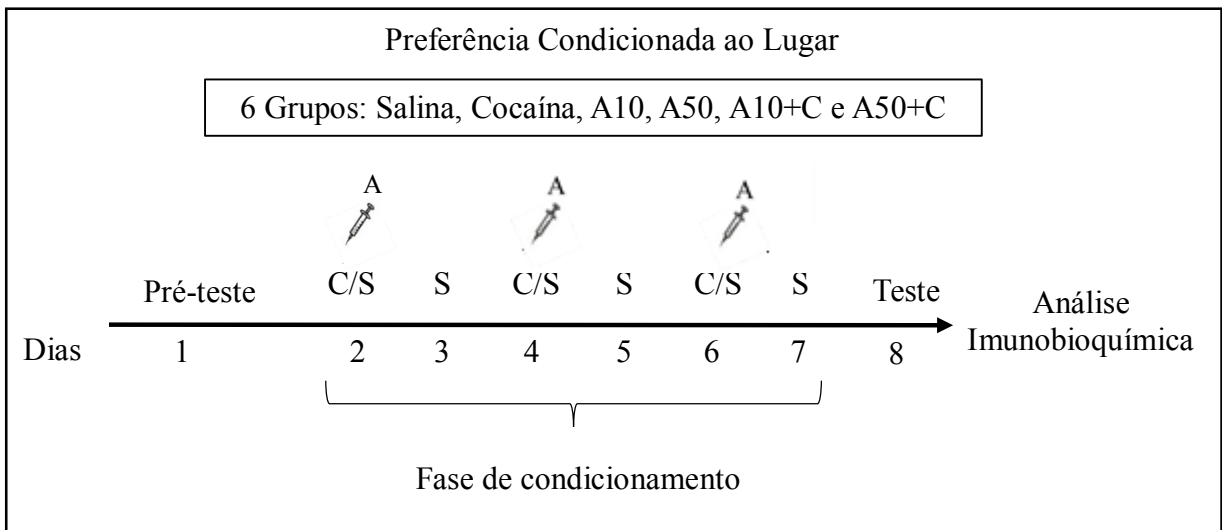


Fig. 7. Esquema representativo do delineamento experimental 2. Os grupos foram submetidos a preferência condicionada ao lugar ($n=6$ animais por grupo). C= cocaína, S= salina, C/S= cocaína ou salina. A10= Ácido clavulânico (10 mg/kg), A50= Ácido clavulânico (50 mg/kg), A10+C= Ácido clavulânico (10 mg/kg) e cocaína, A50+C= Ácido clavulânico (50 mg/kg) e cocaína. A= Administração do ácido clavulânico nas doses citadas anteriormente.

5.6.2.2 Efeitos das doses do ácido clavulânico na preferência condicionadas ao lugar

Para avaliar a possibilidade do ácido clavulânico induzir preferência quando pareado com um contexto (um dos lados da caixa utilizada no paradigma de PCL) os animais foram separados em dois grupos independentes que receberam, cada um, dose de 10mg/kg ou 50mg/kg. Seguiu-se o mesmo protocolo descrito no item 5.6.1.1.

5.6.2.3 Efeito das doses do ácido clavulânico na atividade locomotora

A atividade locomotora dos animais foi avaliada utilizando-se o teste de campo aberto. Para tal foi disposta uma arena cilíndrica de acrílico transparente (30 cm de diâmetro e 50 cm de altura), aberta na extremidade superior e base inferior encaixada em um plano geométrico quadrado. O protocolo experimental foi adaptado de Marinho e colaboradores⁶⁵. Após 3 horas do teste de PCL os animais foram alocados na arena e filmados durante 10 minutos. A filmagem foi realizada com uma câmera de vídeo localizada 2,0 metros acima da arena. Durante o teste, com o emprego do software ANY-maze (versão 4.5), a distância total percorrida por cada animal foi registrada. Os dados estão apresentados como distância percorrida em metros durante o teste.

5.6.2.4 Efeito do pré-tratamento com ácido clavulânico na preferência condicionadas ao lugar

Para avaliar a possibilidade do pré-tratamento com ácido clavulânico induzir preferência quando pareado com um contexto (um dos lados da caixa utilizada no paradigma de PCL) os animais foram separados em dois grupos independentes, o grupo do pré-tratamento recebeu ácido clavulânico na dose de 10mg/kg por 3 dias anteriores ao início do condicionamento e o outro grupo, salina (NaCl 0,9%). Seguiu-se o mesmo protocolo descrito no item 5.6.1.1.

5.7 Análise estatística

5.7.1 Análise dos experimentos com cocaína

Os resultados obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Todos os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e analisados pela análise de variância (ANOVA two-way; Fatores: aparelhos - dois compartimentos ou três compartimentos e tratamento - cocaína ou soro fisiológico), seguido de post-hoc de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o software Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

No teste comportamental, para avaliar a funcionalidade dos aparelhos em promover o condicionamento de preferência local, os dados foram analisados Por ANOVA one-way seguido de post-hoc de Tukey e expressos em média \pm EPM. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o software Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

5.7 2 Análise dos experimentos com nicotina

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Todos os dados foram testados para normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis foram normalmente distribuídas e comparadas pelo teste t de Student. As análises de correlação de Pearson foram realizadas para examinar a relação entre CPP, citocinas e fatores neurotróficos. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ em testes bicaudais. As análises estatísticas foram realizadas com o software Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

6. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de dois artigos, o primeiro que será submetido em periódico indexado, o segundo publicado, além de dados adicionais ainda não publicados sobre o efeito do ácido clavulânico como estratégia terapêutica ao comportamento condicionado induzido pela cocaína.

6.1 Artigo científico 1

Artigo em preparação para submissão.

Title: The type of apparatus used in cocaine-induced CPP influences the production of inflammatory and neurochemical mediators in mice.

The type of apparatus used in cocaine-induced CPP influences the production of inflammatory and neurochemical mediators in mice.

Magda L. P. Rosa^{1,2}, Caroline A. Machado¹, Laila Asth³, Eliana CB Toscano⁴, Rodrigo N. Ferreira¹, Antônio Lúcio Teixeira^{2,5}, Fabrício A. Moreira^{2,3}, Aline S. Miranda^{1,2}

¹Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Brasil;

²Programa de Pós-graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Brasil.

³Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Brasil;

⁴Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Brazil.

⁵Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, University of Texas Health Science Center at Houston, TX, USA.

*Corresponding author:

Aline Silva de Miranda

Departamento de Morfologia, ICB, UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270-901, Brazil.

Tel.: +55 31 34092651; fax: +55 31 34092651.

E-mail: mirandas.aline@gmail.com

Abstract

The cocaine-induced neuroinflammation plays an important role in the pathophysiology of drug addiction. Evidences suggests that the immunological response contributes for consolidation of memory related to place preference behavior underlying cocaine administration in mice. Conditioned place preference (CPP) is a protocol used extensively to study the rewarding or aversive motivational effects of drug abuse in rodents, reproducing cocaine-seeking behavior in humans. Besides the variety of apparatus used in the CPP protocol, the influence that their physical characteristics in the response to conditioned behavior and neuroinflammation is missing. In the current study, two- and three-compartment apparatuses were tested using the behavioral model of CPP. Cocaine-induced CPP was demonstrated in both apparatuses. However, the levels of inflammatory mediators (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , and CX3CL1) and neurotrophic factors (BDNF, GDNF, and NGF) in prefrontal cortex, hippocampus, and striatum were influenced by the type of CPP apparatus used. Increased levels of cytokines and neurotrophic factors were found in the control groups of the three-compartment apparatus, in comparison to the control group of the two-compartment apparatus. In addition, the cocaine groups of the three-compartment apparatus showed higher levels of CX3CL1 than the cocaine group of two-compartment apparatus. Comparing the control and cocaine groups submitted to CPP protocol using three-compartment apparatus, mice injected with cocaine had decreased levels of IL-1 β , IL-6, IL-10, CX3CL1, and GDNF. Similar levels of all the mediators evaluated was similar between the groups submitted to the CPP protocol using the two-compartment apparatus. Our data suggest that the three compartment-apparatus is a functional model, since it is able to trigger changes in the immunological response related to cocaine addiction in the central nervous system.

Keywords

Cocaine; Conditioned place preference; Apparatus; Cytokines; Neurotrophic Factors.

1. Introduction

Drug addiction is a chronic disease characterized by inability to regulate the drug-seeking behavior, resulting in drug intake despite long-term deleterious consequences (Sondheimer and Knackstedt, 2011). Cocaine is among the most commonly abused drugs consumed in western societies, representing a major public health issue. Around 18.2 million people used cocaine in 2016 worldwide. There are indications of increased cocaine use in North and South America (World Drug Report, 2018). The development and persistence of addictive behaviors appears to result from a complex interaction between central nervous system (CNS), immune system, and the environment. However, the mechanisms involved in this interaction remain elusive.

Cocaine use can interfere with the production and release of cytokines, demonstrating its role in immunomodulatory capacity (Correia et al., 2020). The abuse of psychostimulants results in imbalance between pro- and anti-inflammatory response, leading to exacerbated neuroinflammation (Moreira et al., 2016; Liao et al., 2016; Periyasamy et al., 2018). A growing body of evidence suggests that cocaine is recognized by the immune system as a foreign xenobiotic component, triggering pattern recognition receptors (PRR). This mechanism induces the activation of innate immune response and modulates the nuclear factor κ B (NF κ B) signaling pathway (Hutchinson and Watkins, 2014; Northcutt et al., 2015; Liao et al., 2016). Both exacerbation and inhibition of the NF κ B activity can impair the consolidation and reconsolidation memory, which are important parameters to the drug-cue associations (Correia et al., 2020).

Over the past few decades, the use of animal models has enabled a better understanding of neurobiological processes as well as for evaluating new therapeutic strategies involved in addiction (Lipska and Weinberger, 2000). Conditioned place preference (CPP) is a Pavlovian conditioning protocol used to measure the drug-induced rewarding or aversive motivational effects (Tzschentke, 1998). This protocol involves three phases: habituation (or pre-test), conditioning of an association between the drug and a contextual stimulus, and the test that offers the choice between the stimulus associated with the drug and a neutral context. If the drug has a motivational meaning, the animals spend significantly more time exploring the drug-paired compartment (Cunningham et al., 2006; Huston et al., 2013).

The CPP protocol can be performed using different apparatuses (Hitchcock et al., 2014; Bernardi et al., 2009; Cunningham et al., 2003; Cunningham et al., 2006; White et al., 2005; Tzschentke, 2007). The apparatuses most commonly used in CPP studies have two or three compartments. In the first case, the two chambers are directly connected, whereas in the latter

the CPP box consists of two chambers connected by a small corridor (Parker, 1992). Studies suggest that the existence of an additional space may influence CPP behavior, since rodents have a preference for new environments. The existence of the additional compartment enables the animal to remain in an area of the apparatus not associated with a drug or vehicle. In contrast, the two-compartment apparatus requires a choice made by the researcher, which may become a potential bias in the study. (Bardo et al., 1989; Carr et al., 1988; Scoles and Siegel, 1986).

As CPP has become a widely used protocol, the types of apparatuses used vary across studies. However, the consequences for the effects of cocaine on conditioning behavior and neuroinflammation are unclear (Tzschentke, 2007). Therefore, we aim to evaluate the neuroinflammatory response in the cocaine-induced CPP model in mice. In addition, we sought to investigate the possible impact of apparatus of two and three compartments in the immune response relate to cocaine abuse.

2. Methods

2.1. Subjects

Male Swiss mice (aged 8 to 10 weeks) were group-housed (5/cage) in a room maintained at 24 ± 2 °C with a 12 h light/dark cycle (lights on at 6 am). A habituation period of at least one week was awaited between the arrival of the mice and the start of experiments. All mice had access to food and water ad libitum. The project was approved by the local ethics committee (CEUA-UFMG) under the protocol number 270/2018. All protocols were conducted in accordance with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Drug

Cocaine hydrochloride (10 and 20 mg/kg, Merck®) was dissolved in physiological saline (SAL, 0.9% NaCl). The solutions were prepared immediately before use and injected via intraperitoneal (i.p.) route in a volume of 100ul for a 25g mice. Control animals received the same volume of saline (SAL, 0,9%).

2.3. Apparatus and General Conditioning Procedures

All the experiments were conducted in the light phase, between 7.00 and 12.00 a.m. in an isolated, sound-attenuated room. The CPP protocol was performed using different apparatuses, composed by two or three compartments. Both apparatuses had equal size and design. The walls of the chambers were constructed of acrylic with interspersed black and white bands and the floors consisted of removable acrylic surfaces. In one of the chambers (chamber A) the walls had vertical stripes and the floor consisted of an acrylic grid with parallel and equally spaced rods. The other (chamber B) had walls with horizontal stripes and an acrylic floor with circular holes. Both chambers had 20cm long, 15cm wide, and 10cm high.

In the apparatus of three compartments, each chamber, doors (5 x 5cm) connecting them to a central compartment (6cm long, 15cm wide, and 10cm high). In the apparatus of two compartments, chamber A and B were directly connected by a door. In both apparatuses, the intensity of illumination was similar between the compartments.

The CPP protocol was randomized, unbiased, and counterbalanced, consisting of three phases, namely pre-conditioning, conditioning and test. In the pre-conditioning phase (first day), each mouse was placed in the central compartment of the apparatus containing three chambers, with the doors open, and could freely explore the box during 15 min. In the apparatus of two compartments, the researcher previously defined in which compartment the animal would be placed. Each compartment received the same number of animals to start the exploration. The time spent in each compartment was registered. To avoid bias, it was established that the animals exhibiting preference for one of the chambers (more than 70% of the time) would not be included in the experiments. In any case, there was no preference for none of the sides (i.e., this is an “unbiased” CPP protocol).

In the conditioning phase (days 2–7), the animals were randomly assigned to one of the experimental treatments. They received cocaine injections on days 2, 4, and 6 and were immediately confined in one of the chambers (drug-paired side) for 30 min. Even though there was no preference for any of the chambers, half of the animals in each experimental group were confined in chamber A and the others in chamber B (i.e., this is a counterbalanced CPP protocol). On days 3, 5, and 7, vehicle was administered and the animals were confined in the alternate chamber for the same time. Finally, on the test phase (day 8), each animal could freely explore the entire apparatus. In the three compartments apparatus, mice were placed on the central compartment while in the two compartments apparatus they were placed in the least preferred compartment. Both apparatuses had the doors open. Mice, and remained in the box for 15 min, when the time spent in each chamber was registered (Fig. 1).

The CPP index (preference score) was calculated for each animal as the time spent in drug-paired side during the test subtracted by the time spent in the same side in the pre-exposure phase (Cunningham et al., 2006). The experiments were recorded by a video camera and analyzed using the AnyMaze software (version 4.5).

2.4. Measurement of levels of cytokines and neurotrophic mediators

In order to analyze if the presence of the third compartment could influence the neuroinflammatory response, we measured the levels of interleukins and neurotrophic factors in mice submitted to the CPP protocol using apparatus with two or three compartments.

After the CPP protocol, the mice were euthanized with a mixture of Ketamine (300 mg/kg, Laboratory Cristália, Brazil) and Xylazine (30 mg/kg, Rompun®, Bayer, Germany) by i.p. route; Pre-frontal cortex, hippocampus, and striatum were carefully removed and homogenized in an extraction solution (100 mg of tissue per milliliter), containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 KIU aprotinin, using Ultra-Turrax. Lysates were centrifuged at 13,000g for 10 min at 4 °C, supernatants were collected and stocked at -70 °C until use. Samples at 1:3 dilutions in 0.1% BSA in PBS and the concentrations of cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α), chemokine (CX3CL1), and neurotrophic factors (BDNF, NGF, and GDNF) were determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as picogram per 100 mg of tissue or picogram per milliliter of serum. The detection limit of ELISA assays was around 5 pg/mL.

2.5. Statistical Analysis

The data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. In order to evaluate the functionality of the apparatuses in promoting CPP, the data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc and expressed as mean \pm SEM. The results obtained for the groups cocaine and saline in two versus three compartments CPP apparatuses were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc. The significance level was set at $p < 0.05$ in two-tailed tests. Statistical analyses were performed using Prism 6 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1 Cocaine-induced CPP in the two and three-compartment apparatus.

To evaluate the functionality of the apparatuses in promoting CPP, two doses of cocaine (10mg/kg and 20mg/kg) were tested. Mice of cocaine groups showed a significant preference for the drug paired compartment in both two [(Saline: -9.54 ± 28.42 , Cocaine 10mg: 95.36 ± 29.32 , Cocaine 20mg: 103.70 ± 21.02 ; Saline x Cocaine 10 mg: $p= 0.0262$; Saline x Cocaine 20mg: $p= 0.0195$; Cocaine 10mg x Cocaine 20mg: $p= 0.9747$) (Figure 2 A)] and three [(Saline: 32.56 ± 19.67 ; Cocaine 10mg: 140.30 ± 29.92 ; Cocaine 20mg: 172.50 ± 22.71 ; Salina x Cocaine 10mg: $p= 0.0107$; Saline x Cocaine 20 mg: $p= 0.0007$; Cocaine 10mg x Cocaine 20mg: $p= 0.6270$) (Figure 2 B)] compartment apparatuses, when compared to control groups.

3.2 The CPP apparatuses influenced immunological and neurochemical parameters in the prefrontal cortex, hippocampus and striatum.

In order to investigate if the immunological and neurochemical parameters had alterations between conditioned animals in different CPP apparatuses, control and cocaine 20 mg/kg groups conditioned in the two and three compartment apparatuses were chosen.

After the CPP protocol, the mice were euthanized the levels of cytokines and chemokine (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , and CX3CL1) and neurotrophic factors (BDNF, GDNF, and NGF) were measured in the prefrontal cortex, hippocampus and striatum.

3.2.1. Immunological and neurochemical parameters in the pre-frontal cortex

The animals conditioned in the two compartments apparatus showed similar levels of cytokines in the prefrontal cortex in both control and cocaine groups. While in the three compartments apparatus, the mice that received cocaine showed decreased levels of IL-1 β , IL-6, and IL-10, compared to the control group. The TNF- α concentration was similar between the groups (Figure 3). In addition, there was an increase of the evaluated cytokines in the control group conditioned in the three compartments apparatus in comparison to control group conditioned in the two compartments apparatus (IL-1 β : Apparatus: $F(1, 16) = 77.31$, $p < 0.0001$; Treatment: $F(1, 16) = 11.61$, $p = 0.0036$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 20.69$, $p = 0.0003$; IL-6: Apparatus: $F(1, 16) = 6.162$, $p = 0.0245$; Treatment: $F(1, 16) = 3.974$, $p = 0.0635$;

Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 5.395$, $p=0.0337$; IL-10: Apparatus: $F(1, 16) = 23.72$, $p=0.0002$; Treatment: $F(1, 16) = 6.492$, $p=0.0215$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 6.314$, $p=0.0231$; TNF- α : Apparatus: $F(1, 16) = 14.53$, $p=0.0015$; Treatment: $F(1, 16) = 7.570$, $p=0.0142$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 8.339$, $p=0.0107$, two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc, Figure 3 A-D).

Regarding to the chemokine CX3CL1, we observed increased levels in the control group of conditioned animals in the three-compartment apparatus than in two compartments. The same was observed for groups that received cocaine. [(Apparatus: $F(1, 16) = 70.65$, $p<0.0001$; Treatment: $F(1, 16) = 1.568$, $p=0.2285$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 0.3732$, $p=0.5499$), (Figure 3E)]. Taking saline and cocaine groups for comparison, the CX3CL1 levels were similar in both apparatuses with two and three compartments (Figure 3E).

In prefrontal cortex, no significant differences were found in BDNF and NGF levels between control and cocaine groups conditioned in the two or three compartments apparatus (Fig. 3 F and H). [(Apparatus: $F(1, 16) = 0.2247$, $p=0.6419$; Treatment: $F(1, 16) = 2.931$, $p=0.1062$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 0.9517$, $p=0.3438$, (Figure 3F) and NGF (Apparatus: $F(1, 15) = 7.147$, $p=0.0174$; Treatment: $F(1, 15) = 0.1342$, $p=0.7192$; Apparatus x Treatment: $F(1, 15) = 1.269$, $p=0.2776$, Figure 7 H)]. However, cocaine induced reduction of GDNF levels in mice conditioned in the three-compartments apparatus (Fig. 3H) [(Apparatus: $F(1, 16) = 27.52$, $p<0.0001$; Treatment: $F(1, 16) = 9.285$, $p=0.0077$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 11.43$, $p=0.0038$), (Figure 3H)].

3.2.2. Immunological and neurochemical parameters in the hippocampus.

In the hippocampus, there were no significant differences in the levels of the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α between the saline and cocaine groups conditioned in both apparatuses (Fig. 4 A- D). Comparing the saline groups, the mice submitted to the CPP using the apparatus with two compartments, showed higher levels of IL-1 β [(Apparatus: $F(1, 16) = 19.95$, $p=0.0004$; Treatment: $F(1, 16) = 0.3071$, $p=0.5872$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 1.059$, $p=0.3188$, (Figure 4A)] and IL-10 [(Apparatus: $F(1, 16) = 15.55$, $p=0.0012$; Treatment: $F(1, 16) = 0.3194$, $p=0.5798$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 0.8702$, $p=0.3648$), (Figure 4C)] than mice conditioned in apparatus with a three compartments. No significant changes were found in the levels of IL-6 [(Apparatus: $F(1, 15) = 2.648$, $p=0.1245$; Treatment: $F(1, 15) = 0.6876$, $p=0.4200$; Apparatus x Treatment: $F(1, 15) = 1.672$, $p=0.2156$), (Figure 4 B) and

TNF- α [(Apparatus: $F(1, 15) = 4.212, p=0.0580$; Treatment: $F(1, 15) = 0.5346, p=0.4759$; Apparatus x Treatment: $F(1, 15) = 0.3972, p=0.5380$), (Figure 4 D)].

Using the two-compartment apparatus, similar hippocampal levels of CX3CL1 was found in saline and cocaine groups (Fig. 4 E). Whereas cocaine promoted decrease of the CX3CL1 concentrations in mice conditioned in the three-compartment apparatus. compared to saline group conditioned in the two compartments apparatus (Apparatus: $F(1, 16) = 17.13, p=0.0008$; Treatment: $F(1, 16) = 0.4999, p=0.4897$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 3.565, p=0.0773$, Figure 4E).

In hippocampus, cocaine did not change the levels of BDNF, GDNF, and NGF neither using two nor three-compartment apparatus (Figure 4F-H). When the apparatuses used were compared, there were also no changes in the levels of neurotrophic mediators [(BDNF: Apparatus: $F(1, 16) = 0.05998, p=0.8096$; Treatment: $F(1, 16) = 0.2185, p=0.6465$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 0.3414, p=0.5672$, Figure 4F); GDNF: Apparatus: $F(1, 16) = 2.334, p=0.1461$; Treatment: $F(1, 16) = 0.9827, p=0.3363$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 0.2007, p=0.6602$, Figure 4G); NGF: Apparatus: $F(1, 16) = 2.336, p=0.1459$; Treatment: $F(1, 16) = 0.05456, p=0.8183$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 0.1323, p=0.7208$, Figure 4H)].

3.2.3 Immunological and neurochemical parameters in the striatum.

In the striatum, no significant differences were found in levels of IL-6, IL-10, and TNF- α between saline and cocaine groups conditioned in the two or three compartments apparatus (Figure 5B-D). While the concentrations of IL-1 β were decreased in cocaine group in comparison with saline group conditioned in the three-compartment apparatus (Fig.5A). When we evaluated the apparatuses used, the levels of IL-1 β (Apparatus: $F(1, 16) = 12.94, p=0.0024$; Treatment: $F(1, 16) = 3.341, p=0.0863$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 10.31, p=0.0055$, Figure 5A), IL-10 (Apparatus: $F(1, 15) = 14.77, p=0.0016$; Treatment: $F(1, 15) = 2.116, p=0.1664$; Apparatus x Treatment: $F(1, 15) = 2.409, p=0.1415$, Figure 5C), and TNF- α (Apparatus: $F(1, 14) = 9.613, p=0.0078$; Treatment: $F(1, 14) = 0.3168, p=0.5824$; Apparatus x Treatment: $F(1, 14) = 0.02167, p=0.8851$, Figure 5D) of saline group increased, compared to the saline group conditioned in the two compartments apparatus. The same was observed for the levels of IL-6 [(Apparatus: $F(1, 15) = 2.858, p=0.1116$; Treatment: $F(1, 15) = 1.511, p=0.2380$; Apparatus x Treatment: $F(1, 15) = 6.482, p=0.0224$), (Figure 5 B)] of mice receiving cocaine in the apparatus with three compartments, compared to mice receiving cocaine in the apparatus with two compartments.

Cocaine exposure induced did not change the CX3CL1 levels in mice submitted to the CPP protocol using the apparatus with two or three compartments (Figure 5E). Comparing the apparatuses used, the CX3CL1 levels was higher in the saline group conditioned in the three-compartment apparatus than in the groups conditioned in the two-compartment apparatus [(Apparatus: $F(1, 16) = 90.51, p < 0.0001$; Treatment: $F(1, 16) = 9.702, p = 0.0067$; Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 12.38, p = 0.0028$), (Figure 6 C)].

Regarding to neurotrophic factors, cocaine exposure, as well the type of CPP apparatuses used did not change the levels of the BDNF, GDNF, and NGF [(BDNF: Apparatus: $F(1, 16) = 0.8414, p = 0.3726$; Treatment: $F(1, 16) = 1.205, p = 0.2886$, Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 0.6372, p = 0.4364$, Figure 5F); (GDNF: Apparatus: $F(1, 16) = 1.402, p = 0.2537$; Treatment: $F(1, 16) = 0.4394, p = 0.5169$, Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 3.050, p = 0.0999$, Figure 5G); and (NGF: Apparatus: $F(1, 16) = 3.122, p = 0.0963$; Treatment: $F(1, 16) = 0.4633, p = 0.5058$, Apparatus x Treatment: $F(1, 16) = 1.111, p = 0.3074$, Figure 5H)].

4. Discussion

In the current study, we evaluated neuroinflammatory and neurochemical parameters in a murine model of cocaine-induced CPP, using two and three-compartments apparatuses. CPP has been used extensively to investigate the motivational effects of cocaine abuse in mice. Besides the wide variety of CPP apparatuses with different number of compartments, its influence on the behavioral, immunological, and neurochemical response was not evaluated so far. Here, we demonstrated that the administration of cocaine in 10mg/kg and 20mg/kg induced CPP behavior in both two and three-compartments apparatuses. These data corroborate previous studies using different types of CPP apparatuses (Hitchcock et al., 2014; Bernardi et al., 2009; Cunningham et al., 2003; Cunningham et al., 2006; White et al., 2005; Tzschentke, 2007).

Neuroinflammation plays a critical role in the development of reward-related behavior in cocaine self-administration and CPP in rodents. The peripheral levels of cytokines are altered by cocaine use (Fox et al., 2012; Gan et al., 1998; Rofael et al., 2003). In the CNS, a growing body of evidence support the cocaine-induced “xenobiotic hypothesis”. Cocaine induces microglial activation in mice (Liao et al., 2016; Periyasamy et al., 2018) and can be recognized by the immune system as a foreign xenobiotic component, triggering PRRs, mainly toll like receptors (TLRs) 2 and 4 (Correia et al., 2020). Since the innate immunity is prompted, there is activation of glial cells as well as modulation of the NF κ B signaling pathway. This cascade can

lead to changes in the release of several inflammatory mediators, such as IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF α (Correia et al., 2020).

Neurotrophic factors and cytokines influence synaptic transmission and neuronal morphology, leading to dysfunctions in the nucleus accumbens (NAc) and prefrontal cortex after repeated injections of psychostimulants, including cocaine (Robinson et al., 1997; Yamada et al., 2004). The addictive behaviors appear to result from a complex interaction between CNS, immune system, and the environment. However, the mechanisms involved in this interaction remain elusive. For instance, some studies have reported increased levels of IL-1 β , IL-6, and CX3CL1 (Brown et al., 2018; Montesinos et al., 2019); while another has demonstrated a decrease of TNF α alongside to preserved IL-1 concentrations and trend to decreased CX3CL1 in the CNS of rodents exposed to peripheral administration of cocaine (Lin et al., 2011). The dopamine (DA) rewarding system originates in the midbrain ventral tegmental area (VTA) and extends to the NAc, prefrontal cortex, and other limbic areas (Koob et al., 1992). Therefore, the cocaine-induced immune response is site-specific (Yamada et al., 2004; Correia et al., 2020). The protocol of drug administration also seems to impact the levels of inflammatory mediators in the CNS. Evidence indicates the upregulation of NF κ B subunits in the NAc of mice injected daily with cocaine during at least 7 consecutive days, but not in mice that received only a single cocaine administration (Ang et al., 2001; Liao et al., 2016).

In addition, we demonstrated that the apparatuses used in the CPP protocol may influence the cocaine-induced neuroinflammation. We found alterations in inflammatory and neurochemical markers only in mice submitted to cocaine CPP protocol using three-compartment apparatus. These alterations occurred mainly in the pre-frontal cortex, where the levels of IL-1 β , IL-6, IL-10, and GDNF were decreased. We also found reduction of IL-1 β and CX3CL1 in the striatum and hippocampus, respectively. Since cocaine prompts an exacerbated neuroinflammation, the reduction of IL-1 β and IL-6 might be explained by counter-regulatory mechanism to minimize the 'xenobiotic'-related effects of this drug, such as the down-regulation of IL-10 and CX3CL1 (Liao et al., 2016; Periyasamy et al., 2018; Correia et al., 2020).

The up-regulation of IL-1 β and IL-6 has been associated with cognitive decline in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's disease (Swanson et al., 2018; Rea et al., 2018). Addiction is a condition of maladaptive memory. The drug abuse induces a pathological usurpation of the neural mechanism of learning and memory leading to behaviors related to the pursuit of rewards and the cues that predict it, such as places (Hyman, 2005). Interestingly, drug addiction and physiological memory share common neurobiological mechanisms. They may be modulated by the same neurotrophic factors, activating similar

signaling pathways (Nestler et al., 2001). In this context, the reduction or preservation of the IL-1 β and IL-6 levels in key brain areas may contribute for the cocaine-induced CPP observed in the current study.

The down-expression of GDNF found in the pre-frontal cortex of mice submitted to the CPP protocol, using three-compartment apparatus, may also reinforce the place preference behavior. GDNF is important for the survival and differentiation of dopaminergic neurons. Infusion of GDNF into the VTA blocks cocaine-induced rewarding effects. Conversely, rats submitted to intra-VTA infusion of anti-GDNF antibody and heterozygous GDNF knockout mice presented higher cocaine effects in comparison to non-treated rats and wild type mice, respectively. These data suggest that GDNF act as an anti-addictive mediator (Messer et al., 2000; Yamada et al., 2004). The trend to decreased levels of BDNF in the pre-frontal cortex in cocaine-treated animals compared to the control group corroborates studies that report drug exposure-related dysfunctions of neurotrophic factors and peripheral reduction of BDNF levels (Nestler, 2001; Simchon et al., 2015; Ornel et al., 2018; Rovaris et al., 2017).

Interestingly, the protocol using the two-compartment apparatus induced CPP behavior, but did not change the immunological and neurochemical parameters in mice exposed to cocaine. When comparing the control groups submitted to the CPP protocol using two or three-compartment apparatus, a significant increase in IL-1 β and IL-10 (pre-frontal cortex, hippocampus, and striatum), IL-6 and GDNF (pre-frontal cortex), TNF- α (pre-frontal cortex and striatum), and CX3CL1 (pre-frontal cortex and hippocampus) levels were found in animals conditioned in the three-compartment apparatus. Regarding the conditioned cocaine groups, IL-1 β (prefrontal cortex), IL-6 (striatum), and CX3CL1 (prefrontal cortex and hippocampus) were increased in the group submitted to CPP protocol using the three-compartment apparatus in comparison to those of the two-compartment apparatus. These results suggest that the three-compartment apparatus is a functional model of cocaine-induced CPP that can detect changes in neuroinflammatory and neurochemical mediators commonly observed in drug-addiction. Thus, whereas both apparatuses are equally sensitive to detect the behavioral effects of cocaine, the three-compartment version proved to be more sensitive to detect the neuroimmunological effects of the drug. Thus, the use of the three-compartment apparatus seem more appropriate to gather both behavioural and neuroimmunological data related to cocaine administration, resulting in improved construct validity (Machado et al., 2004; Miranda et al., 2017; Nunes and Hallak, 2014).

Several aspects can alter the CPP induced by cocaine, such as doses, route, and administration schedule of the drug. This work suggests that the type of apparatus used can influence

neurobiological mechanisms related to the place preference behavior induced by cocaine. Our results could help to explain why published studies inhibiting CPP, using a two-compartment apparatus, presented variable results (Lespine and Tirelli, 2019; Areal et al., 2019; Adams et al., 2001; Cervo and Samanin, 1995; Kosten et al., 1996; Baker et al., 1998).

In conclusion, the current study demonstrated that the type of apparatus might influence the investigation of neurobiological mechanisms associated with cocaine-induced CPP. Our data suggest that the three compartment-apparatus is a more appropriate model, to investigate the neuroinflammatory response related to cocaine addiction.

Conflict of Interest

The authors report no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support.

References

1. Adams, J.U.; Careri, J.M.; Efferen, T.R.; Rotrosen, J. Differential effects of dopamine antagonists on locomotor activity, conditioned activity and conditioned place preference induced by cocaine in rats. *Behavioural Pharmacology*: December 2001 - Volume 12 - Issue 8 - p 603-611.
2. Areal LB, Hamilton A, Martins-Silva C, Pires RGW, Ferguson SSG. Neuronal scaffolding protein spinophilin is integral for cocaine-induced behavioral sensitization and ERK1/2 activation. *Mol Brain*. 2019 Feb 25;12(1):15. doi: 10.1186/s13041-019-0434-7. PMID: 30803445.
3. Baker DA, Fuchs RA, Specio SE, Khroyan TV, Neisewander JL. Effects of intraaccumbens administration of SCH-23390 on cocaine-induced locomotion and conditioned place preference. *Synapse*. 1998 Oct;30(2):181-93.
4. Bardo MT, Neisewander JL, Pierce RC. Novelty-induced place preference behavior in rats:

- effects of opiate and dopaminergic drugs. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989 Mar;32(3):683-9.
5. Bardo MT, Rowlett JK, Harris MJ. Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 1995 Spring;19(1):39-51.
 6. Barger SW, Hörster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺
 7. Bernardi RE, Ryabinin AE, Berger SP, Lattal MK, Mem L. Post-retrieval disruption of a cocaine conditioned place preference by systemic and intrabasolateral amygdala β 2- and α 1-adrenergic antagonists. 2009 Dec; 16(12): 777–789. doi: 10.1101/lm.1648509.
 8. Boulanger L, Poo M. Gating of BDNF-induced synaptic potentiation by cAMP. *Science.* 1999. Jun 18;284(5422):1982-4.
 9. Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW, Mattson MP. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med.* 1996 Jul;2(7):788-94.
 10. Carr GD, Phillips AG, Fibiger HC. Independence of amphetamine reward from locomotor stimulation demonstrated by conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl).* 1988;94(2):221-6.
 11. Cervo L, Samanin R Effects of dopaminergic and glutamatergic receptor antagonists on the acquisition and expression of cocaine conditioning place preference. *Brain Res.* 1995 Mar 6;673(2):242-50.
 12. Chen P, Zhao W, Guo Y, Xu J, Yin M. CX3CL1/CX3CR1 in Alzheimer's Disease: A Target for Neuroprotection. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 8090918. Published online 2016 Jun 27. doi: 10.1155/2016/8090918.
 13. Cunningham CL, Ferree NK, Howard MA. *Psychopharmacology (Berl).* Apparatus bias and place conditioning with ethanol in mice. 2003 Dec;170(4):409-22. Epub 2003 Oct 30.
 14. Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc*, v. 1, n. 4, p. 1662-70, 2006. doi:10.1038/nprot.2006.279.
 15. Fox HC, D'Sa C, Kimmerling A, Siedlarz KM, Tuit KL, Stowe R, Sinha R. Immune system inflammation in cocaine dependent individuals: implications for medications development. *Hum Psychopharmacol.* 2012 Mar;27(2):156-66. doi: 10.1002/hup.1251.
 16. Gan X, Gan X, Zhang L, Newton T, Chang SL, Ling W, Kermani V, Berger O, Graves MC, Fiala M. Cocaine infusion increases interferon-gamma and decreases interleukin-10 in cocaine-dependent subjects. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998 Nov;89(2):181-90.

17. Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci*. 1988 Feb;8(2):709-14.
18. Goodman JC, Robertson CN, Grossman RG, Narayan RK. Elevation of tumor necrosis factor in head injury. 1990. *J Neuroimmunol*. 30: 213–217.
19. Gu SM, Cha HJ, Seo SW, Hong JT, Yun J. Dopamine D1 receptor antagonist reduces stimulant-induced conditioned place preferences and dopamine receptor supersensitivity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2020 Jan;393(1):131-138. doi: 10.1007/s00210-019-01694-3. Epub 2019 Aug 1.
20. Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, Nishio C, Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. 1989. *Neurosci Lett*. 104: 340–344.
21. Hitchcock LN, Cunningham CL, Lattal KM. Cue configuration effects in acquisition and extinction of a cocaine-induced place preference. *Behav Neurosci*. 2014 Apr; 128(2): 217–227. doi:10.1037/a0036287.
22. Horger, BA, Iyasere CA, Berhow MT, Messer CJ, Nestler EJ, Taylor JR. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1999 May 15;19(10):4110-22
23. Huston JP, Silva MA, Topic B, Muller CP. What's conditioned in conditioned place preference? *Trends Pharmacol Sci*, v. 34, n. 3, p. 162-6, 2013. doi: 10.1016/j.tips.2013.01.004.
24. Indo, Y. NGF-dependent neurons and neurobiology of emotions and feelings: Lessons from congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018 Apr 87: 1–16. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.01.013.
25. Kierdorf K, Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci*. 2013 Apr 23;7:44. doi: 10.3389/fncel.2013.00044.
26. Kosten TA, DeCaprio JL, Nestler EJ. Long-term haloperidol administration enhances and short-term administration attenuates the behavioral effects of cocaine in a place conditioning procedure. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996 Dec;128(3):304-12.
27. Lacagnina MJ, Rivera PD, Bilbo SD. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. *Neuropsychopharmacology*. 2017 Jan;42(1):156-177. doi: 10.1038/npp.2016.121. Epub 2016 Jul 11. Review.
28. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 1993; 260:1130–1132.
29. Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. 2000. *Neuropsychopharmacology* 23, 223-239.

30. Lespine LF, Tirelli E. No evidence that wheel-running exercise impacts cocaine conditioned place preference in male C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 2019 Jun 3;365:110-113. doi: 10.1016/j.bbr.2019.03.002. Epub 2019 Mar 2. PMID: 30836159.
31. Luján MÁ, Castro-Zavala A, Alegre-Zurano L, Valverde O. Repeated Cannabidiol treatment reduces cocaine intake and modulates neural proliferation and CB1R expression in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology.* 2018 Dec;143:163-175. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.09.043. Epub 2018 Sep 28.
32. Machado-Vieira R, Schmidt AP, Avila TT, Kapczinski F, Soares JC, Souza DO, et al. Increased cerebrospinal fluid levels of S100B protein in rat modelo of mania induced by ouabain. 2004. *Life Sci.* 6, 805-811.
33. Maier SF, Watkins LR. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. 1998. *Psychol. Rev.* 105: 83– 107.
34. McGeehan AJ, Olive MF. The mGluR5 antagonist MPEP reduces the conditioned rewarding effects of cocaine but not other drugs of abuse. *Synapse.* 2003 Mar;47(3):240-2.
35. Messer CJ, Eisch AJ, Carlezon, Jr WA, Whisler K, Shen L, Wolf DH, Westphal H, Collins F, Russell DS, Nestler EJ. Role for GDNF in Biochemical and Behavioral Adaptations to Drugs of Abuse. *Neuron.* 2000 Apr; 26(1): 247–257.
36. Miranda AS, Andreatini R, Teixeira AL. Chapter 43 - Animal Models of Mania: Essential Tools to Better Understand Bipolar Disorder *Animal Models for the Study of Human Disease (Second Edition)* 2017, Pages 1131-1143. doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6.00043-7.
37. Moreira FP, Medeiros JR, Lhullier AC, Souza LD, Jansen K, Portela LV, Lara DR, da Silva RA, Wiener CD, Oses JP. Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. *Drug Alcohol Depend.* 2016; 158:181-5.
38. Muñoz-Cuevas FJ, Athilingam J, Piscopo D, Wilbrecht L. Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference. *Nat Neurosci.* 2013 Oct; 16(10): 1367–1369. Published online 2013 Aug 25. doi: 10.1038/nn.3498.
39. Nestler, E.J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction.2001. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 119–128.
40. Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA. Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a Rho-dependent mechanisms. 2002. *J. Neurosci.* 22: 854– 862.
41. Nunes EA and Hallak JEC. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental*, v. 17, p. 528-543, 2014.

42. Ornell F, Hansen F, Schuch FB, Pezzini Rebelatto F, Tavares AL, Scherer JN, Valerio AG, Pechansky F, Paim Kessler FH, von Diemen L. Brain-derived neurotrophic factor in substance use disorders: A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Depend.* 2018, Dec 1;193:91-103. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.08.036. Epub 2018 Oct 12.
43. Parker LA. Place conditioning in a three- or four-choice apparatus: role of stimulus novelty in drug-induced place conditioning. *Behav Neurosci.* 1992 Apr;106(2):294-306.
44. Pedraz M, Martín-Velasco AI, García-Marchena N, Araos P, Serrano A, Romero-Sanchiz P, Suárez J, Castilla-Ortega E, Barrios V, Campos-Cloute R, Ruiz JJ, Torrens M, Chowen JA, Argente J, de la Torre R, Santín LJ, Villanúa MÁ, Rodríguez de Fonseca F, Pavón FJ. Plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent cocaine users with high prevalence of substance use disorders: relationship to psychiatric comorbidity. *PLoS One.* 2015 Mar 3;10(3):e0118610. doi: 10.1371/journal.pone.0118610. eCollection 2015.
45. Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Lüer W, Helwig A, Poser S. Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol.* 1995 Jan;37(1):82-8.
46. Rofael HZ, Turkall RM, Abdel-Rahman MS. Immunomodulation by cocaine and ketamine in postnatal rats. *Toxicology.* 2003 Jun 3;188(1):101-14.
47. Rovaris DL, Schuch JB, Grassi-Oliveira R, Sanvicente-Vieira B, Silva BS, Walss-Bass C, et al. Effects of crack cocaine addiction and stress-related genes on peripheral BDNF levels. *J Psychiatr Res.* 2017 Jul; 90:78-85. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.02.011.
48. Sanchis-segura C and Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol*, v. 11, n. 1, p. 2-38, 2006.
49. Scoles MT, Siegel S. A potential role of saline trials in morphine-induced place-preference conditioning. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986 Dec;25(6):1169-73.
50. Simchon Tenenbaum Y, Weizman A, Rehavi M. The Impact of Chronic Early Administration of Psychostimulants on Brain Expression of BDNF and Other Neuroplasticity-Related Proteins. *J Mol Neurosci.* 2015 Oct;57(2):231-42. doi: 10.1007/s12031-015-0611-9.
51. Sondheimer I, Knackstedt LA. Ceftriaxone prevents the induction of cocaine sensitization and produces enduring attenuation of cue- and cocaine-primed reinstatement of cocaine-seeking. *Behav Brain Res.* 2011;225(1):252-258.
52. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report, 2018. Disponível em: <<http://www.unodc.org/doc/wdr2018/WDR18Booklet2GLOBAL.pdf>>. Acesso em: 30/Abr/2018.

53. Tzschentke, TM. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol.* 1998; 56:613–672.
54. Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol.* 2007; Sep;12(3-4):227-462. doi: 10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x.
55. Wei H, Li B, Sun A, Guo F. Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1172:79-96. doi: 10.1007/978-981-13-9367-9_4.
56. White NM, Chai SC, Hamdani S. Learning the morphine conditioned cue preference: Cue configuration determines effects of lesions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 81(4), 786–796. doi:10.1016/j.pbb.2005.06.002.
57. Zambrana-Infantes E, Rosell Del Valle C, Ladrón de Guevara-Miranda D, Galeano P, Castilla-Ortega E, Rodríguez De Fonseca F, Blanco E, Santín LJ. Palmitoylethanolamide attenuates cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2018 Mar;166:1-12. doi: 10.1016/j.pbb.2018.01.002. Epub 2018 Jan 11.
58. Zaveri NT, Marquez PV, Meyer ME, Hamid A, Lutfy K. The Nociceptin Receptor (NOP) Agonist AT-312 Blocks Acquisition of Morphine- and Cocaine-Induced Conditioned Place Preference in Mice. *Front Psychiatry.* 2018 Nov 29;9:638. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00638. eCollection 2018.

Conditioned Place Preference

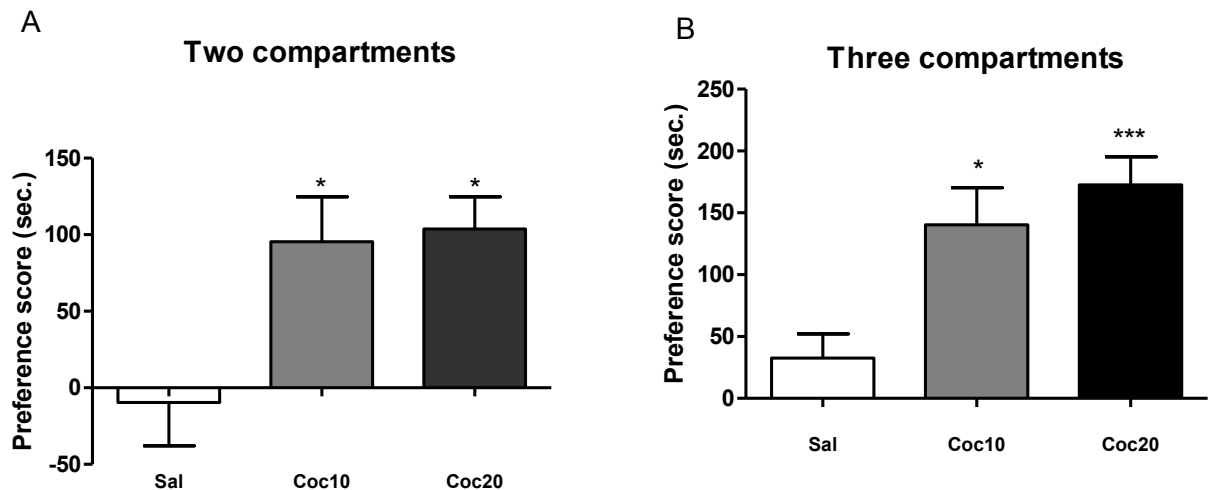
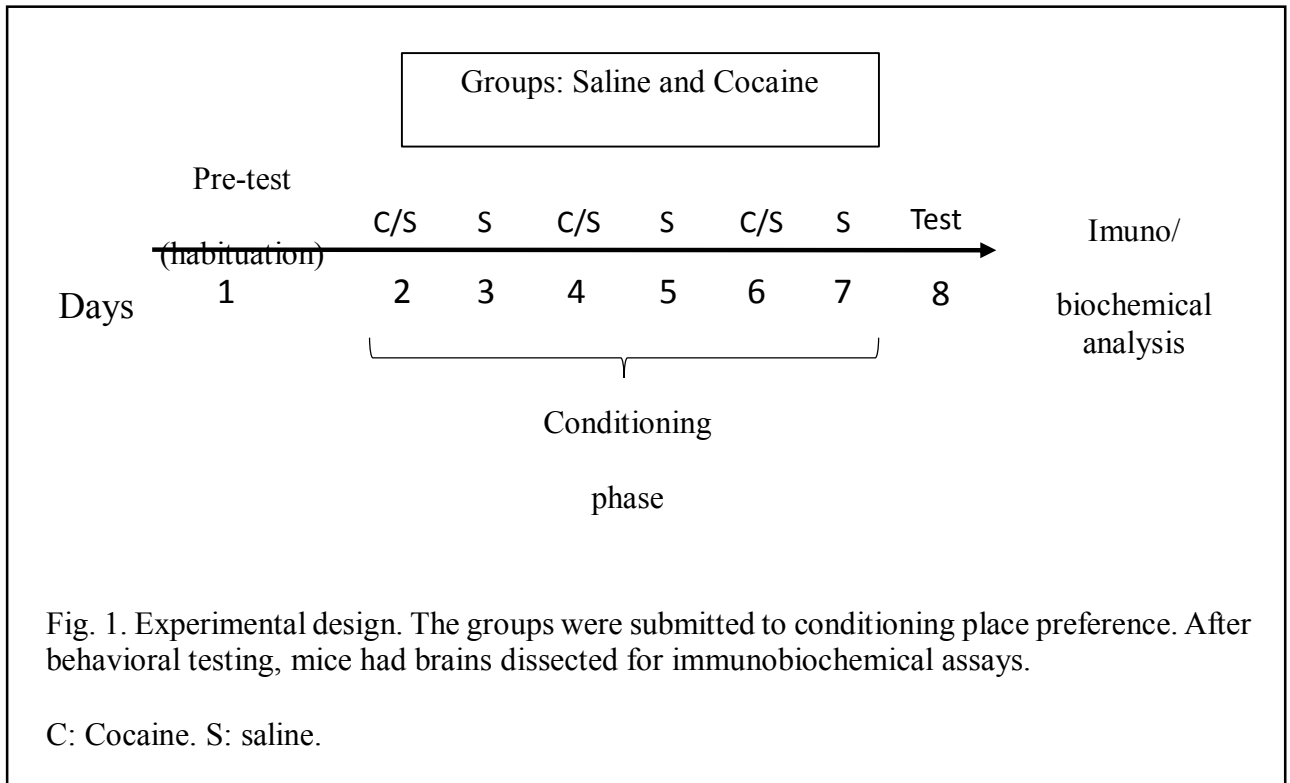


Fig. 2. Cocaine induced conditioned place preference (CPP) in two- and three- compartments apparatuses in mice. (A) CPP to cocaine in apparatus with two compartments. Group Sal received saline every day ($n=9$), group Coc10 received 10 mg/kg of cocaine ($n=9$) and group Coc20 received 20mg/kg on the days of conditioning ($n=8$). (B) CPP to cocaine in apparatus with three compartments. Group Sal received saline every day ($n=10$), group Coc10 received 10 mg/kg of cocaine ($n=8$) and group Coc20 received 20mg/kg on the days of conditioning ($n=9$). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc and expressed as mean \pm SEM. There was a significant preference for the conditioned side in both apparatuses: * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

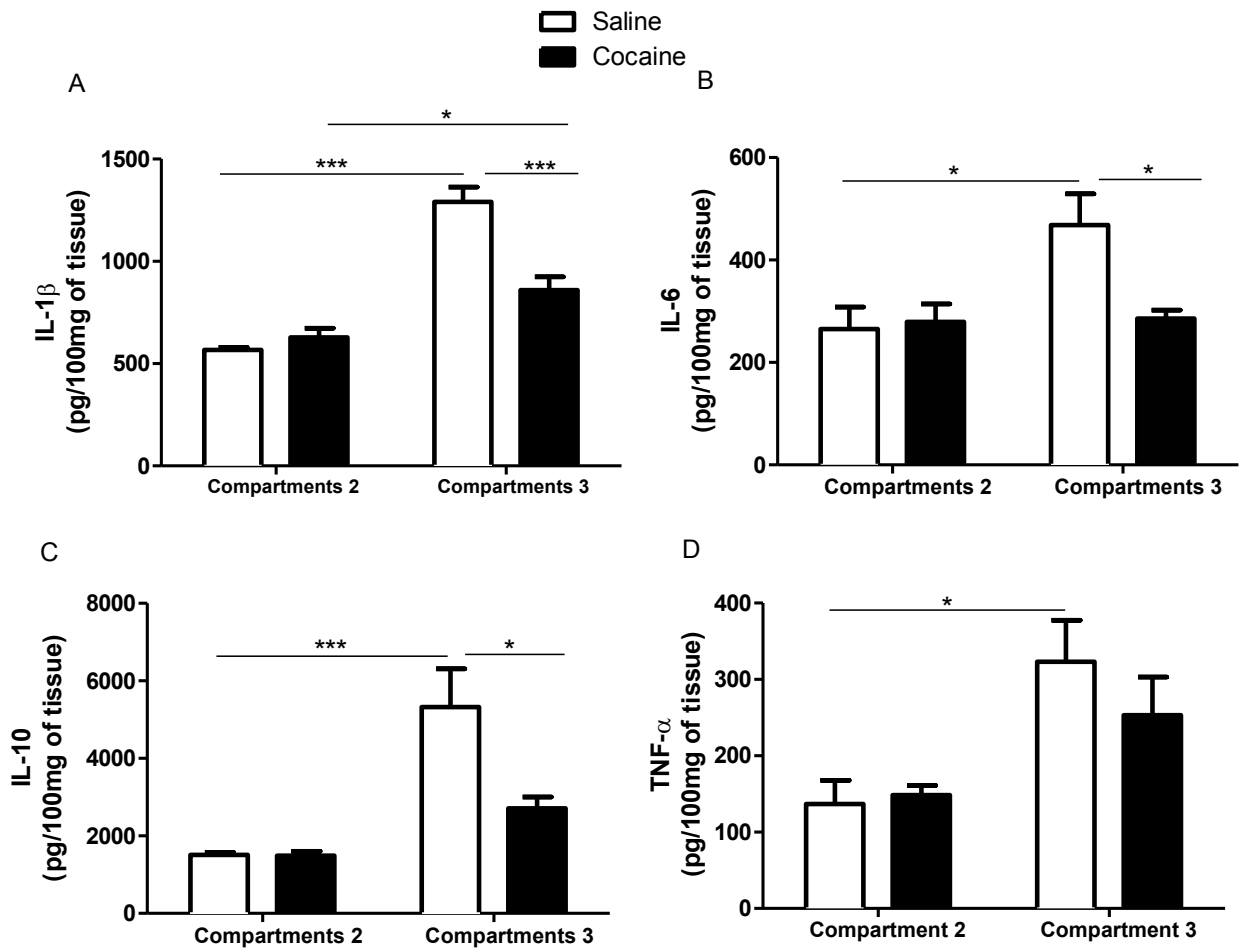


Fig. 3. Levels of cytokines in the prefrontal cortex. Saline and cocaine groups were conditioned to place preference using two and three compartments apparatuses. The group Saline received saline every day ($n=5$), and the group Cocaine ($n=5$) received 20mg/kg on the days of conditioning. The levels of IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α were measured using ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM and asterisks indicate statistical differences between groups: * $p<0.05$, *** $p<0.001$, two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

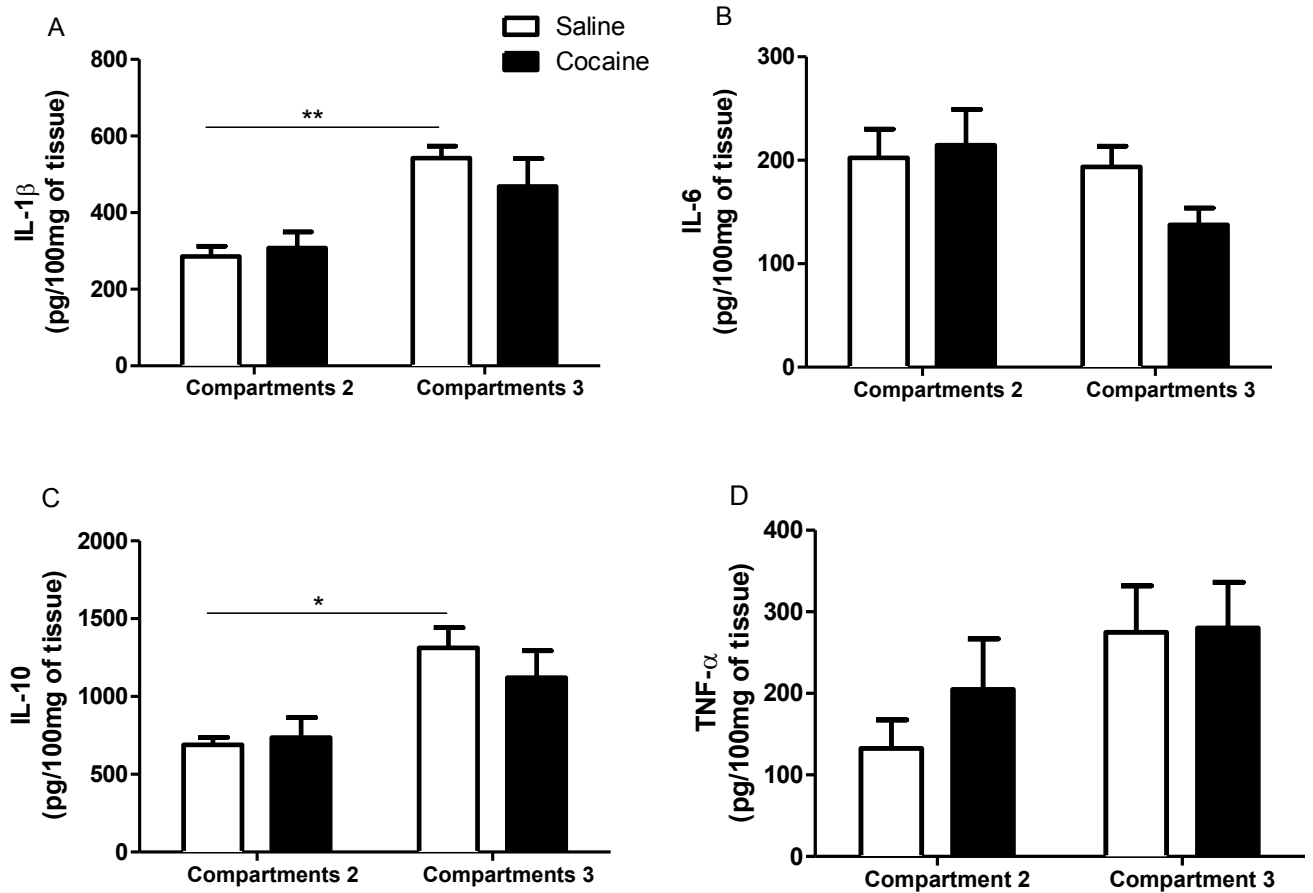


Fig. 4. Levels of cytokines in the hippocampus. Mice were conditioned place preference to cocaine in two and three compartments apparatuses. Group Saline received saline every day ($n=5$), group Cocaine ($n=5$) received 20mg/kg on the days of conditioning. IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α concentration were measured by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM and asterisks indicate statistical differences between groups: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

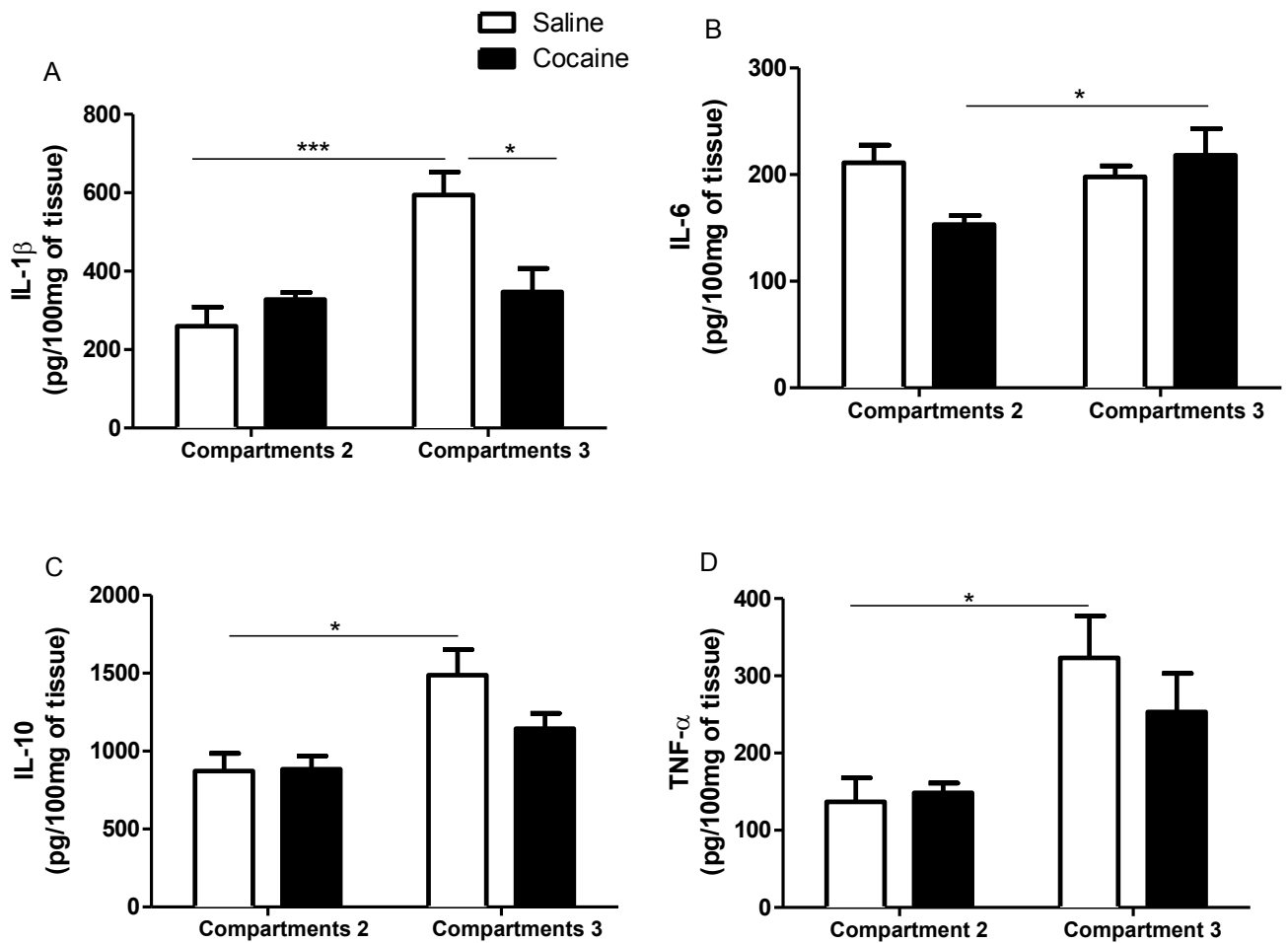


Fig. 5. Levels of cytokines in Striatum. Mice were conditioned place preference to cocaine in two and three compartments apparatuses. Group Sal received saline every day ($n= 5$), group cocaine ($n= 5$) received 20mg/kg on the days of conditioning. IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α concentrations were measured by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM. Asterisk(s) indicate statistical differences where * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

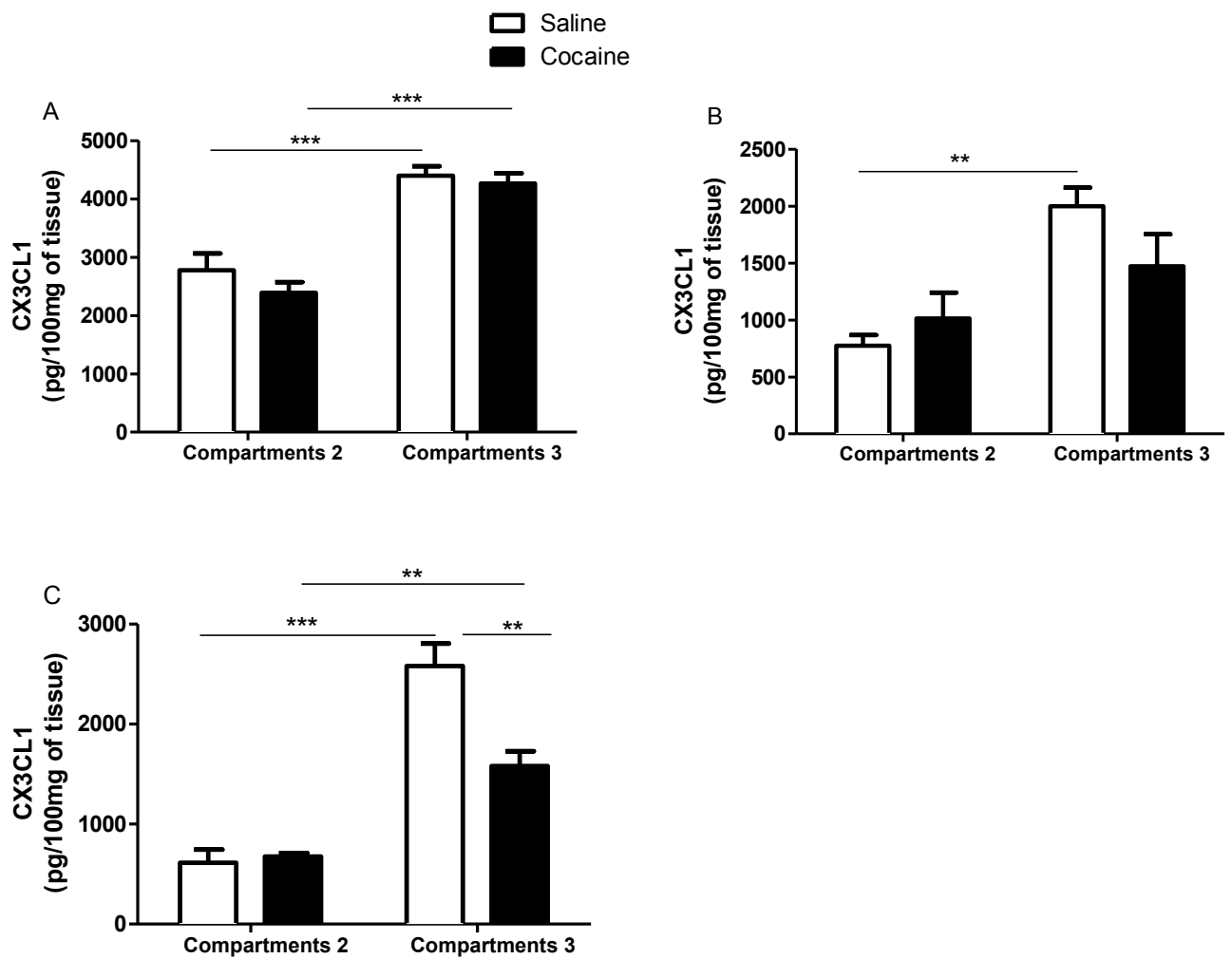


Fig. 6. Levels of CX3CL1 in (A) prefrontal cortex, (B) hippocampus and (C) striatum. Mice were conditioned place preference to cocaine in two and three compartments apparatuses. Group saline received saline every day ($n=5$), group cocaine ($n=5$) received 20mg/kg on the days of conditioning. CX3CL1 concentrations were measured by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM. Asterisks indicate statistical differences where $**p<0.01$, $***p<0.001$, two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

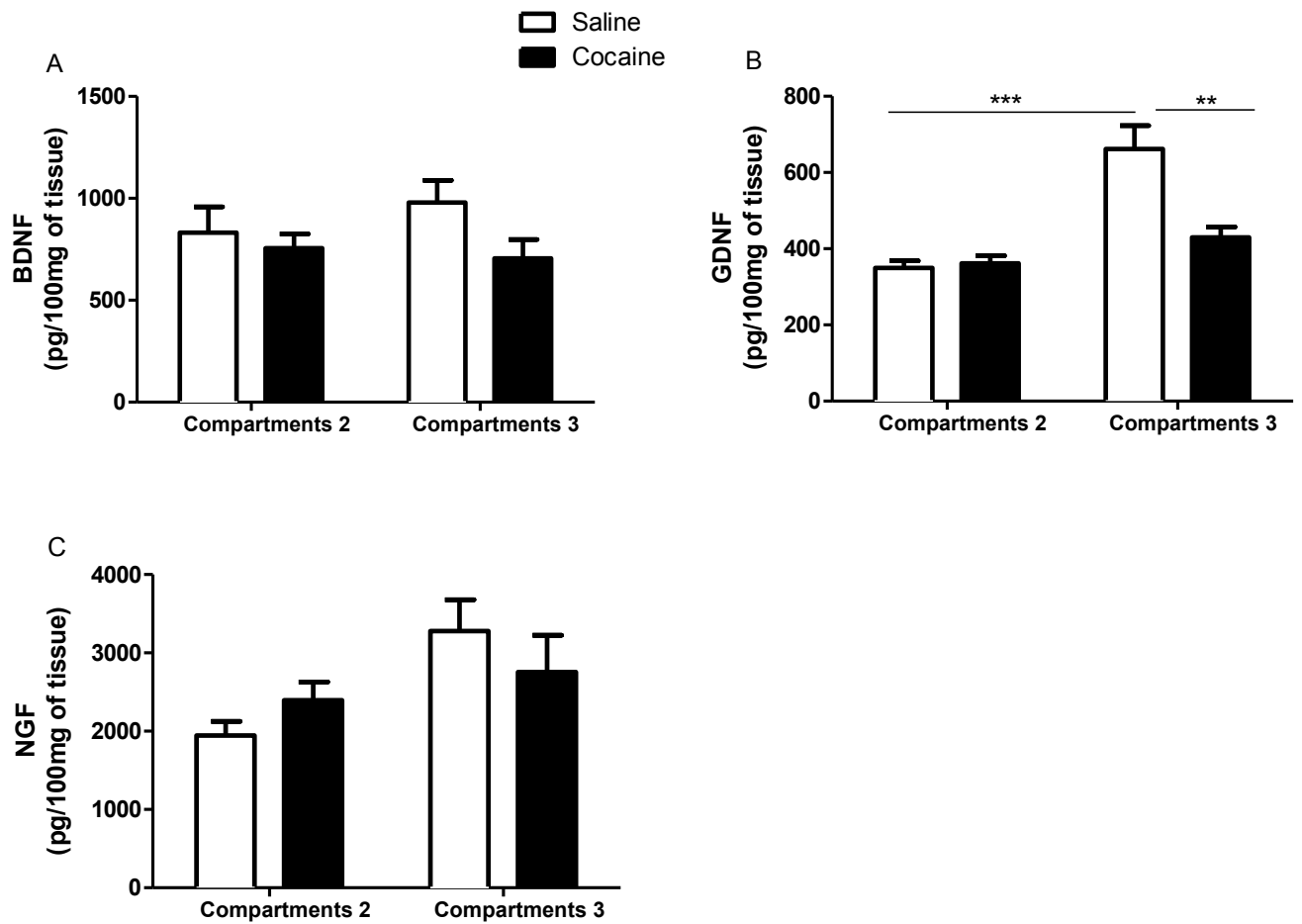


Fig. 7. Levels of neurotrophic mediators in prefrontal cortex. Mice were conditioned place preference to cocaine in two and three compartments apparatuses. Group saline received saline every day ($n=5$), group cocaine ($n=5$) received 20mg/kg on the days of conditioning. BDNF, GDNF and NGF concentration were measured by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM. Asterisks indicate statistical differences where $**p<0.01$, $***p < 0.001$, two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

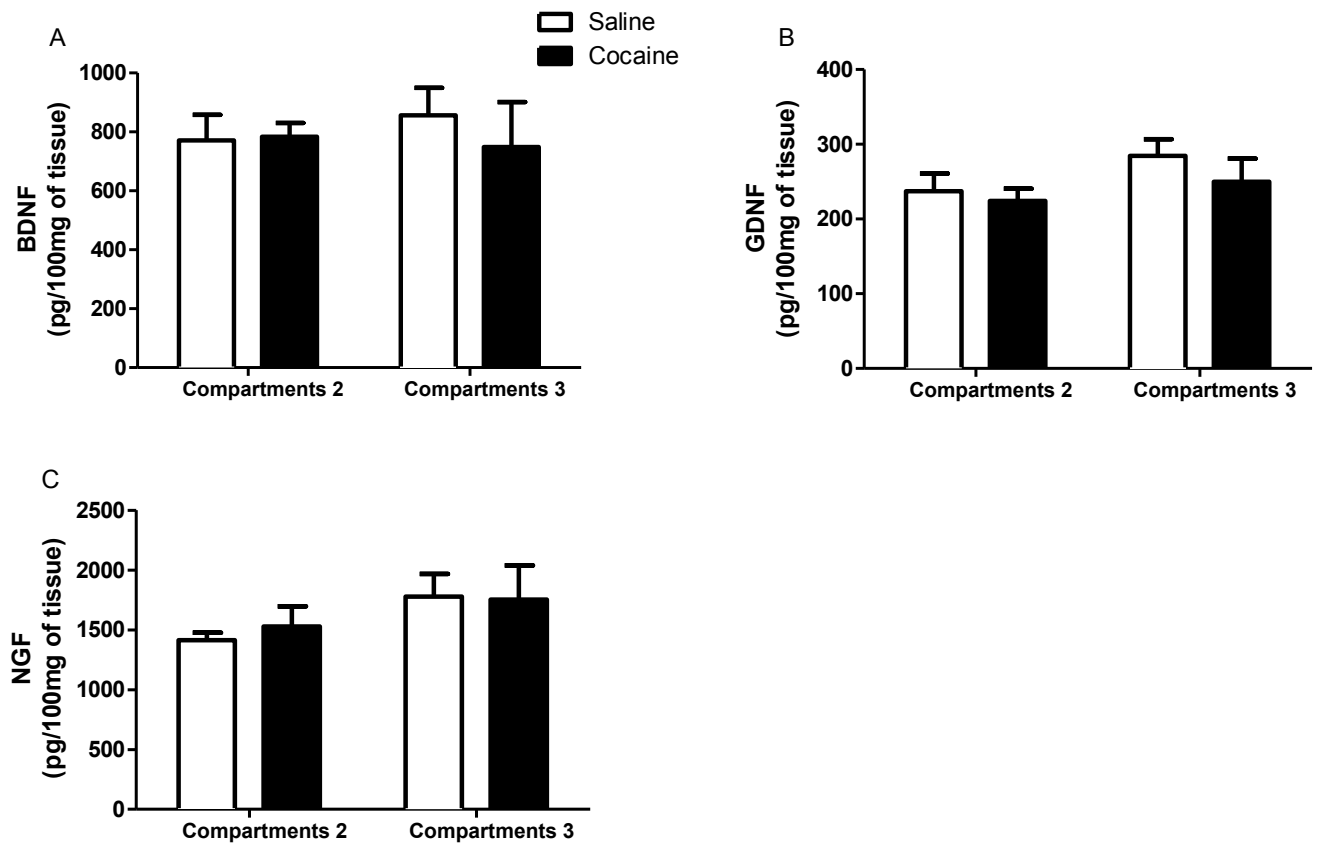


Fig. 8. Levels of neurotrophic mediators in the hippocampus. Mice were conditioned place preference to cocaine in two and three compartments apparatuses. Group saline received saline every day ($n=5$), group cocaine ($n=5$) received 20mg/kg on the days of conditioning. BDNF, GDNF and NGF concentrations were measured by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

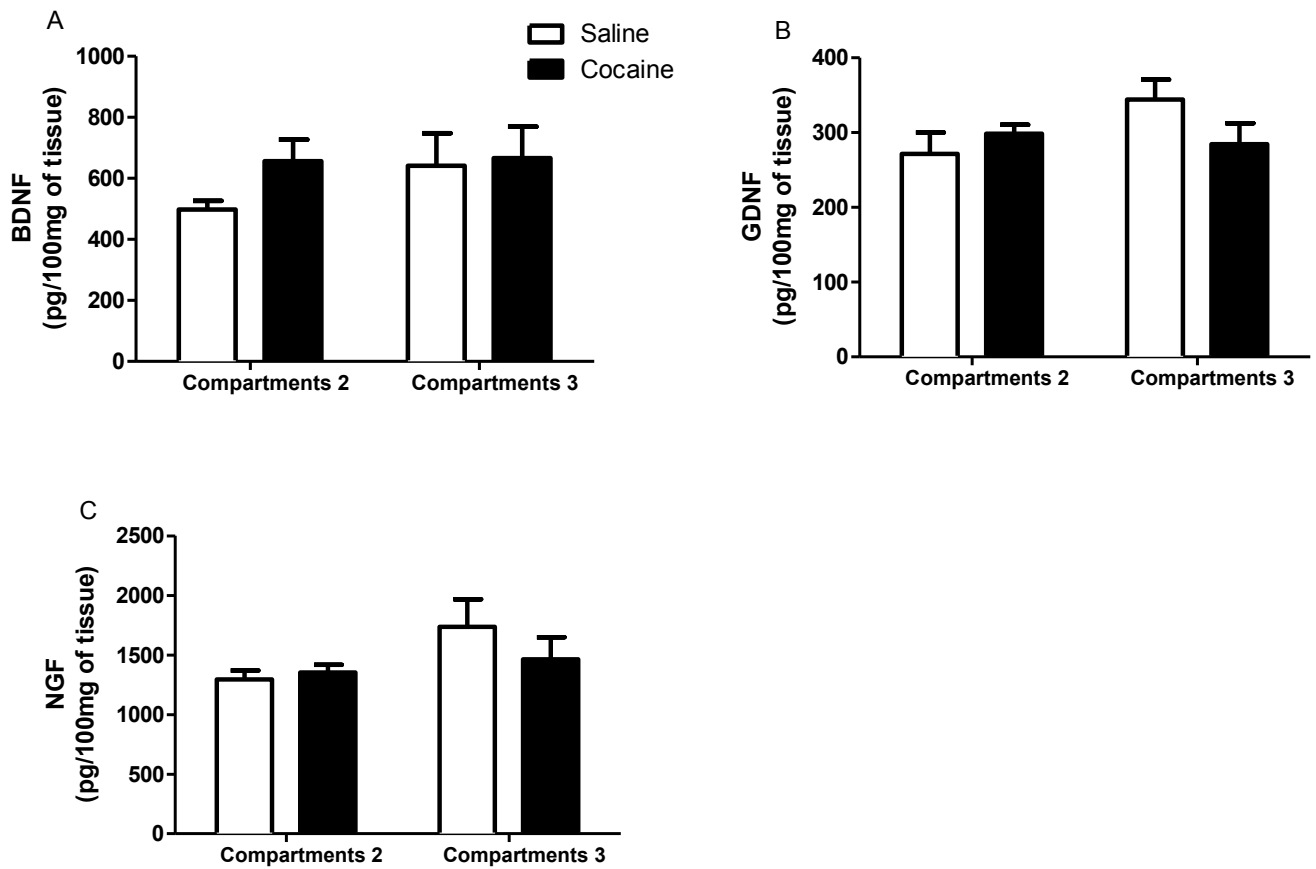


Fig. 9. Levels of neurotrophic mediators in the striatum. Mice were conditioned place preference to cocaine in two and three compartments apparatuses. Group saline received saline every day ($n=5$), group cocaine ($n=5$) received 20mg/kg on the days of conditioning. BDNF, GDNF and NGF concentrations were measured by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

Table 1: Cytokine profile of prefrontal cortex, hippocampus and striatum of mice conditioned in different apparatuses and treated with saline or cocaine.

Cytokine	Brain Regions	Experimental Groups				Effect
		Two compartments		Three compartments		
		Saline	Cocaine	Saline	Cocaine	
IL-1 β	PFC	566.59 \pm 12.84	628.53 \pm 44.22	1290.51 \pm 72.68	858.80 \pm 66.13 ^{#, &}	a
	Hippocampus	285.44 \pm 26.91	307.63 \pm 42.20	*	468.27 \pm 72.40	b
	Striatum	259.96 \pm 48.45	327.93 \pm 18.05	542.24 \pm 31.39* 594.62 \pm 58.23*	346.92 \pm 60.02 ^{&}	c
IL-6	PFC	265.26 \pm 43.20	279.16 \pm 34.97	468.08 \pm 61.34*	285.90 \pm 16.53 ^{&}	d
	Hippocampus	202.45 \pm 27.71	214.70 \pm 34.44	193.62 \pm 19.90	137.58 \pm 16.40	ns
	Striatum	211.03 \pm 16.66	153.22 \pm 8.39	197.93 \pm 10.10	218.10 \pm 25.08 [#]	e
IL-10	PFC	1509.83 \pm 68.7	1491.66 \pm 113.9	5325.04 \pm 982.85	2709.77 \pm 290.63 ^{&}	f
	Hippocampus	7	736.12 \pm 127.8	*	1120.91 \pm 172.70	g
	Striatum	689.130 \pm 48.5	5	1312.37 \pm 129.63	1144.42 \pm 98.57	h
		8	883.43 \pm 85.83	*	1486.95 \pm 163.45	
		872.33 \pm 112.6	7	*		
TNF- α	PFC	373.84 \pm 94.27	394.79 \pm 64.07	1403.48 \pm 265.53	536.79 \pm 104.80 ^{&}	i
	Hippocampus	132.64 \pm 34.95	204.81 \pm 61.96	*	280.21 \pm 56.01	ns
	Striatum	136.89 \pm 30.95	148.33 \pm 12.74	274.86 \pm 57.07 323.09 \pm 54.56	253.04 \pm 50.12	j
CX3CL1	PFC	2777.75 \pm 288.2	2390.39 \pm 181.2	4398.27 \pm 161.49	4264.93 \pm 175.75 [#]	k
	Hippocampus	773.62 \pm 93.85	1	*	1471.83 \pm 281.86	l
	Striatum	614.98 \pm 130.1	1013.95 \pm 225.8	1999.86 \pm 162.18	1580.35 \pm 149.62 ^{#, &}	m
		6	8	*		
		675.90 \pm 36.25	2581.12 \pm 224.49	*		
BDNF	PFC	831.27 \pm 127.0	756.19 \pm 68.82	979.02 \pm 109.53	705.08 \pm 93.18	ns
	Hippocampus	4	783.40 \pm 46.75	855.96 \pm 93.48	748.83 \pm 152.13	ns
	Striatum	771.50 \pm 86.24 498.22 \pm 27.77	656.29 \pm 70.65	641.25 \pm 106.75	666.21 \pm 103.18	ns
GDNF	PFC	349.90 \pm 18.12	361.95 \pm 20.02	661.79 \pm 61.26*	429.40 \pm 27.32 ^{&}	n
	Hippocampus	237.09 \pm 23.85	224.08 \pm 16.42	284.40 \pm 22.27	249.93 \pm 30.96	ns
	Striatum	271.44 \pm 28.87	298.39 \pm 12.12	344.33 \pm 26.56	284.40 \pm 28.07	ns
NGF	PFC	1946.49 \pm 176.	2396.38 \pm 231.7	3277.79 \pm 401.4	2754.72 \pm 469.84	o
	Hippocampus	90	7	2	1753.84 \pm 285.71	ns
	Striatum	1413.61 \pm 62.5	1528.96 \pm 167.3	1778.98 \pm 188.5	1464.20 \pm 185.05	ns
		5	9	8		
		1294.00 \pm 75.1	1352.53 \pm 65.2	1736.04 \pm 232.5		
		3	2	1		

PFC: prefrontal cortex; Results expressed as pg/100mg of tissue (mean \pm SEM).

- a Apparatus: $F_{(1,16)} = 77.31$, $p < 0.0001$; Treatment: $F_{(1,16)} = 11.61$, $p = 0.0036$; Apparatus \times Treatment: $F_{(1,16)} = 20.69$, $p = 0.0003$.
- b Apparatus: $F_{(1,16)} = 19.95$, $p = 0.0004$; Treatment: ns; Apparatus \times Treatment: ns.
- c Apparatus: $F_{(1,16)} = 12.94$, $p = 0.0024$; Treatment: ns; Apparatus \times Treatment: $F_{(1,16)} = 10.31$, $p = 0.0055$.
- d Apparatus: $F_{(1,16)} = 6.162$, $p = 0.0245$; Treatment: ns; Apparatus \times Treatment: $F_{(1,16)} = 5.395$, $p = 0.0337$.
- e Apparatus: ns; Treatment: ns; Apparatus \times Treatment: $F_{(1,15)} = 6.482$, $p = 0.0224$.
- f Apparatus: $F_{(1,16)} = 23.72$, $p = 0.0002$; Treatment: $F_{(1,16)} = 6.492$, $p = 0.0215$; Apparatus \times Treatment: $F_{(1,16)} = 6.314$, $p = 0.0231$.
- g Apparatus: $F_{(1,16)} = 15.55$, $p = 0.0012$; Treatment: ns; Apparatus \times Treatment: ns.
- h Apparatus: $F_{(1,15)} = 14.77$, $p = 0.0016$; Treatment: ns; Apparatus \times Treatment: ns.
- i Apparatus: $F_{(1,16)} = 14.53$, $p = 0.0015$; Treatment: $F_{(1,16)} = 7.570$, $p = 0.0142$; Apparatus \times Treatment: $F_{(1,16)} = 8.339$, $p = 0.0107$.
- j Apparatus: $F_{(1,14)} = 9.613$, $p = 0.0078$; Treatment: ns; Apparatus \times Treatment: ns.
- k Apparatus: $F_{(1,16)} = 70.65$, $p < 0.0001$; Treatment: ns; Apparatus \times Treatment: ns.
- l Apparatus: $F_{(1,16)} = 17.13$, $p = 0.0008$; Treatment: ns; Apparatus \times Treatment: ns.
- m Apparatus: $F_{(1,16)} = 90.51$, $p < 0.0001$; Treatment: $F_{(1,16)} = 9.702$, $p = 0.0067$; Apparatus \times Treatment: $F_{(1,16)} = 12.38$, $p = 0.0028$.
- n Apparatus: $F_{(1,16)} = 27.52$, $p < 0.0001$; Treatment: $F_{(1,16)} = 9.285$, $p = 0.0077$; Apparatus \times Treatment: $F_{(1,16)} = 11.43$, $p = 0.0038$.
- o Apparatus: $F_{(1,15)} = 7.147$, $p = 0.0174$; Treatment: ns; Apparatus \times Treatment: ns.

$p < 0.05$ Turkey's multiple comparisons test, where: * Saline Two compartments \times Saline Three compartments; # Cocaine two compartments \times Cocaine three compartments, & Saline three compartments \times Cocaine three compartments.

6.2 Artigo científico 2

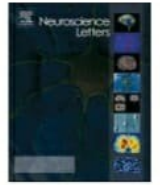
Artigo publicado na revista *Neuroscience Letters* em 2021.

Magda Luciana de Paula Rosa, Caroline Amaral Machado, Bruna da Silva Oliveira, Eliana Cristina de Brito Toscano, Laila Asth, João Luís Vieira Monteiro de Barros, Antônio Lúcio Teixeira, Fabrício A. Moreira, Aline Silveira de Miranda. Role of cytokine and neurotrophic factors in nicotine addiction in the conditioned place preference paradigm. **Neuroscience Letters**. 2021; 764. doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136235.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Research article

Role of cytokine and neurotrophic factors in nicotine addiction in the conditioned place preference paradigm

Magda Luciana de Paula Rosa ^{a,1}, Caroline Amaral Machado ^{a,1}, Bruna da Silva Oliveira ^a, Eliana Cristina de Brito Toscano ^b, Laila Asth ^c, João Luís Vieira Monteiro de Barros ^a, Antônio Lúcio Teixeira ^d, Fabrício A. Moreira ^c, Aline Silva de Miranda ^{a,*}

^a Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

^b Laboratório de Patologia Celular e Molecular, Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

^c Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

^d Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, University of Texas Health Science Center at Houston, TX, USA



ARTICLE INFO

Keywords:

CPP
Nicotine
Inflammation
Neurotrophic factors
Reward

ABSTRACT

The mechanisms involved in the maintenance of cigarette smoking and nicotine reward remain unclear. Immune response might play an important role in this context. Nicotine may induce both central and systemic inflammatory responses as well as changes in the regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). The conditioned place preference (CPP) is a method used for the evaluation of nicotine-induced reward, reproducing nicotine-seeking behavior in humans. So far, there are no studies investigating the relationship between neuroinflammation and nicotine-induced CPP. This study aimed to evaluate the levels of inflammatory mediators and neurotrophic factors in key areas of the central nervous system (CNS) of mice subject to nicotine-induced CPP. CPP was induced with an intraperitoneal administration of 0.5 mg/kg of nicotine in male Swiss mice, using an unbiased protocol. Control group received vehicle by the same route. The levels of cytokines, chemokines, and neurotrophic factors were measured using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the brain after CPP test. As expected, nicotine induced place preference behavior. In parallel, we observed increased peripheral levels of IL-6 and IL-10 alongside increased hippocampal levels of NGF but decreased GDNF in mice treated with nicotine compared to controls. In the striatum, nicotine promoted decrease of IL-1 β , IL-10 and GDNF levels, while the levels of all the mediators were similar between groups in the pre-frontal cortex. Our results provide evidence on the role of cytokines and neurotrophic factors in nicotine-induced CPP in mice.

1. Introduction

Tobacco use is a major public health concern, resulting in nearly 7 million annual deaths worldwide [36]. Nicotine is one of over 4,000 different compounds of tobacco smoke, being the main responsible for its addictive property [4,46,48]. Nicotine stimulates mesolimbic dopaminergic system (reward system) that plays a major role in drug seeking [24].

Notwithstanding the evident abuse potential associated with tobacco smoking, it has been difficult to assess and investigate nicotine-

rewarding properties in experimental settings. This could be explained by factors such as the dose range investigated and the absence of other tobacco products [27,35]. In this context, the conditioned place preference (CPP) is a useful protocol for the evaluation of the nicotine-induced reward and its relevance to addiction [35]. Briefly, the CPP procedure is performed using an apparatus with two or three chambers. One of these chambers is repeatedly associated with administration of nicotine, while the other(s) with administration of vehicle [27]. The preference place effect is detected when the animal spends significantly more time in the drug-paired compartment of the CPP box [9].

* Corresponding author at: Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270-901, Brasil.

E-mail address: mirandaas@icb.ufmg.br (A.S. de Miranda).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136235>

Received 21 April 2021; Received in revised form 27 August 2021; Accepted 6 September 2021

Available online 8 September 2021

0304-3940/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Experimental studies have shown increased expression of pro-inflammatory mediators in different brain regions [42,23,2], as well as higher activation of astrocytes and microglia in rodents exposed to nicotine compared to controls [2,38]. Conversely, evidence also suggests that nicotine-induced suppression of neuroinflammation in both human and experimental models of addiction [23]. Neurotrophic factors also seem to play a role in smoking addiction. Clinical studies showed increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in smokers compared with no-smokers subjects [20,34]. In addition, serum levels of BDNF correlated positively with carbon monoxide in smokers [51]. Despite a steady progress in the area, the mechanisms underlying the maintenance of nicotine reward remains unclear. In addition, there are no studies evaluating the neuroinflammation in nicotine-induced CPP.

The present study aimed to investigate the role of central and systemic inflammatory response, as well as of neurotrophic factors, in nicotine reward using CPP test. We hypothesize that the neuroinflammation modulate, at least in part, the maintenance of nicotine reward.

2. Methods

2.1. Animals

Male Swiss mice (aged 8–10 weeks-old) were group-housed (5 per cage) in a room maintained at 24 ± 2 °C with a 12 h light/dark cycle (lights at 6 am). Mice were tested during the light phase. A habituation period of at least one week was observed between the arrival of the mice and the start of the experiment. The experiments were performed between 7 and 12 am. All mice had access to food and water ad libitum during the study. All procedures were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEUA/UFMG, Permit Protocol Number 270/2018). The brain samples were collected under ketamine/xylazine anesthesia and all efforts were made to minimize animal suffering. The mice were euthanized using an overdose of ketamine/xylazine by intraperitoneal (i.p.) route.

2.2. Drug

Nicotine hydrogen tartrate salt (0.5 mg/kg, Merck®) was dissolved in physiological saline (SAL, 0.9% NaCl) and the pH were adjusted to 7.4. The solutions were prepared immediately before use and injected by intraperitoneal (i.p.) route in a volume of 1 mL/100 g. Control mice receive the same volume of saline.

2.3. Conditioned place preference

The CPP was assessed in a dark acrylic box consisting of two chambers, with equal sizes (20 cm long, 15 wide and 10 cm high) with doors (5 × 5 cm) connecting them to a central compartment (6 cm long, 15 cm wide and 10 cm high). The walls of the side chambers were constructed of acrylic with interspersed black and white bands and the floors consisted of removable acrylic surfaces. In one of the chambers (chamber A) the walls had vertical stripes and the floor consisted of an acrylic grid with parallel and equally spaced rods. The other (chamber B) had walls with horizontal stripes and an acrylic floor with circular holes. The intensity of illumination was similar between the compartments. The experiments were recorded by a video camera and the time spent by the animals in each compartment was automatically analyzed with AnyMaze software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

The CPP protocol was randomized, unbiased and counterbalanced, consisting of three phases: pre-conditioning, conditioning and test. In the pre-conditioning phase (first day), each mouse was placed in the central compartment of the box of the three chambers, with the doors open, and could freely explore the box during 15 min. The time spent in each compartment was registered. To avoid bias, it was established that

the animals exhibiting preference for exploring one of the chambers (more than 70% of the time) would not be included in the experiments (i.e., this is an “unbiased” CPP protocol).

In the conditioning phase (days 2–7), the animals were randomly assigned to one of the experimental treatments (nicotine or vehicle). They received drug injections on days 2, 4 and 6 and were immediately confined in one of the chambers (drug-paired side) for 30 min. Even though there was no preference for any of the chambers, half of the animals in each experimental group were confined in chamber A and the others in chamber B (i.e., this is a counterbalanced CPP protocol). On days 3, 5 and 7 vehicle was administered and the animals were confined in the alternate chamber for the same time. Finally, on the test phase (day 8), each animal was placed in the apparatus with the doors open, and remained in the box for 15 min, and the time spent in each chamber was registered (Fig. 1).

The CPP score was calculated for each animal as the time spent in drug-paired side (chamber A or B, depending on the animal) during the test subtracted by the time spent in the same side in the pre-exposure phase [9].

2.4. ELISA analyses of cytokines and neurotrophic factors

Immediately after CPP protocol, the animals were euthanized and hippocampal, frontal cortex and striatum were rapidly and carefully removed and homogenized in an extraction solution (100 mg of tissue per milliliter), containing 0.4 M NaCl, 0.05 % Tween 20, 0.5 % BSA, 0.1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 KIU aprotinin, using Ultra-Turrax. Lysates were centrifuged at 13,000g for 10 min at 4 °C, supernatants were collected and stocked at -70 °C until use. Blood samples were also obtained, centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min at 4 °C, and the serum was collected and stocked at -70 °C until use.

The concentrations of cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α), chemokine (CX3CL1), and neurotrophic factors (BDNF, NGF, and GDNF) were determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as picogram per 100 mg of tissue or picogram per milliliter of serum. The detection limit of ELISA assays was around 5 pg/mL. These mediators were chosen considering their importance in the modulation of the inflammatory response in the CNS, as well as in the cognitive functions. Both exacerbation and inhibition of the nuclear factor (NF) κ B activity can impair the consolidation and reconsolidation memory, that are important parameters to the drug-cue associations [8].

2.5. Statistical analysis

The results were presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). All data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. The variables were normally distributed and compared by Student's *t* test. Pearson's correlation analyses were performed to examine the relationship among CPP, cytokines and neurotrophic factors. The significance level was set at $p < 0.05$ in two-tailed tests. Statistical analyses were performed using Prism 6 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

3. Results

Mice receiving nicotine (0.5 mg/kg) spent more time exploring the injection-paired side as compared to the vehicle-administered group ($t = 4.267$; $df = 8$; $p = 0.0027$), indicating the CPP was successfully established (Fig. 2). Importantly, no mice displayed preference for exploring one chamber during the pre-conditioning phase. Thus, no exclusions were performed. No significant differences were found between the groups in the percentage of time exploring the chamber A (saline: 51 ± 1.274 ; nicotine: 57.80 ± 3.672 ; $t = 1.750$; $df = 18$;

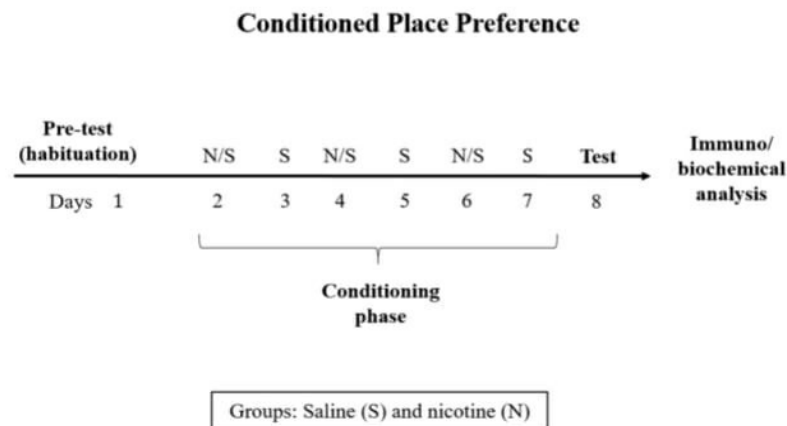


Fig. 1. Experimental design. The mice received saline or nicotine and were submitted to conditioning place preference (CPP). The protocol followed the pre-test, conditioning, and test phases. After the behavioral testing, the brains mice were dissected for neurochemical assays.

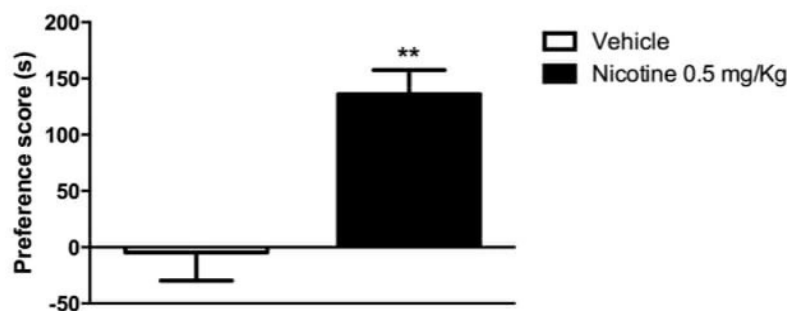


Fig. 2. The preference place score of mice submitted to CPP-nicotine protocol. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of at least two independent experiments ($n = 5$ per group). *Means significant difference comparing nicotine-group versus control ($p < 0.05$).

$p = 0,0972$) or the chamber B (saline: 49 ± 1.274 ; Nicotine: 42.20 ± 3.672 ; $t = 1.750$; $df = 18$; $p = 0,0972$) in the pre-conditioning phase. Moreover, no locomotor activity changes were found as revealed for the total distance (cm) traveled in the apparatus (saline: $2217 \pm 68,66$; nicotine: 2463 ± 248 ; $t = 0.9578$; $df = 8$; $p = 0,3662$).

No significant difference was found in the levels of cytokines, chemokine or neurotrophic factors in the prefrontal cortex of mice receiving nicotine compared with controls (IL-1 β : $t = 0.3822$, $df = 8$, $p = 0.7123$; IL-6: $t = 0.8098$, $df = 8$, $p = 0.4415$; IL-10: $t = 0.09807$, $df = 8$, $p = 0.9243$; TNF- α : $t = 1.022$, $df = 5$, $p = 0.3535$; CX3CL1: $t = 0.6397$, $df = 8$, $p = 0.5402$; BDNF: $t = 0.1038$, $df = 8$, $p = 0.9199$; NGF: $t = 0.04741$, $df = 7$, $p = 0.9635$; GDNF: $t = 0.5630$, $df = 8$, $p = 0.5889$, Fig. 3). In the hippocampus, animals that received nicotine presented increased levels of NGF alongside decreased concentration of GDNF compared with vehicle mice (NGF: $t = 2.993$, $df = 6$, $p = 0.0242$; GDNF: $t = 2.834$, $df = 6$, $p = 0.0298$). No significant difference was found in the levels of IL-1 β ($t = 1.181$, $df = 8$, $p = 0.2714$), IL-6 ($t = 0.05845$, $df = 8$, $p = 0.9548$), IL-10 ($t = 0.5555$, $df = 8$, $p = 0.5937$), TNF- α ($t = 0.3098$, $df = 5$, $p = 0.7692$), CX3CL1 ($t = 0.6308$, $df = 8$, $p = 0.5458$) and BDNF ($t = 1.399$, $df = 8$, $p = 0.1995$, Fig. 4).

In the striatum, a significant decrease in the concentration of IL-1 β , IL-10, and GDNF was found comparing mice that received nicotine with those receiving vehicle (IL-1 β : $t = 2.877$, $df = 7$, $p = 0.0238$; IL-10: $t = 2.401$, $df = 7$, $p = 0.0474$; GDNF: $t = 3.134$, $df = 6$, $p = 0.0202$, Fig. 5). No changes were found in the levels of IL-6 ($t = 1.754$, $df = 7$, $p = 0.1228$), TNF- α ($t = 0.6559$, $df = 5$, $p = 0.5408$), CX3CL1 ($t = 1.488$, $df = 8$, $p = 0.1750$), BDNF ($t = 0.04652$, $df = 8$, $p = 0.9640$), and NGF ($t = 0.3106$, $df = 7$, $p = 0.7652$, Fig. 5).

Higher levels of IL-6 and IL-10 were found in the serum of mice

receiving nicotine compared with control animals receiving vehicle (IL-6: $t = 2.450$, $df = 6$, $p = 0.0498$; IL-10: $t = 2.943$, $df = 4$, $p = 0.0423$, Fig. 6). No difference was observed in the serum concentration of IL-1 β ($t = 0.6418$, $df = 7$, $p = 0.5414$), TNF- α ($t = 1.684$, $df = 6$, $p = 0.1431$), CX3CL1 ($t = 0.2685$, $df = 7$, $p = 0.7960$), BDNF ($t = 0.7362$, $df = 7$, $p = 0.4855$), NGF ($t = 0.2890$, $df = 4$, $p = 0.7869$), and GDNF ($t = 0.1035$, $df = 7$, $p = 0.9204$) (Fig. 6). In the serum of mice that received nicotine, the preference score in the CPP was positively correlated with IL-6 levels ($r = 0.7216$, $p = 0.0185$). Interestingly, the preference score in the CPP correlated negatively with the hippocampal levels of IL-6 ($r = -0.8185$, $p = 0.0038$) in mice receiving nicotine.

4. Discussion

This is the first study investigating the relation between the levels of brain inflammatory mediators and nicotine-induced CPP. CPP is an important experimental paradigm used to evaluate the rewarding effects of different drugs in animal models [3]. Although CPP does not evaluate the phases of the nicotine addiction, this protocol mimics the behavior of human smokers, who are conditioned to smoke in environments previously associated with smoking reward [37].

In line with previous studies, nicotine at the dose of 0.5 mg/kg induced CPP in Swiss mice [50,54]. Both CPP and conditioned place aversion (CPA) have been reported after nicotine administration. Studies reported that in Swiss Webster mice, a dose range of 0.18–2.0 mg/kg produces CPP behavior, while doses superior to 2.0 mg/kg tend to induce CPA [40,43].

Some studies have shown that the modulation of immune response through specific pathways might play a role in CPP with morphine and

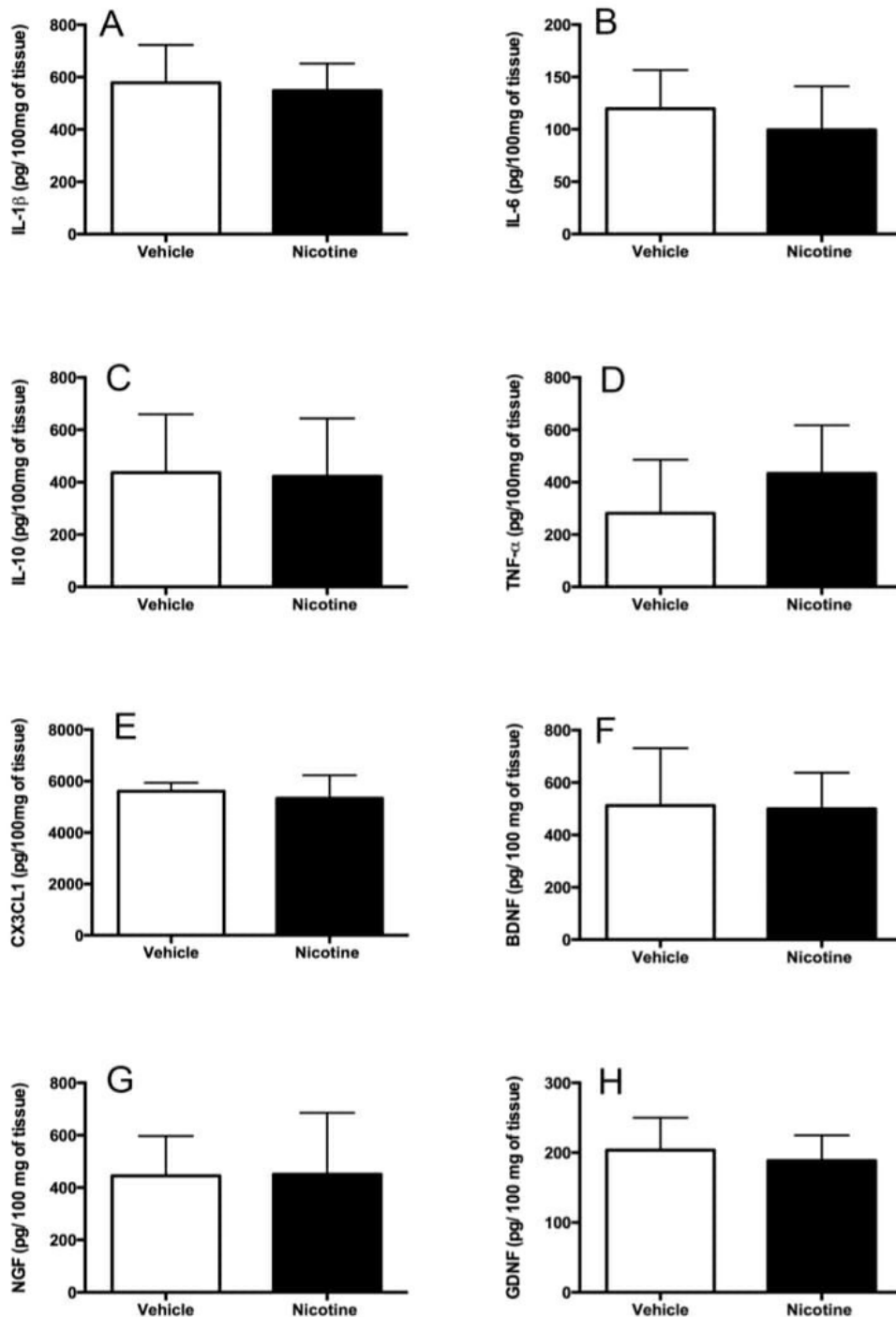


Fig. 3. Inflammatory response in prefrontal cortex (PFC) of animals submitted to CPP-nicotine protocol. The brain areas were collected and processed for evaluation of the levels of mediators using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). (A) IL-1 β ; (B) IL-6; (C) IL-10; (D) TNF- α ; (E) CX3CL1; (F) BDNF; (G) NGF; (H) GDNF. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of at least two independent experiments (n = 5 per group). *Means significant difference comparing nicotine-group versus control (p < 0.05).

cocaine [7,28,55]. Although our results are the first to investigate these changes in nicotine-induced CPP context, there is evidence that supports the role of immune response prompted by nicotine. It is worth mentioning that cocaine-induced CPP also promoted changes in the levels of inflammatory mediators and neurotrophic factors in the brain (data not shown). Interestingly, cocaine induced these changes in different areas of the brain compared with nicotine in the same CPP protocol, indicating that inflammation and neurotrophic factor signaling

may play a role in both addiction processes in a drug-specific manner.

Swiss rats receiving intraperitoneal administration of nicotine (0.25 mg/kg) for 30 days exhibited microglial activation and increased TNF- α and NF- κ B levels in the cerebral cortex [2]. Nicotine administration (6 mg/kg) also induced increase of IL-1 β and TNF- α levels and decrease of the BDNF expression in hippocampal tissue of rats that received nicotine subcutaneously for 21 days [32]. Fischer 344 (F344) rats exposed to subcutaneous injections of nicotine (0.5 mg/kg), twice

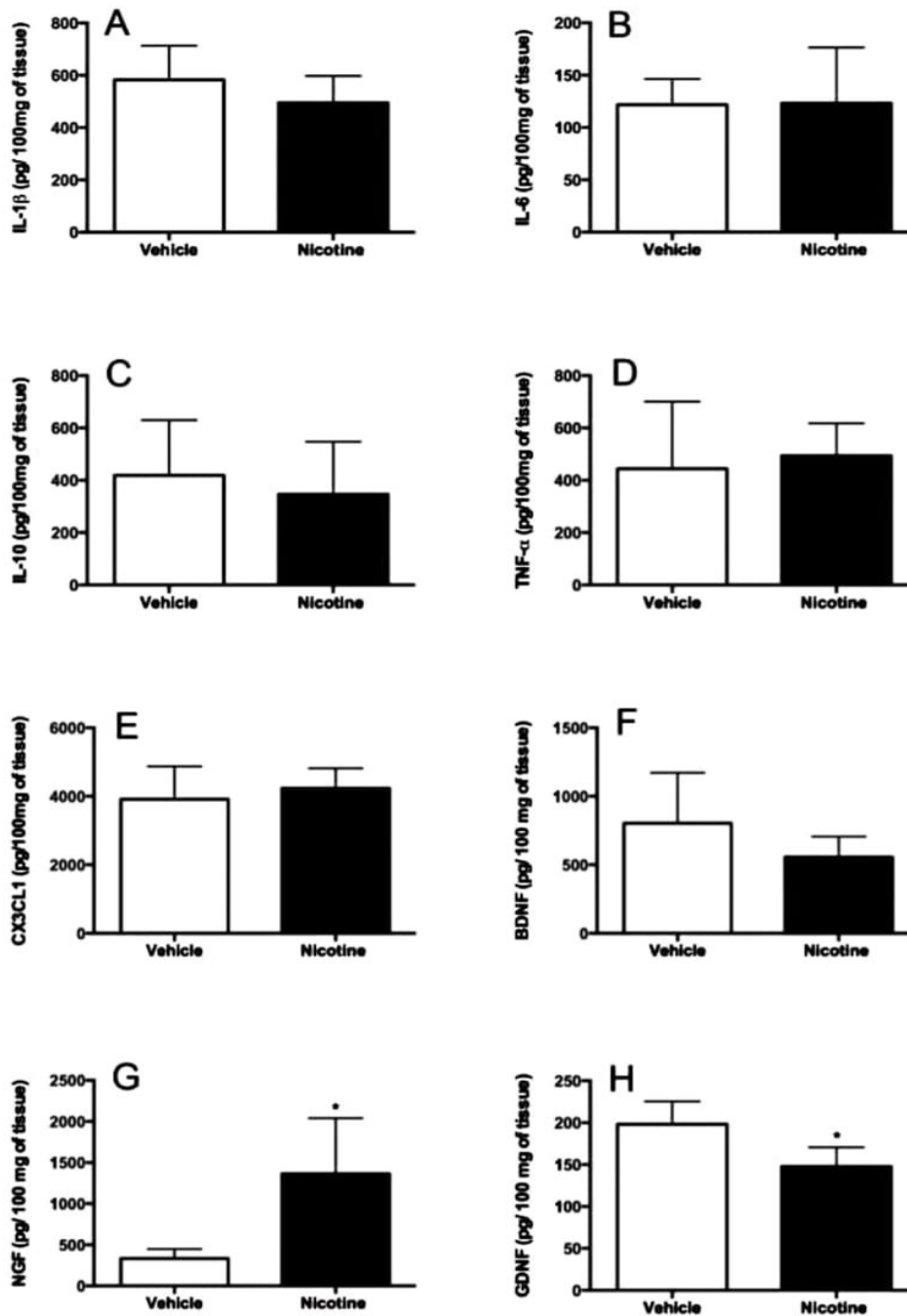


Fig. 4. Inflammatory response in hippocampus of animals submitted to CPP-nicotine protocol. The brain areas were collected and processed for evaluation of the levels of mediators using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). (A) IL-1 β ; (B) IL-6; (C) IL-10; (D) TNF- α ; (E) CX3CL1; (F) BDNF; (G) NGF; (H) GDNF. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of at least two independent experiments (n = 5 per group). *Means significant difference comparing nicotine-group versus control (p < 0.05).

daily, 5 days for week, during 6 weeks presented increased TNF- α levels in prefrontal cortex. Interestingly, in the same study, F344 rats submitted to smoke cigarette (0.7 mg nicotine/cigarette), twice daily for 8–10 min, during the same period, in addition to the increase in TNF- α levels, also showed higher levels of IL-1 in the same area of the brain [42]. These studies suggest an association between nicotine administration and inflammatory response in rodents.

Conversely, a growing body of evidence suggests nicotine-induced

suppression of neuroinflammation through activation of the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor ($\alpha 7$ -nAChR) [49]. The $\alpha 7$ -nAChR is the only nAChR subtype reportedly found on microglia. Nicotine has been established to inhibit pro-inflammatory cytokine release by microglia in the brain, such as IL-1 β , via $\alpha 7$ -nAChR [15,26].

Adeluy et al. (2019) showed that nicotine exposure and withdrawal induce microglial morphological changes, while increased expression of cytokines IL-1 β and TNF- α was found in pre-frontal cortex and

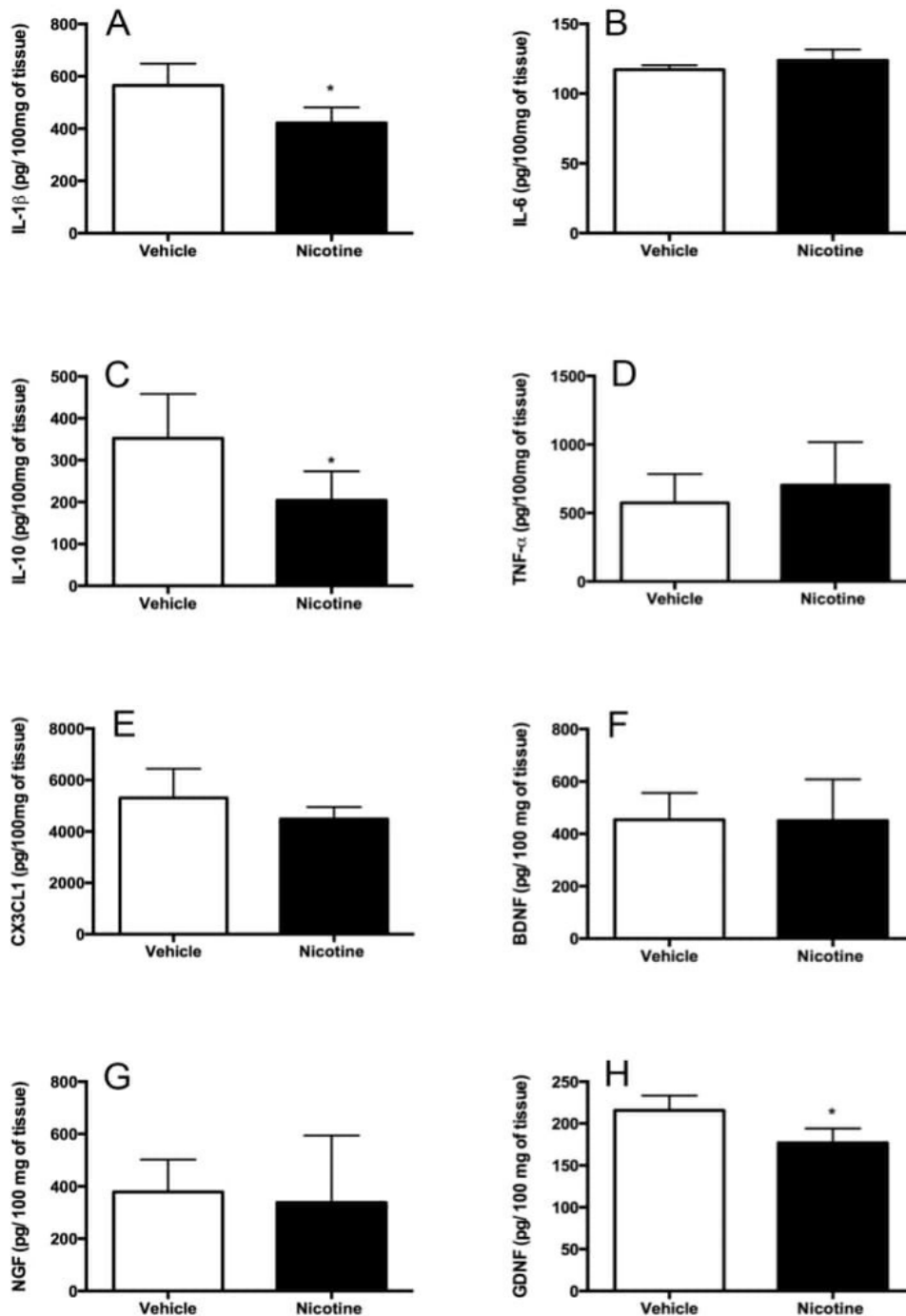


Fig. 5. Inflammatory response in striatum of animals submitted to CPP-nicotine protocol. The brain areas were collected and processed for evaluation of the levels of mediators using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). (A) IL-1 β ; (B) IL-6; (C) IL-10; (D) TNF- α ; (E) CX3CL1; (F) BDNF; (G) NGF; (H) GDNF. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of at least two independent experiments (n = 5 per group). *Means significant difference comparing nicotine-group versus control (p < 0.05).

hippocampus of mice two days after nicotine withdrawal. Interestingly, mice displayed cognitive impairment at the same time point [11]. In mice subjected to continuous administration of nicotine for 14 days, plasma levels of TNF- α and IFN γ were elevated at day four post nicotine withdrawal, while differences were no longer observed at the eighth day of withdrawal, when the mice did not show any cognitive deficits. These data suggest that nicotine withdrawal-induced cognitive deficits are associated with increased levels of inflammatory cytokines [44].

Herein, we found increase of the hippocampal NGF and decrease of the GDNF levels in hippocampus and *striatum* of mice that received nicotine. These findings suggest that neurotrophic factors, which play an important role in neuronal maintenance and survival [19], seem to modulate nicotine addiction. This hypothesis is corroborated by clinical studies that have investigated neurotrophic factors as a therapeutic target in smokers [22,51]. Heavy smokers exhibited increased plasmatic levels of BDNF compared to no-smokers [34]. Another clinical study

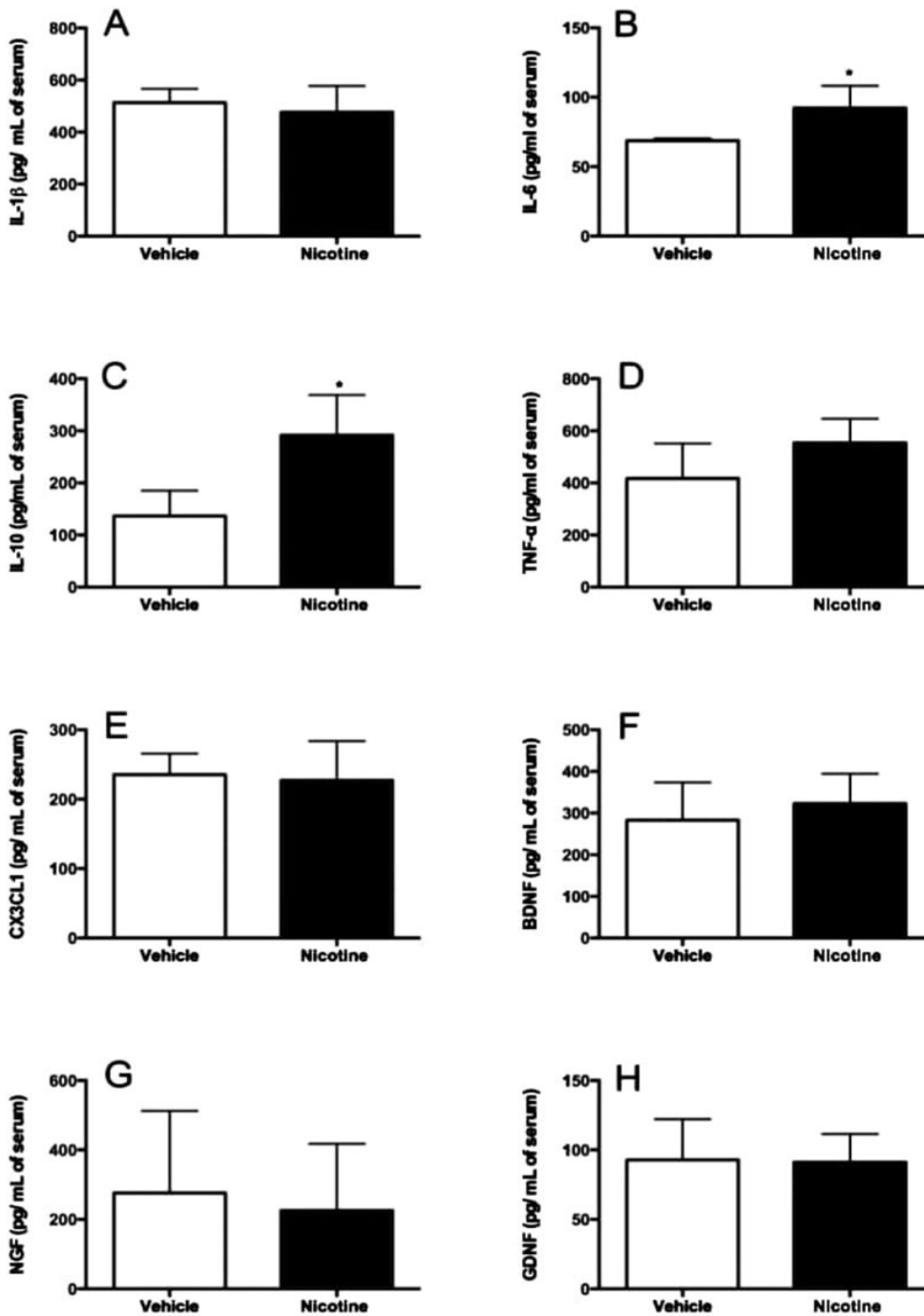


Fig. 6. Inflammatory response in serum of animals submitted to CPP-nicotine protocol. The serum was collected and processed for evaluation of the levels of mediators using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). (A) IL-1 β ; (B) IL-6; (C) IL-10; (D) TNF- α ; (E) CX3CL1; (F) BDNF; (G) NGF; (H) GDNF. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of at least two independent experiments (n = 5 per group). *Means significant difference comparing nicotine-group versus control (p < 0.05).

showed elevated serum levels of BDNF in smokers with and without nicotine dependence compared to both former and never-smoker subjects [20]. In addition, since the *nucleus accumbens* is directly related to the reward system [52] and located in the *striatum*, the reduction of IL-1 β , IL-10, and GDNF found in this brain area may also contribute for the place preference behavior.

The GDNF-induced inhibition of addiction has been described in experimental cocaine abuse models. For instance, rats receiving

infusions of anti-GDNF antibody in the VTA and heterozygous GDNF knockout mice presented higher cocaine effects in comparison to non-treated rats [31,53]. Conversely, the mechanisms linking nicotine and changes in GDNF expression are still missing. A study demonstrated that smoking behavior was associated with GDNF single-nucleotide polymorphisms in young adults [25]. Moreover, the synergistic effects of nicotine and alcohol contributed for a reduction of GDNF expression in mesolimbic areas of alcohol-preferring rats [47].

Nicotine addiction modulates synaptic plasticity and gene expression through its interaction with nAChRs. Desensitization of these receptors, in addition to protecting cells from uncontrolled excitation, has been considered as a form of signaling plasticity [33]. Even limited exposure to nicotine is sufficient to induce changes in mesolimbic dopamine (DA) reward circuitry system and early symptoms of nicotine addiction [30]. Increased release of DA was observed in the nucleus accumbens in response to a single injection of nicotine as well as to intermittent exposure to cigarette smoke [12]. Nicotine, delivered by subcutaneously implanted osmotic pumps (0.125 mg/kg/h, 14 days), induced changes in mesolimbic regions through nAChR sensitization/desensitization, which contributed to the aversive effects of withdrawal, and the preference for environments previously associated with smoking reward [33].

Fujii and Sumikawa (2001) demonstrated that nicotine exposure could decrease the threshold for long-term potentiation (LTP) induction in the hippocampus of rats, increasing the plasticity. It seems that the increase of neurotrophic factors is responsible, at least in part, for this mechanism [11]. Indeed, intra-hippocampal administration of nicotine for 24 h increases NGF levels [21]. Nicotine also up-regulated NGF expression in spinal cord neurons from mice embryos [13]. Repeated exposure to nicotine (0.35 mg/kg every 12 h for 14 days) resulted in positive effects on central cholinergic markers and memory function, mediated through the up-regulation of high-affinity NGF receptors in male Wistar rats [18]. In parallel, NGF increases the encoding of nAChR subunits *in vitro* [17]. These data corroborate the finding of nicotine-induced increased levels of NGF in our study.

Serum levels of IL-6 were higher in mice submitted to administration of nicotine than in the controls. Moreover, the preference score in CPP was correlated with higher peripheral levels of IL-6. This increase of peripheral IL-6 is in line with previous studies injecting nicotine by intraperitoneal route in mice [29,10]. Interestingly, nicotine did not induce changes in IL-6 concentrations in the hippocampus, while the CPP-score correlated negatively with hippocampal levels of this cytokine. It is worth to mention that the up-regulation of IL-1 β and IL-6 has been associated with cognitive decline in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's disease [45,39]. Memory and learning, that are essential for the consolidation of CPP behavior, are the main functions impaired by IL-6 changes [3,14].

A kinetic evaluation investigating the possible association between nicotine doses and the brain levels of neurotrophic factors and cytokines is essential for understanding how these neurochemical mediators are modulated by nicotine exposure and their influence on CPP and nicotine addiction, whose is a limitation of this study. The study of inflammatory mediators and neurotrophic factors in specific zones of the striatum related with reward needs to be also further explored. Another important limitation to be considered in future studies are the lack of other experimental methods for cross-validation. Herein, ELISA was the only method employing to evaluate the levels of cytokines and inflammatory mediators in the brain tissue.

In this scenario, nicotine-induced changes of neurotrophic factors, especially the increase of NGF and, reduction of GDNF levels, alongside to the preservation or reduction of baseline IL-6 and IL-1 β levels in the brain could explain, at least in part, the nicotine-induced CPP behavior in mice. In conclusion, the current study provides first evidence on the potential role of cytokines and neurotrophic factors in behavior induced by nicotine reward, opening a road for this field of investigation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement and funding sources

This study was supported by Brazilian grants from FAPEMIG, CNPq and CAPES.

References

- [1] A. Adeluyi, L. Guerin, M.L. Fisher, A. Galloway, R.D. Cole, S.S. Chan, M.D. Wyatt, S.W. Davis, L.R. Freeman, P.I. Ortinski, Microglia morphology and proinflammatory signaling in the nucleus accumbens during nicotine withdrawal, *Science advances* 5 (2019) eaax7031.
- [2] S.M. Azmy, M.A. Abd El fattah, S.S. Abd El-Rahman, S.A. Nada, O.M.E. Abdel Salam, M.F. El-Yamany, N.N. Nassar, Does nicotine impact tramadol abuse? Insights from neurochemical and neurobehavioral changes in mice, *Neurotoxicology* 67 (2018) 245–258.
- [3] M. Bardo, R.A. Bevins, Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology* 153 (2000) 31–43.
- [4] N.L. Benowitz, Cigarette smoking and nicotine addiction, *Med. Clin. N. Am.* 76 (2) (1992) 415–437.
- [5] J.-X. Chen, K.-M. Huang, M. Liu, J.-X. Jiang, J.-P. Liu, Y.-X. Zhang, C. Yang, W.-J. Xin, X.-Q. Zhang, Activation of TLR4/STAT3 signaling in VTA contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference, *Behav. Brain Res.* 335 (2017) 151–157.
- [6] C. Correia, P. Romieu, M.C. Olmstead, K. Befort, Can cocaine-induced neuroinflammation explain maladaptive cocaine-associated memories? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 111 (2020) 69–83.
- [7] C.L. Cunningham, C.M. Gremel, P.A. Groblewski, Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1662.
- [8] A. Faheem, K. Rehman, K. Jabeen, M.S.H. Akash, Nicotine-mediated upregulation of microRNA-141 expression determines adipokine-intervened insulin resistance, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 80 (2020), 103506.
- [9] S. Fujii, K. Sumikawa, Acute and chronic nicotine exposure reverse age-related declines in the induction of long-term potentiation in the rat hippocampus, *Brain Res.* 894 (2) (2001) 347–353.
- [10] K. Fuxe, K. Andersson, A. Harstrand, L.F. Agnati, Increases in dopamine utilization in certain limbic dopamine terminal populations after a short period of intermittent exposure of male rats to cigarette smoke, *J. Neural Transm.* 67 (1–2) (1986) 15–29.
- [11] R. Garrido, K. King-Pospisil, K.W. Son, B. Hennig, M. Toborek, Nicotine upregulates nerve growth factor expression and prevents apoptosis of cultured spinal cord neurons, *Neurosci. Res.* 47 (3) (2003) 349–355.
- [12] D.L. Gruol, IL-6 regulation of synaptic function in the CNS, *Neuropharmacology* 96 (2015) 42–54.
- [13] Y.-Z. Guan, X.-D. Jin, L.-X. Guan, H.-C. Yan, P. Wang, Z. Gong, S.-J. Li, X. Cao, Y.-L. Xing, T.-M. Gao, Nicotine inhibits microglial proliferation and is neuroprotective in global ischemia rats, *Mol. Neurobiol.* 51 (3) (2015) 1480–1488.
- [14] L.P. Henderson, M.J. Gdovin, C. Liu, P.D. Gardner, R.A. Maue, Nerve growth factor increases nicotinic ACh receptor gene expression and current density in wild-type and protein kinase A-deficient PC12 cells, *J. Neurosci.* 14 (3) (1994) 1153–1163.
- [15] C.M. Hernandez, A. Terry Jr, Repeated nicotine exposure in rats: effects on memory function, cholinergic markers and nerve growth factor, *Neuroscience* 130 (2005) 997–1012.
- [16] D.M. Holtzman, W.C. Mobley, Neurotrophic factors and neurologic disease, *West. J. Med.* 161 (1994) 246.
- [17] M. Jamal, W. Van der Does, B.M. Elzinga, M.L. Molendijk, B.W. Penninx, Association between smoking, nicotine dependence, and BDNF Val66Met polymorphism with BDNF concentrations in serum, *Nicotine Tobacco Res.* 17 (2015) 323–329.
- [18] R.R. Jonnal, A.V. Terry, J.J. Buccafusco, Nicotine increases the expression of high affinity nerve growth factor receptors in both *in vitro* and *in vivo*, *Life Sci.* 70 (13) (2002) 1543–1554.
- [19] K.-W. Kim, Y.L. Won, K.S. Ko, J. won Roh, Smoking habits and neuropeptides: adiponectin, brain-derived neurotrophic factor, and leptin levels, *Toxicol. Res.* 30 (2014) 91–97.
- [20] M. Kohno, J. Link, L.E. Dennis, H. McCready, M. Huckans, W.F. Hoffman, J. M. Loftis, Neuroinflammation in addiction: A review of neuroimaging studies and potential immunotherapies, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 179 (2019) 34–42.
- [21] G.F. Koob, Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways, *Trends Pharmacol. Sci.* 13 (1992) 177–184.
- [22] E. Kotyuk, N. Nemeth, Z. Ronai, Z. Demetrovics, M. Sasvari-Szekely, A. Szekely, Association between smoking behaviour and genetic variants of glial cell line-derived neurotrophic factor, *Journal of genetics* 95 (4) (2016) 811–818.
- [23] M. Kumar, A. Adeluyi, E.L. Anderson, J.R. Turner, Glial cells as therapeutic targets for smoking cessation, *Neuropharmacology* 175 (2020), 108157.
- [24] B. Le Foll, S.R. Goldberg, Effects of nicotine in experimental animals and humans: an update on addictive properties, *Nicotine Psychopharmacology* (2009) 335–367.
- [25] H. Liu, J. Wei, M. Liu, S. Wu, C. Ma, C. Liu, K. Huang, X. Zhang, R. Guo, K. Zhang, W. Xin, Epigenetic upregulation of CXCL12 expression contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference, *Exp. Neurol.* 306 (2018) 55–63.
- [26] A. Makino, S. Yamada, K. Okuda, T. Kato, Nicotine involved in periodontal disease through influence on cytokine levels, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52 (2) (2008) 282–286.

- [30] H.D. Mansvelder, D.S. McGehee, Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine, *Neuron* 27 (2) (2000) 349–357.
- [31] C.J. Messer, A.J. Eisch, W.A. Carlezon, K. Whisler, L. Shen, D.H. Wolf, H. Westphal, F. Collins, D.S. Russell, E.J. Nestler, Role for GDNF in biochemical and behavioral adaptations to drugs of abuse, *Neuron* 26 (1) (2000) 247–257.
- [32] M. Motaghinejad, M. Motevallan, S. Fatima, F. Faraji, S. Mozaffari, The neuroprotective effect of curcumin against nicotine-induced neurotoxicity is mediated by CREB–BDNF signaling pathway, *Neurochem. Res.* 42 (10) (2017) 2921–2932.
- [33] G. Mudo, N. Belluardo, K. Fuxe, Nicotinic receptor agonists as neuroprotective/neurotrophic drugs. Progress in molecular mechanisms, *J. Neural Transm.* 114 (1) (2007) 135–147.
- [34] C.D.C. Neves, A.C.R. Lacerda, L.P. Lima, V.K.S. Lage, C.H. Balthazar, H.R. Leite, V. A. Mendonça, Different levels of brain-derived neurotrophic factor and cortisol in healthy heavy smokers, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 50 (12) (2017), <https://doi.org/10.1590/1414-431x20176424>.
- [35] L.E. O'Dell, T.V. Khroyan, Rodent models of nicotine reward: what do they tell us about tobacco abuse in humans? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 91 (2009) 481–488.
- [36] W.H. Organization, **Tobacco**, (2020).
- [37] S. Pogun, G. Yazarbas, T. Nesil, L. Kanit, Sex differences in nicotine preference, *J. Neurosci. Res.* 95 (2017) 148–162.
- [38] M.E. Quintanilla, P. Morales, F. Ezquer, M. Ezquer, M. Herrera-Marschitz, Y. Israel, Commonality of Ethanol and Nicotine Reinforcement and Relapse in Wistar-Derived UChB Rats: Inhibition by N-Acetylcysteine, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 42 (10) (2018) 1988–1999.
- [39] I.M. Rea, D.S. Gibson, V. McGilligan, S.E. McNERlan, H.D. Alexander, O.A. Ross, Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines, *Front. Immunol.* 9 (2018) 586.
- [40] F.O. Risinger, R.A. Oakes, Nicotine-induced conditioned place preference and conditioned place aversion in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51 (2–3) (1995) 457–461.
- [42] W. Royal, A. Can, T.D. Gould, M. Guo, J. Huse, M. Jackson, H. Davis, J. Bryant, Cigarette smoke and nicotine effects on brain proinflammatory responses and behavioral and motor function in HIV-1 transgenic rats, *J. Neurovirol.* 24 (2) (2018) 246–253.
- [43] H. Sahraei, M. Falahi, M.-R. Zarrindast, M. Sabetkasaei, H. Ghoshoni, M. Khalili, The effects of nitric oxide on the acquisition and expression of nicotine-induced conditioned place preference in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 503 (1–3) (2004) 81–87.
- [44] R. Saravia, M. Ten-Blanco, M.T. Grande, R. Maldonado, F. Berrendero, Anti-inflammatory agents for smoking cessation? Focus on cognitive deficits associated with nicotine withdrawal in male mice, *Brain, behavior, and immunity* 75 (2019) 228–239.
- [45] T. Swanton, J. Cook, J.A. Beswick, S. Freeman, C.B. Lawrence, D. Brough, Is targeting the inflammasome a way forward for neuroscience drug discovery? *Slas discovery: Advancing Life Sciences R&D* 23 (2018) 991–1017.
- [46] R.K. Tiwari, V. Sharma, R.K. Pandey, S.S. Shukla, Nicotine Addiction: Neurobiology and Mechanism, *J. Pharmacopunct.* 23 (2020) 1.
- [47] W.A. Truitt, S.R. Hauser, G.A. Deehan Jr., J.E. Toalston, J.A. Wilden, R.L. Bell, W. J. McBride, Z.A. Rodd, Ethanol and nicotine interaction within the posterior ventral tegmental area in male and female alcohol-preferring rats: evidence of synergy and differential gene activation in the nucleus accumbens shell, *Psychopharmacology* 232 (2015) 639–649.
- [48] N.D. Volkow, Tobacco addiction, *Research Report Series* (2009).
- [49] H. Wang, M. Yu, M. Ochani, C.A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J.H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C.J. Czura, K.J. Tracey, Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation, *Nature* 421 (6921) (2003) 384–388.
- [50] G. Wilar, Y. Shinoda, T. Sasaoka, K. Fukunaga, Crucial role of dopamine D2 receptor signaling in nicotine-induced conditioned place preference, *Mol. Neurobiol.* 56 (12) (2019) 7911–7928.
- [51] H. Xia, X. Du, G. Yin, Y. Zhang, X. Li, J. Cai, X. Huang, Y. Ning, J.C. Soares, F. Wu, Effects of smoking on cognition and BDNF levels in a male Chinese population: Relationship with BDNF Val66Met polymorphism, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–9.
- [52] L.M. Yager, A.F. Garcia, A.M. Wunsch, S.M. Ferguson, The ins and outs of the striatum: role in drug addiction, *Neuroscience* 301 (2015) 529–541.
- [53] K. Yamada, T. Nabeshima, Pro-and anti-addictive neurotrophic factors and cytokines in psychostimulant addiction: mini review, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1025 (2004) 198–204.
- [54] S. You, X. Li, J. Xiong, X. Zhu, D. Zhangsun, X. Zhu, S. Luo, α -Conotoxin Tx1B: A Uniquely Selective Ligand for $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Attenuates Nicotine-Induced Conditioned Place Preference in Mice, *Mar. Drugs* 17 (2019) 490.
- [55] R. Zhu, Q. Bu, D. Fu, X. Shao, L. Jiang, W. Guo, B. Chen, B. Liu, Z. Hu, J. Tian, Toll-like receptor 3 modulates the behavioral effects of cocaine in mice, *J. Neuroinflammation* 15 (2018) 1–11.

6.3 Análise da administração do ácido clavulânico na PCL induzida por cocaína

6.3.1 Administração das doses do ácido clavulânico não induziu preferência condicionada ao lugar.

Para avaliar a possibilidade do AC induzir preferência condicionada ao lugar os animais foram separados em dois grupos, A10 e A50 que receberam, respectivamente, as doses de 10mg/kg e 50mg/kg. Quando comparados os grupos salina (controle), A10 e A50 não houve diferença estatística entre eles, demonstrando que o AC por si só não induziu PCL (Fig. 8).

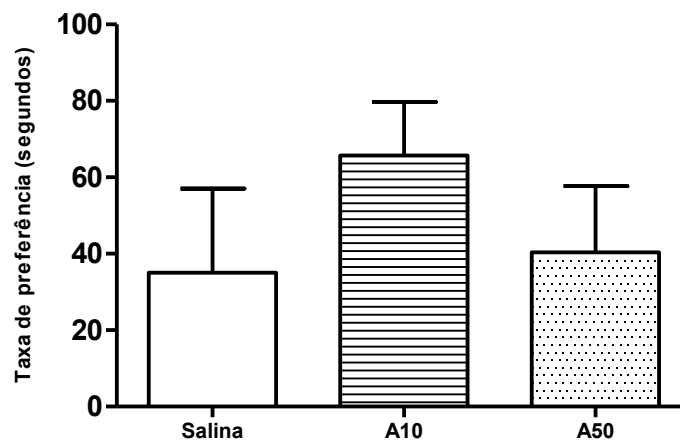


Fig. 8. Controle das doses do ácido clavulânico utilizadas. As doses administradas do ácido clavulânico 10mg/kg (A10) e 50mg/kg (A50) não induziram preferência condicionada ao lugar. A taxa de preferência é o tempo gasto pelo animal no compartimento condicionado com salina ou droga no dia do teste menos o tempo gasto, do mesmo, no dia do pré-teste no lado condicionado com salina ou droga. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=10-11 animais/grupo), ANOVA de uma via e teste post-hoc de Turkey. Não houve diferença estatística entre os grupos Salina, A10 e A50.

6.3.2 Administração das doses do ácido clavulânico não alterou a atividade locomotora.

A atividade locomotora dos animais foi avaliada utilizando-se o teste de campo aberto, realizado após a PCL. Os animais foram alocados na arena e filmados durante 10 minutos. Durante o teste, com o emprego do software ANY-maze, a distância total percorrida por cada animal foi registrada. Os dados estão apresentados como distância percorrida em metros durante o teste.

As administrações de salina, do AC (10 mg/kg e 50mg/kg), cocaína e AC + cocaína não modificaram a locomoção de camundongos expostos à arena no dia do teste. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via e teste post-hoc de Turkey). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (Fig. 9).

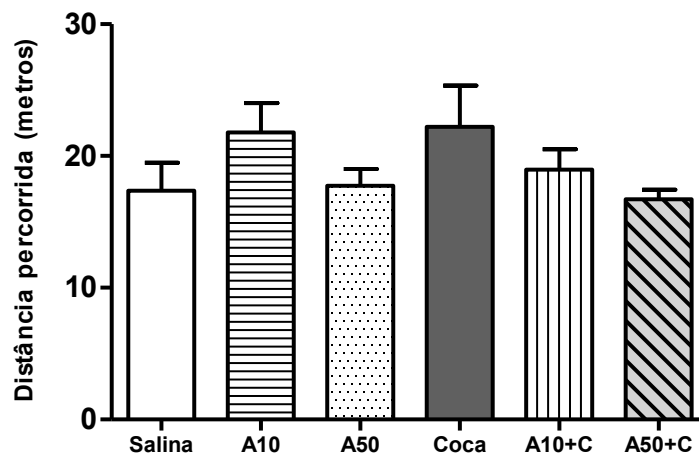


Fig. 9. Efeitos das doses do ácido clavulânico na atividade locomotora em campo aberto, após teste PCL. A salina, ácido clavulânico nas duas doses 10mg/kg (A10) e 50mg/kg (A50), cocaína (20mg/kg), ácido clavulânico e cocaína (A10+C) e (A50+C) não alteraram a locomoção basal de camundongos expostos à arena após 10 minutos de habituação. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n= 6 animais/grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de uma via e teste post-hoc de Turkey).

6.3.3 Efeito da administração do ácido clavulânico em modelo de PCL induzido por cocaína.

O efeito do ácido clavulânico (10 mg/kg e 50mg/kg) na PCL induzida por cocaína quando administrado na fase de aquisição (durante o condicionamento) foi testado. Houve diferença significativa, na expressão da preferência, entre os grupos tratados com o ácido clavulânico e cocaína (A10+C e A50+C) e o grupo controle salina (Fig. 10). Portanto, o tratamento realizado com o AC não preveniu o condicionamento à cocaína, a busca pela recompensa acontece mesmo com sua administração.

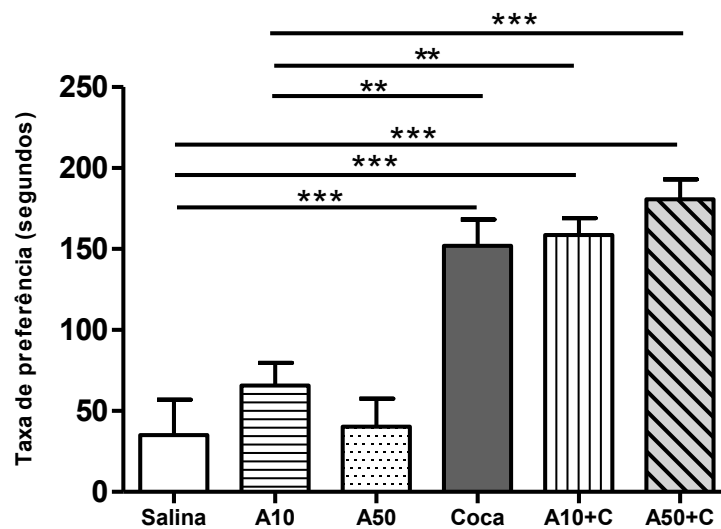


Fig.10. Efeito da administração do ácido clavulânico em modelo PCL induzida por cocaína. Grupo Salina recebeu salina todos os dias, grupo Coca recebeu 20mg/kg durante os dias de condicionamento, grupo A10 recebeu 10mg/kg de ácido clavulânico durante os dias de condicionamento, grupo A50 recebeu 50mg/kg de ácido clavulânico durante os dias de condicionamento, grupo A10+C recebeu 10mg/kg de ácido clavulânico e cocaína durante os dias de condicionamento e grupo A50+C recebeu 50mg/kg de ácido clavulânico e cocaína durante os dias de condicionamento. A taxa de preferência é o tempo gasto pelo animal no compartimento condicionado com salina ou tratamento no dia do teste menos o tempo gasto do mesmo no dia do pré-teste no lado condicionado com salina ou tratamento. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey, e representados como médias \pm SEM (n= 10–11 por grupo) ***p<0.001 quando comparados ao grupo salina.

6.3.4 Efeito do pré-tratamento com ácido clavulânico em modelo de PCL induzido por cocaína.

Por fim, testou-se o efeito do ácido clavulânico (10 mg/kg) na PCL induzida por cocaína quando administrado em fase anterior ao condicionamento. O pré tratamento de três dias com o AC, anterior a fase de condicionamento, não foi suficiente para prevenir o condicionamento à cocaína. Houve diferença significativa entre os grupos salina e os tratados com o AC e cocaína (A10+C) (Fig. 11).

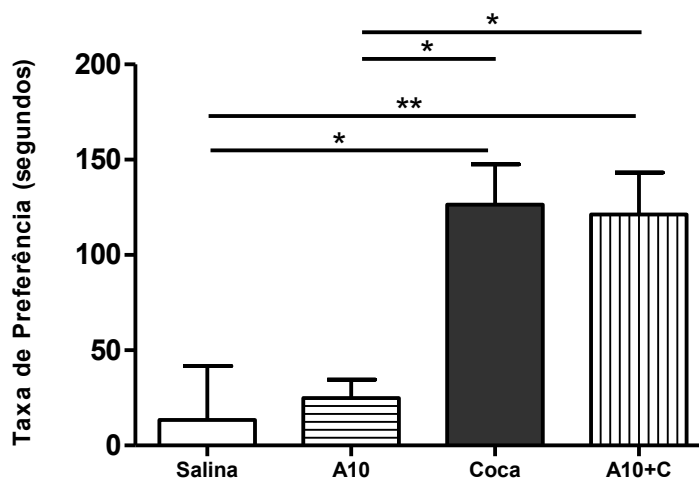


Fig. 11. Efeito da administração de pré-tratamento com ácido clavulânico em modelo PCL induzida por cocaína. Na fase anterior ao condicionamento os grupos Salina, AC 10, Cocaína, receberam salina durante os três dias e o grupo AC10+C recebeu 10mg/kg de ácido Clavulânico durante os três dias. Na fase de condicionamento o grupo Salina recebeu salina todos os dias, grupo Coca recebeu 20mg/kg durante os dias de condicionamento, grupo A10 recebeu 10mg/kg de ácido clavulânico durante os dias de condicionamento, grupo A10+C recebeu 10mg/kg de ácido clavulânico e cocaína durante os dias de condicionamento. A taxa de preferência é o tempo gasto pelo animal no compartimento condicionado com salina ou tratamento no dia do teste menos o tempo gasto do mesmo no dia do pré-teste no lado condicionado com salina ou tratamento. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Tukey, e representados como médias \pm SEM (n= 6–8 por grupo) ***p<0.001 quando comparados ao grupo salina.

7 DISCUSSÃO

Na presente discussão somente os resultados do tratamento com o AC serão abordados, uma vez que os demais já foram discutidos nos artigos 1 e 2.

A atividade locomotora dos animais foi analisada para verificar se a administração do AC influenciaria a mesma. A administração do AC nos dias de condicionamento não influenciou a locomoção dos animais. Bem como, a administração da cocaína não interferiu no padrão de locomoção comparado com o grupo salina. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Estudos sobre sensibilização comportamental ocasionada pela cocaína demonstram aumento na resposta locomotora que ocorre com a repetida e intermitente administração da mesma. Porém, no presente estudo não foi aplicado o protocolo clássico de sensibilização motora, o qual é designado como uma resposta a um estímulo, após repetidas exposições. O objetivo desse experimento foi verificar se as substâncias administradas no protocolo da PCL utilizado, exerceriam algum efeito na locomoção dos animais. Para tal, o teste do campo aberto foi realizado no último dia da PCL, após o mesmo. A sensibilização locomotora é interessante pois demonstra o enorme potencial de indução de plasticidade cerebral por psicoestimulantes, e o quanto a droga administrada pode influenciar essas alterações e facilitar o desenvolvimento de adicção⁴⁶. Além de testar um possível efeito de aumento ou redução da locomoção induzido pelo fármaco.

Testou-se o efeito do AC na PCL induzida por cocaína, quando administrado durante o condicionamento (na fase de aquisição). As doses do AC não impediram o condicionamento por cocaína, quando administrado trinta minutos antes das injeções de cocaína. Portanto, o AC, administrado minutos antes das injeções da droga, não preveniu o condicionamento à cocaína.

Novo experimento com protocolo de pré-tratamento foi realizado. O AC foi administrado 3 dias antes do início da fase de condicionamento. O pré tratamento com o AC não foi suficiente para prevenir o condicionamento à cocaína.

A escolha em estudar os efeitos do AC surgiu após estudos demonstrarem que o mesmo possui fortes efeitos moduladores do SNC, diminuindo a ansiedade em modelos animais, e propriedades neuroprotetoras em modelos *in vivo* de Parkinson³².

O AC é estruturalmente semelhante à ceftriaxona (CTX), uma substância com propriedades demonstradas, que inibem a busca de cocaína através da normalização da transmissão do GLU. O interesse pelo AC advém de suas propriedades farmacocinéticas, por possuir um perfil terapêutico mais desejável, incluindo uma maior biodisponibilidade oral, uma penetrabilidade cerebral aumentada e atividade antibacteriana insignificante^{29, 31, 32}.

A maioria dos estudos comparativos sobre os efeitos da CTX e do AC administram os mesmos em pré-tratamento, uma vez que, a CTX, por seu perfil farmacocinético, necessita ser administrada no mínimo 5 dias antes dos testes para se obter o efeito esperado^{5,30}. No presente estudo, com o intuito de verificar a capacidade do AC em impedir o condicionamento por cocaína, sem pré-tratamento ou com pré-tratamento de 3 dias, constatou-se que o protocolo utilizado não foi eficiente em inibir os efeitos condicionantes da cocaína. Ao serem analisados esses resultados infere-se que os mecanismos envolvidos no aumento da expressão de GLT-1 pelo AC devem requerer mais tempo de pré-tratamento, uma vez que, a administração do mesmo somente nos dias de condicionamento ou durante 3 dias não preveniu a PCL.

8 CONCLUSÃO

Quando comparados os aparatos de três e dois compartimentos, os resultados obtidos demonstraram que em âmbito comportamental, os aparatos de três e dois compartimentos possibilitaram a PCL induzida por cocaína. Porém, somente o aparato de três compartimentos demonstrou influenciar a PCL alterando os níveis de citocinas e fatores neurotróficos em regiões importantes do SNC.

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que o aparato de três compartimentos é um modelo mais funcional pois é capaz de influenciar o sistema imune central, desencadeando alterações em parâmetros imunológicos e neurotróficos que são observados na adicção. Portanto seria um protocolo mais adequado para o estudo da neurobiologia da adicção por cocaína e nicotina bem como de potenciais alvos terapêuticos que minimizem ou previnam essas condições.

O que pode ser inferido a partir dos dados acima relatados é que a escolha do aparato a ser utilizado em estudos de preferência condicionada ao lugar pode influenciar os resultados da pesquisa e deverá ser feita após uma consideração cuidadosa das limitações associadas a cada tipo de aparato.

Os resultados do tratamento com ácido clavulânico demonstram ser necessário mais dias de pré-tratamento, para que os mecanismos envolvidos no aumento da expressão de GLT-1 pelo AC possam atuar de maneira eficaz prevenindo a PCL.

A capacidade do AC em melhorar a expressão de GLT-1, já observada na literatura, torna-o um candidato para o tratamento do vício, pois múltiplas drogas de abuso reduzem a expressão deste transportador.

Estratégias terapêuticas podem ser desenvolvidas com a compreensão dos mecanismos imunoneurobiológicos relacionados aos efeitos do ácido clavulânico.

PERSPECTIVAS

As alterações e limitações causadas pela pandemia impossibilitaram a continuidade dos experimentos. Abaixo seguem as perspectivas sugeridas para a continuidade e aprimoramento do estudo:

- Realizar experimento administrando AC com pré-tratamento de 5 dias.
- Análise imunológica e de fatores neurotróficos em animais pré-tratados com AC;
- Análise de micróglia e astrócitos por imunohistoquímica;
- Caracterizar a microbiota intestinal em animais submetidos a PCL por cocaína e pré-tratados com AC;
- Investigar o perfil inflamatório intestinal dos animais submetidos a PCL por cocaína e pré-tratados com AC;
- Investigar os efeitos do pré-tratamento do AC combinado com probióticos.

REFERÊNCIAS

- 1- Sondheimer I, Knackstedt LA. Ceftriaxone prevents the induction of cocaine sensitization and produces enduring attenuation of cue- and cocaine-primed reinstatement of cocaine-seeking. *Behav Brain Res.* 2011;225(1):252–258.
- 2- APA Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. 5ed.2014. Disponível em:<<http://www.tdahmente.com/wp-content/uploads/2018/08/Manual-Diagn%C3%B3stico-e-Estat%C3%ADstico-de-Transtornos-Mentais-DSM-5.pdf>>. Acesso em: 30/Abr/2018.
- 3- United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report, 2018. Disponível em: <<http://www.unodc.org/doc/wdr2018/WDR18Booklet2GLOBAL.pdf>>. Acesso em: 30/Abr/2018.
- 4- Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(1):217–238.
- 5- Scofield MD, Kalivas PW. Astrocytic Dysfunction and Addiction: Consequences of Impaired Glutamate Homeostasis. *Neuroscientist.* 2014; 20(6): 610–622.
- 6- Biondich AS, Joslin JD. Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas. *Wilderness Environ Med.* 2015 Dec;26(4):567-71. doi: 10.1016/j.wem.2015.07.006.
- 7- Rivera, MA, Aufderheide AC, Cartmell LW, Torres CM, Langsjoen O. Antiquity of coca-leaf chewing in the South Central Andes: a 3,000 year archaeological record of coca-leaf chewing from Northern Chile. *J Psy Drugs.* 2005; 37: 455–458.
- 8- Ferreira PE e Martini RK. Cocaína: lendas, história e abuso. *Rev Bras Psiquiatr* 2001;23(2):96-9.
- 9- Jay M. Miracle or Menace? *International Review of Neurobiology*, v. 120, p. 27-39, 2015.
- 10- O'Brien CP, Volkow N and Li TK. What's in a word? Addiction versus dependence in DSM-V. *Am J Psychiatry*, v. 163, n. 5, p. 764-5, 2006.
- 11- Ritz MC, Cone EJ, Kuhar MJ. Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. *Life Sci.* 1990;46:635–45.
- 12- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics.* 11th. New York: McGrawHill, 2006. 1984 p. ISBN: 0071422803. Disponível em: <https://dvmbooks.weebly.com/uploads/2/2/3/6/22365786/2._goodman_and_gilman.pdf>
- 13- Nestler EJ. The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect.* 2005;3(1):4–10.
- 14- Swanson LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull.* 1982;9:321–53.

- 15- Di CG and Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, n. 14, p. 5274-8, 1988.
- 16- Koob GF and Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 1, p. 217-38, 2010.
- 17- Beaulieu JM and Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, v. 63, n. 1, p. 182-217, 2011.
- 18- Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Schlyer D, Shiue CY, Alpert R, Dewey SL, Logan J, Bendriem B, Christman D and et al. Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *Am J Psychiatry*, v. 147, n. 6, p. 719-24, 1990.
- 19- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, Dewey SL and Wolf AP. Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse*, v. 14, n. 2, p. 169-77, 1993.
- 20- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol*. 1993;338(2):255-78.
- 21- Everitt BJ, Robbins TW. From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of their roles in drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37:1946-54.
- 22- Vanderschuren L, Di Ciano P, Everitt BJ. Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *J Neurosci*. 2005;25:8665-70.
- 23- Veeneman MM, Broekhoven MH, Damsteegt R, Vanderschuren LJ. Distinct contributions of dopamine in the dorsolateral striatum and nucleus accumbens shell to the reinforcing properties of cocaine. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37:487-98.
- 24- French SJ, Totterdell S. Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience*. 2003;119:19-31.
- 25- Pascoli V, Terrier J, Espallergues J, Valjent E, O'Connor EC, Luscher C. Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature*. 2014;509:459-64.
- 26 - Yamada K, Nabeshima T. Pro- and anti-addictive neurotrophic factors and cytokines in psychostimulant addiction: mini review. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Oct;1025:198-204.
- 27- Moreira FP, Medeiros JR, Lhullier AC, Souza LD, Jansen K, Portela LV, Lara DR, da Silva RA, Wiener CD, Oses JP. Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. *Drug Alcohol Depend*. 2016; 158:181-5.
- 28- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB. β -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*. 2005; 433(7021):73-7.

- 29- Kim J, John J, Langford D, Walker E, Ward S, Rawls SM. Clavulanic acid enhances glutamate transporter subtype I (GLT-1) expression and decreases reinforcing efficacy of cocaine in mice. *Amino Acids*. 2016; 48(3): 689–696.
- 30- Trantham-Davidson H, LaLumiere RT, Reissner KJ, Kalivas PW, Knackstedt LA. Ceftriaxone normalizes nucleus accumbens synaptic transmission, glutamate transport and export following cocaine self-administration and extinction training. *J Neurosci*. 2012; 32(36):12406-10.
- 31- Schroeder JA, Tolman NG, McKenna FF, Watkins KL, Passeri SM, Hsu AH, Shinn BR, Rawls SM. Clavulanic acid reduces rewarding, hyperthermic and locomotor-sensitizing effects of morphine in rats: a new indication for an old drug? *Drug Alcohol Depend*. 2014;142: 41–45.
- 32- Kost GC, Selvaraj S, Lee YB, Kim DJ, Ho Ahn C, Singh BB. Clavulanic acid increases dopamine release in neuronal cells through a mechanism involving enhanced vesicle trafficking. *Neurosci Lett*. 2011; 504(2): 170–175.
- 33- Hutchinson MR, Shavit Y, Grace PM, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Exploring the Neuroimmunopharmacology of Opioids: An Integrative Review of Mechanisms of Central Immune Signaling and Their Implications for Opioid Analgesia. *Pharmacol Rev*. 2011; 63(3): 772–810.
- 34- Yamamoto BK, Moszczynska A, Gudelsky GA. Amphetamine toxicities Classical and emerging mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1187: 101–121.
- 35- Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. 2000. *Neuropsychopharmacology* 23, 223-239.
- 36- Machado-Vieira R, Schmidt AP, Avila TT, Kapczinski F, Soares JC, Souza DO, et al. Increased cerebrospinal fluid levels of S100B protein in rat modelo of mania induced by ouabain. 2004. *Life Sci*. 6, 805-811.
- 37- Miranda AS, Andreatini R, Teixeira AL. Chapter 43 - Animal Models of Mania: Essential Tools to Better Understand Bipolar Disorder *Animal Models for the Study of Human Disease (Second Edition)* 2017, Pages 1131-1143. doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6.00043-7.
- 38- Nunes EA and Hallak JEC. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental*, v. 17, p. 528-543, 2014.
- 39- Deroche-Gamonet V, Belin D, and Piazza PV. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*, v. 305, n. 5686, p. 1014-7, 2004.
- 40 - Sanchis-segura C and Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol*, v. 11, n. 1, p. 2-38, 2006.
- 41- Cunningham CL, Gremel CM, and Groblewski PA. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc*, v. 1, n. 4, p. 1662-70, 2006.
- 42- Huston JP, Silva MA, Topic B and Muller CP. What's conditioned in conditioned place preference? *Trends Pharmacol Sci*, v. 34, n. 3, p. 162-6, 2013.

- 43 - Bardo MT and Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl)*, v. 153, n. 1, p. 3143, 2000.
- 44- White NM, Chai SC and Hamdani S. Learning the morphine conditioned cue preference: cue configuration determines effects of lesions. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 81, n. 4, p. 786-96, 2005.
- 45- Wise RA and Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev*, v. 94, n. 4, p. 469-92, 1987.
- 46- Robinson TE and Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 18, n. 3, p. 247-91, 1993.
- 47- Berridge KC and Robinson TE. Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. *Am Psychol*, v. 71, n. 8, p. 670-679, 2016.
- 48- Kalivas PW. How do we determine which drug-induced neuroplastic changes are important? *Nat Neurosci*, v. 8, n. 11, p. 1440-1, 2005.
- 49- Morales M and Margolis EB. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci*, v. 18, n. 2, p. 73-85, 2017.
- 50- Ribeiro M, Laranjeira RR, Dunn J. Cocaína: bases biológicas da administração, abstinência e tratamento. *J Bras Psiquiatr*. 1998 Out;47(10):497-511.
- 51- Zullino DF, Khazaal Y, Hättenschwiler J, Borgeat F, Besson J. Anticonvulsant drugs in the treatment of substance withdrawal. *Drugs Today (Barc)*. 2004 Jul;40(7):603-19.
- 52- Dackis CA, Kampman KM, Lynch KG, Pettinati HM, O'Brien CP. A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil for cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Jan;30(1):205-11.
- 53- Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP. The status of disulfiram: a half of a century later. *J Clin Psychopharmacol*. 2006 Jun;26(3):290-302.
- 54- Poling J, Oliveto A, Petry N, Sofuoglu M, Gonsai K, Gonzalez G, et al. Six-month trial of bupropion with contingency management for cocaine dependence in a methadone-maintained population. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Feb;63(2):219-28.
- 55- Soares BG, Lima MS, Reisser AA, Farrell M. Dopamine agonists for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(2):CD003352.
- 56- Amato L, Minozzi S, Pani PP, Davoli M. Antipsychotic medications for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Jul 18;(3):CD006306.
- 57- Reid MS, Casadonte P, Baker S, Sanfilippo M, Braunstein D, Hitzemann R, et al. A placebo-controlled screening trial of olanzapine, valproate, and coenzyme Q10/L-carnitine for the treatment of cocaine dependence. *Addiction*. 2005 Mar;100(Suppl 1):43-57.

- 58- Kampman KM, Pettinati H, Lynch KG, Sparkman T, O'Brien CP. A pilot trial of olanzapine for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2003 Jun5;70(3):265-73.
- 59- Karila L, Gorelick D, Weinstein A, Noble F, Benyamina A, Coscas S, et al. New treatments for cocaine dependence: a focused review. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008 May;11(3):425-38.
- 60- Gardner TJ, Kosten TR. Therapeutic options and challenges for substances of abuse. *Dialogues Clin Neurosci.* 2007;9(4):431-45.
- 61- Martell BA, Mitchell E, Poling J, Gonsai K, Kosten TR. Vaccine pharmacotherapy for the treatment of cocaine dependence. *Biol Psychiatry.* Jul 2005;58(2):158-64.
- 62- Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Javors MA, Harrison JM, Elkashef A, et al. A preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of ondansetron in the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2006 Oct1;84(3):256-63.
- 63- Almeida-Santos AF, Gobira PH, Souza DP, Ferreira RC, Romero TR, Duarte ID, Aguiar DC and Moreira, FA. The antipsychotic aripiprazole selectively prevents the stimulant and rewarding effects of morphine in mice. *Eur J Pharmacol*, v. 742, p. 139-44, 2014.
- 64- Muñoz-Cuevas FJ, Athilingam J, Piscopo D, Wilbrecht L. Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference. *Nat Neurosci.* 2013 Oct; 16(10): 1367–1369. Published online 2013 Aug 25. doi: 10.1038/nn.3498_
- 65- Marinho EA, Oliveira-Lima AJ, Santos R, Hollais AW, Baldaia MA, Wuo-Silva R, Yokoyama TS, Takatsu-Coleman AL, Patti CL, Longo BM, Berro LF and Frussa-Filho R. Effects of rimonabant on the development of single dose-induced behavioral sensitization to ethanol, morphine and cocaine in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 58, p. 22-31, 2015.
- 66- Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol.* 2007; Sep;12(3-4):227-462. doi: 10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x.
- 67- Hitchcock LN, Cunningham CL, Lattal KM. Cue configuration effects in acquisition and extinction of a cocaine-induced place preference. *Behav Neurosci.* 2014 Apr; 128(2): 217–227. doi:10.1037/a0036287.
- 68- Cunningham CL, Ferree NK, Howard MA. Psychopharmacology (Berl). Apparatus bias and place conditioning with ethanol in mice. 2003 Dec;170(4):409-22. Epub 2003 Oct 30.
- 69- Bernardi RE, Ryabinin AE, Berger SP, Lattal MK, Mem L. Post-retrieval disruption of a cocaine conditioned place preference by systemic and intrabasolateral amygdala β 2- and α 1-adrenergic antagonists. 2009 Dec; 16(12): 777–789. doi: 10.1101/lm.1648509.
- 70- Lowery RL, Tremblay ME, Hopkins BE, Majewska AK. The Microglial Fractalkine Receptor is Not Required for Activity-dependent Plasticity in the Mouse Visual System. *Glia.* 2017 Nov; 65(11): 1744–1761. Published online 2017 Aug 24. doi: 10.1002/glia.23192.

- 71- McAfoose J, Baune BT. Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009 Mar;33(3):355-66. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.10.005. Review.
- 72- Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci.* 1988 Feb;8(2):709-14.
- 73- Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, Nishio C, Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. 1989. *Neurosci. Lett.* 104: 340–344.
- 74- Maier SF, Watkins LR. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. 1998. *Psychol. Rev.* 105: 83– 107.
- 75- Goodman JC, Robertson CN, Grossman RG, Narayan RK. Elevation of tumor necrosis factor in head injury. 1990. *J. Neuroimmunol.* 30: 213–217.
- 76- Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Lür W, Helwig A, Poser S. Tumor necrosis factor- α messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol.* 1995 Jan;37(1):82-8.
- 77- Barger SW, Hörster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors α and β protect neurons against amyloid β -peptide toxicity: evidence for involvement of a κ B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca^{2+} accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 26;92(20):9328-32
- 78- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtzman FW, Mattson MP. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med.* 1996 Jul;2(7):788-94.
- 79 - Chen P, Zhao W, Guo Y, Xu J, Yin M. CX3CL1/CX3CR1 in Alzheimer's Disease: A Target for Neuroprotection. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 8090918. Published online 2016 Jun 27. doi: 10.1155/2016/8090918.
- 80- Tremblay MÈ, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol.* 2010 Nov 2;8(11):e1000527. doi: 10.1371/journal.pbio.1000527.
- 81- Nestler, E.J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. 2001. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 119–128.
- 82- Pedraz M, Martín-Velasco AI, García-Marchena N, Araos P, Serrano A, Romero-Sanchiz P, Suárez J, Castilla-Ortega E, Barrios V, Campos-Cloute R, Ruiz JJ, Torrens M, Chowen JA, Argente J, de la Torre R, Santín LJ, Villanúa MÁ, Rodríguez de Fonseca F, Pavón FJ. Plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent cocaine users with high prevalence of substance use disorders: relationship to psychiatric comorbidity. *PLoS One.* 2015 Mar 3;10(3):e0118610. doi: 10.1371/journal.pone.0118610. eCollection 2015.

- 83- Ornell F, Hansen F, Schuch FB, Pezzini Rebelatto F, Tavares AL, Scherer JN, Valerio AG, Pechansky F, Paim Kessler FH, von Diemen L. Brain-derived neurotrophic factor in substance use disorders: A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Depend.* 2018, Dec 1;193:91-103. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.08.036. Epub 2018 Oct 12.
- 84- Rovaris DL, Schuch JB, Grassi-Oliveira R, Sanvicente-Vieira B, da Silva BS, Walss-Bass C, Müller D, Stolf AR, von Diemen L, Ceresér KMM, Pianca TG, Szobot CM, Kessler FHP, Roman T, Bau CHD. Effects of crack cocaine addiction and stress-related genes on peripheral BDNF levels. *J Psychiatr Res.* 2017 Jul;90:78-85. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.02.011. Epub 2017 Feb 11.
- 85- Simchon Tenenbaum Y, Weizman A, Rehavi M. The Impact of Chronic Early Administration of Psychostimulants on Brain Expression of BDNF and Other Neuroplasticity-Related Proteins. *J Mol Neurosci.* 2015 Oct;57(2):231-42. doi: 10.1007/s12031-015-0611-9.
- 86- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 1993; 260:1130–1132.
- 87- Messer CJ, Eisch AJ, Carlezon, Jr WA, Whisler K, Shen L, Wolf DH, Westphal H, Collins F, Russell DS, Nestler EJ. Role for GDNF in Biochemical and Behavioral Adaptations to Drugs of Abuse. *Neuron.* 2000 Apr; 26(1): 247–257.
- 88- Lacagnina MJ, Rivera PD, Bilbo SD. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. *Neuropsychopharmacology.* 2017 Jan;42(1):156-177. doi: 10.1038/npp.2016.121. Epub 2016 Jul 11. Review
- 89- Kierdorf K, Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci.* 2013 Apr 23;7:44. doi: 10.3389/fncel.2013.00044.
- 90- Liu X, Bu H, Liu C, Gao F, Yang H, Tian X, Xu A, Chen Z, Cao F, Tian Y. Inhibition of glial activation in rostral ventromedial medulla attenuates mechanical allodynia in a rat model of cancer-induced bone pain. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2012 Apr;32(2):291-298. doi: 10.1007/s11596-012-0051-5.
- 91- Lau LT, Yu AC. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J Neurotrauma.* 2001 Mar;18(3):351-9.
- 92- Swift RM; Lewis DC. Farmacologia da dependência e abuso de drogas. In: Golan, D.E., TASHJIAN, A.H., ARMSTRONG, E.J., ARMSTRONG, A.W. *Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- 93- Russo SJ, Nestler EEJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2013. Set;14(9). doi: 10.1038/nrn3381.
- 94- W.H. Organization, Tobacco, 2020.

- 95- Benowitz NL. Cigarette smoking and nicotine addiction. *Med. Clin. N. Am.* 1992. 76 (2):415-437. Doi: 10.1016/S0025-7125(16)30360-1.
- 96- Tiwari RK, Sharma V, Pandey RK, Shukla SS. Nicotine Addiction: Neurobiology and Mechanism. *J. Pharmacopunct.* 2020. 23, p. 1.
- 97- Volkow ND. Tobacco addiction Research Report Series, 2009.
- 98- Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways *Trends Pharmacol. Sci.* 1992. 13:177-184. doi: 10.1016/0165-6147(92)90060-J.
- 99- Benowitz NL. Nicotine addiction. *N Engl J Med.* 2010. Jun 17; 362(24):2295-303. doi: 10.1056/NEJMra0809890.
- 100- Mansvelder HD, McGehee DS. Long-Term Potentiation of Excitatory Inputs to Brain Reward Areas by Nicotine. *Neuron.* 2000 Aug. 27(2): 349-357. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00042-8.
- 101- Dani JA, Biasi MD. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2001. Dec. 70(4): 439-446. doi: 10.1016/S0091-3057(01)00652-9.
- 102- Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction?. *Nature Neuroscience.* 2005. Oct 26. 8:1445-1449. doi: 10.1038/nm1578.
- 103- Fernandez MM. Historia del tabaco. De panacea a pandemia. *Med Clin* 2005. 125(19):745-747. doi: 10.1016/s0025-7753(05)72175-8.
- 104- Adeluyi A, Guerin L, Fisher ML, Galloway A, Cole RD, Chan SS, Wyatt MD, Davis SW, Freeman LR, Ortinski PI, Microglia morphology and proinflammatory signaling in the nucleus accumbens during nicotine withdrawal. *Science advances.* 2019. 5. eaax7031.
- 105- Azmy SM, Abd El fattah MA, Abd El-Rahman SS, Nada SA, Abdel Salam OME, El-Yamany MF, Nassar NN. Does nicotine impact tramadol abuse? Insights from neurochemical and neurobehavioral changes in mice. *Neurotoxicology.* 2018. 67:245-258.
- 106- Faheem A, Rehman K, Jabeen K, Akash MSH. Nicotine-mediated upregulation of microRNA-141 expression determines adipokine-intervened insulin resistance. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2020. 80, Article 103506.
- 107- Garrido R, King-Pospisil K, Son KW, Hennig B, Toborek M. Nicotine upregulates nerve growth factor expression and prevents apoptosis of cultured spinal cord neurons. *Neurosci. Res.* 2003. 47 (3):349-355.
- 108- Jamal M, Van der Does W, Elzinga BM, Molendijk ML, Penninx BW. Association between smoking, nicotine dependence, and BDNF Val66Met polymorphism with BDNF concentrations in sérum. *Nicotine Tobacco Res.* 2015. 17:323-329.
- 109- Jonnala RR, Terry AV, Buccafusco JJ. Nicotine increases the expression of high affinity nerve growth factor receptors in both in vitro and in vivo. *Life Sci.* 2002. 70 (13):1543-1554.

- 110- Kohno M, Link J, Dennis LE, McCready H, Huckans M, Hoffman WF, Loftis JM. Neuroinflammation in addiction: A review of neuroimaging studies and potential immunotherapies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2019. 179:34-42.
- 111- Makino A, Yamada S, Okuda K, Kato T. Nicotine involved in periodontal disease through influence on cytokine levels. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008. 52(2):282-286.
- 112- Motaghinejad M, Motevalian M, Fatima S, Faraji F, Mozaffari S. The neuroprotective effect of curcumin against nicotine-induced neurotoxicity is mediated by CREB–BDNF signaling pathway. *Neurochem. Res.* 2017. 42 (10):2921-2932.
- 113- Neves CDC, Lacerda ACR, Lima LP, Lage VKS, Balthazar CH, Leite HR, Mendonça VA. Different levels of brain-derived neurotrophic factor and cortisol in healthy heavy smokers. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2017 50 (12). doi:10.1590/1414-431x20176424.
- 114- Quintanilla ME, Morales P, Ezquer F, Ezquer M, Herrera-Marschitz M, Israel Y. Commonality of Ethanol and Nicotine Reinforcement and Relapse in Wistar-Derived UChB Rats: Inhibition by N-Acetylcysteine. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2018. 42 (10):1988-1999.
- 115- Royal W, Can A, Gould TD, Guo M, Huse J, Jackson M, Davis H, Bryant J. Cigarette smoke and nicotine effects on brain proinflammatory responses and behavioral and motor function in HIV-1 transgenic rats. *J. Neurovirol.* 2018. 24 (2):246-253.
- 116- Saravia R, Ten-Blanco M, Grande MT, Maldonado R, Berrendero F. Anti-inflammatory agents for smoking cessation? Focus on cognitive deficits associated with nicotine withdrawal in male mice. *Brain, behavior, and immunity.* 2019. 75:228-239.
- 117- Pedraz M, Araos P, García-Marchena N, Serrano A, Romero-Sanchiz P, Suárez J, Castilla-Ortega E, Mayoral-Cleries F, Ruiz JJ, Pastor A, Barrios V, Chowen JA, Argente J, Torrens M, de la Torre R, Rodríguez De Fonseca F, Pavón FJ. Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. *Front Psychiatry.* 2015 Feb. 16;6:17. doi:10.3389/fpsy.2015.00017. eCollection 2015.
- 118- Kohno M, Link J, Dennis LE, McCready H, Huckans M, Hoffman WF, Loftis JM. Neuroinflammation in addiction: A review of neuroimaging studies and potential immunotherapies. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019 Apr. 179:34-42. doi:10.1016/j.pbb.2019.01.007.
- 119- Lopes JB, Bastos JR, Costa RB, Aguiar DC, Moreira FA. The roles of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2020. Feb. 237(2):385-394. doi: 10.1007/s00213-019-05370-5.

ANEXO

O Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais aprovando o projeto.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 270/2018

Título do projeto: Estratégias terapêuticas em modelo experimental de adicção por cocaína.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Aline Silva de Miranda

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Morfologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 01/10/2018. Validade: 01/10/2018 à 30/09/2023

Belo Horizonte, 01/10/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br