

Informe final publicable de proyecto

Eje intestino-cerebro: papel de la microbiota intestinal en los efectos inducidos por cocaína

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_155832

Fecha de cierre de proyecto: 01/12/2022

ZUNINO ABIRAD, Pablo (Responsable Técnico - Científico)

LAGOS SMEJA, Patricia Friné (Investigador)

PICCINI FERRÍN, Claudia (Investigador)

PRIETO PORTA, José Pedro (Investigador)

SCORZA ARLO, Ma. Cecilia (Investigador)

URBANAVICIUS, Jessika Carolina (Investigador)

FABIUS CUKIERMAN, Sara (Investigador)

FERNÁNDEZ CIGANDA, Sofía Muriel (Investigador)

ABIN CARRIQUIRY, Juan Andres (Investigador)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"
(Institución Proponente) \\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA \\
FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

Resumen del proyecto

Estudios recientes muestran una relación entre la microbiota intestinal (MI) y el desorden de abuso de sustancias (SUD), sugiriendo la participación del eje bidireccional intestino-cerebro en la respuesta a drogas de abuso. Evidencias preclínicas mostraron que la administración sistémica de cocaína altera la MI, y que su depleción potencia las respuestas comportamentales inducidas por cocaína (efecto estimulante y reforzador). Nuestro grupo demostró recientemente que la exposición repetida a cocaína volatilizada (fumable), altera la estructura y diversidad de la MI en ratas, proponiendo la hipótesis de que la modulación de la MI atenuaría las respuestas inducidas por cocaína. En este proyecto investigamos el papel de la modulación de la MI sobre la sensibilización locomotora inducida por cocaína volatilizada. Ratas macho adultas recibieron una mezcla de cepas bacterianas (*L. johnsonii* ATCC-33200; *L. rhamnosus*-GG ATCC-53103; *L. reuteri* ATCC-23272) por vía oral durante 28 días, en los últimos 7 días fueron expuestos a cocaína volatilizada y finalmente se evaluaron parámetros comportamentales. La exposición a cocaína indujo un efecto estimulante progresivo (sensibilización locomotora) entre los días 1-5, que decae al día 7. Inesperadamente, la administración de las bacterias no previno el efecto sensibilizador de cocaína, sino que mantuvo la actividad locomotora elevada hasta el final. Los animales que recibieron bacterias y fueron expuestos a cocaína mostraron diferencias significativas en la estructura y composición de su MI respecto al control. Estos resultados sugieren que la MI se vincula con la actividad inducida por la combinación de bacterias y cocaína. Los mecanismos explorados (ácidos grasos de cadena corta, citoquinas, proteína Fos en núcleo accumbens y corteza prefrontal), podrían mediar cambios comportamentales, aunque serán necesarios estudios adicionales. Los resultados evidencian el papel del eje intestino-cerebro en la respuesta a cocaína y apoyan la hipótesis de la modulación de la MI como alternativa terapéutica para el tratamiento de SUD.

Ciencias Médicas y de la Salud / Ciencias de la Salud / Abuso de Sustancias / Microbioma y Salud Mental

Palabras clave: Eje intestino-cerebro / Microbiota intestinal / Cocaína /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Estudios recientes en la literatura muestran una conexión importante entre la microbiota intestinal (MI) y el desorden de abuso de sustancias (SUD), en particular a cocaína (Chivero et al. 2022; Wang et al. 2022). El tratamiento del SUD, continúa siendo un desafío para la salud mundial. La abstinencia, y algunas estrategias terapéuticas comportamentales se aplican en el tratamiento, aunque hasta el momento no existen estrategias farmacológicas exitosas, y ninguna garantizan la recuperación total de las personas. Se requieren con urgencia nuevas ideas para el tratamiento del SUD. Una estrategia innovadora la constituye la modulación de la MI, dado que varios trabajos han mostrado que el consumo de drogas de abuso genera modificaciones en la MI, o viceversa, que modificaciones en la MI, ocasionan una potenciación o atenuación de los efectos de las drogas de abuso (Kiraly et al. 2016; Chivero et al. 2019).

La MI es el conjunto de microorganismos que habitan en el intestino y que mantiene las funciones fisiológicas normales del huésped. Cambios en la composición de la MI impactan en la homeostasis corporal, la fisiología, perfil metabólico, y la vulnerabilidad a las enfermedades. A través del eje intestino-cerebro, la MI se comunica con el cerebro a través de los sistemas nerviosos autónomo, entérico y el sistema inmunológico, participando de la función cerebral. Los mecanismos de señalización entre intestino y cerebro se centran en sustancias neuroactivas, citoquinas, o fibras nerviosas a través del nervio vago (Cryan and Dinan, 2012; Scorza 2019a).

Este proyecto tuvo como punto de partida un estudio realizado por el grupo de investigación en colaboración entre el Departamento de Microbiología y de Neurofarmacología Experimental del IIBCE. En ese trabajo pudimos determinar, que la exposición de ratas a cocaína volatilizada durante 14 días indujo una disminución de la riqueza y la diversidad de la MI analizada en heces de los animales tratados, en relación a los controles. Dicho efecto se asoció con un aumento progresivo en la actividad locomotora de los animales (efecto tipo-sensibilización). Además, cuando se predijo el contenido funcional metagenómico (PICRUSt) de las comunidades bacterianas de los animales tratados, se observó una disminución dramática del gen de la L-aminoácido aromático decarboxilasa con respecto a los controles, sugiriendo una alteración en la neurotransmisión de las monoaminas (Scorza 2019b). Estos hallazgos concuerdan con otros estudios (González-Arancibia et al. 2019; Kiraly et al. 2016) y sugiere la idea de que la modulación de la MI podría ser una estrategia para atenuar los efectos inducidos por la cocaína en el SNC.

En base a todo lo expuesto, en el proyecto se planteó la hipótesis que existe una relación entre la MI, el intestino y el cerebro, capaz de mediar los efectos de las drogas de abuso. En particular, se propuso

que el tratamiento crónico con cocaína volatilizada inducía cambios comportamentales (efecto sensibilizador locomotor, aumento de ansiedad y de la respuesta de motivación-recompensa), las cuales se vinculan con cambios en la estructura, diversidad y función de la MI. Además, el tratamiento crónico con cocaína provoca respuestas pro-inflamatorias acompañadas de aumento de niveles de hormonas de estrés, y daño sobre la mucosa intestinal. La modulación de la MI ejercida por la administración de cepas de *Lactobacillus* spp. atenúa los efectos deletéreos asociados a la droga (comportamentales y de inflamación), lo que se refleja además, en el aumento de producción bacteriana de AGCC así como la estimulación del nervio vago que redundará en cambios en la expresión de c-Fos, en regiones del SNC.

Metodología/Diseño del estudio

I. Animales

Se emplearon ratas Wistar machos (250-300 gr) criadas y mantenidas en condiciones estándar en el Bioterio del IIBCE (22 ± 2 °C, ciclo de luz/oscuridad 07:00-19:00 h) de acuerdo a las condiciones éticas avaladas por el CEUA-IIBCE.

II. Drogas y cepa bacteriana

Cepa bacteriana:

Se emplearon las cepas *Lactobacillus johnsonii* ATCC 33200, *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272.

Cocaína Base:

Se usó cocaína base provista por el Instituto Técnico Forense con la autorización de la Comisión de Lucha contra las Toxicomanías del Ministerio de Salud Pública (Inv. Responsable: Dra. C. Scorza).

III. Esquema de tratamientos y grupos experimentales

1. Las bacterias liofilizadas de acuerdo a procedimientos ya empleados en estudios previos se administraron oralmente por ingestión voluntaria y controlada individualmente [Tillmann y Wegener, 2017]. Esta forma constituye una vía de administración no estresante para el animal y permite conocer con exactitud la dosis consumida. Se realizó el protocolo de adiestramiento reportado en el artículo. Este incluyó cuatro días de adiestramiento, manipulando directamente al animal, y posteriormente, la administración de la solución, a través de la caja, sin necesidad de levantar/manipular al animal. Las dosis diarias fueron de 1×10^8 unidades formadoras de colonias en 1 ml de PBS, durante 28 días consecutivos [Chen et al. 2015]. El grupo control recibió el vehículo estéril (vehículo I).

2. La exposición a la cocaína volatilizada se realizó utilizando la cámara inhalatoria (CI) de acuerdo a la metodología reportada en trabajos de nuestros grupos [Galvalisi et al. 2017].

Los animales se trataron durante 14 días (25 mg cocaína/día), comenzando 14 días después de iniciada la administración de las cepas bacterianas. Los animales del grupo control se colocaron en la CI sin droga (vehículo II).

Los grupos experimentales serán: 1) Bacterias + cocaína volatilizada; 2) "vehículo I" + cocaína volatilizada; 3) Bacterias + "vehículo II"; 4) "vehículo I" + "vehículo II"

IV. Modelos Comportamentales

1. Se utilizó el modelo de campo abierto (CA: 45x45x40 cm), una cámara de video y un software de video-seguimiento (Ethovision XT12) para registrar y analizar automáticamente los parámetros: distancia recorrida (m), velocidad (m/s), tiempo en movimiento, tiempo en centro y periferia [Urbanavicius et al., 2014]. Para simplificar la presentación de resultados, el parámetro que se asocia a la sensibilización comportamental es el de distancia recorrida [Prieto et al. 2015].

2. Se utilizó el modelo X-maze para evaluar la ansiedad experimental [Pellow et al. 1985]. El aparato consiste de dos brazos abiertos, BA (30 x 5 cm) y dos cerrados, BC (30x5x15 cm) formando una cruz, elevado 50 cm del piso. Un aumento de ansiedad se refleja en una disminución del tiempo de permanencia y número de entradas a los BA.

3. El TNF se realizó según lo descrito previamente por Urbanavicius et al. 2019. El aparato consistió en un tanque cilíndrico transparente (50 cm de altura y 20 cm de diámetro) lleno de agua ($24-25$ °C) hasta una profundidad de 34 cm (para permitir que las ratas nadaran o flotaran sin tocar el fondo del tanque con sus patas). Se aplicaron dos sesiones de nado experimental con un intervalo de 24 h. Las pautas comportamentales fueron puntuadas por un investigador experimentado en tiempo real durante 5 min [Porsolt et al., 1977].

V. Efecto per se de las cepas bacterianas luego de 28 días de administración

Los animales fueron administrados por vía oral con la mezcla de cepas bacterianas durante 28 días. El día 28, evaluamos de forma secuencial el efecto sobre la actividad locomotora en el CA, seguido del plus-maze y 24 hs. luego la conducta en el TNF.

VI. Análisis de microbiota fecal

Las heces se tomaron pasivamente de cada animal en forma individual en los días 0, 14 y 28 y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de su procesamiento. Se realizó la extracción de ADN total de las muestras de heces utilizando kits comerciales [Scorza et al. 2019]. El análisis de la composición de la MI se realizó por medio de secuenciación masiva de la región V4 del ARNr 16S bacteriano. El análisis bioinformático se realizó empleando el paquete DADA2 para analizar los datos obtenidos por la secuenciación masiva del gen ribosomal 16S, se asignó la taxonomía de los reads comparándola con la última versión de la base de datos Silva (versión 138). Las diferencias de alfa y beta diversidad entre las poblaciones bacterianas de los distintos grupos experimentales se analizaron utilizando el paquete phyloseq, y también las diferencias en abundancia de ASVs particulares entre grupos utilizando el paquete DESeq2 [Callahan et al. 2016].

VII. Evaluación de Fos en regiones del SNC

La detección de la proteína Fos mediante inmunohistoquímica se utilizó como marcador de actividad neuronal para el trazado neuroanatómico de circuitos y estudiar la acción de drogas psicoactivas [Gallo et al. 2018]. Luego de los ensayos comportamentales (día 28), los cerebros se procesaron para poner en evidencia la presencia de la proteína c-Fos [Tortorolo et al. 2009]. Los cortes obtenidos de los distintos sectores serán montados en láminas gelatinizadas y observados bajo microscopio óptico (Nikon E800). Las imágenes fueron fotografiadas y adquiridas a través de una cámara digital y analizadas mediante el programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics). Las regiones antero-posterior se eligieron de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2005) [Paxinos y Watson, 2005] y seleccionadas según las aferencias del nervio vago que alcanzan el SNC [González-Arancibia et al. 2019].

VIII. Ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces

La producción de AGCC (acético, propiónico y butírico) se cuantificó en las heces de los animales por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se inyectaron en un sistema de HPLC modular (Waters) y un detector de matrices de fotodiodos (Waters). Esta metodología es de uso corriente en el Depto. de Microbiología y la Plataforma de Servicios Analíticos (IIBCE) [Fraga et al. 2014].

IX. Cuantificación de indicadores de inflamación en plasma

Se midieron los niveles plasmáticos de citoquinas pro-inflamatoria (IL-6) y anti-inflamatoria (IL-10), por medio de kits comerciales de ELISA [Kiraly et al. 2016].

X. Análisis estadístico

Se utilizaron métodos paramétricos y/o no-paramétricos seguidos por el análisis post-hoc correspondiente. La significancia fue de $P < 0.05$.

Resultados, análisis y discusión

- Efecto per se de las cepas bacterianas luego de 28 días de administración

Con el fin de evaluar la actividad per se de las cepas bacterianas sobre el comportamiento animal, realizamos un experimento previo al combinado de las cepas bacterianas y el tratamiento de cocaína. Los animales fueron administrados por vía oral con la mezcla de cepas bacterianas durante 28 días. El día 28, evaluamos de forma secuencial el efecto sobre la actividad locomotora en el CA, seguido del plus-maze y 24 hs. luego la conducta en el TNF.

Figura 1. Efecto comportamental en el CA (A), plus-maze (B) y TNF (C) (ver adjunto).

La Figura 1A, muestra que el tratamiento no indujo cambios en la actividad locomotora. Tampoco se observaron diferencias significativas en el número de entradas a los brazos abiertos (BA) en el plus-maze (figura 1B). Otras conductas evaluadas en este modelo tales como tiempo de permanencia en el BA o head dipping tampoco se vieron afectadas, sugiriendo que este tratamiento no genera cambios en la ansiedad. En el TNF (figura 1C), no se evidenciaron diferencias en ninguno de los comportamientos evaluados. Los resultados sugieren que esta mezcla de bacterias no tendría un efecto ansiolítico/ansiogénico o tipo-antidepresivo en animales naïve. Sin embargo, desconocemos si el tratamiento produjo cambios en la MI, los que quizás podrían ser insuficientes para inducir cambios comportamentales evidentes en los test ensayados. Durante estos experimentos se recolectaron fecas en los días 0, 1 y 28. Estas muestras fueron almacenadas y en el futuro se analizarán para determinar si existen cambios en la MI que expliquen la ausencia de cambios comportamentales.

- Evaluación comportamental inducida por cocaína volatilizada y cepas potencialmente probióticas

El siguiente experimento se llevó a cabo con la combinación de las cepas bacterianas y el tratamiento repetido de cocaína volatilizada, de acuerdo a experimentos ya realizados por nuestro grupo (Scorza et al. 2019a). Los animales fueron administrados por vía oral con la mezcla de 3 cepas bacterianas o su vehículo durante 28 días (testeadas en su efecto per se en el primer ensayo), y del día 21 al 28, fueron expuestos durante 10 min a cocaína volatilizada (25 mg) o a la caja de volatilización pero sin exposición a la droga (grupo control; Galvalisi et al. 2017; Scorza et al. 2023). Inmediatamente después de cada exposición se evaluó la actividad locomotora en el CA durante 30 min. En los días 21 y 28, además, se registraron vocalizaciones ultrasónicas (VUS) durante 5 minutos. En el día 28, también se evaluó el comportamiento en el plus-maze.

Figura 2. Actividad locomotora evaluada en el CA (A) y evaluación de ansiedad experimental (B) a través del número de entradas y tiempo de permanencia en el BA y BC en el plus-maze (ver adjunto).

La Figura 2A muestra la actividad locomotora (distancia recorrida) durante el tratamiento con cocaína volatilizada. Encontramos que los animales del grupo bacterias/control no presentaron alteraciones en su actividad respecto al grupo control. Los animales tratados con cocaína (vehículo/cocaína) mostraron un aumento progresivo de la actividad, sugiriendo un efecto tipo-sensibilización locomotora del día 1 al día 5. En los días 6 y 7 esta actividad decae. Antecedentes previos de nuestro grupo demostraron que la exposición repetida (14 días) a cocaína volatilizada (25 mg), aumenta la actividad locomotora en el día 14 sugiriendo que la reducción observada en los días 6 y 7 podría ser un efecto transitorio. Sin embargo, otros fenómenos asociados al proceso adictivo tal como la tolerancia no pueden ser descartados. Nuevos experimentos serán necesarios para profundizar en la comprensión de este efecto. Los animales tratados con bacterias y expuestos a cocaína presentaron una actividad locomotora similar al grupo cocaína en los primeros 5 días y de manera interesante, esta actividad elevada se sostuvo hasta el día 7. Este resultado muestra que la combinación de las cepas bacterianas y cocaína provoca un efecto comportamental opuesto al esperado, aunque esperable de acuerdo a la hipótesis de trabajo del proyecto. En el plus-maze (Figura 2B), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Durante la realización de los experimentos se obtuvieron muestras de heces para el análisis de la MI.

- Análisis de la MI de ratas expuestas a cocaína volatilizada y cepas potencialmente probióticas

Una vez finalizado el experimento comportamental, se procedió a realizar el estudio de la microbiota intestinal de los animales tratados, mediante estudios de secuenciación genómica (Scorza et al. 2019a). Se realizó la extracción de ADN de las muestras de heces del día 28 de las ratas tratadas y se enviaron a secuenciar. Los resultados de secuenciación se analizaron con el paquete de RStudio - Dada2. Cabe destacar que este procedimiento implicó el adiestramiento en el manejo de estos datos de una de las estudiantes de Maestría del proyecto.

Las Figuras 3 y 4, y la Tabla 1 ilustran los resultados del análisis de la estructura y diversidad de la MI de los animales tratados (ver adjuntos).

Figura 3. Índices de diversidad alfa (diversidad de grupos taxonómicos dentro de cada muestra o comunidad) de la microbiota intestinal de rata. Los diagramas de caja muestran las medias, los rangos y los valores atípicos de cada índice de diversidad alfa, y la comparación entre los tratamientos calculados para las comunidades bacterianas obtenidas de las heces. Prueba de Kruskal-Wallis (ver adjuntos).

Tabla 1. Análisis de diversidad beta (evalúa cambios entre diferentes comunidades). Comparación de tratamientos usando PERMANOVA basado en distancias Bray-Curtis el día 28 (T28). * = $P < 0.05$. N.S = no significativo.

Figura 4. Abundancias diferenciales de la variante de secuencia del amplicón bacteriano (ASV) calculadas con el paquete {DESeq2} comparando el grupo Bacteria/Cocaína con el grupo Control (A), Bacteria (B) y Cocaína (C). Un valor positivo de \log_2 FoldChange significa que la ASV es significativamente más abundante en el grupo Bacteria/Cocaína en comparación con los otros grupos, y viceversa. Los paréntesis rectos rojos indican la disminución de las ASV bacterianas compartidas entre los tres tratamientos en comparación con el grupo Bacteria/Cocaína. Las flechas rojas muestran un ASV aumentado en el grupo Bacteria/Cocaína en comparación con los otros grupos.

La Figura 3 muestra cuatro índices de diversidad alfa (la cual representa la diversidad presente dentro de una misma muestra

o comunidad). No se encontraron cambios en ninguno de los índices presentados en los distintos tratamientos. Sin embargo, al analizar la diversidad beta (parámetro que indica cambios entre diferentes comunidades), se encontraron diferencias significativas entre los animales del grupo Bacterias/Cocaína respecto al control, al grupo bacteria y tiende a diferir respecto al grupo cocaína (Tabla. 1). A su vez, al analizar cuáles eran las bacterias que cambiaron en el grupo Bacterias/Cocaína respecto a los demás grupos (Fig. 4), se encontraron distintas ASVs que estarían disminuidas en todos los grupos respecto a Bacterias/Cocaína y otras que estarían aumentadas. Este conjunto de resultados podría sugerir que el grupo Bacterias/Cocaína tiene una MI distinta a los demás grupos experimentales y esos cambios podrían estar implicados en la actividad motora sostenida que se observó en el comportamiento.

- Avances en la evaluación de los mecanismos descritos en la interacción intestino-cerebro

a) Ácidos grasos de cadena corta:

En primer lugar, evaluamos la capacidad de los tratamientos de modificar los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como uno de los mecanismos de interacción del eje intestino-cerebro. La Figura 5 muestra los resultados obtenidos del análisis de los ácidos grasos de cadena corta, a dos tiempos de análisis.

Figura 5 A-F. Niveles de AGCC en fecas analizados en fecas a tiempo 0 (T0) y a tiempo final (TF, día 28) (ver adjunto).

Los datos muestran que no parece haber cambios significativos en los AGCC de cada tratamiento y en cada tiempo analizado, que acompañen los resultados observados en el fenómeno de sensibilización comportamental.

Se realizaron otras comparaciones, que se grafican en la Figura 6 A-C.

Figura 6 A-C. Comparación entre tiempo 0 y tiempo final para cada uno de los AGCC (ver adjuntos).

Al comparar cada tratamiento en relación al tiempo 0 vs. tiempo final, encontramos un cambio interesante. Se observó que el ácido propiónico disminuye significativamente en el grupo tratado con cocaína al final del tratamiento. Interesantemente, existen evidencias que relacionan al ácido propiónico con la modulación de la expresión del CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript; Zhang et al. 2022), un péptido hipotalámico vinculado al efecto de drogas psicoestimulantes como cocaína o anfetamina. La función de CART está asociada a la homeostasis, recompensa, ansiedad, estrés (Job, 2016). Este cambio sugiere que el ácido propiónico podría ser uno de los intermediarios en la interacción entre los cambios en la MI y el comportamiento inducido por cocaína. Futuros experimentos deberán realizarse para profundizar en dicha relación.

b) Citoquinas

Las citoquinas, son factores clave en la respuesta inmune; juegan un papel fundamental en el control y modulación de las respuestas inflamatorias locales y sistémicas, manteniendo un equilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. La interleuquina-6 (IL-6) es una de las citoquinas proinflamatorias activada en el proceso inmunitario innato, y como consecuencia está relacionada con una activación de la microglía. La interleuquina-10 (IL-10) es uno de los factores antiinflamatorios endógenos más importantes producidos por el organismo (Moreira et al. 2016).

En este experimento se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de niveles plasmáticos de IL-6 e IL-10 en los grupos tratados de animales. Cabe señalar que estos experimentos permitieron el adiestramiento de una de las estudiantes de Maestría en el ensayo.

La Figura 7 muestra los resultados de los niveles plasmáticos de citoquinas (ver adjunto).

Figura 7 A-C. Niveles plasmáticos de citoquinas IL-6 e IL-10 para cada tratamiento.

Si bien no se registran diferencias significativas entre los tratamientos, se observa una tendencia a un aumento en la producción de IL-6 en animales tratados con cocaína. Este resultado concuerda con lo reportado por la literatura para las drogas psicoestimulantes y las citoquinas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias, ya sea a nivel clínico y preclínico (Lacagnina et al. 2017). Futuros experimentos deberán ser realizados para complementar el resultado de la combinación de bacterias y

cocaína debido a la elevada variabilidad de los niveles de citoquinas entre individuos.

d) Expresión de c-fos en regiones NAcc y PFC.

La detección de la proteína Fos (como producto de lgen de expresión temprana c-fos) mediante inmunohistoquímica se utiliza como marcador de actividad neuronal (Gallo et al. 2018) para el trazado neuroanatómico de circuitos y estudiar la acción de drogas psicoactivas. La activación celular inicia una serie de eventos intracelulares que llevan a la excitación neuronal y modulación en la expresión de proteínas (ej. receptores dopaminérgicos). El aumento en la marca de la proteína Fos refleja los cambios neurobiológicos adaptacionales que subyacen a la sensibilización con cocaína (Brenhouse et al. 2006).

De acuerdo a los antecedentes planteados en el proyecto, la activación de circuitos neurales que subyacen a los efectos del tratamiento repetido con cocaína podría deberse a una acción directa sobre el sistema nervioso central (Volkow et al. 2009), preferentemente en regiones del circuito motivacional (ej. núcleo accumbens), o una acción indirecta vía activación del nervio vago (González-Arancibia et al 2019).

Las figuras 8, 9 y 10 muestran los resultados del análisis inmunohistoquímico cualitativo, realizado en uno de los núcleos principales asociados con el efecto reforzador y sensibilizador de la cocaína (Núcleo accumbens) (ver adjunto).

El análisis fue realizado en dos subdivisiones: núcleo accumbens core y shell. Los resultados muestran que se puede apreciar la marca constitutiva en los animales controles, no parece haber cambios sustanciales con el tratamiento de las cepas bacterianas, ni con cocaína. Sin embargo, hay un aparente aumento en la señal positiva para la expresión de la proteína Fos (Fig. 9 y 10) que podría indicar que la combinación de ambos tratamientos (cocaína y cepas bacterianas), esté afectando la excitación neuronal. Este aumento debe confirmarse con más cantidad de ensayos, aunque podría especularse, que se asocia con el cambio comportamental observado en los animales con la combinación de tratamientos.

Conclusiones y recomendaciones

El pretratamiento con las cepas bacterias *Lactobacillus johnsonii* ATCC 33200, *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272 no previno la sensibilización comportamental inducida por cocaína, sino que sostuvo el efecto potenciador hasta el día 7. Este resultado se acompañó de una alteración significativa en la diversidad beta de la microbiota intestinal (MI) y patrones de enriquecimiento de ASVs, sugiriendo que cambios en la MI subyacen a los efectos comportamentales inducidos por la exposición a la cocaína.

La administración oral crónica (28 días en este caso) de las bacterias seleccionadas, tuvo la capacidad de generar cambios en la MI intestinal y modular el eje MI-intestino-cerebro.

Los resultados comportamentales podrían acompañarse de algunos de los cambios en la actividad neural, en los ácidos grasos de cadena corta, y citoquinas

Otras cepas bacterianas deberán ser seleccionadas y testeadas con el fin de encontrar nuevas candidatas como estrategia terapéutica basada en bacterias para el tratamiento de SUD.

Investigación adicional deberá ser llevada a cabo para confirmar el valor traslacional que estos resultados puedan tener en intervenciones terapéuticas en el desorden de abuso de sustancias en humanos.

Los resultados de este proyecto refuerzan el concepto de que la modulación de la microbiota intestinal podría estar involucrada en desórdenes del sistema nervioso central, como la adicción a drogas de abuso, y por ende ser utilizada como una estrategia terapéutica.

Referencias bibliográficas

- Brenhouse HC, Stellar JR. c-Fos and deltaFosB expression are differentially altered in distinct subregions of the nucleus accumbens shell in cocaine-sensitized rats. *Neuroscience*. 137:773-780. 2006.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 13:581-583. 2016.
- Chen D, Yang Z, Chen X, Huang Y, Yin B, Guo F, Zhao H, Huang J, Wu Y, Gu R. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* hsryfm 1301 on the Gut Microbiota and Lipid Metabolism in Rats Fed a High-Fat Diet. *J Microbiol Biotechnol*. 25:687–695. 2015.
- Chivero ET, Ahmad R, Thangaraj A, Periyasamy P, Kumar B, Kroeger E, Feng D, Guo ML, Roy S, Dhawan P, Singh AB, Buch S. Cocaine Induces Inflammatory Gut Milieu by Compromising the Mucosal Barrier Integrity and Altering the Gut Microbiota Colonization. *Sci Rep*. 9:12187. 2019.
- Chivero ET, Sil S, Kumar M, Buch S. Substance use, microbiome and psychiatric disorders. *Pharmacol Biochem Behav*. 219:173432. 2022.
- Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 13:701-712. 2012.
- Fraga, M., Perelmuter, K., Valencia, M.J. et al. Evaluation of native potential probiotic bacteria using an in vitro ruminal fermentation system. *Ann Microbiol* 64:1149-1156. 2014.
- Gallo FT, Kathe C, Morici JF, Medina JH, Weisstaub NV. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Front Behav Neurosci*. 12:79. 2018.
- Galvalisi M, Prieto JP, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Scorza C. Caffeine Induces a Stimulant Effect and Increases Dopamine Release in the Nucleus Accumbens Shell Through the Pulmonary Inhalation Route of Administration in Rats. *Neurotox Res*. 31:90-98, 2017.
- González-Arancibia C, Urrutia-Piñones J, Illanes-González J, Martinez-Pinto J, Sotomayor-Zárate R, Julio-Pieper M, Bravo JA. Do your gut microbes affect your brain dopamine? *Psychopharmacology (Berl)*. 236:1611-162. 2019.
- Job MO. Chapter 20 - Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CART) Peptide and Drug Addiction, Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse. Vol 3: General Processes and Mechanisms, Prescription Medications, Caffeine and Areca, Polydrug Misuse, Emerging Addictions and Non-Drug Addictions, 196-205. 2016.
- Kiraly DD, Walker DM, Calipari ES, Labonte B, Issler O, Pena CJ, Ribeiro EA, Russo SJ, Nestler EJ. Alterations of the Host Microbiome Affect Behavioral Responses to Cocaine. *Sci Rep*. 6:354552016. 2016.
- Lacagnina MJ, Rivera PD, Bilbo SD. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. *Neuropsychopharmacology*. 42:156-177. 2017.
- 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*. 158:181-185. 2016
- Paxinos, G. and Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Compact 6th Edition, Academic Press, New York, 400. 2005.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in

the rat. *J Neurosci Methods*. 14:149-67. 1985.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 229:327-336. 1977.

Prieto JP, Galvalisi M, López-Hill X, Meikle MN, Abin-Carriquiry JA, Scorza C. Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *Am J Addict*. 24:475-481. 2015.

Scorza C, Piccini C, Martínez Busi M, Abin Carriquiry JA, Zunino P. Alterations in the Gut Microbiota of Rats Chronically Exposed to Volatilized Cocaine and Its Active Adulterants Caffeine and Phenacetin. *Neurotox Res*. 35:111-121. 2019b.

Scorza C, Piccini C, Zunino P. Microbiota intestinal, probióticos y salud mental. *Rev Psiquiatr Urug* 83: 33-42. 2019a.

Scorza C, Prieto JP, Fabius S, Galvalisi M. Pulmonary Inhalation to Assess Effects of Coca Paste on Behavior and Dopamine Neurotransmission. In: Fuentealba-Evans, J.A., Henny, P. (eds) *Dopaminergic System Function and Dysfunction: Experimental Approaches*. *Neuromethods*, vol 193. Humana, New York, NY, 2023.

Skosnik PD, Cortes-Briones JA. Targeting the ecology within: The role of the gut-brain axis and human microbiota in drug addiction. *Med Hypotheses*. 93:77-80. 2016.

Tillmann S, Wegener G. Syringe-feeding as a novel delivery method for accurate individual dosing of probiotics in rats. *Benef Microbes*. 9: 311-315. 2018.

Torterolo P, Benedetto L, Lagos P, Sampogna S, Chase MH. State-dependent pattern of Fos protein expression in regionally-specific sites within the preoptic area of the cat. *Brain Res*. 1267: 44-56. 2009.

Urbanavicius J, Lagos P, Torterolo P, Scorza C. Prodepressive effect induced by microinjections of MCH into the dorsal raphe: time course, dose dependence, effects on anxiety-related behaviors, and reversion by nortriptyline. *Behav Pharmacol*. 25: 316-324. 2014.

Urbanavicius J, Fabius S, Roncalho A, Joca S, Torterolo P, Scorza C. Melanin-concentrating hormone in the Locus Coeruleus aggravates helpless behavior in stressed rats. *Behav Brain Res*. 374: 112120. 2019.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology* 56(Suppl. 1) 3-8. 2009.

Wang Z, Hou Ch, Chen L, Zhang M, Luo W. Potential roles of the gut microbiota in the manifestations of drug use disorders. *Frontiers in Psychiatry*. 13:1046804. 2022.

Zhang Y, Li X, Huang G, Wang H, Chen H, Su Y, Yu K, Zhu W. Propionate stimulates the secretion of satiety hormones and reduces acute appetite in a cecal fistula pig model. *Anim Nutr*.10:390-398. 2022.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)