

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE PSICOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Efectos protectores de la oleoiletanolamida en el eje intestino-
cerebro en un modelo de consumo de alcohol en atracón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alicia Rodríguez González

Directora

Laura Orío Ortiz

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE PSICOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS PROTECTORES DE LA OLEOILETANOLAMIDA EN EL EJE INTESTINO-
CEREBRO EN UN MODELO DE CONSUMO DE ALCOHOL EN ATRACÓN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alicia Rodríguez González

DIRECTORA

Laura Orío Ortiz

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora, **Laura Orío**, la oportunidad de poder hacer esta Tesis Doctoral, por haber confiado en mí y haberme entregado su tiempo y su dedicación, así como por haberme enseñado y apoyado tanto. Muchas gracias, sin ti no hubiera sido posible.

Quiero continuar dando las gracias a **Raquel Gómez de Heras**, ya que, entre otras muchas cosas, hizo posible que al menos 2 años de la Tesis Doctoral fueran remunerados. A **Patxi Alén** por endulzarme un poco este camino con sus dulces y charlas. A **María Antón** por enseñarme tantas cosas y recordarme lo importante que es la presencia de un postdoctoral en un laboratorio, ya que sin tu ayuda hubiera tardado más en aprender y habría errado mucho más. A **Noemí Blanco**, por esos ratos en los que compartíamos nuestras penas y alegrías de la vida. A **Eva Luna Piñel**, por tu apoyo y escucha sobre todo en los últimos meses, en los que nuestros caminos se han juntado más que nunca. No me olvido de las risas con **Víctor Echeverry**, **Javier Calleja** y **Lucía Segovia** tanto dentro como fuera del lab. También quiero dar las gracias a todos los estudiantes de Grado y de Máster que han pasado por el laboratorio y me han ayudado así como enseñado lo mucho que me gusta enseñar.

Después quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio su ayuda para poder realizar esta Tesis. **Leticia López** y **Berta Escudero**, fuisteis las últimas en llegar, pero ha sido un verdadero placer compartir momentos científicos y no científicos con vosotras, gracias por vuestra ayuda y por confiar en mí, así como por vuestras bonitas palabras siempre. **Antonio Ballesta**, millones de gracias por esas noches de “botellón” con las ratas, sin tu ayuda y generosidad no hubiera podido hacer los experimentos de esta Tesis, y no se me ocurre mejor compañero de aventuras entre biberones y jeringas. Gracias también por aguantarnos a Marta y a mí y por soportar esas horas de “tortura” escuchando reguetón en los sacrificios. Y por último, **Marta Moya**, gracias por aparecer en mi vida, por ser tan buena compañera, estar siempre dispuesta a ayudarme en todo, así como tus bonitas palabras siempre; pero sobre todo gracias por el intercambio de “podcasts” de 10 minutos de audio por WhatsApp casi todas las semanas, gracias Amiga. Los tres hemos formado un gran bio-equipo y hemos compartido muchas horas de risas y lágrimas de alegría. Desde luego, recorrer este camino con compañeros como vosotros ha sido un lujo.

Quiero continuar agradeciendo al laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina por su inestimable apoyo tecnológico. En primer lugar, a su investigador principal, **Juan Carlos Leza**, por hacerlo posible, y a **Borja García-Bueno** y **Javier Caso** por sacarme siempre una sonrisa y por reírse de mi disfraz de *Darth Vader* en cada experimento. También quiero agradecer a todos los miembros del equipo su ayuda y recibirme siempre con una sonrisa en el lab.

También quiero agradecer a **Beatrice Passani** que me acogiera en su laboratorio en Florencia, y que me brindara la oportunidad de colaborar con 3 laboratorios diferentes y conocer

a gente tan maravillosa como **Simone Li Puma**. Gracias por las risas y conversaciones profundas en esa mezcla de italiano e inglés. Me has demostrado que el idioma no es una barrera para la amistad. *Mi manchi un sacco*.

Al grupo de investigación dirigido por **María Isabel Colado** en la Facultad de Medicina también quiero agradecer el tiempo en el que tuve el placer de estar aprendiendo durante mis prácticas del Máster junto con todos sus integrantes.

No me olvido del tiempo que estuve en el Hospital de la Princesa y de todas esas personas que conocí allí, en especial a su investigador principal, **Miguel Vicente-Manzanares**. Gracias por acompañarme en mis primeros pasos durante las prácticas del Grado y enseñarme la cruda realidad de la Tesis.

A mis Bioquímicas preferidas **Amaia, Marta e Inés**, les quiero agradecer su compañía tanto durante la carrera que me enseñó a pensar como ahora lo hago, y también por las veces que nos hemos visto desde que terminamos que han hecho más llevadero el camino de la Tesis compartiendo nuestras alegrías y frustraciones. Gracias guapis.

Quiero agradecer también a mis Amigos, especialmente a mis **Lauras, Beas, Gracia, Patxi y María**, que sin tener muy claro qué hacía, siempre se han prestado a escucharme y apoyarme. Gracias por todos esos días que hemos ido a cenar, a bailar o a arreglar el mundo. Han hecho este camino mucho más llevadero.

Quiero continuar dando las gracias a toda mi **familia**. Pero en especial a mis padres, por su constante apoyo y por concederme durante todos y cada uno de los años que ha durado esta Tesis la mejor beca del mundo: la beca *Rodríguez-González*. **Papá**, gracias por todas las veces que con nocturnidad (pero sin alevosía) me has llevado al animalario para poder hacer los experimentos. **Mamá**, gracias por ese “atracón” de Tesis (y de risas) que nos dimos para revisarla. A mi hermano **Javier** y a mi cuñada **Laura**, gracias por vuestros consejos y por ser mi ejemplo a seguir en tantos aspectos.

A mi compañero de vida, **David**, gracias por tu eterna espera, apoyo y comprensión. Gracias también por confiar en mí hasta cuando ni yo misma lo hago. Ojalá pudiera mirarme a través de tus ojos. Te quiero.

Por último, quiero darme las gracias a **mí** misma por mi trabajo, mi paciencia y resiliencia durante estos años.

“Todas las enfermedades comienzan en el intestino”

Hipócrates (460 a. C. – 370 a. C.)

ÍNDICE

Abreviaturas.....	14
I) RESUMEN Y ABSTRACT.....	18
1. RESUMEN	20
2. ABSTRACT	22
II) INTRODUCCIÓN.....	26
1. EJE MICROBIOTA- INTESTINO-CEREBRO: EL PSICOMICROBIOMA.....	28
1.1 La microbiota intestinal.....	29
1.2 Vías de comunicación del eje intestino-cerebro	34
1.3. La barrera intestinal	38
1.4. La barrera hematoencefálica	47
2. ALCOHOL	54
2.1. El alcohol altera el eje microbiota-intestino-cerebro	57
2.1.1 Alteraciones en la microbiota e intestino.....	57
2.1.2 Alteraciones en la BHE y neuroinflamación	60
2.1.3 Alteraciones en el comportamiento	62
2.2 El consumo de alcohol en atracón	63
3. OEA.....	70
3.1 El papel de la OEA en las enfermedades neuropsiquiátricas y en el trastorno por uso de sustancias.....	74
III) HIPÓTESIS	80
IV) OBJETIVOS	84
V) MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
1. Animales.....	92
2. Administración de alcohol y compuestos	92
3. Medida de niveles de alcohol en sangre y recogida de muestras biológicas.....	94
4. Recogida de heces y extracción del DNA genómico bacteriano	95
5. Preparación de amplicones de los genes del rRNA 16S y secuenciación	96
6. Estudios de translocación bacteriana.....	97
7. Western blot	97
8. Extracción de RNA y RT-qPCR.....	99
9. Niveles de LPS en plasma	101
10. Niveles de IgA e IgM en colon y plasma.....	102

11. Medida de las citoquinas proinflamatorias.....	103
12. Medida de los niveles de nitritos.....	103
13. Medida de concentración total de proteínas	104
14. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión.....	104
15. Pruebas de comportamiento.....	105
15.1. Test de preferencia a la sacarina	105
15.2. Test del laberinto en cruz elevado.....	106
15.3. Test de natación forzada	106
16. Estadística	107
<u>VII) RESULTADOS</u>	<u>112</u>
1. EFECTOS GENERALES DEL MODELO DE CAA	114
2. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA/STUDY ABOUT MICROBIOTA.....	114
2.1 Effects of alcohol binges on gut microbiota profile	115
2.2 Effects of OEA treatment on gut microbiota profile	119
2.3 Effects of different routes of OEA administration on alcohol-induced dysbiosis	123
3. ESTUDIO DE LA BARRERA INTESTINAL	126
3.1 Estudio inicial sobre permeabilidad de bacterias.....	126
3.2 Inflamación colónica.....	129
3.3 Niveles de IgM e IgA en colon y plasma	132
3.4 Las uniones estrechas en el colon	134
3.5 Ultraestructura de las uniones estrechas del colon	137
3.6 Marcadores apoptóticos en el colon	140
3.7 Translocación bacteriana a los GLMs.....	142
4. ESTUDIO DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	147
4.1 La barrera hematoencefálica de la corteza frontal	147
4.2 La barrera hematoencefálica del hipocampo.....	148
4.3 Neuroinflamación en el hipocampo.....	150
5. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO	151
5.1 Evaluación del comportamiento motivacional.....	152
5.2 Evaluación del estado ansioso	153
5.3 Estudio el comportamiento depresivo	155
<u>VII) DISCUSIÓN.....</u>	<u>160</u>
1. EFECTOS EN LA MICROBIOTA	162
2. EFECTOS EN LA BARRERA INTESTINAL	167

3. EFECTOS EN LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	175
4. EFECTOS EN EL COMPORTAMIENTO.....	178
5. DISCUSIÓN GLOBAL, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	180
<u>VIII) CONCLUSIONES / CONCLUSIONS</u>	<u>190</u>
1. CONCLUSIONES.....	192
2. CONCLUSIONS	193
<u>IX) REFERENCIAS.....</u>	<u>196</u>
<u>X) ANEXOS.....</u>	<u>216</u>

Abreviaturas

ABD: *alcohol binge drinking*

ABDH4: A/B-hidrolasa 4

AJ: uniones adherentes

AUD: *alcohol use disorder*

ATP: adenosín trifosfato

ASV: *amplicon sequence variant*
(variantes de secuencia de amplicones).

BHE: barrera hematoencefálica

BDNF: factor neurotrófico
derivado del cerebro

CAA: consumo de alcohol en
atracción

COX: ciclooxygenasa

DAMPS: moléculas asociadas a
daño celular

DID: *drinking in the dark*

DSM V: Manual Diagnóstico y
Estadístico de los Trastornos
Mentales. 5ª edición

LD: límite de detección

EEM: error estándar de la media

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato
deshidrogenasa

GFM: ratones libres de gérmenes

GLMs: ganglios linfáticos
mesentéricos

g.l: grados de libertad.

GPR55: Receptores acoplados a
proteína G 55

HMGB1: proteína de alta
movilidad del grupo de caja 1

HHA: hipotálamo-hipófisis-
adrenal

FAAA: ácido graso amido
hidrolasa

FXR: receptor X fernesioide

i.g.: intragástrico

i.p.: intraperitoneal

Ig: inmunoglobulina

TRPV1: receptor de vanilloides
tipo 1

IκBα: proteína inhibidora de
IκappaB-alfa

IL: interleuquina

iNOS: óxido nítrico sintasa
inducible

JAM: moléculas de unión por
adhesión

LEfSe: *Linear discriminant analysis
effect size*

LPS: lipopolisacárido

LRC: líquido cefalorraquídeo

MAMPS: moléculas asociadas a microbios

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1

MDA: malondialdehído

MYD88: factor de diferenciación mieloide 88

NAAA: N-acil etanolamina-hidrolizante ácido amidasa

NAEs: N-aciletanolamidas

NAPE: N-acil fosfatidiletanolamina

NAPE-PLD: NAPE- fosfolipasa D

NAT: N-acil transferasa

NF- κ B: factor nuclear de transcripción *kappa B*

OEA: oleoiletanolamida

PAMPS: moléculas asociadas a patógenos

PCoA: *Principal Coordinates Analysis*

PEA: N-palmitoiletanolamida

PPAR: Receptor activado por proliferación de peroxisomas

PRR: receptor de reconocimiento de patrones

REG3: proteína derivada de islotes en regeneración 3

ROS: especies reactivas del oxígeno

SCFA: ácidos grasos de cadena corta.

SNC: sistema nervioso central

TJ: uniones estrechas

TUA: trastorno por uso de alcohol

TUS: trastorno por uso de sustancias

TLRs: Receptores tipo Toll

TRPV1: receptor de vanilloides tipo 1

TNF- α : factor de necrosis tumoral

UFC: unidad formadora de colonias

ZO: zona occludens

I) RESUMEN Y ABSTRACT



1. RESUMEN

Título: Efectos protectores de la oleoiletanolamida en el eje intestino-cerebro en un modelo de consumo de alcohol en atracón

Introducción: El consumo de alcohol en atracón (CAA) es un patrón de consumo de esta droga cada vez más practicado por jóvenes y adultos, que consiste en tomar 5 o más unidades de bebida estándar en hombres y 4 o más en el caso de las mujeres, en aproximadamente 2 horas. Este patrón de consumo produce graves daños en el organismo, altera el comportamiento y trae como consecuencia grandes costes socioeconómicos. Existe un gran interés científico por conocer los efectos del CAA en el organismo, incluyendo su acción en el cerebro y en otros órganos y su relación con alteraciones en la conducta, ya que se sabe que el CAA es un factor que predispone al desarrollo de un Trastorno por Uso de Alcohol (TUA).

Estudios previos han demostrado que en modelos animales de CAA se produce una fuerte activación del sistema inmune innato, neuroinflamación en la corteza frontal, así como una elevación en los niveles plasmáticos de lipopolisacárido (LPS), que es un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas altamente proinflamatorio. Esta neuroinflamación se relaciona con conductas asociadas a la abstinencia como el comportamiento tipo depresivo o la anhedonia. En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que un pretratamiento con oleoiletanolamida (OEA) antes de cada atracón de alcohol era capaz de prevenir la neuroinflamación en la corteza frontal; el pretratamiento con OEA también reduce el consumo de alcohol y la recaída por claves contextuales en otros modelos de alcohol y además es beneficioso para tratar los aspectos físicos de la abstinencia, como las vocalizaciones y temblores. Sin embargo, se desconocen en gran medida los mecanismos por los que la OEA ejerce su acción protectora frente a la neuroinflamación y la posible modulación de conductas emocionales/motivacionales en la abstinencia de alcohol.

Se sabe que existe una comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro que podría regular el desarrollo del sistema nervioso, el estado de ánimo, el estrés, las emociones, la cognición y ciertos comportamientos, mediante vías inmunes, endocrinas, neurales y metabólicas. Así, se ha demostrado con diferentes grados de evidencia, que la microbiota podría

estar implicada en enfermedades y trastornos del sistema nervioso central, como la ansiedad y depresión.

La OEA fue descubierta como una sustancia endógena cuya síntesis en el intestino es capaz de regular funciones eminentemente cerebrales como la saciedad. Esta circunstancia, junto con el creciente auge del estudio de la influencia del eje intestino-cerebro en la regulación de ciertos trastornos cerebrales, motivaron los objetivos de la presente Tesis Doctoral. En este sentido, el estudio de los efectos de la OEA como agente protector en el CAA y regulador de la conducta podrían extenderse más allá de su acción en el cerebro.

Objetivos: evaluar los efectos que el CAA provoca en el eje microbiota-intestino-cerebro, así como explorar los mecanismos de acción de la OEA en dicho eje, a través del estudio de las alteraciones en la microbiota y en la barrera intestinal, las alteraciones en la barrera hematoencefálica (BHE) y en el estado motivacional y/o emocional en la abstinencia.

Resultados: Mediante un modelo animal en ratas Wistar macho de CAA inducido por administraciones intragástricas repetidas de alcohol durante 4 días observamos que el CAA alteró el eje intestino-cerebro: alteró la microbiota intestinal, produjo inflamación colónica así como un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal favoreciendo la translocación bacteriana y de componentes altamente inflamatorios como el LPS; además, el CAA afectó a los niveles de algunas proteínas que forman la BHE de la corteza frontal, área donde el CAA produce neuroinflamación, pero no afectó al hipocampo; y, finalmente, estas acciones se relacionaron con comportamientos de tipo depresivo y anhedónico en la abstinencia temprana. El pretratamiento con OEA antes de cada administración de alcohol previno parcialmente estos efectos inducidos por el CAA: aunque no produjo alteraciones consideradas “beneficiosas” en la composición de la microbiota intestinal, sí previno parcialmente la inflamación y la alteración de la barrera intestinal originada por el CAA, el paso de LPS a plasma, y la translocación de bacterias a los ganglios linfáticos mesentéricos; a nivel cerebral, la OEA (que previene la neuroinflamación cortical) no previno las alteraciones de la BHE en la corteza frontal, pero sí tuvo una acción moduladora positiva de la anhedonia y el comportamiento tipo depresivo durante la abstinencia temprana.

Conclusión: El pretratamiento con OEA durante el CAA es capaz de prevenir ciertas alteraciones del eje intestino-cerebro inducidas por este patrón de consumo de alcohol, en especial el daño en la barrera intestinal, la activación del sistema inmune innato y adaptativo y la regulación de la anhedonia y del comportamiento de tipo depresivo en la abstinencia temprana (junto con la conocida acción protectora sobre la neuroinflamación de la corteza frontal). Estos resultados sugieren que la OEA podría ser usada en un futuro como tratamiento coadyuvante, junto con la terapia psicológica, para prevenir los efectos nocivos del consumo de alcohol.

2. ABSTRACT

Title: Protective effects of oleoylethanolamide in the gut-brain axis in a model of alcohol binge drinking.

Introduction: Alcohol binge drinking (ABD) is a pattern of alcohol abuse increasingly practiced by young and adult people defined as the consumption of 5 or more drinks for men or 4 or more drinks for women in about 2 hours. This pattern causes profound damages in the body, alters the behavior and promotes a high socioeconomic impact. There is a profound scientific interest in increasing the knowledge regarding the effects of ABD in the brain and other organs and its relation to behavioral changes, as it is known that ABD is a predisposing factor to the development of an Alcohol Use Disorder (AUD).

Previous studies have observed that in ABD animal models there is an activation of the innate immune system, neuroinflammation of the frontal cortex and an increment of plasmatic lipopolysaccharide (LPS), a cell wall component of Gram-negative bacteria. The neuroinflammation has been linked to behaviors associated with the abstinence, such as depressive and anxiety-like behaviors. In previous studies in our laboratory, it has been observed that the pretreatment with oleoylethanolamide (OEA) before each alcohol binge prevented the frontal cortex neuroinflammation; OEA pretreatment was also effective reducing alcohol drinking and cue-induced relapse in other animal models and OEA also ameliorated physical signs

associated to withdrawal, such vocalizations and tremors. However, it is largely unknown the mechanisms through which OEA exerts its protective functions in the neuroinflammation and its possible modulatory role in emotional/motivational behavior during alcohol withdrawal and early abstinence.

There is a bidirectional communication between the brain and the gut that may regulate the nervous system development, mood, stress, emotions, cognition and certain behaviors, through immune, endocrine, neural and metabolic pathways. Thus, it has been demonstrated, with different levels of evidence, that the microbiota is implicated in disorders of the central nervous system, such as anxiety and depression.

OEA was discovered as an endogen substance synthesized in the gut able to regulate a cerebral function such as satiety. This phenomenon altogether with the increasing interest in the research about the influence of the gut-brain axis in the regulation of brain disorders, resulted in the aims of this Doctoral Thesis.

Aims: To evaluate the effects of ABD in the microbiota-gut-brain axis and to understand the mechanisms of action of the possible protective effects of OEA in this axis, through the study of microbiota and gut barrier alterations, disruptions in the blood-brain barrier and in the emotional/motivational status during acute withdrawal and protracted abstinence.

Results: Using a male Wistar rat model of ABD induced by repeated intragastric administrations of alcohol for 4 days, we observed that ABD altered the gut-brain axis: altered the gut microbiota, promoted colonic inflammation and incremented the intestinal barrier permeability favoring the translocation of bacteria and highly pro-inflammatory compounds, such as LPS; additionally, ABD also altered the levels of some proteins which form the blood-brain barrier in the frontal cortex, area in which ABD promotes neuroinflammation but not in the hippocampus; and finally, these actions were related with anhedonia and depressive-like behavior in early withdrawal. OEA pretreatment partially prevented these ABD-induced effects: although OEA did not promote changes in the gut microbiota

composition considered as “beneficial”, it partially prevented the ABD-induced gut barrier disruption, the passage of LPS to plasma, and the translocation of bacteria to mesenteric lymph nodes. OEA (which is known to prevent the prefrontal neuroinflammation) did not prevent the blood-brain barrier alterations in the frontal cortex but promoted a positive modulatory effect in the anhedonia and depressive-like behavior during early withdrawal.

Conclusions: The OEA pretreatment during the ABD is able to prevent some ABD-induced alterations in the gut-brain axis, especially the gut barrier disruption, the innate and adaptative immune system activation and the regulation of the anhedonic and depressive-like behaviors during early withdrawal (as well as the already known protective action on the frontal cortex neuroinflammation). These results suggest that OEA could be used in the future as a coadjutant treatment, along with the psychotherapy, to prevent the negative effects of alcohol consumption.

II) INTRODUCCIÓN



1. EJE MICROBIOTA- INTESTINO-CEREBRO: EL PSICOMICROBIOMA

Durante mucho tiempo se ha creído que es el cerebro el que gobierna de forma exclusiva las emociones y otros procesos psicológicos y, en general, el comportamiento. Sin embargo, aún reconociendo la supremacía de este órgano en el control de la conducta, desde hace algunos años existen evidencias científicas que sugieren que otros órganos periféricos, como el intestino, tendrían un papel modulador muy importante en la conducta. Así, recientemente se ha demostrado una asociación entre la microbiota intestinal (conjunto de microorganismos vivos presentes en el tracto digestivo), el intestino y el cerebro en ciertos procesos psicológicos, mediante lo que se conoce como el eje microbiota-intestino-cerebro (Sarkar *et al.*, 2018).

Aunque la obtención de evidencias científicas de la existencia de este eje bidireccional intestino-cerebro es reciente, la sabiduría popular ha sido consciente de su existencia desde hace mucho tiempo: ¿quién no ha sentido malestar estomacal antes de una reunión importante o quién no ha sentido somnolencia después de una comida copiosa?

En estos últimos años, la emergencia del eje microbiota-intestino-cerebro ha dado lugar a un nuevo paradigma en el mundo de la neurociencia y de la salud, dando paso a una visión mucho más holística, que, en lugar de disociar el cuerpo y el cerebro, integra disciplinas como la psicología y la microbiología, mediante el estudio de lo que se ha denominado el **psicomicrobioma**.

En los siguientes apartados de esta Tesis Doctoral se describe qué es la microbiota o flora intestinal, las vías de comunicación del eje intestino-cerebro y las barreras biológicas intestinal y hematoencefálica, con el fin de desarrollar más adelante los efectos del abuso de alcohol sobre varios componentes de este eje y el papel protector de la oleoiletanolamida (OEA).

1.1 La microbiota intestinal

La microbiota o flora intestinal es el conjunto de microorganismos que viven en nuestro tracto gastrointestinal y el microbioma incluye sus genes y metabolitos. Aunque son datos bastante controvertidos, se estima que el peso total de microorganismos en el cuerpo humano es de 1Kg y que el número total de microorganismos que viven en el intestino asciende a la cifra de 10^{14} células, que son significativamente más células de las que hay en el organismo del hospedador, es decir, nosotros; también se estima que el microbioma contiene 100 veces más genes que el genoma del hospedador (Dinan & Cryan, 2017a). La microbiota intestinal está formada en su mayoría por **bacterias**, pero también la conforman virus, hongos, protozoos y arqueas (Vassallo *et al.*, 2015; Wang & Wang, 2016).

El colon es la parte del tracto intestinal donde se albergan la mayoría (70%) de los microorganismos. El estudio de la microbiota presente en el colon se ha llevado a cabo generalmente mediante el análisis de la materia fecal, ya que, aunque se sabe que pueden existir diferencias con respecto a la microbiota de la mucosa intestinal, es la técnica más habitual dado que la recogida de heces puede hacerse de forma natural, no es invasiva y puede obtenerse varias veces (Tang *et al.*, 2020). La mayoría de las bacterias colónicas que se han identificado en las heces de humanos por secuenciación del RNA ribosomal 16S, considerada como la diana universal para la identificación bacteriana, pertenecen a 5 divisiones o *phyla*: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* (Huse *et al.*, 2008). A niveles taxonómicos más bajos la composición varía mucho entre individuos (Hillman *et al.*, 2017).

El paradigma clásico sostiene que tanto el ambiente fetal como el feto son estériles, y que la colonización comienza en el momento del parto. Sin embargo, los últimos estudios apuntan a que ni la placenta, ni el líquido amniótico ni el feto son estériles, pero de momento son resultados muy controvertidos por el riesgo de contaminación de la muestra durante la experimentación y por tanto, es necesario seguir investigando (Mesa *et al.*, 2020). Según el dogma tradicional, **la colonización** comienza en el

momento del nacimiento por las bacterias del medio (colonización horizontal) y las bacterias maternas (colonización vertical). Esta colonización se ve influenciada por factores como el modo de nacimiento (parto vs cesárea), la edad gestacional, el tipo de alimentación (pecho vs leche de fórmula) y uso de antibióticos (Rea *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018).

Durante los primeros años de vida la complejidad de la microbiota aumenta de forma muy rápida y existe mucha variedad entre individuos. La madurez de la microbiota se alcanza con la edad de tres años, momento en el cual la microbiota es prácticamente como la de un adulto (Wang *et al.*, 2018). En la edad adulta existen **variaciones interindividuales** debido a factores como la edad, la dieta, el estrés, el estilo de vida y el origen geográfico. Las **variaciones intraindividuales** que tienen lugar a lo largo de la vida de un individuo se deben a factores como enfermedades, medicamentos y cambios en la dieta (Vassallo *et al.*, 2015). Se estima que un tercio de la microbiota es común entre los humanos y los otros dos tercios son específicos de cada individuo, por lo que la composición de la microbiota proporciona una identidad personal (Rieder *et al.*, 2017).

La relación de la microbiota con el hospedador es una **relación mutualista** en la que ambos salen beneficiados: el hospedador proporciona a las bacterias el medio donde vivir y los nutrientes (Rea *et al.*, 2016), y éstas a su vez, entre otras funciones, participan del metabolismo de carbohidratos, la degradación de fibra, la síntesis de vitaminas, la absorción de nutrientes, la homeostasis de la barrera intestinal, la modulación de la motilidad intestinal, el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune y previenen la colonización de patógenos (Mu *et al.*, 2016; Panduro *et al.*, 2017; Vassallo *et al.*, 2015).

Sin embargo, además de participar en los procesos anteriormente comentados, en los últimos años se ha generado una gran evidencia científica acerca de cómo la microbiota intestinal ejerce **influencia en el sistema nervioso**: afecta al desarrollo del sistema nervioso, al estado de ánimo, al estrés, a las emociones, a la cognición y al comportamiento (Cryan

& Dinan, 2012; Sarkar *et al.*, 2018) (Ver Figura 1). Es lo que se conoce como el eje microbiota-intestino-cerebro.

En investigaciones preclínicas, los murinos se consideran un buen modelo para el estudio de la microbiota humana, ya que las ratas, por ejemplo, contienen las mismas divisiones o *phyla* dominantes que la especie humana en el tracto gastrointestinal, siendo *Firmicutes* (74%) y *Bacteroidetes* (23%) los más representados (Zhu *et al.*, 2016).

La mayor parte de los estudios científicos sobre la influencia de la microbiota en el sistema nervioso anteriormente mencionadas se han realizado con **ratones libres de gérmenes** (GFM, por sus siglas en inglés, *germ-free mice*). En cuanto a alteraciones neurales, los GFM presentan cambios en la mielinización, en la plasticidad sináptica, más serotonina, microglía inmadura, más neurogénesis, más longitud de las dendritas y menos conexiones sinápticas, y más permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) (revisado en (Cryan, *et al.*, 2019). En cuanto al comportamiento, algunos estudios indican que estos GFM presentan un comportamiento más ansioso (Crume yrole-Arias *et al.*, 2014) y de tipo depresivo (Zheng *et al.*, 2016), mientras que otros estudios demuestran que tienen un comportamiento menos ansioso (Neufeld *et al.*, 2011). Estas diferencias pueden deberse al diverso bagaje genético y a las diferentes técnicas usadas.

Otras estrategias ampliamente utilizadas, debido a la gran cantidad de información que aportan en el estudio del eje intestino-cerebro, son el uso de antibióticos, los trasplantes fecales, técnicas de imagen, la bioinformática y los estudios con **prebióticos y probióticos**.

Los prebióticos son compuestos no digeribles que, mediante su metabolización por los microorganismos en el intestino, modulan la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, confiriendo beneficios fisiológicos en el hospedador (Gibson *et al.*, 2017). Los probióticos son bacterias vivas que cuando se consumen en la cantidad

adecuada confieren un beneficio para la salud. Recientemente, se ha acuñado un nuevo término, **psicobiótico**, para definir el potencial que tienen los probióticos para conferir beneficios en la salud mental (Dinan *et al.*, 2013). Así, el consumo de probióticos en condiciones fisiológicas y en patologías diversas ha demostrado, tanto en humanos como en modelos animales, que tiene efectos beneficiosos para la salud mental, tales como disminución del estrés, la ansiedad, la depresión y una mejora de los procesos cognitivos (Cryan *et al.*, 2019). Posteriormente, se amplió el término incluyendo en la definición de psicobiótico a los prebióticos que confieren beneficios para la salud mental (Sarkar *et al.*, 2016). Así, la suplementación con prebióticos ha demostrado que mejora procesos cognitivos, el aprendizaje y reduce la ansiedad y la depresión, tanto en animales como en personas (Cryan *et al.*, 2019). De manera que, actualmente, el término psicobiótico englobaría tanto a probióticos como prebióticos que tienen efectos beneficiosos sobre los procesos psicológicos y la salud mental.

También recientemente se han introducido otros términos, como, por ejemplo, **postbióticos**, que son fragmentos o metabolitos derivados de microorganismos que confieren un efecto beneficioso y que no cumplen con la definición de probiótico ni son de naturaleza exclusivamente prebiótica, como por ejemplo lisados bacterianos, enzimas, fragmentos de la pared celular o vitaminas (Zólkiewicz *et al.*, 2020).

Así como se han descrito algunos efectos que la microbiota intestinal puede promover en la salud del individuo, también hay numerosos estudios que demuestran que la microbiota intestinal está implicada en **enfermedades y trastornos del sistema nervioso central**. El grado de evidencia es diferente en los distintos tipos de trastornos o procesos patológicos: algunos estudios están en fases preliminares en las que simplemente se describe una correlación entre la microbiota y el trastorno, mientras que otros estudios demuestran una relación causal de la microbiota en la enfermedad. Algunos de estos trastornos y enfermedades son: ansiedad, depresión, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno bipolar, esclerosis múltiple, anorexia, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, estrés postraumático, autismo, Parkinson,

Alzheimer y trastorno por uso de sustancias (TUS) (Cryan *et al.*, 2019; Cryan & Dinan, 2012; Dinan & Cryan, 2017b; Sampson & Mazmanian, 2015; Wang *et al.*, 2018).

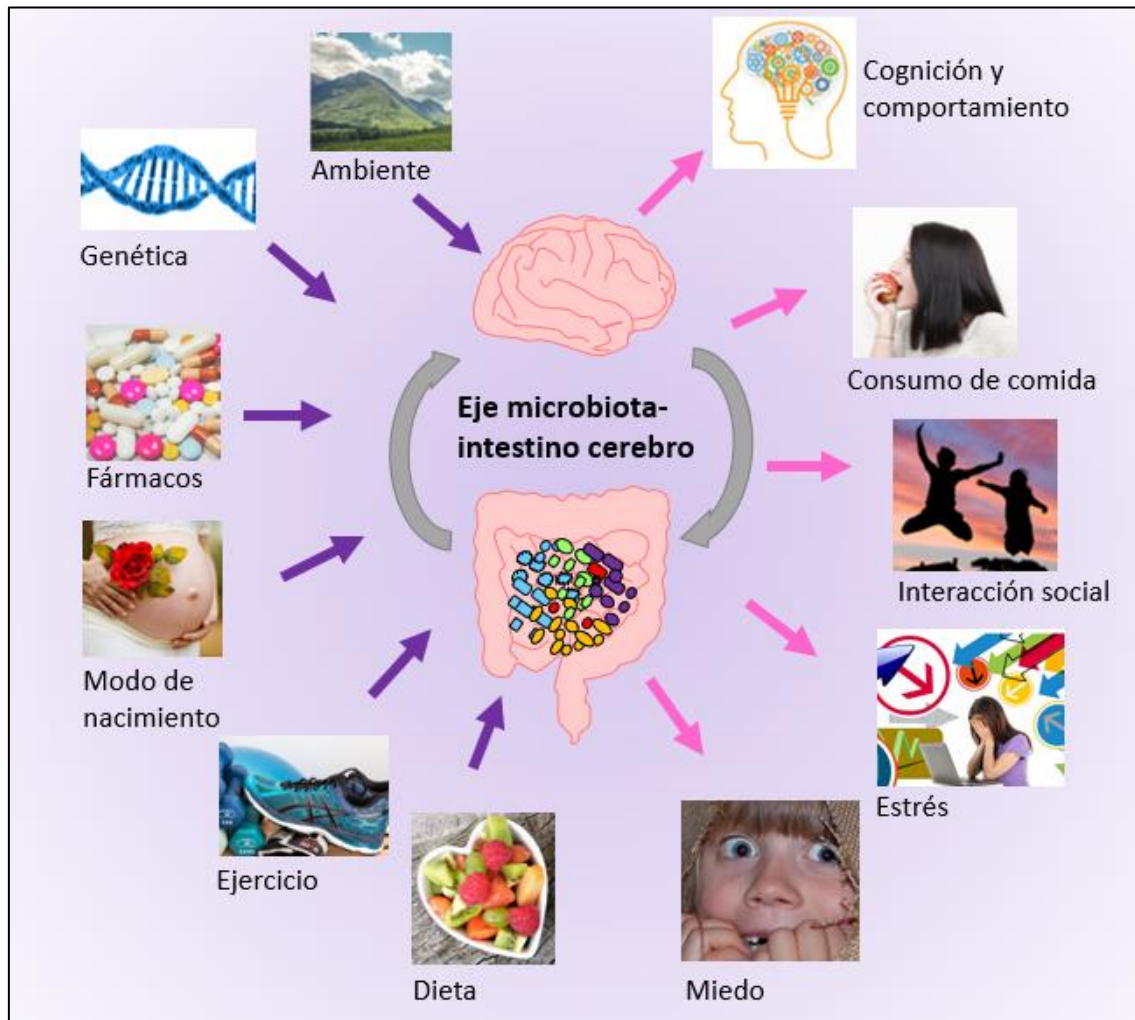


Figura 1: Ilustración de los factores que alteran la microbiota intestinal, así como los principales comportamientos afectados por las alteraciones en el eje intestino-cerebro (Adaptado de Cryan *et al.*, 2019). Entre los factores que alteran la microbiota intestinal encontramos el ambiente, la genética, los fármacos, el modo de nacimiento, el ejercicio y la dieta. Entre los comportamientos que se encuentran afectados por alteraciones en el eje intestino-cerebro encontramos el miedo, el estrés, la interacción social, el consumo de comida y la cognición y comportamiento.

1.2 Vías de comunicación del eje intestino-cerebro

Como se ha comentado anteriormente, la comunicación entre el intestino y el cerebro parece producirse de manera bidireccional. Las vías por las cuales se establecen estas relaciones bidireccionales en el eje intestino-cerebro no han sido elucidadas por completo, sin embargo, se sabe que la comunicación de este eje incluye **vías endocrinas, neurales, metabólicas e inmunes** (ver Figura 2) (Cryan & Dinan, 2012; Dinan & Cryan, 2017b; Rieder *et al.*, 2017; Wang & Wang, 2016; Wang *et al.*, 2018).

En cuanto a las vías endocrinas, el **eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)** es crucial para que el organismo pueda adaptarse al estrés y juega un papel muy importante en la regulación de diferentes funciones homeostáticas, así como el comportamiento y el estado de ánimo. Ya se ha comentado antes que las evidencias con relación al estado del eje HHA y los ratones GF son contradictorias, algunos estudios demuestran que estos ratones son más ansiosos (Crume yrole-Arias *et al.*, 2014) y otros estudios demuestran que son menos ansiosos (Neufeld *et al.*, 2011), pero evidencian que la microbiota afecta al eje HHA. De igual modo, el estrés puede afectar a la microbiota, por ejemplo, la separación maternal reduce la abundancia de *Lactobacillus* en las heces de crías de rata, con efectos a largo plazo en la microbiota (O'Mahony *et al.*, 2009).

Por otro lado, con relación a las vías neurales, el sistema nervioso autónomo conecta el tracto gastrointestinal con regiones del cerebro como el hipotálamo y el núcleo del tracto solitario. El nervio más largo de este sistema es el **nervio vago**, que tiene inervaciones eferentes y aferentes en la cavidad abdominal y controla diversas funciones como la motilidad intestinal. Las terminaciones aferentes tienen receptores de la citoquina inflamatoria interleuquina-1beta (IL-1 β), lo cual podría servir para informar al cerebro del estatus inmune periférico (Ek *et al.*, 1998). La estimulación eléctrica del nervio vago promueve la liberación de IL-1 β en el cerebro y la activación del eje HHA (Hosoi *et al.*, 2000). La vagotomía (eliminación quirúrgica del nervio vago) previene los efectos ansiolíticos y antidepresivos de la administración de *L. rhamnosus*, evidenciando que este nervio tiene

un papel muy importante en la comunicación microbiota-cerebro (Bravo *et al.*, 2011).

En cuanto a las vías metabólicas, la microbiota sintetiza **neurotransmisores** como la serotonina, que controla el humor y el comportamiento social; dopamina, noradrenalina y ácido γ -aminobutírico (GABA); así como triptófano (precursor de la serotonina) y ácidos grasos de cadena corta (SCFAs). Estos compuestos viajan por la vena porta a la circulación sanguínea e interaccionan con el sistema inmune del hospedador y pueden afectar localmente al sistema nervioso entérico y al nervio vago, que señalizan directamente al cerebro (Moraes *et al.*, 2020). Específicamente, los SCFAs, que derivan de la degradación de la fibra, modulan la BHE (Hoyle *et al.*, 2018), la neuroinflamación (Park *et al.*, 2019), la inflamación intestinal y la barrera intestinal (Berni Canani *et al.*, 2011; Furusawa *et al.*, 2013). Con relación a la barrera hematoencefálica, la ausencia de microbiota en el periodo fetal aumenta la permeabilidad de esta barrera que se mantiene hasta la edad adulta, aunque puede ser revertida mediante la transferencia de bacterias beneficiosas, productoras de SCFAs (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2014).

Sin embargo, una de las vías de comunicación del intestino al cerebro más potentes es la que se establece a través de las **vías inmunes**. El sistema inmune regula la inflamación, que es un proceso fisiológico en respuesta a patógenos y daños que protege al organismo contra las infecciones. Uno de los cambios biológicos asociados a la inflamación es la liberación de citoquinas, que son proteínas que modulan la inflamación. Las citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 β y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , aumentan la inflamación; mientras que las citoquinas antiinflamatorias, como IL-4 e IL-10 reducen la inflamación. Algunas citoquinas tienen un perfil antiinflamatorio o proinflamatorio en función del contexto, como la IL-6 (Turner *et al.*, 2014). Una actividad inmunológica normal requiere el balance entre ambos tipos de citoquinas, sin embargo, en algunas condiciones neuropsiquiátricas, como en la depresión o en el *sickness behaviour* (caracterizado por la apatía y el aislamiento social) existe un desbalance con una elevación de las citoquinas proinflamatorias (Dantzer *et al.*, 2008). El sistema inmune ayuda a mantener la homeostasis del tracto

gastrointestinal y tiene también un alto impacto en el comportamiento; de hecho, alteraciones en el sistema inmune están documentadas en depresión, como acabamos de ver, así como en la ansiedad y en el TUS (Cacabelos *et al.*, 2016).

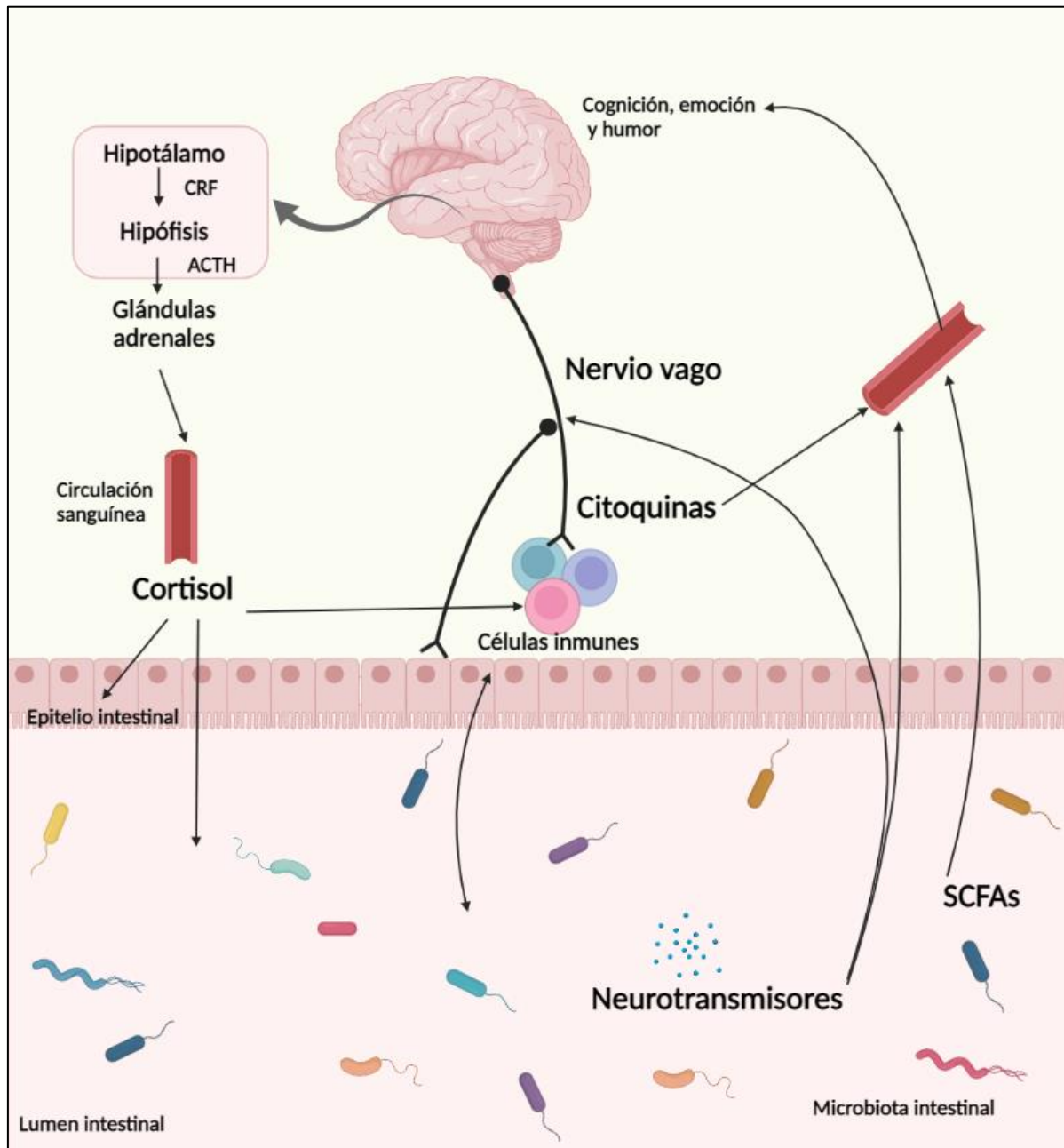


Figura 2: Vías implicadas en la comunicación del eje intestino-cerebro (adaptado de Cryan & Dinan *et al.*, 2012). Existen diferentes vías de comunicación entre el cerebro y en el intestino, como por ejemplo las vías endocrinas (cortisol), vías inmunes (citoquinas) y vías neurales (nervio vago). El nervio vago está muy implicado en la comunicación intestino-cerebro. El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal regula la secreción de cortisol, que a su vez afecta a las células inmunes (incluyendo la liberación de citoquinas) localmente y a nivel sistémico. El cortisol también puede alterar la permeabilidad de la barrera intestinal y cambiar la composición de la microbiota. La microbiota y los probióticos pueden alterar los niveles circulantes de citoquinas, lo cual puede tener un impacto a nivel cerebral. Los SCFAs pueden modular también el cerebro y el comportamiento. ACTH: hormona adrenocorticotropa, CRF: hormona liberadora de corticotropina, SCFAs: ácidos grasos de cadena corta.

La microbiota intestinal, por otro lado, parece ser necesaria para el correcto desarrollo del sistema inmune (Round & Mazmanian, 2009), ya que los ratones GF tienen defectos en la estructura y función de este sistema, que pueden ser parcialmente revertidos tras proporcionarles microbiota intestinal adecuada (Gensollen *et al.*, 2016). Además, la microbiota parece regular la maduración y función de las células de la microglía (Erny *et al.*, 2015), consideradas las células de vigilancia del sistema inmune en el cerebro.

La microbiota también puede ser una fuente de producción de moléculas proinflamatorias, especialmente por la liberación del lipopolisacárido (LPS), componente de la pared de las bacterias Gram negativas (Hug *et al.*, 2018), del cual hablaremos más adelante. Las citoquinas que se generan en la periferia, en condiciones normales pueden transducir señales inflamatorias al parénquima cerebral uniéndose y activando receptores que se expresan en la BHE, e incluso pueden ser capaces de llegar al parénquima cerebral mediante sistemas saturables de transporte y a través de los órganos circunventriculares carentes de BHE (revisado en (Gonçalves & De Felice, 2021)). Además, como veremos más adelante, en algunas condiciones la permeabilidad de la BHE está comprometida, promoviendo el paso de estas citoquinas y otras moléculas proinflamatorias al parénquima cerebral dando lugar a neuroinflamación. Las citoquinas también pueden activar el eje HHA promoviendo así la liberación de cortisol en humanos y corticosterona en animales, ya que la eminencia media del hipotálamo es una estructura circunventricular que carece de BHE (Cryan & Dinan, 2012; Dinan & Cryan, 2017b). Las citoquinas como hemos visto anteriormente también pueden activar el nervio vago.

Como ya se ha comentado, en los últimos años se ha generado una gran evidencia científica acerca del eje microbiota-intestino-cerebro. Sin embargo, aún queda un largo camino de investigación para seguir esclareciendo el papel que juega la microbiota en el desarrollo y en la fisiología cerebral, así como en determinados procesos fisiológicos y patologías del sistema nervioso.

Anteriormente se ha comentado que la mayor colonia de microbiota se encuentra en el intestino, especialmente en el colon. A continuación, se describe la estructura y función de la barrera intestinal, que separa el contenido del tubo digestivo, incluyendo las bacterias, del interior del organismo.

1.3. La barrera intestinal

La barrera intestinal es una de las barreras biológicas más extensas que existen en los mamíferos (Turner, 2009). Es una barrera física y bioquímica que separa al organismo del ambiente externo y está especialmente adaptada para separar la microbiota del hospedador en general y más específicamente de la lámina propia intestinal donde se alojan las células del sistema inmune (Maldonado-Contreras & McCormick, 2011).

La primera línea de defensa que existe en la barrera intestinal es la capa de **moco**. En el intestino delgado solo existe una capa, mientras que en el colon existen dos capas: la más externa, donde se encuentra la microbiota, y una más interna, que es estéril y contiene péptidos antimicrobianos e inmunoglobulina (Ig)A e IgG. Estas inmunoglobulinas son secretadas por las células plasmáticas, que son linfocitos B maduros productores de anticuerpos, que se alojan en la lámina propia. Las inmunoglobulinas junto con los péptidos antimicrobianos refuerzan la separación física entre la microbiota y el epitelio intestinal. El moco impide la adherencia de microorganismos y su permeabilidad a través de la barrera

intestinal y neutraliza sus toxinas (Maldonado-Contreras & McCormick, 2011). Esta capa de moco está formada por **mucinas** liberadas por las células Goblet, siendo MUC2 la mucina más abundante en el colon. Las mucinas son proteínas altamente glicosiladas y conservadas entre especies y que se secretan de forma constitutiva, aunque su liberación puede ser inducida por algunos estímulos, como la activación por la microbiota de receptores tipo Toll (TLR) (Sellers & Morton, 2014), de los que hablaremos en más profundidad a continuación.

La segunda línea de defensa es el **epitelio** de la barrera intestinal que está formada por distintos tipos de células que derivan de un progenitor pluripotente y que se dividen en dos grupos: la **línea absorptiva**, formada por los **enterocitos**, que es el tipo celular más abundante en la barrera intestinal, y la **línea secretora**, formada por células **enteroendocrinas**, que secretan moléculas como hormonas y serotonina; células **Goblet**, que se encargan de producir el moco intestinal; y las células **Paneth**, que se suelen encontrar en el intestino delgado, aunque también aparecen en el colon en condiciones de inflamación crónica, que se encargan de secretar moléculas antimicrobianas, como la *Regenerating islet-derived protein 3* (REG3) y defensinas que interfieren en la función o estructura de la pared celular de los microorganismos (Abreu, 2010).

El epitelio intestinal, a la vez que establece una barrera que evita la penetración de microorganismos, toxinas y moléculas proinflamatorias, permite la absorción de nutrientes desde el lumen al tejido intestinal y a la circulación sanguínea. Esta regulación de la permeabilidad se logra mediante dos vías: la transcelular y la paracelular.

La vía **transcelular** permite el paso a través de las células de compuestos lipofílicos y los compuestos hidrofílicos pequeños por difusión pasiva, así como permite la absorción de nutrientes (azúcares, aminoácidos, péptidos, ácidos grasos, vitaminas...) mediante transportadores o canales específicos y diferentes mecanismos como la endocitosis, transcitosis y exocitosis, por la cual en condiciones fisiológicas se produce el paso controlado de pequeñas cantidades de productos bacterianos e incluso de

algún microorganismo, para la inmunovigilancia y el desarrollo de tolerancia (Keita & Soderholm, 2010; Tordesillas & Berin, 2018).

La vía **paracelular** consiste en el paso de sustancias por el espacio intercelular entre dos células adyacentes. Por esta vía se permite el paso de sustancias pequeñas solubles en agua. La permeabilidad de la vía paracelular está regulada por las uniones adherentes o en inglés ***adherens junctions*** (AJ), formadas por las proteínas transmembrana (cadherinas) y proteínas citoplasmáticas (cateninas) (France & Turner, 2017). La permeabilidad de esta vía también está controlada por las uniones estrechas, en inglés ***tight junctions*** (TJ), que se localizan en la zona apical del epitelio y mantienen la polaridad intestinal, limitando el paso de sustancias y de bacterias y sus productos desde el lumen. Las TJ están formadas por las proteínas transmembrana ocludina, claudinas y moléculas de unión por adhesión (JAM, por sus siglas en inglés), así como por proteínas citoplasmáticas que unen las TJ con el citoesqueleto de actina, que reciben el nombre de zona occludens (ZO) (ver Figura 3). La permeabilidad de la vía paracelular está regulada por múltiples factores, como las citoquinas proinflamatorias: por ejemplo, el TNF- α aumenta la permeabilidad intestinal ya que disminuye la proteína ZO-1 (Suzuki, 2013). Otros factores han demostrado disminuir la permeabilidad intestinal, como los probióticos (Zhou *et al.*, 2010).

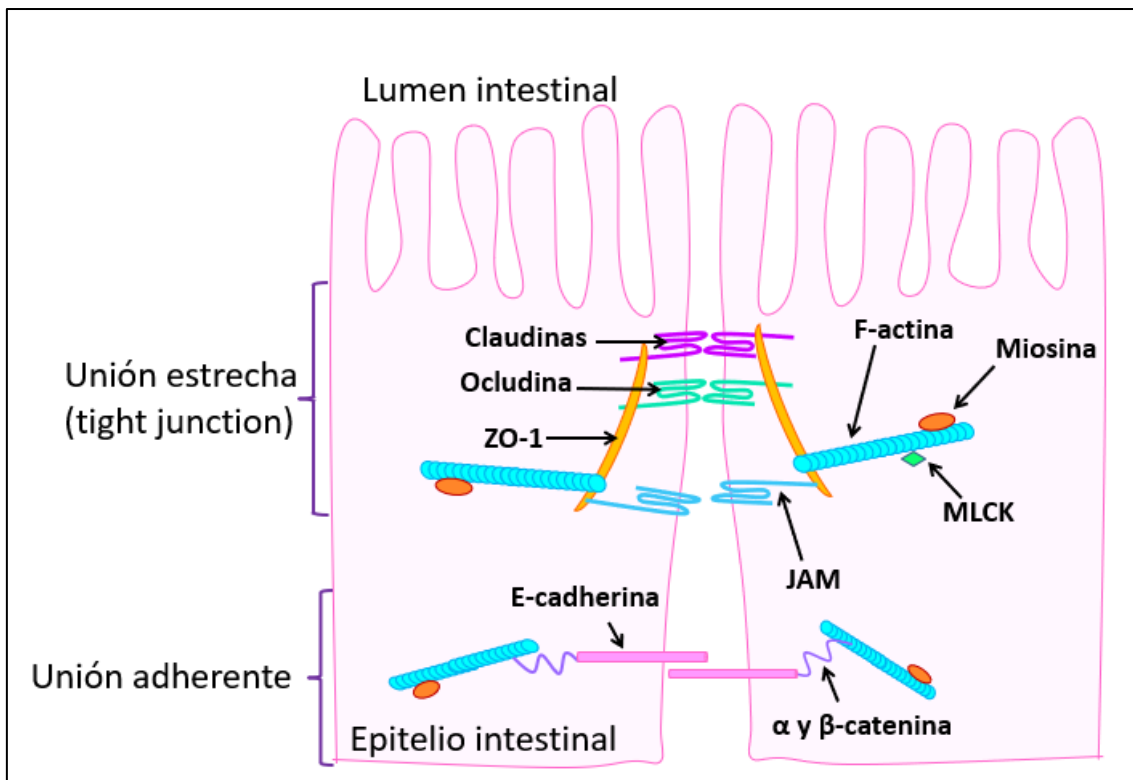


Figura 3: Ilustración de la estructura de la unión intercelular en el epitelio intestinal. Las *tight junctions* o uniones estrechas se localizan en la zona apical del epitelio y mantienen la polaridad intestinal, limitando el paso de sustancias y de bacterias y sus productos desde el lumen. Las TJ están formadas por las proteínas transmembrana ocludina, claudinas y JAM, así como por proteínas citoplasmáticas que unen las TJ con el citoesqueleto de actina llamadas ZO. Las uniones adherentes o en inglés *adherens junctions* están formadas por las proteínas transmembrana llamadas cadherinas y proteínas citoplasmáticas cateninas. ZO: zona ocludens, JAM: moléculas de unión por adhesión, MLCK: quinasa de la cadena corta de la miosina.

Se ha visto que las bacterias pueden alterar la expresión y distribución de las proteínas que forman las TJ de forma directa. La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) enteropatógena daña la estructura y función de las TJ (Shifflett *et al.*, 2005). El probiótico *Lactobacillus plantarum* aumenta la expresión de ZO-1, ocludina y claudinas (Zhou *et al.*, 2010), y por otro lado, los factores secretados por el probiótico *Bifidobacterium infantis* aumentan la expresión de ocludina, claudina -4 y ZO-1 y mejoran la función de la barrera intestinal en un modelo de colitis (Ewaschuk *et al.*, 2008).

Cuando el epitelio intestinal está dañado, la translocación bacteriana, de la cual se hablará más adelante en mayor profundidad, se puede producir mediante la ruta transcelular, regulada por bombas y canales, o por la ruta paracelular, ya que el daño directo en los enterocitos, así como la alteración o deterioro de las TJ podrían permitir el paso de bacterias a través del epitelio intestinal (revisado en (Antonini *et al.*, 2019)).

La tercera línea de defensa de la barrera intestinal es el **sistema inmune**, que se subdivide en innato y adquirido. **La inmunidad innata**, como en el resto del organismo, está mediada, entre otros receptores, por los **TLR**, que pertenecen a la familia de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Sellers & Morton, 2014). Estos receptores reconocen moléculas potencialmente dañinas, como las moléculas asociadas a daño celular (DAMPs), moléculas asociadas a patógenos (PAMPs), así como moléculas asociadas a microbios (MAMPs). Hay descritos 13 tipos distintos de TLR, pero esta Tesis Doctoral está centrada en el **TLR4**, por su relevancia dentro de los receptores de inmunidad innata y ya que sus principales ligandos son el alcohol y el LPS, temas en los que está centrada esta Tesis, como se verá más adelante.

Brevemente, es conocido que la unión del alcohol o del LPS (endotoxina de origen bacteriano) a TLR4 activa la cascada de señalización dependiente de su adaptador, que es el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88). Esto desencadenan una serie de procesos que dan lugar a la fosforilación del complejo de proteínas inhibidoras de *kappa* B (I κ B), por la quinasa inhibidora de κ B (I κ K), lo que produce la degradación de I κ B y la translocación del factor nuclear de transcripción (NF)- κ B al núcleo. Esto promueve la síntesis de moléculas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6; la síntesis de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que da lugar a la formación de óxido nítrico y sus metabolitos, como los nitritos (NO $_2^-$). Los nitritos a su vez interactúan con los lípidos de la membrana celular generando así peroxidación lipídica, dando lugar a productos tóxicos como el malondialdehído (MDA), y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Éstos generan inestabilidad y muerte celular, en particular el 4-HNE a través de la activación de las caspasas (Antón *et al.*, 2017; Ayala *et al.*, 2014; Blanco *et al.*, 2005; Hug *et al.*, 2018; Orio *et al.*, 2019) (Ver Figura 4). Esta vía se ha

caracterizado principalmente en cerebro y plasma tras estímulos inflamatorios, así como también en el intestino.

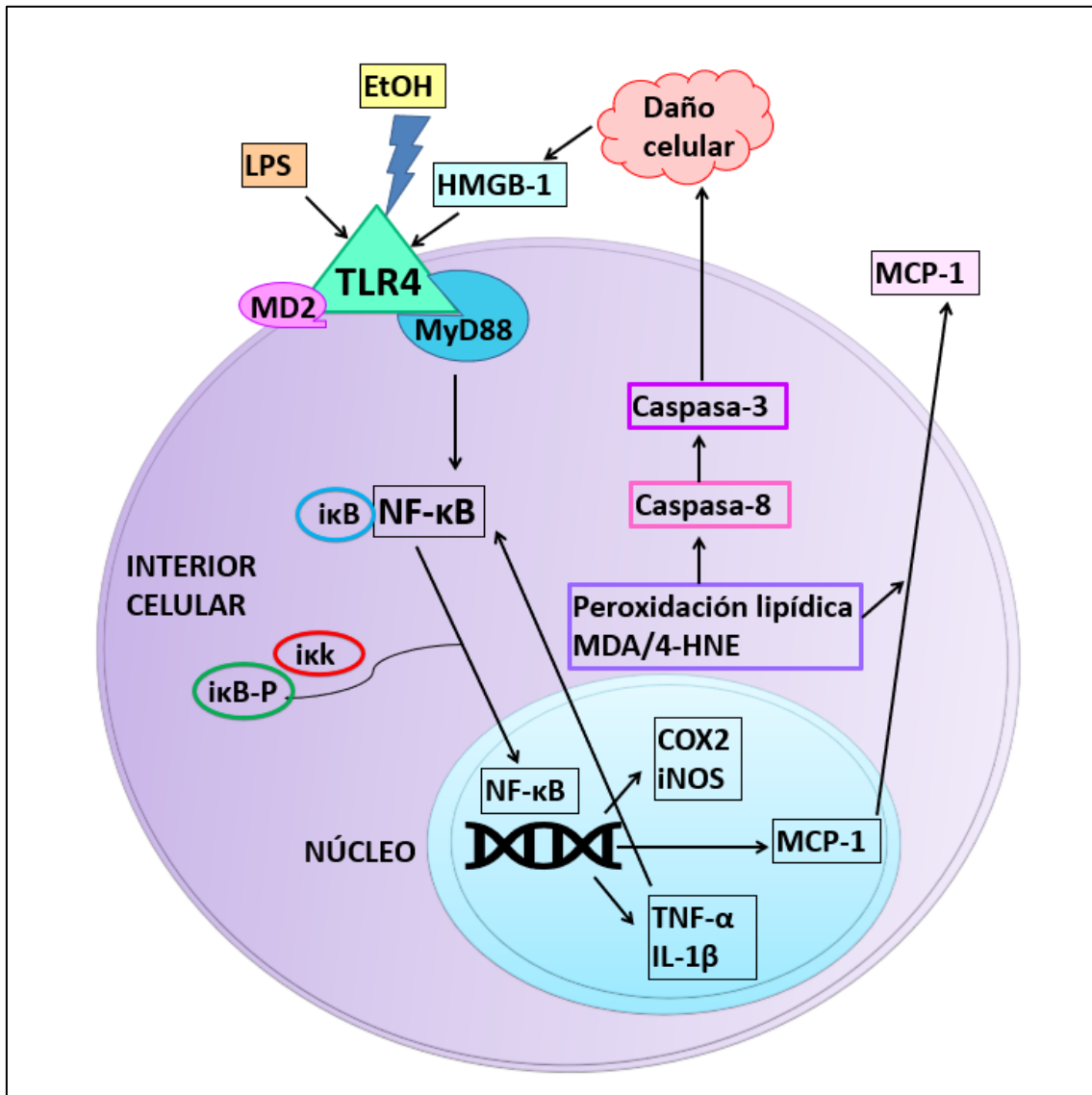


Figura 4: Esquema de la vía de señalización de TLR4. (Adaptado de Orio *et al.*, 2019). La unión del alcohol o del LPS al receptor TLR4 activa la cascada de señalización dependiente de su adaptador, MyD88. Esto desencadenan una serie de procesos que dan lugar a la fosforilación del complejo de proteínas IκB, por la quinasa IκK, lo que produce la degradación de IκB y la translocación de NF-κB al núcleo. Esto promueve la síntesis de moléculas proinflamatorias, como TNF-α, IL-1β e IL-6; y la síntesis de iNOS, que da lugar a la formación de óxido nítrico y sus metabolitos, como los nitritos (NO₂⁻). Los nitritos a su vez interaccionan con los lípidos de la membrana celular generando así peroxidación lipídica, dando lugar a productos tóxicos como el MDA, y 4-HNE. Éstos generan inestabilidad y muerte celular, en particular el 4-HNE a través de la activación de las caspasas. HMGB1: proteína de alta movilidad del grupo de caja 1, MD-2: antígeno de linfocito 96, MyD88: factor de diferenciación mieloide 88, NF-κB: factor nuclear Kappa B, IκB: inhibidor de κB, IκK: quinasa inhibidora de κB, IκK-p: quinasa inhibidora de κB fosforilada, TNF-α: factor tumoral de necrosis alfa, IL-1β: interleuquina 1beta, MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, COX-2: ciclooxigenasa 2, MDA: malondialdehído, 4-HNE: 4-hidroxinonenal.

En condiciones fisiológicas, el TLR4 se expresa en muy baja concentración en la membrana basolateral del epitelio intestinal, así como en las células Paneth, células dendríticas y macrófagos de la barrera intestinal. Sin embargo, en condiciones patológicas, cuando existe activación del sistema inmune, la expresión de TLR4 en las células de la barrera intestinal se ve incrementada y estos receptores se localizan también en la zona apical dando lugar a inflamación intestinal (Hug *et al.*, 2018).

En cuanto a **la inmunidad adaptativa**, en la lámina propia, debajo del epitelio intestinal, se alojan las células del sistema inmune: macrófagos, células dendríticas, células T, células B, y células B maduras llamadas células plasmáticas que producen inmunoglobulinas, que alcanzan la luz intestinal mediante transcitosis a través de las células del epitelio intestinal. Además, algunos tipos celulares de la inmunidad adaptativa se alojan entre las células del epitelio intestinal, como por ejemplo los linfocitos intraepiteliales, que se encargan de controlar la proliferación y diferenciación de las células que forman el epitelio intestinal. También algunas células dendríticas toman muestras del lumen intestinal (tanto antígenos como bacterias vivas) emitiendo una dendrita entre dos células epiteliales para los procesos de tolerancia e inmunovigilancia. Esto pueden hacerlo ya que son capaces de abrir las TJ existentes y formar nuevas

uniones debido a que las células dendríticas expresan las proteínas que forman estas uniones (Peterson & Artis, 2014; Yu & Yang, 2009).

Otro tipo de células que se encuentran en el epitelio intestinal son las **células M**, que transportan antígenos y bacterias enteras de la luz intestinal a los subyacentes folículos linfoides aislados o a las placas de Peyer (agregados de folículos linfoides), donde se encuentran células del sistema inmune: células B, T, células dendríticas y macrófagos, donde se inicia o se inhibe una respuesta inmune, dando lugar a una respuesta inmune o a un proceso de tolerancia, respectivamente (Peterson & Artis, 2014). A diferencia del resto de células que forman el epitelio intestinal, las células M carecen de un borde apical muy organizado, y en su lugar tienen microproyecciones que facilitan la endocitosis de antígenos y microorganismos, y el borde basolateral tiene invaginaciones en las que residen los linfocitos B, T y macrófagos de los folículos aislados y de las placas de Peyer (Maldonado-Contreras & McCormick, 2011).

Las placas de Peyer están conectadas con el resto del organismo por medio de los vasos linfáticos y vénulas endoteliales: las células del sistema inmune llegan a las placas de Peyer mediante vénulas endoteliales, y salen mediante vasos linfáticos que conectan con los **ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs)** (Jung *et al.*, 2010) (Ver Figura 5).

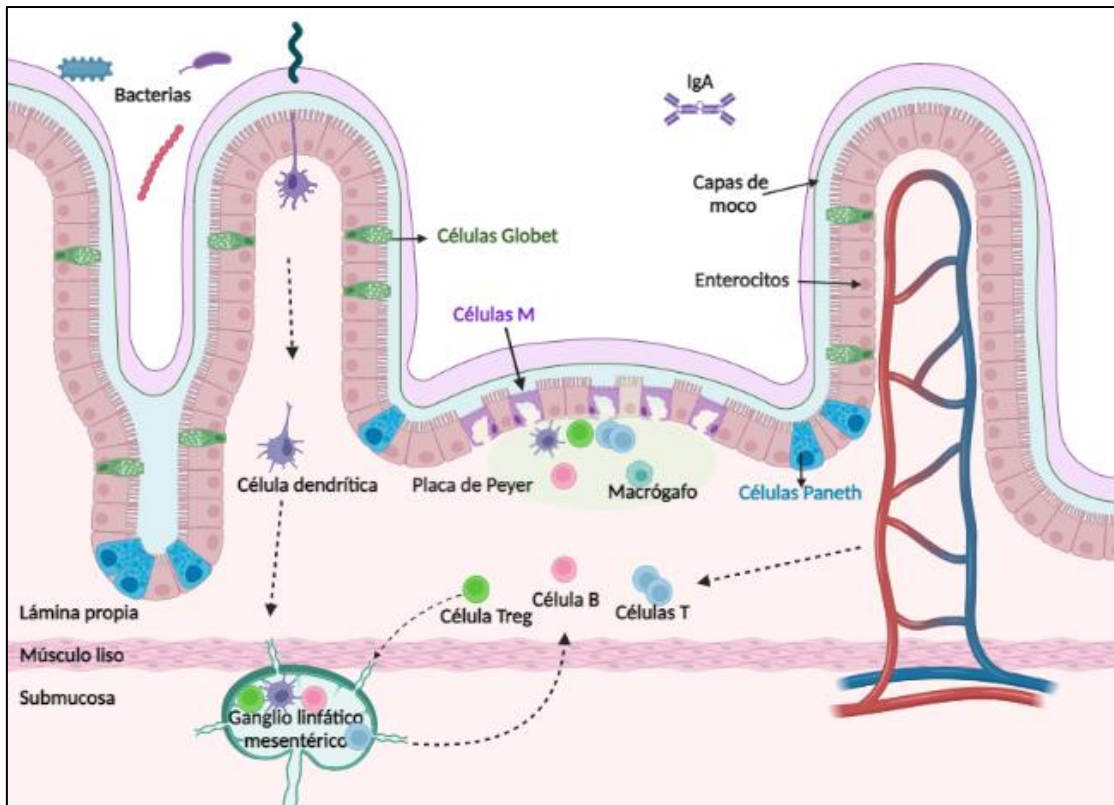


Figura 5: Ilustración de la barrera intestinal. En el lumen intestinal se encuentran la microbiota intestinal y moléculas antimicrobianas como la IgA. La barrera intestinal está formada por la capa de moco que recubre una monocapa de células epiteliales, células Goblet (sintetizan la mucina), células Paneth (sintetizan péptidos antimicrobianos) y células enteroendocrinas (secretan hormonas y otras moléculas). Debajo del epitelio se encuentra la lámina propia con las células del sistema inmune (macrófagos, células dendríticas, células T, células B). También existen las células M, que transportan antígenos y bacterias a las placas de Peyer, a su vez conectadas con el resto del organismo por medio de los vasos linfáticos y vénulas endoteliales: las células del sistema inmune llegan a las placas de Peyer mediante vénulas endoteliales, y salen mediante vasos linfáticos que conectan con los ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs). IgA: inmunoglobulina A, Célula Treg: célula T reguladora.

En condiciones fisiológicas, los microorganismos vivos o sus productos que atraviesan el epitelio intestinal mediante las células M o las células dendríticas, promueven la activación de los linfocitos **T reguladores** tanto en la lámina propia, como en las placas de Peyer, así como en los GLMs. La activación de los linfocitos T reguladores promueve **un estado de tolerancia** hacia los microorganismos que residen en nuestro intestino lo cual permite que se alojen allí y nuestro organismo no reaccione ante ellos (Peterson & Artis, 2014; Tordesillas & Berin, 2018). En procesos inflamatorios, en los GLMs tiene lugar la activación de las células del

sistema inmune que allí se localizan. Estas células inmunes activadas se dirigen a la lámina propia donde llevan a cabo sus acciones de forma local. Además, en estas condiciones de inflamación también tiene lugar la activación de forma local de las células del sistema inmune, por los macrófagos residentes del intestino y por las moléculas inflamatorias que allí se generan, entre otros factores (Peterson & Artis, 2014).

Debajo de la lámina propia hay dos finas capas de **músculo liso** que permiten los movimientos peristálticos característicos del tracto digestivo (Abreu, 2010).

1.4. La barrera hematoencefálica

En el organismo de los mamíferos existen numerosas barreras que separan la sangre de los fluidos intersticiales que rodean los tejidos, siendo la más selectiva de todas ellas la BHE, situada a lo largo de los vasos sanguíneos del sistema nervioso central (SNC). La existencia de una barrera tan selectiva refleja lo regulado que debe estar el microambiente que rodea a las neuronas, ya que la comunicación efectiva entre estas células depende de señales eléctricas y químicas, y pequeños cambios en estas señales pueden dar lugar a fallos en la cognición, regulación del metabolismo y coordinación de las funciones de los órganos periféricos, entre otros (Keaney & Campbell, 2015).

La BHE separa la sangre del líquido cefalorraquídeo, que es un líquido fabricado por los plexos coroideos, ubicados en los ventrículos. El líquido cefalorraquídeo contribuye a la homeostasis mecánica, bioquímica e inmunológica del SNC. La BHE protege así al SNC de la entrada de toxinas y patógenos, y regula la entrada y salida de iones y moléculas, como nutrientes y oxígeno. Sin embargo, la BHE no es una simple barrera física que regula el paso de sustancias, sino que, además, esta barrera media la señalización bidireccional desde el SNC a la periferia y viceversa (Obermeier *et al.*, 2016).

Los daños en la BHE están asociados con neuroinflamación y neurodegeneración, y se ha observado en enfermedades como el Parkinson, el Alzheimer, tumores e infartos cerebrales, esclerosis múltiple, epilepsia, trauma, así como en infecciones y procesos inflamatorios, como los inducidos por LPS (Abbott *et al.*, 2009).

El elemento central de la BHE son las células endoteliales, pero la lámina basal, los pericitos y los astrocitos también forman parte de la BHE. Además, las neuronas, la microglía, los macrófagos perivasculares y las células inmunes periféricas también interactúan con la BHE y participan activamente en esta estructura. El conjunto de todos estos tipos celulares es lo que se conoce como la **unidad neurovascular** (Abbott, 2005).

Las **células endoteliales** son la base anatómica de la BHE ya que forman y sellan los vasos sanguíneos del SNC. Al igual que en el epitelio intestinal, existen dos tipos de uniones entre estas células: las AJ y TJ. Las AJ inician y mantienen el contacto entre las células endoteliales y están formadas por la proteína transmembrana cadherina del endotelio vascular, que se une al citoesqueleto mediante la proteína citoplasmática catenina. Las TJ sellan las células endoteliales restringiendo de forma severa la difusión paracelular de moléculas y, además, regulan la difusión lateral de lípidos y proteínas de membrana contribuyendo a la polaridad de ésta. Las TJ están formadas por proteínas transmembrana (occludina, claudinas y JAM) que se unen al citoesqueleto de actina mediante las proteínas citoplasmáticas ZO-1 y cingulina. La función de barrera llevada a cabo por las TJ no solo está mediada por la presencia de estas proteínas, sino también por la forma en la que están organizadas e interactúan (Abbott *et al.*, 2009; Tajés *et al.*, 2014). A nivel de estas proteínas, la permeabilidad de la BHE se puede regular por mecanismos como la degradación proteolítica o fosforilación, activadas por factores como las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β (Gloor *et al.*, 2001; Luissint *et al.*, 2012).

Para restringir el paso de moléculas, las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos del SNC tienen características diferentes al

resto de las células endoteliales de la periferia: presentan TJ de alta resistencia eléctrica que restringen la difusión paracelular de moléculas, presentan menos vesículas endocíticas restringiendo así el flujo transcelular de moléculas, no presentan fenestraciones o poros, tienen más mitocondrias, lo cual refleja el elevado metabolismo celular, y tienen sistemas de transporte especializados (Abbott *et al.*, 2009; Tajés *et al.*, 2014).

Del mismo modo que en la barrera intestinal, existen dos tipos de transporte a través de la BHE: el paracelular y el transcelular. Mediante el transporte **paracelular**, atraviesan la BHE las moléculas hidrosolubles o de bajo peso molecular y está mediado estructuralmente por las TJ en función de la contractilidad del citoesqueleto de la célula endotelial (Tajés *et al.*, 2014). Además, en condiciones normales las células mononucleares son capaces de cruzar la BHE mediante diapédesis a través del citoplasma de las células endoteliales sin afectar a las TJ. Sin embargo, en procesos inflamatorios que afectan a la BHE, las TJ de las células endoteliales pueden abrirse debido a las citoquinas, entre otros agentes, y las células mononucleares pueden atravesar las células endoteliales mediante la vía paracelular y transcelular (Abbott *et al.*, 2009).

En cuanto a la vía **transcelular**, existen diversos mecanismos. Por un lado, existe la difusión pasiva, por la cual una gran cantidad de moléculas liposolubles son capaces de atravesar la BHE en función del tamaño y la polaridad de la molécula. Algunas moléculas que atraviesan la BHE mediante este mecanismo son el oxígeno y el dióxido de carbono (Abbott *et al.*, 2009). Por otro lado, otro mecanismo es la transcitosis mediada por receptor, que constituye el principal mecanismo usado por las células endoteliales para tomar moléculas como hormonas y lipoproteínas a través de la BHE. También existen transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporters*) y transportadores específicos de soluto (*carriers*), que permiten eliminar sustancias del SNC y el intercambio de sustancias como aminoácidos y glucosa, respectivamente. La orientación y la localización polarizada de estos transportadores en las células endoteliales es gracias a las TJ que restringen el movimiento de las proteínas transportadoras y de los *lipid rafts* o balsas lipídicas a través de la membrana celular. Por último,

también existe la transcitosis adsortiva, por la cual se transportan moléculas como la albúmina, y la transcitosis mediada por receptor, para moléculas como la insulina (Abbott *et al.*, 2006; Abbott *et al.*, 2009; Tajés *et al.*, 2014) (Ver Figura 6).

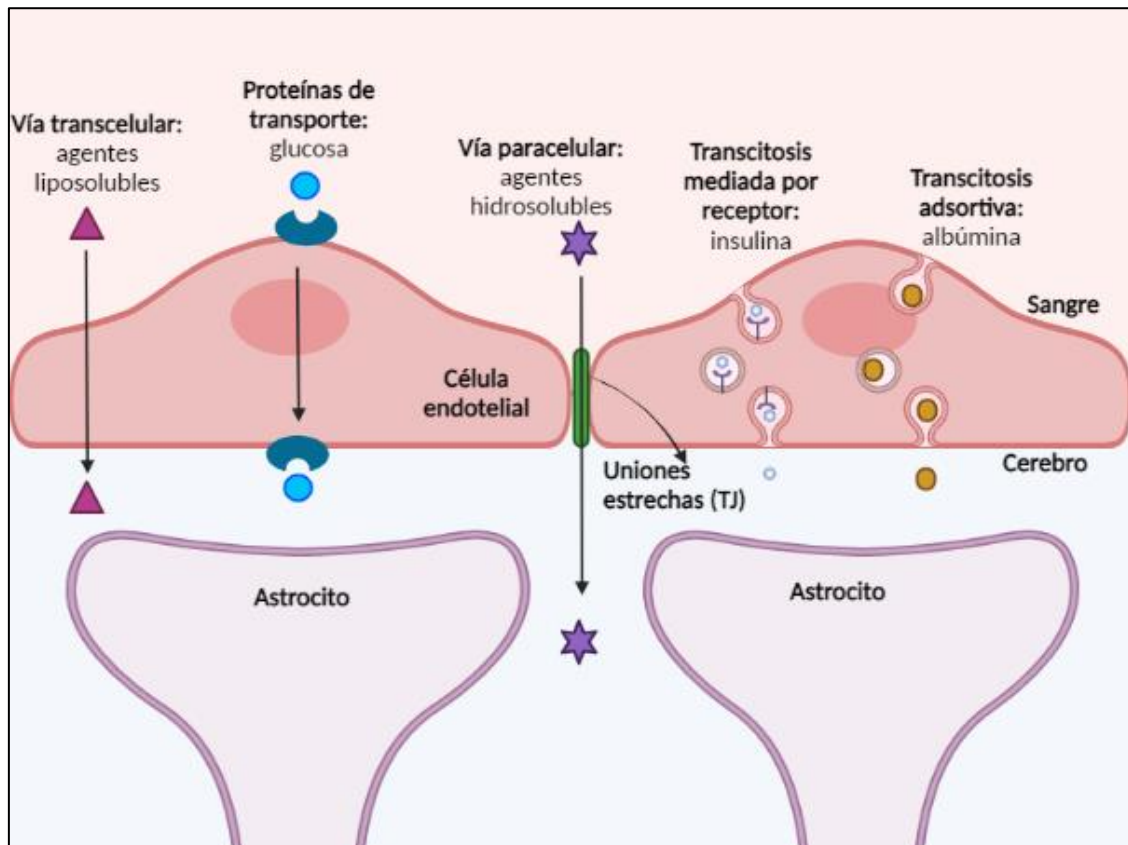


Figura 6: Diagrama representativo de las distintas vías de transporte a través de la barrera hematoencefálica. Mediante la vía transcelular se transportan moléculas liposolubles, mientras que los compuestos hidrosolubles se transportan mediante la vía paracelular, regulada por las uniones estrechas. La barrera también tiene proteínas de transporte, para el paso de moléculas como la glucosa. También existen la transcitosis mediada por receptor, por la cual se transportan moléculas como la insulina, o la transcitosis adsortiva, para moléculas como la albúmina.

Las células endoteliales se encuentran rodeadas de lo que se denomina la **lámina basal**, el componente acelular de la BHE, que consiste en una matriz extracelular compleja secretada por las células endoteliales, pericitos y astrocitos. Los principales constituyentes de la lámina basal son:

laminina y colágeno tipo IV. Estas moléculas son ligandos de las integrinas que se expresan en las membranas de las células que componen la BHE promoviendo así el anclaje de estas células. Además, la lámina basal regula la comunicación intercelular ya que inmoviliza las moléculas de señalización secretadas por las células. La lámina basal también media la redistribución de las proteínas que forman las TJ y la polarización de los transportadores explicados anteriormente, asegurando una correcta dirección en el intercambio de moléculas (Obermeier *et al.*, 2016).

En esta zona acelular de la lámina basal juegan un papel muy importante las enzimas proteolíticas metaloproteinasas de la matriz (**MMPs**). Las MMPs son endopeptidasas dependientes de zinc y calcio capaces de degradar los sustratos de la lámina basal disminuyendo así la integridad de la BHE (Obermeier *et al.*, 2016).

Existe un tipo celular que se encuentra en la lámina basal: son los **pericitos**. Los pericitos están totalmente embebidos en la lámina basal y por tanto se encuentran separados de las células endoteliales, aunque en sitios localizados se encuentran unidos por distintos tipos de uniones, entre las que se encuentran las TJ (Obermeier *et al.*, 2016). La vasculatura del SNC tiene más pericitos que los vasos de la periferia. Entre las funciones que ejercen estas células están la de regular el diámetro de los capilares, el flujo sanguíneo cerebral y regular la secreción y los niveles de las proteínas que forman la matriz extracelular (Keaney & Campbell, 2015) (Ver Figura 7).

Otro tipo celular que también forma parte de la BHE son los **astrocitos**, que son el tipo celular más abundante del cerebro y que tienen múltiples funciones además de la regulación de la BHE como son: formación de sinapsis, recogida y reciclaje de neurotransmisores e iones, regulación de los niveles extracelulares de potasio, nutrición de las neuronas y control de la respuesta inflamatoria del SNC. Además de estas funciones, participan en la regulación de la permeabilidad y función de la BHE, ya que emiten los pies astrocitarios que se anclan a la lámina basal y que cubren el 99% de la vasculatura del SNC (Obermeier *et al.*, 2016). Se comunican con las células endoteliales mediante mediadores, ya que se encuentran separadas

físicamente por la lámina basal. Cultivos in vitro demuestran que los astrocitos hacen que aumente la expresión de las proteínas que forman las TJ, transportadores, y enzimas metabólicas, que mejoran el fenotipo de la BHE (Keaney & Campbell, 2015; Obermeier *et al.*, 2016).

Otros componentes que se consideran que forman parte de la BHE ya que interactúan con el resto de los componentes anteriormente explicados son las neuronas, la microglía (el sistema inmune del SNC), los macrófagos perivasculares y células inmunes periféricas; formando así una barrera que además de permitir el intercambio de sustancias entre el parénquima cerebral y la periferia, también protege al cerebro de la entrada de toxinas.

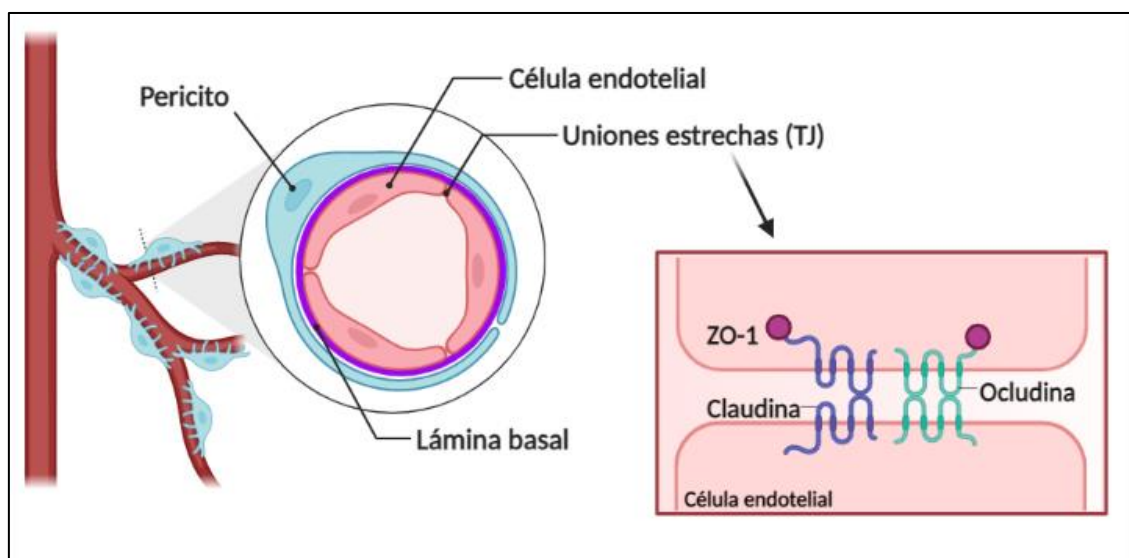


Figura 7: Representación de la unidad neurovascular de la barrera hematoencefálica y de las uniones estrechas. La unión neurovascular está formada por distintas células, como células endoteliales y pericitos, y la lámina basal. Ayuda a proteger al cerebro de la entrada de toxinas y permite el intercambio de sustancias entre el parénquima cerebral y la periferia. Las uniones estrechas sellan las células endoteliales restringiendo la difusión paracelular de moléculas. Están formadas por proteínas transmembrana (occludina y claudinas) que se unen al citoesqueleto de actina mediante las proteínas citoplasmáticas como ZO-1. ZO-1 (zona occludens).

Hay muchos factores que modulan la BHE. Por ejemplo, tanto las bacterias como sus productos son capaces de modificar esta barrera. Por un lado, la permeabilidad de la BHE puede verse incrementada tras la inyección del LPS (Banks *et al.*, 2015) y en casos de sepsis (Danielski *et al.*, 2018). Por otro lado, y como se ha comentado antes, la microbiota es necesaria para el correcto desarrollo y funcionamiento de la BHE. Braniste y colaboradores demostraron que los ratones libres de microorganismos tienen una BHE más permeable, tanto en la etapa embrionaria como en la adulta. Este aumento de la permeabilidad se debe a que las TJ están desorganizadas y a una disminución de ocludina y claudina 5. La colonización de estos ratones libres de microorganismos con la microbiota de ratones libres de patógenos específicos aumenta la integridad de la BHE, incrementando la expresión de ZO-1, ocludina y claudina 5 en el estriado, en la corteza frontal y en el hipocampo, disminuyendo la permeabilidad a *Evans Blue*. Los resultados son muy parecidos cuando se realiza una monocolonización con una cepa de bacterias que produce SCFA (Braniste *et al.*, 2014). Además, un estudio *in vitro* ha demostrado que el propionato, un tipo de SCFA, tiene efectos beneficiosos sobre la BHE ante el daño producido por el LPS, disminuyendo la permeabilidad de la BHE (Hoyles *et al.*, 2018). Por el momento se desconoce el mecanismo de acción exacto de los SCFA: puede ser que actúen a través de los receptores GPR41 y GPR43 (Sivaprakasam *et al.*, 2016) o entrando en las células y actuando como un inhibidor de la histona deacetilasa modificando epigenéticamente el fenotipo (Michel & Prat, 2016). Por tanto, es interesante destacar la importancia de seguir estudiando cómo el consumo de psicobióticos podría mejorar la salud mental a través de su acción sobre la BHE.

También se ha visto que, en diversas condiciones neuropsiquiátricas como la esquizofrenia, el autismo y la depresión, la BHE está alterada, observándose, por ejemplo, una disminución de las proteínas que forman las uniones estrechas, lo cual aumenta su permeabilidad. Los estudios sugieren que este aumento de la permeabilidad promueve el paso de componentes proinflamatorios, como las citoquinas, al cerebro dando lugar a la neuroinflamación y cambios comportamentales que se observan en esas condiciones. A su vez se ha visto que la activación prolongada de la microglía puede dañar la BHE mediante la secreción de especies reactivas

del oxígeno y citoquinas como TNF- α e IL-1 β (revisado en (Kealy *et al.*, 2020)).

Por lo tanto, en patologías que cursan con inflamación, la integridad de la BHE podría estar alterada, relacionándose con neuroinflamación. La regulación de la microbiota y de la barrera intestinal podría ayudar a prevenir este efecto, con consecuencias sobre la homeostasis cerebral y en último término sobre la conducta.

2. ALCOHOL

El consumo de alcohol está ampliamente integrado en nuestra cultura, sin embargo, es una de las principales causas prevenibles de enfermedad y muerte en todo el mundo.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el consumo total de alcohol por habitante a nivel global de la población mayor de 15 años en el 2016 fue de 6,4 litros, siendo Europa la región con los niveles más altos de consumo. En ese mismo año, casi la mitad de la población mundial había consumido alcohol en los últimos 12 meses. Además, el consumo de alcohol en 2016 causó 3 millones de muertes en el mundo, siendo esta mortalidad mayor a la de otras enfermedades como el VIH o diabetes. De todas las muertes atribuibles por el alcohol, el 28,7% fue debido a traumatismos y el 21,3% a enfermedades del aparato digestivo (WHO, 2018).

Además de este tipo de enfermedades, el consumo el alcohol está relacionado con patologías psiquiátricas como la depresión, ansiedad y el trastorno por uso del alcohol (TUA). En 2016, se estimó que un 5,1% de la población mundial podría padecer un TUA (WHO, 2018). El TUA se define como un patrón patológico de comportamientos relacionados con el consumo de alcohol. Desde el 2014, año en que se publicó la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5),

el TUA se clasifica en un espectro de severidad variable que abarca el abuso y la dependencia del alcohol (APA, 2014).

El alcohol etílico (etanol o EtOH), es una molécula pequeña polar que es **absorbida** por difusión pasiva en su mayor parte en el intestino delgado pasando al torrente sanguíneo, aunque una parte del alcohol ingerido puede metabolizarse en el estómago y en el intestino delgado y dar lugar a acetaldehído, que se absorbe junto con el resto del alcohol (Hernández *et al.*, 2016). Por lo tanto, el daño que el consumo de alcohol provoca en el colon, que se explicará más adelante, se debe principalmente a los niveles de alcohol en sangre (Bishehsari *et al.*, 2017). La absorción del alcohol se ve afectada por la concentración de alcohol, el flujo sanguíneo en la zona de la absorción, el tipo de alcohol, el consumo de comida y la tasa de ingesta del alcohol (Cederbaum, 2012).

La mayor parte del alcohol ingerido se metaboliza en el hígado y este proceso consta de dos pasos: el primero lo cataboliza la enzima acetaldehído deshidrogenasa en el citosol y da lugar a la molécula acetaldehído, aunque este paso también lo puede realizar la catalasa, que se localiza en los peroxisomas, en condiciones de altas concentraciones de alcohol. El segundo paso lo cataboliza la enzima mitocondrial aldehído deshidrogenasa y da lugar a la formación de acetato. El acetato puede seguir metabolizándose fuera del hígado a acetil CoA, molécula clave para la síntesis de ácidos grasos, colesterol, esteroides o cuerpos cetónicos, o puede pasar a la circulación sanguínea. Además, el alcohol puede llegar al cerebro atravesando la BHE donde también tiene lugar el metabolismo que se acaba de explicar, pero en este caso el primer paso lo cataboliza principalmente la enzima catalasa (Cederbaum, 2012; Hernández *et al.*, 2016) (Ver Figura 8).

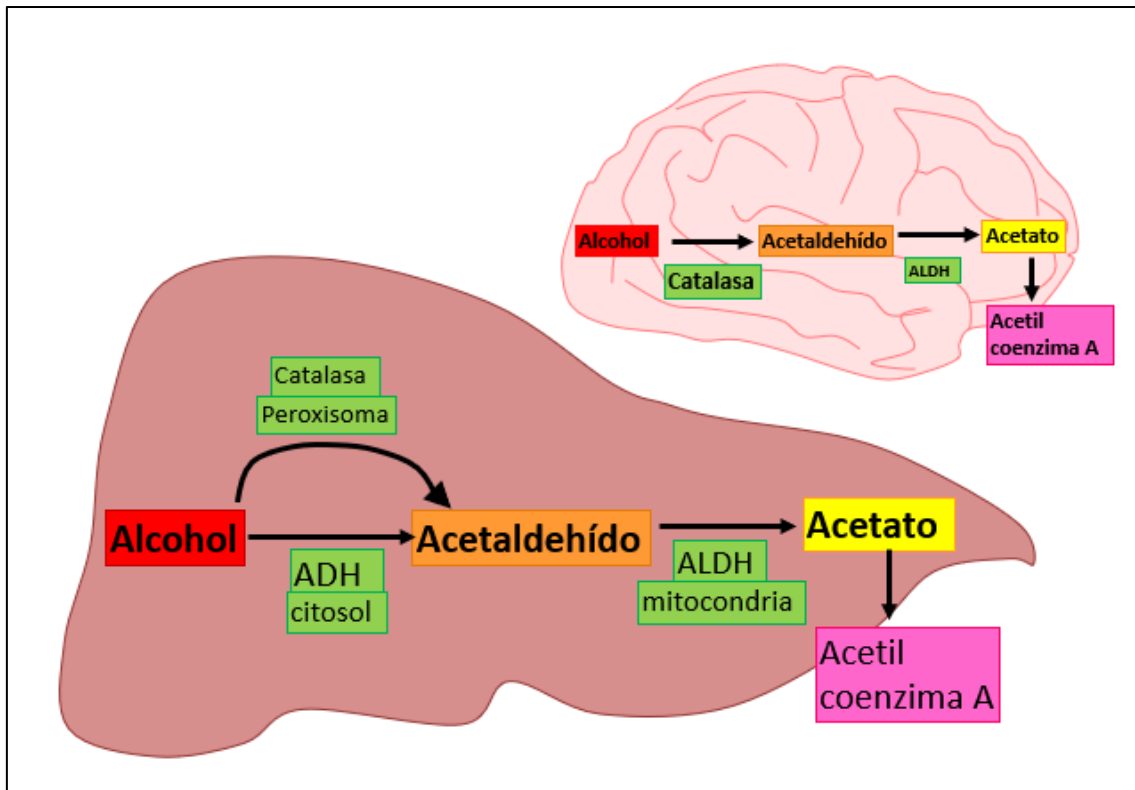


Figura 8: Esquema de la metabolización del alcohol en hígado y cerebro. En el hígado, el alcohol es metabolizado a acetaldehído por las enzimas ADH en el citosol, o por la enzima catalasa en el peroxisoma; mientras que en el cerebro esta reacción es catalizada por la segunda. En ambos tejidos, el acetaldehído es convertido en acetato por la ALDH, en la mitocondria. ADH: acetaldehído deshidrogenasa, ALDH: aldehído deshidrogenasa.

Aproximadamente, el 90% del alcohol se elimina por oxidación. El 10% restante se excreta por orina, sudor y la respiración. La tasa de eliminación del alcohol varía según el sexo, la edad, la raza, la comida ingerida, los ritmos biológicos, el ejercicio y consumo de otras drogas (Cederbaum, 2012).

2.1. El alcohol altera el eje microbiota-intestino-cerebro

2.1.1 Alteraciones en la microbiota e intestino

El consumo excesivo de alcohol puede provocar **disbiosis**: cambios en la cantidad de bacterias que existen en el intestino o cambios en su composición o en su actividad (Engen *et al.*, 2015).

Respecto a las **alteraciones cuantitativas**, hay estudios que han demostrado que el consumo de alcohol promueve un **aumento** de la cantidad de bacterias del intestino delgado tanto en animales tras tres semanas de consumo de alcohol (Yan *et al.*, 2011), como en personas que realizan un consumo crónico de alcohol (Bode *et al.*, 1984; Gabbard *et al.*, 2014). Hartmann y colaboradores observaron sobrecrecimiento bacteriano en el intestino grueso en roedores tras una semana de consumo de alcohol (Hartmann *et al.*, 2013). Este sobrecrecimiento puede deberse a que el alcohol disminuye la motilidad intestinal ya que altera el músculo liso (Preedy *et al.*, 1993); o porque el alcohol reduce la producción de ácido en el estómago (Chari *et al.*, 1993; Shindo *et al.*, 1993) y de ácidos biliares (Kakiyama *et al.*, 2013; Monroe *et al.*, 1981; Ridlon *et al.*, 2015) que limitan el crecimiento bacteriano.

Además de promover un aumento de la cantidad de bacterias, el consumo de alcohol también provoca **alteraciones cualitativas**, ya que parece alterar la **composición microbiana** tanto en animales tras 10 semanas de consumo de alcohol (Mutlu *et al.*, 2009) como en personas que consume alcohol de forma crónica (Mutlu *et al.*, 2012).

Sin embargo, este efecto del alcohol es más controvertido. Se han encontrado cambios en diferentes parámetros, como disminución de la diversidad α (riqueza de especies de una comunidad) y cambios en la diversidad β (grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades) tras una dieta líquida con alcohol durante 8 semanas (Bull-Otterson *et al.*, 2013) y tras una semana de administración de 0,8g/kg/día de alcohol (Lee *et al.*, 2020); mientras que otros estudios no

han observado cambios en estos mismos parámetros, por ejemplo tras una administración de alcohol al 30% a una dosis de 6g/kg (Neyrinck *et al.*, 2016). Esto parece indicar que el tipo de consumo de alcohol podría producir un impacto diferente en la microbiota, así que es necesario seguir investigando para establecer el efecto del consumo de distintos patrones de alcohol en la microbiota intestinal.

Al estudiar los cambios taxonómicos derivados del consumo de alcohol es cuando los resultados son más diversos. Esto se debe particularmente a que los experimentos estudian estos cambios a diferentes niveles taxonómicos (familia, división, género...). Se han publicado recientemente revisiones que resumen los cambios que tienen lugar tras el consumo de alcohol en modelos preclínicos (Engen *et al.*, 2015) y en humanos (Litwinowicz *et al.*, 2019). Cabe destacar que los individuos con TUA parecen caracterizarse por una disminución de *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii*. La primera es conocida por sus efectos protectores en la barrera intestinal, y la segunda secreta metabolitos que pueden bloquear la ruta NF- κ B, que está relacionada con la alteración de la barrera intestinal por el consumo de alcohol. Por el contrario, los pacientes con TUA parecen tener mayores niveles de Enterobacteriaceae y *Streptococcus*, que son los patógenos más comunes responsables de infecciones bacterianas en personas con cirrosis (revisado en (Qamar *et al.*, 2019)).

En cuanto a los **daños en la mucosa del colon**, diferentes estudios han demostrado que el consumo agudo de alcohol da lugar a daños en la capa de moco y en el epitelio intestinal en animales y humanos. Los principales daños que produce el consumo de alcohol son **apoptosis** (Asai *et al.*, 2003; Klingensmith *et al.*, 2017), hemorragia, ampollas, edema, inflamación, infiltración de células inflamatorias, reducción de la altura de las vellosidades y adhesión de bacterias a la mucosa (Bode & Bode, 2003; Brozinsky *et al.*, 1978; Gottfried *et al.*, 1978; Lambert *et al.*, 2003; Napolitano *et al.*, 1995; Persson *et al.*, 1990; Tamai *et al.*, 2000).

Los mecanismos exactos por los cuales el consumo de alcohol produce los cambios que se acaban de describir no se conocen en profundidad, pero los eventos iniciales desencadenantes son: un efecto tóxico directo del alcohol en la mucosa, daños en la microcirculación de la barrera intestinal, contracción de las vellosidades que da lugar a las ampollas y a la exfoliación de las vellosidades, y por último, infiltración de leucocitos que da lugar al aumento de especies reactivas del oxígeno y otras moléculas dañinas (Bode & Bode, 2003).

Además, el consumo de alcohol reduce la molécula antimicrobiana REG3 en roedores y humanos (Hartmann *et al.*, 2015), lo que hace que las bacterias estén más cerca del epitelio intestinal, dando lugar a la activación del sistema inmune (Vaishnava *et al.*, 2011).

Otro mecanismo por el cual el alcohol daña la barrera intestinal es la **alteración de las TJ**. A tenor de estudios *in vitro*, se sabe que el alcohol altera la expresión y organización de las proteínas del citoesqueleto y de las TJ, dañando así la integridad de estas uniones. Esto podría ser debido a que el alcohol produce la fosforilación de miosina (Elamin *et al.*, 2014a; Elamin *et al.*, 2014b; Ma *et al.*, 1999) y la hiperacetilación de microtúbulos (Elamin *et al.*, 2012).

Sin embargo, no solo el alcohol produce efectos deletéreos directos sobre la barrera intestinal, sino que también puede hacerlo a través de su metabolito **acetaldehído**, producido por la deshidrogenasa de la mucosa y de la microbiota (Visapaa *et al.*, 2002). Gracias al uso de modelos *in vitro* se postula que posiblemente el acetaldehído, mediante la fosforilación de las TJ y AJ, provoca la alteración de su distribución y la pérdida de interacción entre las TJ (Atkinson & Rao, 2001; Sheth *et al.*, 2007). El acetaldehído también promueve la hiperacetilación de los microtúbulos (Elamin *et al.*, 2012) y la disminución de las proteínas que forman las TJ (Seth *et al.*, 2004).

2.1.2 Alteraciones en la BHE y neuroinflamación

Como acabamos de ver, el consumo de alcohol daña las TJ aumentando la permeabilidad de la barrera intestinal. Esto hace que los niveles de la endotoxina LPS se encuentren elevados en plasma, lo cual puede producir una endotoxemia. El LPS llega al hígado y produce la liberación de citoquinas proinflamatorias, que se liberan a la circulación sistémica y cruzan la barrera hematoencefálica activando las células endoteliales, la microglía y los astrocitos (revisado en (Montesinos, Alfonso-Loeches *et al.*, 2016)). Además, el alcohol, al ser una molécula pequeña polar, directamente cruza la BHE, activa el receptor TLR4, que en el SNC se localiza en neuronas, astrocitos, macrófagos y microglía (Pascual *et al.*, 2018). Tras la activación del TLR4, como se ha comentado en apartados anteriores, se produce la liberación de mediadores proinflamatorios, que pueden causar astrogliosis, microgliosis e infiltración de leucocitos. Este ambiente proinflamatorio puede inducir daño neuronal y neuroinflamación, así como efectos comportamentales que se comentarán más adelante (Crews *et al.*, 2015; Montesinos *et al.*, 2016; Stärkel *et al.*, 2018) (Ver Figura 9).

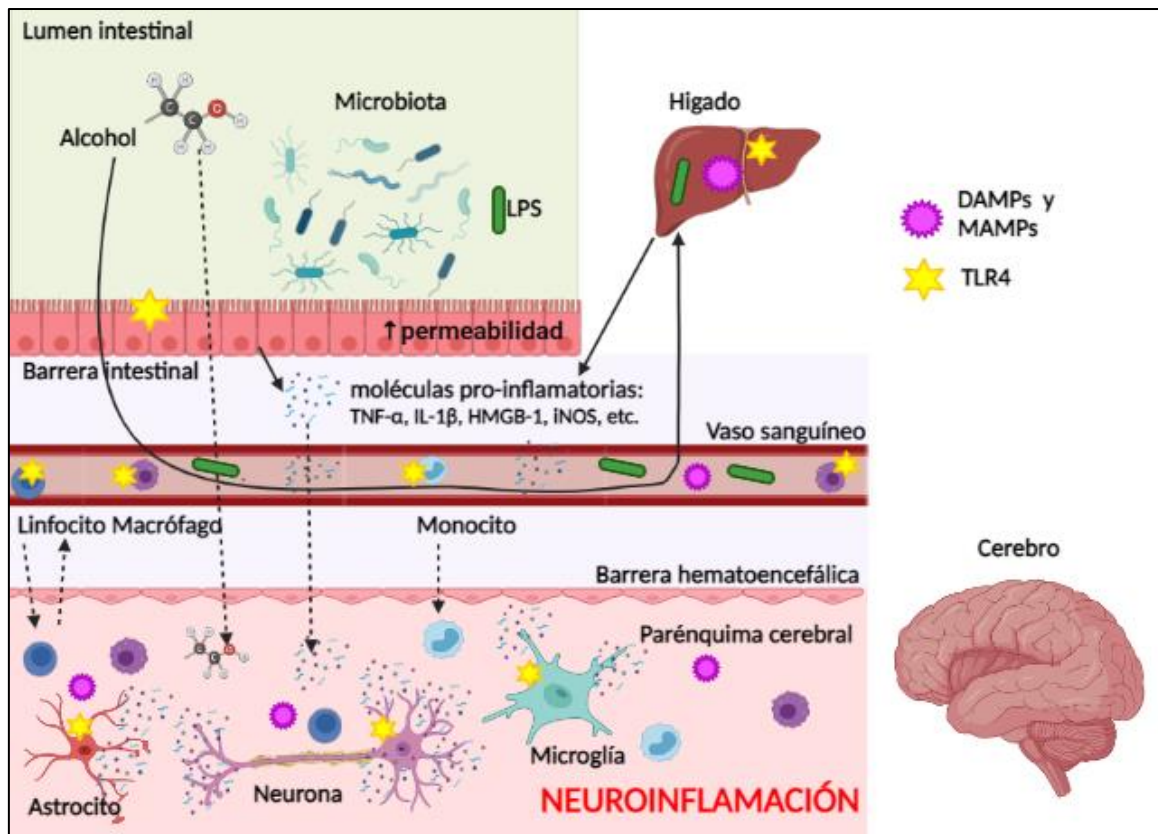


Figura 9: Neuroinflamación inducida por el alcohol (adaptada en Montesinos *et al.*, 2016). El alcohol altera la microbiota intestinal y aumenta la permeabilidad de la barrera intestinal. Esto permite el paso del LPS a la circulación sistémica, que llega al hígado y estimula el receptor TLR4 (presente en varias localizaciones: intestino, hígado, linfocitos sanguíneos, etc) dando lugar a moléculas proinflamatorias que cruzan la barrera hematoencefálica, y activan las células del parénquima cerebral (astrocitos, microglía...), pudiendo causar astrogliosis, microgliosis e infiltración de leucocitos. El alcohol también puede difundir directamente al cerebro activando la vía del TLR4 en neuronas y células gliales. Esta neuroinflamación puede contribuir a la producción de daño neuronal, y tiene efectos comportamentales. LPS: Lipopolisacárido, TNF- α : factor tumoral de necrosis alfa, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, IL: interleuquina, HMGB1: proteína de alta movilidad del grupo de caja 1, PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos, DAMPs: patrones moleculares asociados a daño, TLR4: receptor de tipo Toll 4.

En resumen, la neuroinflamación, como acabamos de ver, se puede dar mediante diferentes mecanismos: directamente por el alcohol, ya que es capaz de cruzar la BHE y promover la síntesis de mediadores proinflamatorios activando el receptor TLR4, o mediante las citoquinas producidas en la periferia, específicamente a nivel hepático e intestinal, que o bien cruzan la BHE, o bien producen neuroinflamación mediante la

transducción de señales a través de las células endoteliales que forman la BHE.

Además de estos mecanismos, también existe la posibilidad de que el alcohol modifique la BHE y aumente su permeabilidad. Sin embargo, los estudios a este respecto son contradictorios: unos estudios demuestran que el alcohol aumenta la permeabilidad de la BHE (Haorah *et al.*, 2005) y otros encuentran que el alcohol no modifica la permeabilidad de ésta (Elmas *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2007).

2.1.3 Alteraciones en el comportamiento

En el curso del TUA pueden surgir síntomas afectivos negativos, como la **ansiedad**, irritabilidad o **bajo estado anímico**, que pueden suponer un motivo para que siga teniendo lugar la ingesta de alcohol. La teoría neurobiológica que da explicación a la emergencia de dichos estados negativos recibió el nombre de “*dark side*” o lado oscuro de la adicción (Koob, 2015).

Además, en el TUA existe una elevada comorbilidad psiquiátrica, especialmente con **depresión** y con estrés postraumático (Hasin & Grant, 2015). Así, por un lado, los pacientes que padecen depresión y/o ansiedad también padecen TUA con mayor frecuencia que la población general, (Boschloo *et al.*, 2011) y, por otro lado, los pacientes con TUA tienen una mayor probabilidad de sufrir depresión que la población general (Fergusson *et al.*, 2009).

Estudios durante la adolescencia han concluido que en sujetos humanos el consumo de alcohol da lugar a déficits en el aprendizaje, atención y memoria. En modelos animales se ha observado que el consumo de alcohol da lugar a una disminución de la flexibilidad del comportamiento, aumento de comportamiento **tipo ansioso**, desinhibición y persistencia del fenotipo adolescente en la etapa adulta (Spear, 2018).

Los efectos comportamentales del consumo crónico de alcohol han sido ampliamente estudiados. En esta Tesis Doctoral nos centraremos principalmente en las respuestas motivacionales y emocionales negativas asociadas a un patrón de consumo de alcohol en atracón.

2.2 El consumo de alcohol en atracón

Existe información científica acerca de cómo el consumo de alcohol en general (consumo crónico, agudo, etc.) podría afectar al eje intestino-cerebro. Sin embargo, hay pocos estudios que hayan abordado específicamente el efecto del consumo de alcohol en atracón (CAA) en este eje, un tipo de patrón que en los últimos años se ha extendido entre la población general, y especialmente entre adolescentes y adultos jóvenes (ESPAD Group, 2020; SAMHSA, 2017).

El CAA es un patrón de consumo de alcohol en el que los niveles de esta droga en sangre alcanzan una concentración de al menos 0,08 g/dL. En hombres, esta concentración se suele alcanzar al consumir cinco unidades o más de bebida estándar (14g de alcohol) en dos horas, mientras que en las mujeres son cuatro o más unidades de bebida estándar en el mismo tiempo (NIAAA, 2004). A pesar del límite que marca la definición del patrón de consumo, los niveles de alcohol en sangre que se suelen alcanzar son mucho más elevados, pudiendo llegar a ser 250 mg/dL (Pascual *et al.*, 2017), o incluso >400 mg/dL (Afshar *et al.*, 2015).

En una encuesta realizada en 35 países europeos, se reveló que alrededor de una de cada tres personas (34%) de 15-16 años habían consumido alcohol en forma de atracón en el último mes (ESPAD Group, 2020). La encuesta nacional de Estados Unidos mostró que alrededor del 40% de adultos jóvenes (20-25 años) han consumido alcohol en forma de atracón al menos una vez al mes (SAMHSA, 2017). En EEUU, de las 88.000 muertes anuales que causa el consumo de alcohol, la mitad son debidas a este patrón de consumo (Kanny *et al.*, 2015), y genera el 77% (191,1 billones de dólares) del gasto anual que produce el consumo de alcohol (Sacks *et al.*, 2015).

El estudio del CAA es de gran importancia, no sólo por los daños físicos y psicológicos que puede producir, sino porque en sí mismo es un factor de predisposición para el desarrollo de un TUA en el futuro tanto en animales como en humanos (Crews *et al.*, 2016).

Este patrón de consumo puede mimetizarse en animales de laboratorio mediante diferentes modelos. Por un lado, están los modelos de consumo voluntario, más usados para medir la impulsividad y la preferencia por el alcohol. Por ejemplo, el sistema de dos botellas (*two-bottle choice*) en el que los animales son expuestos durante varios días a agua solo, y luego uno de los biberones se cambia por concentraciones crecientes de alcohol. Otro modelo ampliamente usado es el de “bebiendo en la oscuridad” (*drinking in the dark*), en el cual a los animales se les reemplaza el biberón de agua por alcohol en el ciclo de oscuridad de los animales durante 2-4 horas. En este modelos, los animales alcanzan unos niveles de aproximadamente 0,08 g/dL de alcohol en sangre (Jeanblanc *et al.*, 2018).

Sin embargo, con estos modelos los roedores no llegan a consumir de forma voluntaria niveles tan altos de alcohol como los que se alcanzan en humanos en un atracón, por lo que se pueden usar modelos de administración forzada, que son más precisos para medir aspectos farmacológicos. El ***gavage*** consiste en insertar una cánula en el esófago del roedor e inyectar una solución de alcohol, que se absorbe en el tracto digestivo y da lugar a unos niveles de alcohol en sangre muy parecidos a los que se observa en los humanos. Este procedimiento se puede llevar a cabo de forma aguda, subcrónica o crónica (Jeanblanc *et al.*, 2018). Este tipo de administración se usa ampliamente para el estudio de los daños que produce el atracón de alcohol en el hígado, en forma de administración aguda junto a una dieta alta en grasas (Wang *et al.*, 2017), de forma aguda junto a una dieta líquida con alcohol (Thompson *et al.*, 2017), o de forma subcrónica (Yan *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2017); aunque también se ha usado para el estudio del impacto del consumo crónico de alcohol en el aprendizaje y la memoria en ratones con daño cerebral (Karelina *et al.*, 2017) y del aumento del consumo voluntario de alcohol tras su consumo crónico (Griffin *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que el daño a la sustancia blanca, la neurotoxicidad y la inhibición de la neurogénesis adulta pueden ocasionar un menor control sobre el consumo en la etapa adulta (Nixon & McClain, 2010). El CAA en ratones adolescentes da lugar a cambios epigenéticos duraderos en genes asociados con la adicción en la corteza frontal, lo cual se ha relacionado con cambios en el circuito de la recompensa, con la preferencia por el alcohol y con los comportamientos tipo ansioso. A su vez estos efectos han sido correlacionados con la activación del receptor TLR4 (revisado en (Pascual *et al.*, 2018)).

En esta Tesis Doctoral se ha usado un modelo de *gavage* para poder controlar mejor los niveles de alcohol en sangre y seguir la línea de investigación iniciada en experimentos previos con el mismo modelo. En concreto, se ha usado una versión modificada del modelo de Majchrowicz, que consiste en realizar 3 administraciones diarias de alcohol durante 4 días consecutivos, controlando los signos de intoxicación (Majchrowicz, 1975). Este modelo ha sido previamente validado por otros autores y por nuestro grupo de investigación para estudiar neurodegeneración y déficits cognitivos (Obernier *et al.*, 2002a; Obernier *et al.*, 2002b); neuroinflamación (Antón *et al.*, 2017; Tajuddin *et al.*, 2014), incluyendo la respuesta de la microglía (Marshall *et al.*, 2016); el comportamiento durante la abstinencia a alcohol (Antón *et al.*, 2017; Morris *et al.*, 2010); para estudiar los niveles de orexina y su relación con el consumo de alcohol, el refuerzo y el insomnio durante la abstinencia (Sharma *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2021); así como para estudiar los efectos del CAA sobre la plasticidad neuronal (McClain & Nixon, 2016).

Hay que tener en cuenta que los animales pequeños (ratas y ratones) metabolizan el alcohol más rápido que los animales más grandes (incluyendo los humanos). La tasa de metabolización de las ratas es de 42,2 mg/dL/h (Kelly *et al.*, 1987), mientras que la de las personas es de 20 mg/dL/h (Gershman & Steeper, 1991). Por lo tanto, las ratas requieren niveles de alcohol más altos que los de las personas para tener los efectos biológicos equivalentes (Shukla *et al.*, 2013).

A continuación, se expone lo que se conoce hasta ahora de cómo el CAA afecta al eje intestino-cerebro. Cabe señalar que en el momento de plantear esta Tesis Doctoral, hasta donde nosotras sabemos, no se habían publicado estudios sobre los efectos del CAA en la microbiota ni en la barrera intestinal. Los experimentos que se detallan a continuación en estos apartados fueron publicados al mismo tiempo o tras la obtención de los resultados de esta Tesis Doctoral.

En cuanto a **la microbiota intestinal**, en el momento de la realización de esta Tesis Doctoral se desconocían en profundidad los efectos que produce el patrón de CAA sobre la microbiota intestinal, que es objeto de estudio en esta Tesis. En el momento en el que se estaba escribiendo esta Tesis, se publicó un artículo que usaba un modelo de *drinking in the dark* en ratón y posteriormente se publicó otro artículo que usaba un modelo intermitente de alcohol durante la adolescencia de las ratas, en los que se observó que el CAA no alteró ni la diversidad α ni la diversidad β (Reyes *et al.*, 2020; Vetreno *et al.*, 2021). A nivel taxonómico en Reyes y colaboradores, no se observaron cambios en las bacterias estudiadas (Reyes *et al.*, 2020); mientras que en Vetreno y colaboradores observaron que el alcohol dio lugar al aumento del *phylum* Actinobacteria y alteró los niveles de bacterias pertenecientes a diferentes géneros (Vetreno *et al.*, 2021).

En relación con las **alteraciones en la barrera intestinal** en animales de experimentación, se sabe que el CAA produce una disminución de los niveles de las proteínas que forman las TJ claudina-1, claudina-4, ocludina y zona occludens-1 en los enterocitos del intestino delgado. Estas alteraciones se deben principalmente al estrés nitrosativo producido por el CAA. Así mismo, el CAA da lugar a un aumento de los marcadores de apoptosis caspasa 3 y 9 en enterocitos del intestino delgado. Estos cambios aumentan la permeabilidad de la barrera intestinal dando lugar a un aumento de LPS en plasma (Cho *et al.*, 2018).

Este fenómeno del aumento de LPS en plasma ya se había descrito tras el CAA en experimentos anteriores en nuestro laboratorio tanto en animales (Antón *et al.*, 2017) como en humanos (Orio *et al.*, 2018). Varios

grupos de investigación como el de la Dra. Consuelo Guerri en España, los del Dr. Fulton Crews y la Dra. Gyongyi Szabo en EEUU, y también nuestro grupo de investigación, dirigido por la Dra. Laura Orío, han demostrado que el CAA produce **neuroinflamación** en la corteza frontal mediada por la activación de TLR4 (ver revisiones del tema de cada grupo en (Crews *et al.*, 2017; Montesinos *et al.*, 2016; Orio *et al.*, 2019; Szabo & Lippai, 2014)).

Utilizando el mismo modelo de CAA empleado en los experimentos de esta Tesis Doctoral, estudios previos de nuestro grupo caracterizaron en detalle la vía proinflamatoria activada por el alcohol (Antón *et al.*, 2017). Así, tras el CAA se produce un aumento de los niveles del receptor TLR4 y de su molécula adaptadora MyD88, así como de su correceptor, la proteína de diferenciación mieloide (MD2) en la corteza frontal. Como consecuencia, se modifican los niveles de algunos componentes de la vía de señalización del NF- κ B, tales como la proteína inhibidora I κ B α , que inhibe NF- κ B y lo secuestra en el citoplasma en el estado inactivo. El CAA aumenta los niveles de p65, que es la subunidad de NF- κ B que se transloca al núcleo cuando I κ B α es degradado y que se une al DNA dando lugar a la transcripción de múltiples genes proinflamatorios. Así, se observa un aumento la liberación de TNF- α e IL-1 β en la corteza frontal, que también se ha observado en el plasma, y un aumento de iNOS y de 4-HNE, un producto tóxico formado por la peroxidación lipídica que se genera a consecuencia de la interacción de los lípidos de la membrana celular con los nitritos, producidos por iNOS. Además, el CAA aumenta los niveles cerebrales de la caspasa 8, así como los niveles y la actividad de la caspasa-3, que da lugar a la apoptosis o muerte celular. Por último, tras la translocación de p65 al núcleo se produce la síntesis de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), que regula la migración de células del sistema inmune participando en el proceso inflamatorio, y de la proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 (HMGB1), un tipo de patrón molecular endógeno de respuesta al daño tisular, que a su vez se une al receptor TLR4 activando esta vía que se acaba de explicar (ver Imagen 5) (Antón *et al.*, 2017).

En sujetos humanos que practican este patrón de consumo de alcohol de forma regular, además del aumento de LPS, también se encontraron aumentados los niveles plasmáticos o linfocitarios de TLR4,

MyD88, MD2, p65, TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 y COX-2, indicando que la vía proinflamatoria del NF- κ B está activada, y podría ser especialmente perjudicial en mujeres consumidoras, que mostraron elevados niveles del factor indicador de daño HMGB1. Además, los niveles de algunos de estos marcadores de inflamación correlacionaron con peores puntuaciones en la memoria episódica y tareas ejecutivas en mujeres bebedoras, pero no en hombres (Antón *et al.*, 2018; Orio *et al.*, 2018).

En cuanto al **daño en la BHE**, durante el período de realización de esta Tesis Doctoral, Rubio-Araiz y colaboradores publicaron un artículo observando un aumento de la permeabilidad de la BHE en la región CA1 del hipocampo usando el modelo *drinking in the dark* en ratón (Rubio-Araiz *et al.*, 2017). Sin embargo, no tenemos constancia de que haya más estudios que analicen el daño que produce el CAA en la BHE, que constituye uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral (Ver Figura 10).

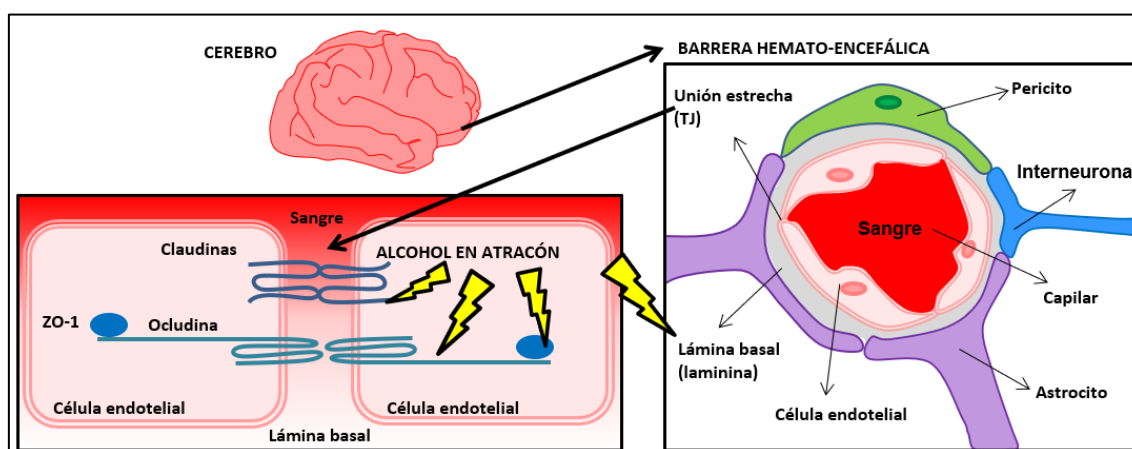


Figura 10: Representación de los posibles puntos de acción del CAA en la barrera hematoencefálica. El consumo de alcohol en atracón es posible que altere las proteínas que forman la barrera hematoencefálica, como las claudinas, ocludina y ZO-1. ZO-1: zona occludens.

Existen numerosos estudios clínicos y preclínicos que han evaluado el **impacto neuropsicológico** del CAA, especialmente en los adolescentes, ya que el CAA es un patrón de consumo llevado a cabo en su mayoría por adolescentes y adultos jóvenes (Kuntsche & Gmel, 2013). Además, los

adolescentes son más vulnerables a los efectos del consumo de alcohol. Esto parece deberse a que su cerebro todavía se encuentra en proceso de maduración y por tanto sufriendo numerosos cambios estructurales y funcionales, especialmente en la corteza prefrontal, área relacionada con las funciones ejecutivas, que continúa su desarrollo casi en la etapa adulta (revisado en (Carbia *et al.*, 2018)). La memoria episódica también continúa en desarrollo hasta la edad adulta en un proceso que se relaciona con la integración del circuito hipocampo-corteza prefrontal (Murty *et al.*, 2016).

En **modelos animales** de CAA los cambios que se han observado son alteraciones en la memoria espacial, pérdida de la flexibilidad comportamental y cognitiva, desinhibición, impulsividad, aumento de conductas de riesgo, aumento del consumo de alcohol, y mayor aumento del **comportamiento tipo ansioso y depresivo**. Algunos de estos cambios persisten además en la edad adulta: la impulsividad, la preferencia por el riesgo, el comportamiento ansioso y el aumento del consumo de alcohol (revisado en (Crews *et al.*, 2016; Hiller-Sturmhöfel & Spear, 2018). En animales también se ha comprobado que el CAA produce alteraciones estructurales en la corteza frontal (menos volumen) (Vetreno *et al.*, 2017) y en el hipocampo (aumento del número de espinas dendríticas con características de inmadurez) (Risher *et al.*, 2015). Estos cambios se mantuvieron en la etapa adulta.

Se han realizado diversos estudios para analizar el efecto del CAA en el comportamiento de los **humanos** en etapas tempranas (10-24 años). Consistentemente los resultados que se han obtenido son: peor toma de decisiones, menor inhibición, peor funcionamiento de procesos cognitivos como atención, memoria y función ejecutiva, peor procesamiento emocional y un mayor consumo de alcohol en la etapa adulta (revisado en (Guerri & Pascual, 2018; Lees *et al.*, 2019; Waszkiewicz *et al.*, 2018)). Igual que ocurre en los modelos animales, algunas de estas alteraciones persisten en la edad adulta, como por ejemplo el mayor consumo de alcohol (Strong *et al.*, 2010). Además, se ha comprobado por estudios de imagen que el CAA en personas adolescentes da lugar a cambios estructurales (menor volumen) de la materia gris y blanca de regiones cerebrales como la corteza frontal y el hipocampo, altamente relacionadas con las funciones

que hemos visto que se encuentran alteradas tras el CAA (revisado en (Lees *et al.*, 2019; Waszkiewicz *et al.*, 2018)). Algunos estudios no han observado cambios en el comportamiento, sin embargo, han encontrado anomalías en el procesamiento durante la fase de codificación de la memoria (Folgueira-Ares *et al.*, 2017).

En resumen, el CAA no es un hábito inofensivo, sino que da lugar a alteraciones neuropsicológicas, que en ocasiones pueden continuar en la etapa adulta. Estas alteraciones se relacionan con el daño neuronal y la neuroinflamación que provoca este tipo de consumo de alcohol (revisado en (Crews *et al.*, 2016; Guerri & Pascual, 2010; Jacobus & Tapert, 2013; Pascual *et al.*, 2018)).

3. OEA

La **oleoiletanolamida** (OEA) es un biolípido endógeno que fue descrito en primer lugar como un factor de saciedad que se sintetiza en el intestino y reduce la ingesta de comida y el peso corporal (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001). La OEA forma parte de la familia de las N-acetiletanolaminas (NAEs), que ejercen muchas funciones reguladoras, como **efectos antiinflamatorios, analgésicos y neuroprotectores**. Algunos biolípidos de esta familia son la anandamida, que forma parte del sistema endocannabinoide; y la N-palmitoiletanolamida (PEA).

Estos biolípidos no se almacenan en vesículas, sino que son sintetizados a demanda a partir de fosfolípidos de la membrana en respuesta a estímulos. Por lo tanto, los niveles endógenos de estos biolípidos están regulados fundamentalmente por las enzimas que las sintetizan y degradan.

La vía principal de **síntesis** de las NAEs empieza por la transferencia de una cadena de ácidos grasos de un glicerofosfolípido al grupo amino de la fosfatidiletanolamina. Este primer paso está catalizado por la N-acil transferasa (NAT) y da lugar a la N-acil fosfatidiletanolamina (NAPE). El

siguiente paso está catalizado por la NAPE-fosfolipasa D (NAPE-PLD) y da lugar a la liberación de NAE desde su precursor NAPE. Hay otras vías que dan lugar a NAE desde el precursor NAPE. Por ejemplo, la fosfolipasa C cataliza la formación de fosfo-NAE, que después es transformado a NAE mediante la eliminación del grupo fosfato por fosfatasas. También la A/B-hidrolasa 4 (ABDH4) promueve la formación de liso-NAPE, que puede ser convertido en NAE directamente por la acción de la enzima liso-PLD, o puede ser convertido en glicerofosfo-NAE por ABDH4, y luego transformado en NAE por acción de una glicerofosfodiesterasa (Alhouayek & Muccioli, 2014; Okamoto *et al.*, 2009).

En cuando a la **degradación**, las NAEs pueden ser transformadas a ácidos grasos y etanolamida por la ácido graso amido hidrolasa (FAAH 1 y 2) y por la N-acil etanolamina-hidrolizante ácido amidasa (NAAA). Por otro lado, otras enzimas como la COX-2 y la lipooxigenasa pueden degradar también NAEs dando lugar a la formación de prostamidas y prostaglandinas; y ácidos hidroxi-eicoatrienoicos, respectivamente (Fezza *et al.*, 2014; Ueda, N. *et al.*, 2013) (Ver Figura 11).

Figura 11: Estructura química de las acetiletanolamidas anandamida (AEA), oleoiletanolamida (OEA) y palmitoiletanolamida (PEA), y las vías de su síntesis, degradación y oxidación. (Adaptado de Orio *et al.*, 2019). La vía principal de síntesis de las NAEs empieza por la transferencia de una cadena de ácidos grasos de un glicerofosfolípido al grupo amino de la fosfatidiletanolamina. Este primer paso está catalizado por la NAT y da lugar a NAPE. El siguiente paso está catalizado por la NAPE-PLD y da lugar a la liberación de NAE desde su precursor NAPE. Hay otras vías que dan lugar a NAE desde el precursor NAPE. Por ejemplo, la fosfolipasa C cataliza la formación de fosfo-NAE, que después es transformado a NAE mediante la eliminación del grupo fosfato por fosfatasas. También la ABDH4 promueve la formación de liso-NAPE, que puede ser convertido en NAE directamente por la acción de la enzima liso-PLD, o puede ser convertido en glicerofosfo-NAE por ABDH4, y luego transformado en NAE por acción de una glicerofosfodiesterasa. En cuanto a la degradación, las NAEs pueden ser transformadas a ácidos grasos y etanolamida mediante la FAAH 1 y 2, y la NAAA. Por otro lado, otras enzimas como la COX-2 y la lipooxigenasa pueden degradar también NAEs dando lugar a la formación de prostamidas y prostaglandinas; y ácidos hidroxiicoatrienoicos, respectivamente. NAT: N-acil transferasa dependiente de calcio, iNAT: N-acil transferasa independiente de calcio, NAPE: N-acil fosfatidiletanolamina, NAPE-PLD: NAPE-fosfolipasa D, ABDH4: A/B-hidrolasa 4, GDE: glicerofosfodiesterasa, NAE: acetilamida (N-acetiletanolamina), AEA: anandamida (N-araquidonoiletanolamina), OEA: oleoiletanolamida (N-oleoiletanolamina), PEA: palmitoiletanolamida (N-palmitoiletanolamina), COX-2: ciclooxigenasa-2, FAAH: ácido graso amido hidrolasa, NIAAA: N-acil etanolamina-hidrolizante ácido amidasa, LOX: lipoxigenasa.

Mientras que la AEA ejerce sus funciones por unión a los receptores endocannabinoides CB1 y CB2, la OEA actúa principalmente mediante su unión al receptor activado por proliferación de peroxisomas (PPAR)- α , a través del receptor de vanilloides tipo 1 (TRPV1) y mediante el receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) (Hansen & Vana, 2018; Ueda *et al.*, 2010).

El principal receptor de la OEA por el cual podría estar ejerciendo sus funciones neuroprotectoras y antiinflamatorias es PPAR- α . La activación de este receptor nuclear induce la síntesis de I κ B α , que se une a NF- κ B en el citoplasma y previene que éste se transloque al núcleo, por tanto, previene la expresión de moléculas proinflamatorias como COX-2, iNOS, TNF- α e IL-1 β (Flores-Bastías & Karahanian, 2018; Zolezzi *et al.*, 2017). En estudios previos en nuestro laboratorio se ha demostrado que tanto la OEA como la PEA previene la activación de NF- κ B inducida por la inyección de LPS, previniendo así el aumento de expresión de iNOS, COX2, acumulación de NO y la peroxidación lipídica en la corteza frontal de rata (Sayd *et al.*, 2015).

Sin embargo, aún no existe una evidencia directa de la implicación de PPAR- α en el papel antiinflamatorio de la OEA.

De hecho, estudios recientes indican que la elevación endógena de OEA, PEA y AEA regula la neuroinflamación asociada con TLR4 mediante el receptor TRPV1 (Henry *et al.*, 2017). Otro estudio reciente ha comprobado que la OEA regula la neuroinflamación asociada a TLR4/NF- κ B en células dendríticas tras la inyección de LPS mediante el receptor TRPV1 (Yao *et al.*, 2019).

La OEA parece ser capaz de cruzar la BHE tras su administración intraperitoneal (i.p.) (Plaza-Zabala *et al.*, 2010), aunque hay estudios que demuestran que la OEA ejerce sus efectos a través de su unión a los receptores PPAR- α de la periferia (Campolongo *et al.*, 2009). Esto refuerza la idea de que posiblemente el mecanismo de acción por el cual la OEA reduce la neuroinflamación sea a través de la reducción de la inflamación a nivel periférico. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la OEA reduce los niveles plasmáticos de LPS (altamente proinflamatorio) y de las citoquinas IL-1 β y TNF- α en plasma tras el CAA (Antón *et al.*, 2017), y tanto la OEA como la PEA reducen los niveles de TNF- α plasmáticos tras la inyección de LPS (Sayd *et al.*, 2015).

3.1 El papel de la OEA en las enfermedades neuropsiquiátricas y en el trastorno por uso de sustancias

Son numerosos los trastornos y/o enfermedades **neuropsiquiátricas** en los que se ha descrito un alto componente neuroinflamatorio (Fourrier *et al.*, 2019). Se ha demostrado que la OEA, y en general las NAEs, podrían ejercer un papel antiinflamatorio y neuroprotector muy importante en estas patologías. Por ejemplo, niveles elevados de NAEs se han encontrado en condiciones como la enfermedad de Parkinson (Gonzalez-Aparicio & Moratalla, 2014), trastorno de estrés postraumático (Hauer *et al.*, 2013) o

estrés (Hill *et al.*, 2009). Romero-Sanchiz y colaboradores encontraron que los niveles de diferentes NAEs, como la OEA, estaban aumentados en el plasma de pacientes con depresión que recibían tratamiento con antidepresivos; la severidad de la depresión se correlacionaba positivamente con estos niveles de NAEs y la OEA parecía ser liberada como parte del mecanismo de acción antidepresivo de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (Romero-Sanchiz *et al.*, 2019).

En cuanto a los TUS, en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento del papel que podrían tener las NAEs modulando aspectos como el consumo, la motivación, la recaída y las conductas asociadas a la abstinencia a drogas (Orio *et al.*, 2013). El **consumo de cocaína**, por ejemplo, aumenta los niveles de NAEs. En particular, los niveles de OEA aumentan en regiones cerebrales como la corteza prefrontal y frontal en ratas tras 14 días de consumo (Bystrowska *et al.*, 2014). En humanos también se ha demostrado que los niveles de NAEs, como la OEA, son mayores en el plasma de consumidores de cocaína durante la abstinencia, comparado con sujetos controles (Pavón *et al.*, 2013; Pedraz *et al.*, 2015). También se ha visto que la OEA disminuye la autoadministración de **nicotina**. La OEA disminuye la excitación de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y reduce las elevaciones de dopamina del núcleo accumbens, áreas muy relacionada con el refuerzo y la adicción, producidas por el consumo de la nicotina (Mascia *et al.*, 2011).

El papel de la OEA en el **TUA** ha sido descubierto de manera reciente por nuestro grupo de investigación. Este biolípido tiene un perfil muy prometedor ya que es capaz de regular múltiples facetas relacionadas con la adicción al alcohol.

En **animales de laboratorio** se ha demostrado que la administración i.p. de 4g/kg de alcohol en rata elevó los niveles de OEA en plasma, intestino delgado, núcleo accumbens y cerebelo a diferentes tiempos (entre 45 y 240 minutos) después de la inyección de alcohol. Además, el consumo crónico de alcohol durante 21 días con una dieta líquida con alcohol al 10% (peso/volumen) aumentó los niveles de OEA en plasma con respecto al

control (Bilbao *et al.*, 2016). Estas elevaciones de OEA se han interpretado como una respuesta homeostática del organismo frente al daño inducido por el alcohol.

También en estudios previos en este laboratorio se ha demostrado que la administración exógena de OEA antes del CAA en rata previene la inflamación periférica, disminuyendo los niveles de LPS en plasma, así como el aumento plasmático de TNF- α e IL-1 β . Además, la OEA tiene un perfil muy completo previniendo la neuroinflamación en la corteza frontal tras el CAA, ya que disminuye marcadores proinflamatorios como la sobreexpresión de TLR4, su correceptor MD2 y su adaptador MyD88. También previene el aumento en la expresión de I κ B α , p65, TNF- α e IL-1 β , iNOS, COX-2, el proceso de peroxidación lipídica y la inducción de caspasas 3 y 8, así como las elevaciones de MCP-1 y del marcador de daño HMGB1 inducidos por el CAA en dicho área cerebral (Antón *et al.*, 2017). En cuanto al comportamiento inducido por el consumo de alcohol, la OEA a una dosis de 5 mg/kg es capaz de prevenir la autoadministración de alcohol, así como la recaída del consumo de alcohol inducida por señales contextuales, y mejora los síntomas físicos del síndrome de abstinencia, como los temblores y la rigidez.

La influencia de la OEA en el TUA también se ha demostrado en **humanos**. En personas con dependencia al alcohol se demostró que, tras 4 semanas de abstinencia, los niveles de diferentes NAEs, incluida la OEA, estaban más elevados en plasma en comparación a los controles, y que estos niveles se correlacionaban negativamente con la duración de la abstinencia, aunque no se encontró relación con la gravedad de la dependencia, la duración del uso problemático del alcohol o con el diagnóstico de comorbilidad psiquiátrica (Garcia-Marchena *et al.*, 2017). Un experimento realizado en nuestro laboratorio demostró que mantener un patrón de CAA de forma regular en jóvenes adolescentes aumenta los niveles plasmáticos de diferentes NAEs, como la OEA, durante la abstinencia en comparación con sujetos controles, y que estos niveles se correlacionan con diferentes parámetros proinflamatorios medidos en plasma como TLR4, MyD88, IL-1 β , IL-6 y COX-2 (Antón *et al.*, 2018).

En resumen, las NAEs, y en particular la OEA, parecen tener un papel neuroprotector y antiinflamatorio muy importante en diferentes condiciones neuropsiquiátricas, incluyendo el trastorno por uso de cocaína, nicotina y alcohol. Sin embargo, hacen falta más estudios para determinar el mecanismo de acción por el cual se dan estos efectos. En particular, en cuanto al efecto protector de la OEA en el contexto del CAA, no se han elucidado los mecanismos específicos por los cuáles la OEA previene parcialmente la neuroinflamación producida por este tipo de consumo de alcohol, que es el principal objetivo de esta Tesis Doctoral.

III) HIPÓTESIS



HIPÓTESIS

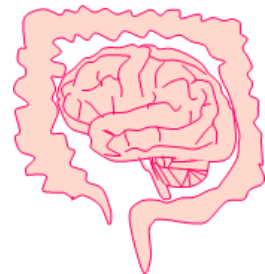
Dado que es conocido que el CAA produce neuroinflamación y que la OEA tiene propiedades protectoras frente a ella, en esta Tesis Doctoral se estudió si el CAA cambia la composición de la microbiota, si altera la barrera intestinal induciendo el paso de compuestos proinflamatorios y bacterias desde el lumen intestinal a otros órganos y/o al torrente sanguíneo, y si el CAA altera la estructura de la barrera hematoencefálica y el comportamiento asociado a la abstinencia, así como los efectos protectores de la OEA.

Por lo tanto, la **HIPÓTESIS GENERAL** de esta Tesis Doctoral fue que el CAA produce una alteración del eje microbiota-intestino-cerebro, que puede ser prevenida por el pretratamiento con el lípido OEA.

Las **hipótesis específicas** son:

1. El CAA produce alteraciones en la microbiota intestinal, que pueden ser modificadas por el pretratamiento con OEA.
2. El CAA produce inflamación y consecuentemente estrés nitrosativo en el colon; que pueden ser prevenidos por un pretratamiento con OEA.
3. El CAA altera la estructura y funcionalidad de la barrera intestinal en el colon, disminuyendo los niveles de las proteínas que forman las uniones estrechas, aumentando su permeabilidad, permitiendo así el paso de bacterias y sus productos proinflamatorios a otros órganos y/o al torrente sanguíneo. El pretratamiento con OEA previene el intestino permeable inducido por el CAA.
4. El CAA altera la estructura de la BHE en estructuras cerebrales relacionadas con el abuso de alcohol como la corteza frontal y el hipocampo, reduciendo los niveles de las proteínas que forman las uniones estrechas y de la lámina basal; y que estos efectos pueden ser parcialmente prevenidos por el pretratamiento con OEA.
5. El CAA produce cambios comportamentales en el estado motivacional/anímico relacionados con un estado inflamatorio, especialmente anhedonia, ansiedad y un estado depresivo. La OEA administrada exógenamente, puesto que bloquea la neuroinflamación, puede prevenir estos cambios comportamentales.

IV) OBJETIVOS



El **OBJETIVO** general de esta Tesis Doctoral es evaluar los efectos que el CAA provoca en el eje microbiota-intestino-cerebro, estudiando el efecto del CAA en la microbiota y en la barrera intestinal, así como en la BHE y en el estado anímico y/o motivacional, además de explorar los mecanismos de acción de la OEA, con posible efecto protector, en dicho eje.

Los **objetivos concretos** son:

1. MICROBIOTA INTESTINAL:

1.1 Estudiar los cambios que tienen lugar en la composición de la microbiota tras el CAA, midiendo diversidad α y β , y la composición de bacterias a niveles de género y familia.

1.2 Analizar los efectos de la administración de OEA en la composición de la microbiota intestinal tanto en condiciones fisiológicas como durante un CAA, midiendo diversidad α y β , y la composición de bacterias a niveles de género y familia.

2. BARRERA INTESTINAL:

a) Estudios estructurales:

2.1 Evaluar el estado de la barrera colónica a nivel inflamatorio e inmune tras el CAA y evaluar el papel protector de la OEA, midiendo los niveles de TNF- α , iNOS, NO $_2^-$ (inflamación), TLR4 (sistema inmune innato), e IgA e IgM (sistema inmune adaptativo).

2.2 Estudiar el efecto del CAA y el papel protector de la OEA sobre los niveles de proteína y de mRNA de las proteínas que forman las uniones estrechas: ocludina, claudina-3 y 4, y ZO-1, y corroborar estos efectos mediante micrografías de microscopía electrónica de transmisión.

2.3 Evaluar el efecto del CAA sobre la muerte celular o apoptosis en el colon, y evaluar el papel protector de la OEA frente a estas alteraciones, midiendo los parámetros de apoptosis FasL y caspasa9.

b) Estudios funcionales:

2.4 Analizar si el CAA induce la translocación bacteriana desde el lumen intestinal a otros órganos, como GLMs, bazo e hígado, y/o sangre.

2.5 Estudiar si el pretratamiento con OEA previene la translocación de bacterias y sus productos a través de la barrera intestinal.

3. BARRERA HEMATOENCEFÁLICA:

3.1 Estudiar el efecto del CAA en la estructura de la BHE en la corteza frontal y estudiar el papel protector de la OEA, midiendo los niveles de las proteínas que forman las uniones estrechas: ocludina y ZO-1, y laminina, un componente de la lámina basal.

3.2 Estudiar el efecto del CAA en la estructura de la BHE en el hipocampo y explorar el papel protector de la OEA, midiendo los niveles de las proteínas que forman las uniones estrechas: ocludina y ZO-1, y laminina, un componente de la lámina basal.

3.3 Evaluar si el CAA induce, al igual que sucede en la corteza frontal, neuroinflamación en el hipocampo y el posible papel protector de la OEA, midiendo los niveles de proteína de los parámetros de inflamación TLR4, MyD88, TNF- α e IL-1 β .

4. COMPORTAMIENTO:

4.1 Analizar los efectos comportamentales en abstinencia aguda tras el CAA y estudiar los efectos del pretratamiento con OEA sobre el comportamiento motivacional/anímico, especialmente la anhedonia, la ansiedad y el estado depresivo.

4.2 Analizar los efectos comportamentales en abstinencia a largo plazo tras el CAA y explorar los efectos del pretratamiento con OEA sobre el comportamiento motivacional/anímico, especialmente la anhedonia, la ansiedad y el estado depresivo.

V) MATERIALES Y MÉTODOS



1. Animales

Los animales utilizados para realizar los experimentos fueron ratas Wistar macho (de Envigo, Barcelona, España) de entre 160-300 gramos de peso y 7-8 semanas de edad. Durante su estancia en el animalario CAI animal de la UCM (sección Somosaguas) fueron estabuladas en grupos de 3-4 animales por caja en ciclo invertido de 12 horas de luz/oscuridad en condiciones estándar de temperatura (20-24°C) y humedad (55±10%) con comida estándar y agua *ad libitum*. Los animales fueron estabulados y vigilados durante 10 días antes de comenzar los experimentos.

Todos los procedimientos realizados con los animales fueron aprobados debidamente por el Comité de Experimentación Animal, órgano habilitado por la CAM, y por el Comité Ético de Experimentación Animal de la UCM, con referencia del proyecto: PROEX 420/15, y siguiendo las directrices marcadas por la legislación europea (2010/63/UE). Las muestras biológicas obtenidas de estos animales fueron procesadas en el Laboratorio de Psicobiología (Facultad de Psicología) de la Universidad Complutense de Madrid.

2. Administración de alcohol y compuestos

El alcohol se administró de forma intragástrica 3 veces al día mediante una cánula específica (cánula 16G, Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), siguiendo el modelo de administración de alcohol tipo *binge* de 4 días de duración previamente validado por nuestro grupo (Antón *et al.*, 2017) y otros (Obernier *et al.*, 2002a; Obernier *et al.*, 2002b).

Este modelo consiste en la administración forzada de alcohol cada 8h durante 4 días consecutivos. Los animales reciben una dosis de carga inicial de 5 g/kg de alcohol al 30% y en las siguientes dosis se administran, como máximo, dosis de 3 g/kg de alcohol al 30%. Teóricamente con este modelo de administración cada animal recibe un máximo de 9 g/kg/día de alcohol, sin embargo, las dosis se ajustan según los niveles de alcohol en sangre de

cada animal medidos 2h después de la segunda administración de alcohol del día y de los comportamientos propios de una intoxicación de alcohol, como pérdida de reflejos y ataxia, según la escala de intoxicación de seis puntos (Majchrowicz, 1975). Los animales se mantienen en un estado de sedación/ataxia relativamente constante (ver resultados).

En experimentos previos en este laboratorio se testaron grupos control que recibieron agua intragástrica o dextrosa al 5% equivalentemente isocalórica al alcohol 3 g/kg con y sin restricción de alimento para simular la pérdida de peso del grupo de alcohol. No se observaron diferencias en los parámetros medidos de neuroinflamación en dichos grupos control (Antón *et al.*, 2017). Por ello, en este estudio se han usado controles que reciben volúmenes de agua iguales a los volúmenes de alcohol que se dan de media a los grupos de alcohol.

La OEA fue sintetizada según se explica en (Giuffrida *et al.*, 2000), y disuelta en 5% Tween-80 en suero salino. Se administró 10 minutos antes de cada administración de alcohol, con una primera dosis de choque de 10mg/kg (i.p.), y las sucesivas dosis a una concentración de 5mg/kg (ver Tabla 1). La dosis de OEA usada en estos estudios está dentro del rango de dosis en el cual ha demostrado ser farmacológicamente activa (5-20 mg/kg i.p.) (Bilbao *et al.*; 2013, Bilbao *et al.*, 2016, Plaza-Zabala *et al.*, 2010). En estudios previos de nuestro grupo se demostró que la dosis única de 10mg/kg i.p. de OEA es efectiva reduciendo la neuroinflamación tras LPS (Sayd *et al.*, 2015). Respecto a las dosis repetidas usadas en esta tesis, este protocolo (alcohol binge y pretratamiento con OEA) ha sido previamente usado a estas mismas dosis por nuestro grupo (Antón *et al.*, 2017), mostrando su efecto antiinflamatorio en la corteza prefrontal. En experimentos previos en este laboratorio también se hicieron curvas temporales usando estas mismas dosis de OEA (a tiempos 3h, 6h y 24h tras el *binge*) para observar la distribución de los parámetros inflamatorios clave tras el binge y el pretratamiento con OEA (Antón *et al.*, 2017).

Hora	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
7 h		OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg	OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg	OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg	OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg
15 h	OEA i.p. 10mg/kg EtOH 5g/kg	OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg	OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg	OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg	
23 h	OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg	OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg	OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg	OEA i.p. 5mg/kg EtOH 3g/kg	

Tabla 1: Esquema de las administraciones de alcohol y OEA i.p.

La OEA también se administró oralmente. En este caso, la OEA se disolvió en carboximetilcelulosa al 1% en salino y se administró a una concentración de 20mg/kg (3mL/kg) 20 minutos antes de cada administración de alcohol. Se usó una dosis de OEA que ha demostrado ser farmacológicamente activa con esta ruta de administración (Nielsen *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2012).

3. Medida de niveles de alcohol en sangre y recogida de muestras biológicas

Para medir los niveles de alcohol en sangre durante el experimento se extrajo un volumen aproximado de 20µL de sangre mediante una pequeña escisión en la cola dos horas después de cada segunda administración del día (realizada a las 3 p.m.) y los niveles se midieron mediante una reacción enzimática con el analizador *AM1 Alcohol Analyzer* (Analox Instruments, Londres, Reino Unido).

Finalizado el experimento, los animales fueron anestesiados entre 2 y 4 horas después de la última administración de alcohol usando una dosis letal de pentobarbital sódico (300mg/kg i.p., Dolethal®, España). La sangre se obtuvo mediante punción cardíaca usando citrato trisódico (3,15%) como anticoagulante y se centrifugó a 2000g durante 15 minutos a 4°C para obtener el plasma que se guardó a -20°C hasta su uso. Se extrajeron del cerebro la corteza frontal y el hipocampo; y del intestino grueso, la parte distal del colon. Estas muestras se guardaron a -80°C hasta su uso, y en el caso del colon, además, una porción se procesó en fresco para realizar las micrografías de microscopía electrónica de transmisión, como se explicará más adelante. Adicionalmente, los ganglios linfáticos mesentéricos, el lóbulo central del hígado y el bazo se procesaron en fresco en condiciones estériles para los estudios de translocación bacteriana, como se detalla en el próximo apartado.

4. Recogida de heces y extracción del DNA genómico bacteriano

Las heces se recogieron en condiciones estériles antes del inicio del protocolo de consumo del alcohol en atracón (T0) y después del último atracón (T1) de cada grupo experimental. Se almacenaron a -80°C hasta la extracción de los ácidos nucleicos. La extracción del DNA genómico bacteriano se llevó a cabo mediante el kit *Dneasy PowerLyzer PowerSoil Kit* (Quiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones. La calidad del DNA extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con el colorante de DNA GelRed (Euroclone, Italia). Se cargaron 5µL del DNA extraído junto con 1µL del colorante de carga de DNA 6x (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU). Los geles se dejaron correr a 100V durante 40 minutos y se tomaron fotos con el transiluminador de UV UVIDOC HD2 (Uvitec, Reino Unido). La calidad se evaluó en función de: I) la presencia de banda para evaluar el éxito de la extracción, II) la intensidad de la banda para evaluar la concentración de DNA (cuanto más intensidad, más concentración), III) la compacidad de la señal para evaluar la fragmentación del DNA (el DNA genómico es de alto peso molecular y lo que se espera es una señal luminosa compacta al principio del gel; una mancha difuminada se debe a que el DNA se fragmenta).

5. Preparación de amplicones de los genes del rRNA 16S y secuenciación

Se amplificaron las regiones hipervariables V3-V4 del RNA ribosomal 16S bacteriano usando cebadores específicos (341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'y 805r: 5'-GACTACNVGGGTWTCTAATCC-3') (Takahashi *et al.*, 2014). La secuenciación se llevó a cabo mediante Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) con el protocolo PE 2X300 de IGA Technology Service (Udine, Italia) siguiendo su protocolo interno. Las secuencias en crudo están disponibles en un repositorio público en la base de datos del ENA (*European Nucleotide Archive*), con el número de referencia (*accession number*) PRJEB44965.

De forma parecida a como se ha descrito anteriormente (Butera *et al.*, 2020; Tamburini *et al.*, 2020), las secuencias obtenidas fueron pretratadas eliminando el cebador usando CUTADAPT (Martin, 2011), y eliminando los extremos 5' de baja calidad usando Sickel (Joshi & Fass, 2011) aplicando un punto de corte de 20 como control de calidad. Las secuencias pretratadas fueron analizadas usando MICCA v 1.7.2 (Albanese *et al.*, 2015) para unir las secuencias inversas y directas y llevar a cabo el *picking* de las ASVs (*Amplicon Sequence Variance*, variantes de secuencia de amplicones) usando el algoritmo UNOISE3 (Edgar, 2016). La asignación taxonómica de las variantes de secuencia de amplicones (ASVs) identificadas se realizó usando el clasificador RDP y la base de datos v. 2. 11 (Wang, Q. *et al.*, 2007).

Esta metodología se llevó a cabo durante la estancia internacional, en colaboración con los grupos de investigación de la Prof.^a Beatrice Passani (Departamento de ciencias de la salud, Universidad de Florencia) y la Dra. Carlotta di Filippo (Istituto de Agricultura y Biotecnología, Pisa).

6. Estudios de translocación bacteriana

Una vez que se extrajeron los GLMs, el bazo y el lóbulo central del hígado, estos órganos fueron pesados y homogeneizados en suero salino estéril mediante Potter-Elvehjem vidrio-vidrio en condiciones estériles. Se plantaron alícuotas de 2mL de las diluciones seriadas al 10x del homogeneizado obtenido en placas 5% agar sangre y placas agar McConkey para determinar la presencia de bacterias aerobias, y en placas agar sangre Brucella suplementadas con vitamina K1 y hemina para determinar la presencia de bacterias anaerobias. Tras 24 horas de incubación a 37°C para los cultivos aerobios y 48 horas para los anaerobios, se procedió al recuento de colonias y el resultado se expresó como número de unidades formadoras de colonias (UFC) por miligramo de tejido.

Un resultado positivo por encima del límite de detección de la técnica en cualquiera de los órganos en los que se midieron las colonias, se consideró señal de translocación bacteriana desde el lumen intestinal. Las cepas fueron identificadas mediante diferentes técnicas: tinción Gram, tests bioquímicos (oxidasa, catalasa y coagulasa) y medios de cultivo (manitol y agar bilis-esculina). Los tubos usados para la identificación de las bacterias Gram negativas fueron los Enterotubos II (BD DIFCO® Fisher Scientific®, PA, USA).

Estos experimentos de cultivos e identificación de bacterias se realizaron en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Gómez-Lus del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UCM.

7. Western blot

Las muestras se homogeneizaron por sonicación en tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) con pH=7,4 mezclado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche®, Madrid, España). Después se sometieron a una centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y tras medir la concentración de proteínas y ajustar todas las muestras a la misma concentración (en colon a 2mg/mL, en

corteza prefrontal e hipocampo a 1mg/mL) se mezclaron con el tampón laemmli (Bio Rad®, CA, E.E.U.U.) y con β -mercaptoetanol (Bio Rad®, CA, EEUU) (50 μ L / mL de laemmli) y se cargó la misma cantidad de todas las muestras en el gel de electroforesis.

Tras la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Ibérica®, España) en sistema semihúmedo (Bio Rad®, CA, E.E.U.U.), las membranas se bloquearon en tampón Tris-salino 10mM con 5% de leche desnatada/albúmina de suero bovino (BSA, de sus siglas en inglés) durante una hora a temperatura ambiente. Luego fueron incubadas toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario a la concentración indicada en la tabla 2. Después se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente indicado también en la tabla 2 durante 90 minutos a temperatura ambiente. Por último, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-Tween.

Proteína	Casa comercial	Concentración	Anticuerpo secundario
Zo-1	Santa Cruz®, EEUU	1:750; 1% BSA	α -conejo 1:2000
Ocludina	Invitrogen, EEUU	1:1000	α -conejo 1:2000
FasL	Santa Cruz®, EEUU	1:1000; 2% BSA	α -conejo 1:2000
Caspasa 9	Santa Cruz®, EEUU	1:500; 1% BSA	α -ratón 1:5000
Claudina 1	Santa Cruz®, EEUU	1:500; 1% BSA	α -ratón 1:2000
Claudina 3	Elabscience, China	1:1000	α -ratón 1:2000
Claudina 4	Santa Cruz®, EEUU	1:500; 1% BSA	α -ratón 1:2000
Laminina	Merck KGaA®, Alemania	1:1000	α -conejo 1:2000
TLR4	Santa Cruz®, EEUU	1:500; 1% BSA	α -ratón 1:2000
MyD88	Abcam®, Reino Unido	1:750; 5% BSA	α -conejo 1:2000
IκBα	Santa Cruz®, EEUU	1:1000; 5% BSA	α -conejo 1:2000
iNOS	Santa Cruz®, EEUU	1:750; 1% BSA	α -conejo 1:2000
GAPDH	Merck KGaA®, Alemania	1:5000	α -ratón 1:5000
β-Actina	Merck KGaA®, Alemania	1:15000	α -ratón 1:10000

Tabla 2: Listado de proteínas marcadas con los anticuerpos primarios usados en la presente Tesis Doctoral. Se incluye la casa comercial y las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios. TLR4: receptor tipo toll 4, MyD88: factor de diferenciación mieloide 88, I κ B α : proteína inhibidora de κ B α , iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

Las bandas se revelaron usando el kit ECL[®] de quimioluminiscencia (Amersham Ibérica[®], España) y fueron visualizadas en películas de forma manual o usando el detector Odyssey[®] FC (Licor, Alemania).

Las imágenes obtenidas por ambos métodos se densitometraron con el programa Image J (NIH, Image J[®] software, National Biosciences, Lincoln, Nebraska, EEUU). Los datos obtenidos en crudo se transformaron en porcentaje en función de la media del grupo control. Los controles de carga usados fueron gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y β -actina.

8. Extracción de RNA y RT-qPCR

Para extraer el RNA, en condiciones de esterilidad, el colon se homogeneizó usando TyssueLyser (QUIAGEN[®]) en 600 μ L de Trizol[®] (Invitrogen, EEUU) durante 4 minutos a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se añadieron 200 μ L de cloroformo, se pasó por el vórtex y se incubó 2-3 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 12.000rpm durante 15 minutos en frío. Se obtuvo la fase acuosa (no la orgánica) y se repitió la extracción con 200 μ L de de Trizol y 40 μ L de cloroformo. De nuevo, se recogió la fase acuosa y se añadieron 400 μ L de isopropanol y tras mezclar con el vórtex se dejó reposar toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se obtuvo el pellet de RNA. Se lavó el pellet tres veces con 600 μ L de etanol al 80% preparado con agua libre de RNAsas y DNAsas (Agua DEPEC, Invitrogen, EEUU). Tras dejar evaporar el etanol, se resuspendió el pellet en 50 μ L de agua DEPEC y se agitó con el vórtex. Se guardaron las muestras a -80°C hasta su uso.

La cantidad de RNA extraído se cuantificó y se comprobó su pureza mediante espectrofotometría usando NanoDrop[®] 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU). Estas concentraciones se normalizaron a 100 ng/ μ L diluyendo con agua DEPEC a un volumen final de 10 μ L. Después, se añadieron 4,5 μ L de una mezcla de agua DEPEC, cebadores aleatorios y deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). Las muestras se introdujeron en el

termociclador My Cyclor™ (Bio-Rad, EEUU) y se sometieron a un calentamiento de 10 minutos: 1 minuto a 95 °C, 8 minutos a 70 °C y 1 minuto a 42 °C. Después, se agregaron 5,5 µL de una mezcla de la enzima retrotranscriptasa y su tampón e inhibidores de RNAsas. Las muestras se calentaron durante 60 minutos a 42°C. Por último, a estos 20 µL se añadieron 80 µL de agua DEPEC y el cDNA se guardó a -20°C hasta su uso.

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o a tiempo real (pPCR o *real time*-PCR) permite amplificar y cuantificar de forma comparativa el mRNA de la proteína que se quiere determinar. Esto es posible gracias a un fluoróforo intercalante inespecífico. En nuestro caso usamos SYBR® Green que se excita mediante luz azul ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$) y emite luz verde ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$) que es recogida por el termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Research®, Mortlake, NSW, Australia). Se mezclaron 2 µL de cDNA con 18 µL de una mezcla de *Quantimix Easy Master Mix* (Biotools B&M Labs, España), agua DEPC y el cebador específico para la secuencia de la proteína (Tabla 3). Primero se calentaron durante 3 minutos a 95°C y después se sometieron a 35 ciclos de 10 segundos a 95°C para la desnaturalización, 15 segundos a 60°C para el alineamiento y 20 segundos a 72°C para la extensión. Las concentraciones se midieron con el programa incorporado en el termociclador. Los datos fueron normalizados con los niveles de GAPDH.

Las secuencias de los cebadores usados:

Proteína	Número de accesión	Cebador directo (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')
TLR4	NM_019178	ACA TCA GAG GAA GAA CAA GAA GCA	CGG AAA TTG TAA ACA TAA TGG GTT T
iNOS	NM_012611	GGA CCA CCT CTA TCA GGA A	CCT CAT GAT AAC GTT TCT GGC
CASP9	NM_031632	AGT GAA GCT GGA CCC ATC TC	GAG CTC TGC CAG AAC CAA TG
CLDN1	NM_031699	TCT GGG TTT CAT CCT GGC TT	TCA GAT TCA GCA AGG AGT CGA
CLDN3	NM_031700	GCC ATC GCA GCT ACT TGC CA	GCA AAA ACG AAA GGC TTT TAT
CLDN4	NM_00101202 2	GGA AGG GTG GAG GTG GTT TA	GGG TAG GGA ATT CAG AGG GG
OCLN	NM_031329	ATG TAT GGC GGA GAG ATG CAC GTT	ATA GGCTCT GTC CCAAGCAAG TGT
ZO-1	NM_00110626 6	AAG ATG GGA TTC TTA GGC CCA GCA	TCT TTG GCT GCA GGG CTA TCT TCT
GAPDH	NM_017008	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	GG CAT GGA CTG TGG TCA TGA G

Tabla 3: Número de accesión y secuencias de los cebadores directos e indirectos usados.

TLR4: receptor tipo toll 4, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, CASP9: Caspasa-9, CLDN1: Claudina-1, CLDN3: Claudina-3, CLDN4: Claudina-4, OCLN: Ocludina, ZO-1: Zona occludens 1, GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Esta metodología se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Prof. Juan Carlos Leza (Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina) de la Universidad Complutense de Madrid.

9. Niveles de LPS en plasma

Se midieron en plasma los niveles de LPS, componente de la pared de bacterias Gram negativas, por su gran capacidad para desencadenar una respuesta inmune innata. Para ello se utilizó el kit comercial LAL

Chromogenic Endpoint Assay (Hycult Biotech, Uden, Países Bajos), siguiendo las instrucciones. La absorbancia se mide a 405 nm con el lector de microplacas Synergy 2 (BioTek®, EEUU). Los resultados se obtienen en unidades de endotoxina por mililitro (EU/mL), interpolando la concentración de endotoxina de las muestras gracias a un estándar de ésta. El límite de detección inferior del kit es de 0,04 EU/ml.

El principio de este test se basa en que el LPS desencadena una reacción enzimática en el lisado de amebocitos del cangrejo herradura del atlántico (*Limulus polyphemus*), dando lugar a su gelificación. El kit dispone de una enzima sensible al LPS que en su presencia provoca la liberación de un cromóforo, la p-nitroanilina. La reacción se para con ácido acético.

10. Niveles de IgA e IgM en colon y plasma

Ambas inmunoglobulinas representan la primera línea de defensa en el epitelio intestinal. Se midieron usando un kit de ELISA (Elabscience Biotechnology Co., China), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras de plasma se diluyeron 1:100 para el kit de IgA y 1:500 para el kit de IgM. Para el colon, las muestras se homogenizaron en 4 volúmenes de tampón fosfato (PBS, pH=7,4) mezclado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche®, Madrid, España) y tampón RIPA. La homogenización se realizó con TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Alemania), a una frecuencia de 50 oscilaciones por segundo durante 4 minutos, seguido de una centrifugación a 12.000g durante 10 minutos. Todos estos procedimientos se realizaron a 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron 1:100 para el kit de IgA y 1:200 para el kit de IgM. El ensayo se realizó según las instrucciones. La densidad óptica se midió usando un lector de placas (Synergy 2; BioTek, EEUU) a 450nm. En el caso de los resultados del colon, los datos fueron normalizados por la cantidad total de proteína.

Las sensibilidades de los ensayos fueron 9,38 ng/mL en el kit de IgA, y 18,75 ng/mL en el kit de IgM; y los coeficientes de variación intra-ensayo fueron menos de 10% en cada kit.

11. Medida de las citoquinas proinflamatorias

IL-1 β y TNF- α se midieron con kits de ELISA comerciales (RayBiotech®, Georgia, EEUU). Las muestras de hipocampo se prepararon de la misma manera que para el western blot (ver apartado 7) y se diluyeron 1:12 para el kit de TNF- α y 1:5 para el kit de IL-1 β . Las muestras de colon se prepararon como en el caso de los kits de IgA e IgM (ver apartado 10) y se diluyeron 1:6. El ensayo se realizó según las instrucciones. La densidad óptica se midió con un lector de placas (Synergy 2; BioTek, EEUU) a 450nm. Los datos fueron normalizados por la cantidad total de proteína.

Las sensibilidades de los kits fueron menos de 25pg/mL para TNF- α y 80pg/mL para IL-1 β ; y los coeficientes de variación intra-ensayo fueron menos de 10% en cada kit.

12. Medida de los niveles de nitritos

Los catabolitos provenientes del óxido nítrico, como los nitritos, contribuyen al estrés oxidativo/nitrosativo celular. Para cuantificarlos, se siguió el método descrito por Peter Griess en 1858 conocido como “ensayo Griess”. Las muestras se homogeneizaron usando TyssueLyser (QUIAGEN®) en 10 volúmenes de tampón fosfato 50 mM (PBS, pH=7,4) mezclado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche®, Madrid, España) y se centrifugaron a 13.000g durante 10 minutos a 4°C, y se utiliza el sobrenadante. En una placa de 96 pocillos se realizaron duplicados con 100 μ l de muestra o estándar de nitrito de sodio para la recta patrón. A todos los pocillos se añadieron 50 μ l de N-1-(Naftil)-etil-enediamina (Neda) al 0,1% (p/v) y 50 μ l de sulfanilamida al 1% (p/v). La lectura se realizó a 540 nm en el lector de microplacas Synergy 2 (BioTek®, EEUU) y se extrapolaron las concentraciones de nitritos según la recta patrón. La concentración se

normaliza por la cantidad de proteína total en tejido medida mediante Bradford.

13. Medida de concentración total de proteínas

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) que se basa en el cambio de absorbancia del colorante azul brillante de Coomassie® en condiciones ácidas que adquiere un tono azulado al unirse a las proteínas. Esto se produce porque en su forma rojiza dona su electrón libre a los grupos ionizables de las proteínas. Esto provoca la exposición de las zonas hidrofóbicas de las estructuras terciarias de las proteínas, permitiendo que interaccionen con las regiones apolares del colorante Coomassie® mediante fuerzas de van der Waals. Esto permite que la unión de la proteína con el colorante se fortalezca mediante la interacción iónica al aproximar cargas de diferente polaridad. Los cambios que tienen lugar después de esta unión estabilizan la forma azulada del colorante de Coomassie® y es lo que se usa como medida indirecta de la cantidad de proteína total que hay en una muestra.

Tras 5 minutos de incubación, la absorbancia se lee a 595 nm con el lector de placas *Synergy 2* (BioTek®, EEUU). La concentración de proteína se calcula interpolando con la recta patrón que se hace con albúmina de suero bovino (Sigma) entre 0 y 400 µg/ml, tras la dilución previa de las muestras.

14. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión

Para la realización de las micrografías se tomaron muestras de colon fresco y se fijaron durante 4h en una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2%, y se guardaron toda la noche a 4°C crioprotegidas en PBS. Después, se fijaron en osmio al 1% y se embebieron en resina Spurr. Se tomaron secciones de 7 nm de grosor y se tiñeron en acetato de uranilo

al 2% y citrato de plomo al 3%. Las secciones se examinaron y fotografiaron con el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (Madrid).

Para evaluar el estado de las uniones estrechas, se midieron las distancias máximas de diferentes espacios intercelulares (n=5-15 por animal) en varios animales (n=4-6) de cada grupo experimental. La medida de la distancia intercelular se realizó con el programa Image J (NIH, Image J® software, National Biosciences, Lincoln, Nebraska, E.E.U.U.). Se consideró dilatación de TJ a una apertura de más de 28nm (la máxima distancia registrada en el grupo control).

15. Pruebas de comportamiento

15.1. Test de preferencia a la sacarina

Se utilizó el test de sacarina como medida para evaluar la anhedonia. Los roedores tienen apetencia por las bebidas azucaradas, altamente reforzantes, por lo que la ausencia de consumo de este tipo de líquidos cuando existe libre disponibilidad, se considera un comportamiento anhedónico.

Las ratas fueron estabuladas individualmente y tuvieron libre elección durante 24 horas a dos biberones colocados de manera aleatoria: uno contenía agua y el otro una solución con sacarina al 0.1%. Se midió la cantidad consumida por todas las ratas de ambos biberones durante 9 horas. La preferencia por la sacarina se calculó mediante el ratio de solución de sacarina bebida entre el total de líquido consumido. Este test se realizó un mes después de la última administración de alcohol.

15.2. Test del laberinto en cruz elevado

Las ratas fueron sometidas al test del laberinto en cruz elevado (Panlab, Barcelona, España) como medida del comportamiento tipo ansioso. Este test se realizó en un equipo elevado a 65 cm del suelo dotado de haces de luz infrarroja en los cuatro brazos de 50 cm de longitud y 10 cm de ancho colocados perpendicularmente. Dos de estos brazos tienen paredes opacas, considerados los brazos cerrados y otros dos brazos no tienen paredes, considerados los brazos abiertos. Además, hay una superficie de 10 cm² que conecta los 4 brazos. Al inicio del test, las ratas se colocaban de forma individual en el centro de la plataforma mirando hacia un brazo abierto en frente del investigador. El test duró 5 minutos en los cuales la rata podía explorar libremente los 4 brazos. La plataforma se limpió con alcohol y se secó con papel después de su uso por cada sujeto experimental. El test completo se llevó a cabo al día siguiente y 1 mes después de la última administración de alcohol.

Tanto el número de entradas en brazos abiertos y cerrados, como el tiempo en el que los animales estuvieron en ambos tipos de brazos se cuantificaron con un programa de ordenador (MAZE software, Panlab, Barcelona, España) que cuantificaba las interrupciones de los haces de luz infrarroja localizados en los brazos cada vez que los animales los atravesaban. La disminución del tiempo y número de entradas en brazos abiertos en relación con el tiempo total y el número de entradas totales (en brazos abiertos y cerrados), respectivamente, se consideró un aumento del comportamiento tipo ansioso.

15.3. Test de natación forzada

Las ratas fueron sometidas al test de la natación forzada basado en el método descrito por Porsolt (Porsolt *et al.*, 1977). Las ratas fueron situadas individualmente en cilindros transparentes de 47 cm de altura y 35 cm de diámetro llenos de agua a una temperatura de 25±1°C. La prueba tuvo una duración de 5 minutos por rata que fueron grabados por una

cámara para poder analizar el comportamiento después. El test completo se realizó dos días y un mes después de la última administración del protocolo de alcohol.

Originalmente el Test de Porsolt solo incluía el parámetro de la inmovilidad, definido como la ausencia de movimiento diferente a los movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua. Posteriormente, se han añadido más parámetros, como la natación, que se definió como movimiento horizontal en el cilindro; la escalada, que se consideró cuando el animal usaba sus patas delanteras para moverse en vertical por la pared del cilindro; y la latencia, que fue definida como el tiempo necesario para observar la inmovilidad en los animales. El aumento del tiempo de inmovilidad, así como la disminución del tiempo de escalada, natación y latencia se consideran comportamientos de desesperanza del animal, que desiste en el intento de escapar del tanque de agua; este tipo de comportamiento en roedores es sensible al tratamiento con antidepresivos, por lo que el test se usa de manera habitual para observar conductas de tipo depresivo (Cryan, John F. *et al.*, 2002; Detke *et al.*, 1995).

16. Estadística

Los tamaños muestrales de cada grupo se calcularon usando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI (licencia UCM). Así, el número de sujetos experimentales se calculó para poder obtener una diferencia de 1,8 x sigma con una potencia del test del 80% y un nivel de significación de 0,05. Teniendo en cuenta que el modelo de CAA utilizado provoca una mortalidad del 9-15% (Antón *et al.*, 2017; Obernier *et al.*, 2002a; Obernier *et al.*, 2002b), los grupos que recibieron alcohol fueron asignados con un mayor número de sujetos inicialmente, para poder corregir por esta posible mortalidad. Los animales fueron asignados a cada grupo de forma aleatoria. La n (a excepción de las micrografías) representa replicados biológicos (animales diferentes), no replicados técnicos. Los datos y figuras están expresados como media $\pm$ error estándar de la media (EEM).

En los experimentos de microbiota los datos fueron analizados usando el programa R. El paquete Phyloseq v.1.28.0 (McMurdie & Holmes, 2013) se usó para importar y manejar la tabla de ASVs y los archivos de los taxones obtenidos mediante MICCA, así como para calcular los análisis de ordenación PCoA (*Principal Coordinates Analysis*), usando la distancia de Bray-Curtis. Se usó la rarefacción para normalizar las ASVs de las secuencias más pequeñas antes de realizar los análisis de la diversidad- α , para lo cual se usó el paquete microbioma v 1.6.0 (Lahti *et al.*, 2019). Otros análisis se llevaron a cabo mediante CSS (*Cumulative Sum Scaling*) seguido de la tabla de cuentas de ASV normalizada con el logaritmo en base 2 (*log2 scaling normalized ASV count table, as implemented in the metagenomeSeq*) versión 1.26.3 (Paulson *et al.*, 2013). Los análisis de PERMANOVA se realizaron usando el paquete vegano y usando 9999 permutaciones. Las comparaciones en los análisis de la diversidad- α se realizaron mediante el test U de Mann Whitney (también llamado Wilcoxon Rank Sum Test). Para identificar posibles marcadores en los grupos de muestras, se usó el análisis discriminante lineal (*Linear discriminant analysis effect size* (LEfSe)) (Segata *et al.*, 2011); y la abundancia fue transformada mediante CSS.

Para los estudios de translocación bacteriana se usaron dos metodologías diferentes para visualizar y analizar los datos, ya que hubo grupos sin crecimiento bacteriano. Primero se incluyó una presencia mínima de bacterias (1 UFC/mL) corregida por los gramos de tejido de cada animal, que es el límite de detección (DL) de la técnica. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con los grupos que presentaron translocación de bacterias (se excluyeron los grupos sin crecimiento bacteriano). La segunda aproximación se hizo mediante el uso de tablas de contingencias con todos los grupos, para estudiar la dependencia entre las variables alcohol o tratamiento con OEA y la presencia de bacterias, usando el Test exacto de Fisher y χ^2 .

Los datos obtenidos de Western blot son presentados como cambios relativos a la media del grupo control. Los datos obtenidos de la PCR fueron normalizados con la media del grupo control (valor=1). Los datos de ambas técnicas se normalizaron con β -Actina o GAPDH.

Todos los datos se sometieron al test de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Cuando los datos no se distribuyeron de manera normal, se usaron tests no paramétricos: el test de Mann-Whitney, para comparaciones entre dos grupos, y el test Kruskal-Wallis (con el test *post hoc* de Dunn en caso apropiado) para comparar tres o más grupos experimentales. Cuando los datos se distribuyeron de forma normal, se usaron tests paramétricos: T de *Student* de dos colas para comparar dos grupos, y el test ANOVA (el análisis de la varianza) de una o dos vías en el caso de tres o más grupos experimentales (seguidos del post hoc Bonferroni cuando fue pertinente). Previamente al test de ANOVA, los datos fueron sometidos al test de Bartlett para estudiar la homogeneidad de varianzas. En caso de no homogeneidad, los datos se transformaron al $\log_{10}$. Los análisis de correlación se llevaron a cabo usando el coeficiente de rangos de Spearman (r). Los animales que causaron baja durante los experimentos fueron eliminados de toda medición y de los análisis estadísticos. Se utilizó el valor $p < 0,05$ como límite de significación. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EEUU). Las imágenes fueron creadas con BioRender.com y PowerPoint.

VI) RESULTADOS



1. EFECTOS GENERALES DEL MODELO DE CAA

El modelo de CAA utilizado en esta Tesis Doctoral provocó un aumento elevado en los niveles de alcohol en sangre. Los resultados de esta Tesis Doctoral son el compendio de varios experimentos de CAA y, en ellos, la media de los niveles de alcohol medido en sangre por día del grupo alcohol fue de 199,5 +/-12,4 mg/dL y del grupo alcohol-OEA fue de 208,8 +/- 8,8 mg/dL. Los niveles se mantuvieron relativamente constantes durante los 4 días de duración del protocolo y estuvieron en el rango de sedación/ataxia según la escala de comportamiento de 6 puntos de intoxicación de alcohol (Majchrowicz, 1975). Los aspectos comportamentales observables más destacados fueron la pérdida de reflejo de enderezamiento, extremidades estiradas, ataxia y sedación. El protocolo de CAA indujo mortalidad aproximadamente en el 9-15% de los animales, similar a estudios anteriores (Antón *et al.*, 2017; Obernier *et al.*, 2002a; Obernier *et al.*, 2002b). La mortalidad no varía entre el grupo alcohol y el grupo OEA, encontrándose a lo largo de todos los experimentos un % de pérdidas de sujetos similar.

2. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA/STUDY ABOUT MICROBIOTA

Los resultados de este apartado corresponden a experimentos realizados en colaboración con el grupo de investigación de la Profesora Beatrice Passani de la Universidad de Florencia y del grupo de la Doctora Carlotta di Filippo del Instituto de Biología Agrícola y Biotecnología de Pisa, Italia, durante y a posteriori de mi estancia de investigación de 3 meses en Florencia (abril-julio 2019). Los resultados de este apartado se presentan en inglés por este motivo, cumpliendo los requisitos de Doctorado con Mención Internacional a la que se opta con esta Tesis Doctoral.

For this study, we analyzed the sequence of the genes which code for the 16S rRNA, that is a component of the small subunit (30S) of the prokaryotic ribosome. 16S rRNA gene is regarded as an optimal molecular

clock. It is present in all prokaryotes and allows for clear distinction from eukaryotes; along its sequence, it has a portion characterized by a high conservation among prokaryotic species (useful to design universal amplification primers), as well as hypervariable regions (9 in total, named from V1 to V9) that are used for the phylogenetic identification (Fraher *et al.*, 2012). To cluster the obtained 16S reads, the most recent algorithm was utilized using the full sequence to obtain the amplicon sequence variants.

2.1 Effects of alcohol binges on gut microbiota profile

With the aim to depict the specific influence of CAA on gut microbiota, we explored bacterial composition in alcohol-administered animals at two time points: before (T0) and after (T1) the 4-days alcohol binge drinking protocol. Diversity analysis results (**Figure 11**) suggest that alcohol binge drinking had a major effect on the fecal microbiota. Alcohol lowered the richness of the community, which otherwise is significantly increasing from T0 to T1 in the control group (Figure 11A) but did not significantly affect the Evenness (indicative of equitability of the distribution of relative abundances) nor the Shannon (diversity of the community) indexes (Figure 11B, C). In addition, alcohol caused a clearly distinguishable community composition in PCoA ordination analysis, with alcohol treated samples forming a distinct cluster along the first ordination axis, significantly different with respect to other samples (Figure 11D, see PERMANOVA reported as notation on the ordination graph).

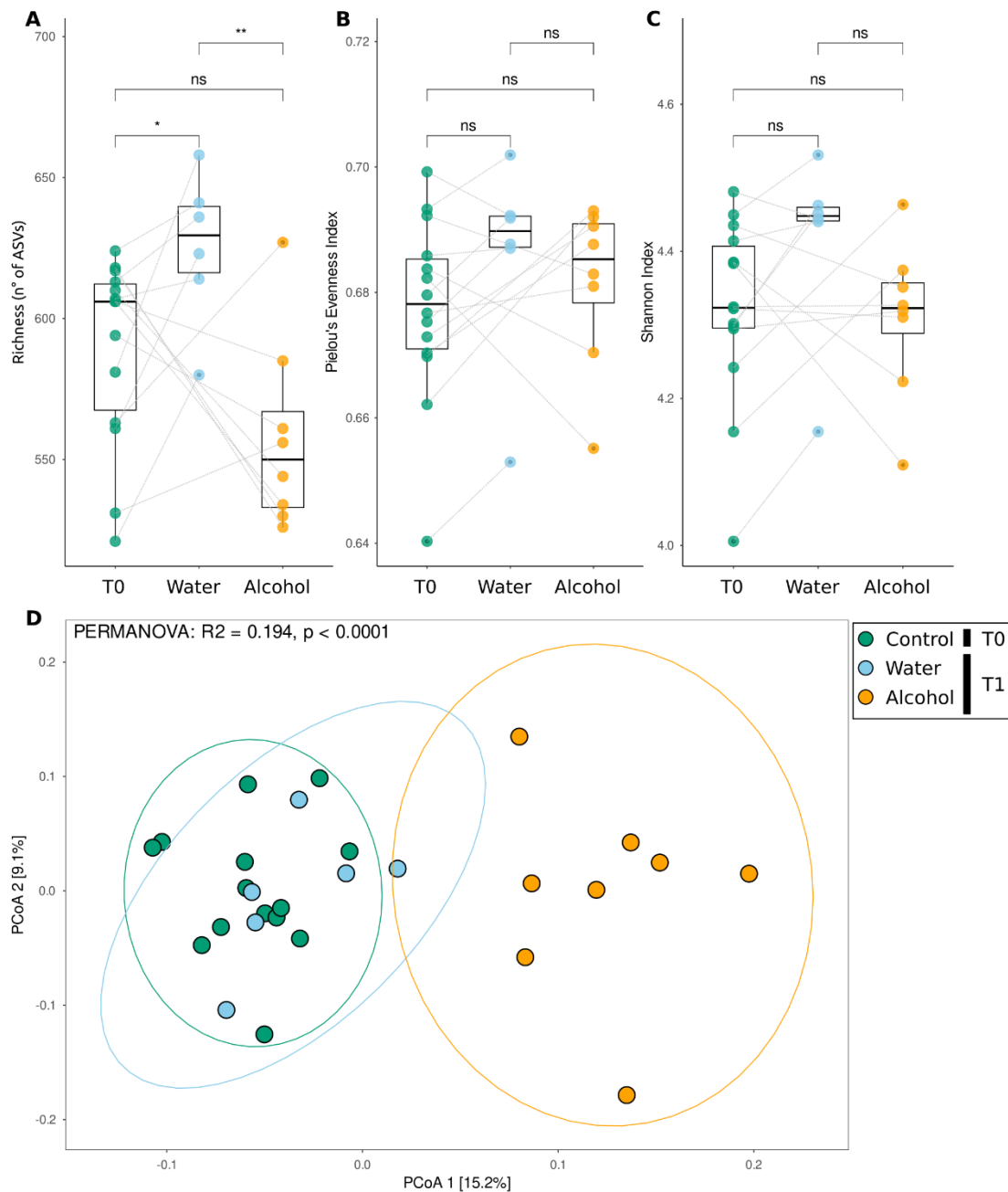


Figure 11: Bacterial community response to alcohol binge drinking. Analyses were performed with the T1 alcohol and water administered rats, and the corresponding T0 samples. A) Richness (number of different ASVs); B) Pielou's Evenness index (equitability of the distribution of relative abundances among ASVs), C) Shannon index (diversity of the community) as measures of α -diversity. Differences between groups were tested by Wilcoxon Rank Sum test and reported as notation on the plot (ns: p -value > 0.05 ; *: p -value < 0.05 ; **: p -value < 0.01). Dotted lines connect the data from the same animal at the two time points for each treatment. D) β -diversity analysis with PCoA ordination using the Bray-Curtis distance measure. Notation above the plots reports the results of PERMANOVA test.

LEfSe analysis (Figure 12) was used to discover biomarkers associated to each group. To identify those most likely linked to a biological effect, we measured their relative abundance (i.e. biomarkers with very low median relative abundance in a group, are less indicative of a biological effect connected to that group) as well as their frequency distribution (i.e. those markers found in all samples of a group can be considered more likely connected to a biological effect, than those found in only few samples of a group).

By doing so, we identified *Clostridium sensu stricto*, *Romboutsia*, *Turicibacter*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides* and *Enterococcus* as valuable markers for the T1 alcohol group (**Figure 13**) and found at high relative abundance levels in alcohol administrated rats. Conversely, *Lactobacillus*, *Clostridium XIVa*, *Clostridium XIVb* and *Oscillibacter* were found as markers of T0 samples and displayed a significantly decreasing trend in relative abundance from T0 to T1 (**Figure 13**). As such, they could be considered as markers of the normal weaning process. However, given that their decrease in relative abundance was more evident in alcohol administrated rats, we can attribute it to a specific effect of ethanol on these genera.

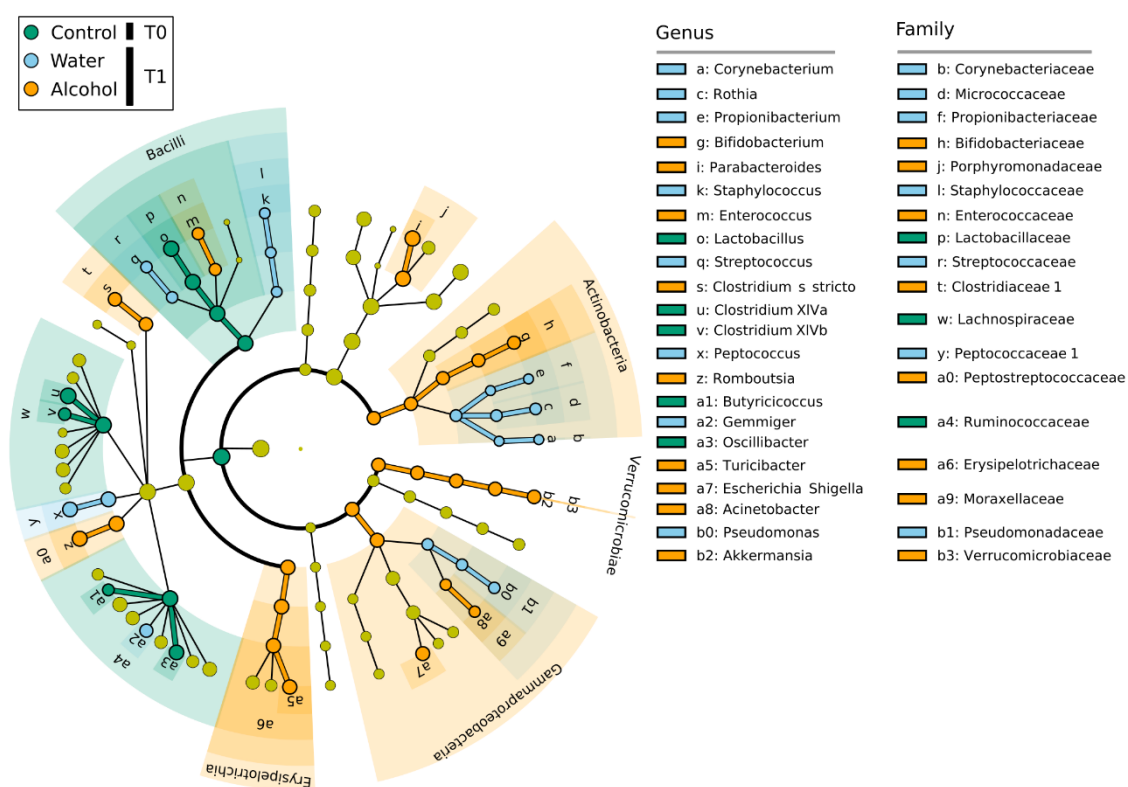


Figure 12: LEfSe biomarker identification for the comparison of genera relative abundance between the T1 alcohol administered rats, the T1 water administered rats, and the corresponding T0 samples. Significant biomarkers taxon for each group were obtained with a Kruskal–Wallis test among groups [$\alpha = 0.05$], and only biomarkers with a logarithmic linear discriminant analysis score higher than 2.0 were retained.

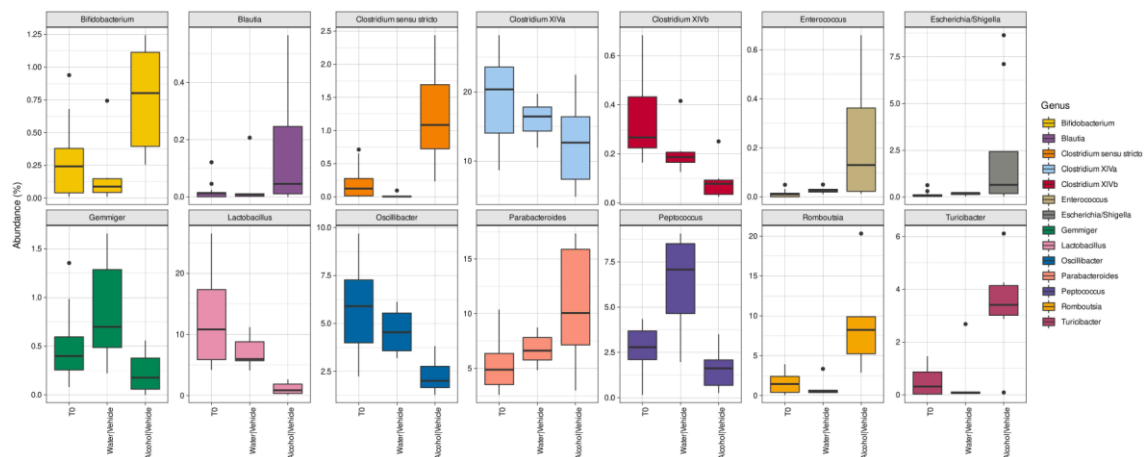


Figure 13: Comparison of genera relative abundance between the T1 alcohol administered rats, the T1 water administered rats, and the corresponding T0 samples. Only the genera with significant (with p -value < 0.05) difference in one way ANOVA were reported.

2.2 Effects of OEA treatment on gut microbiota profile

After assessing the overall effects of alcohol binge drinking on fecal microbiota, we aimed at analyzing the specific effect of OEA administration *per se* and in the context of alcohol binge drinking. **Figure 14** reports microbiota α and β -diversity analysis on all groups.

The higher richness values were observed in the control groups receiving water and vehicle, showing no significant difference with respect to the rats receiving water and OEA, but with a significant difference with respect to samples collected at T0 and to the alcohol receiving rats (both vehicle and OEA treated ones). Alternatively, the lowest richness values were observed in the group of rats receiving alcohol and OEA (Figure 14A), with a statistically significant difference *versus* all other groups. Evenness and Shannon's indexes showed similar trends: both were increased from T0 to T1 except for the group of rats receiving alcohol and OEA, which showed significantly lower values with respect to all other T1 samples, and,

interestingly, similar to those observed in T0 samples (untreated animals) (Figure 14B and C).

β -diversity analysis (Figure 14D) indicated that the community was significantly different in the groups, as confirmed by PERMANOVA results (see notation above the ordination plot in Figure 14D). As previously observed, water samples overlap with T0 samples (Pairwise PERMANOVA between T0 and water samples were significant but showed low R² values. T0 vs Water + Vehicle: R² = 0.055, *p*-value: 0.001; T0 vs Water + OEA: R² = 0.062, *p*-value: 0.001), showing a separation along the second ordination axis between vehicle and OEA treated group (Pairwise PERMANOVA: Water + Vehicle vs Water + OEA: R² = 0.098, *p*-value: 0.024). Regarding alcohol treated samples (Figure 14D), they are clearly separated from the others along the first ordination axis (representing 18% of total data variance), also showing a difference between OEA and vehicle treatment (Pairwise PERMANOVA: Alcohol + Vehicle vs Alcohol + OEA: R² = 0.142, *p*-value: 0.001).

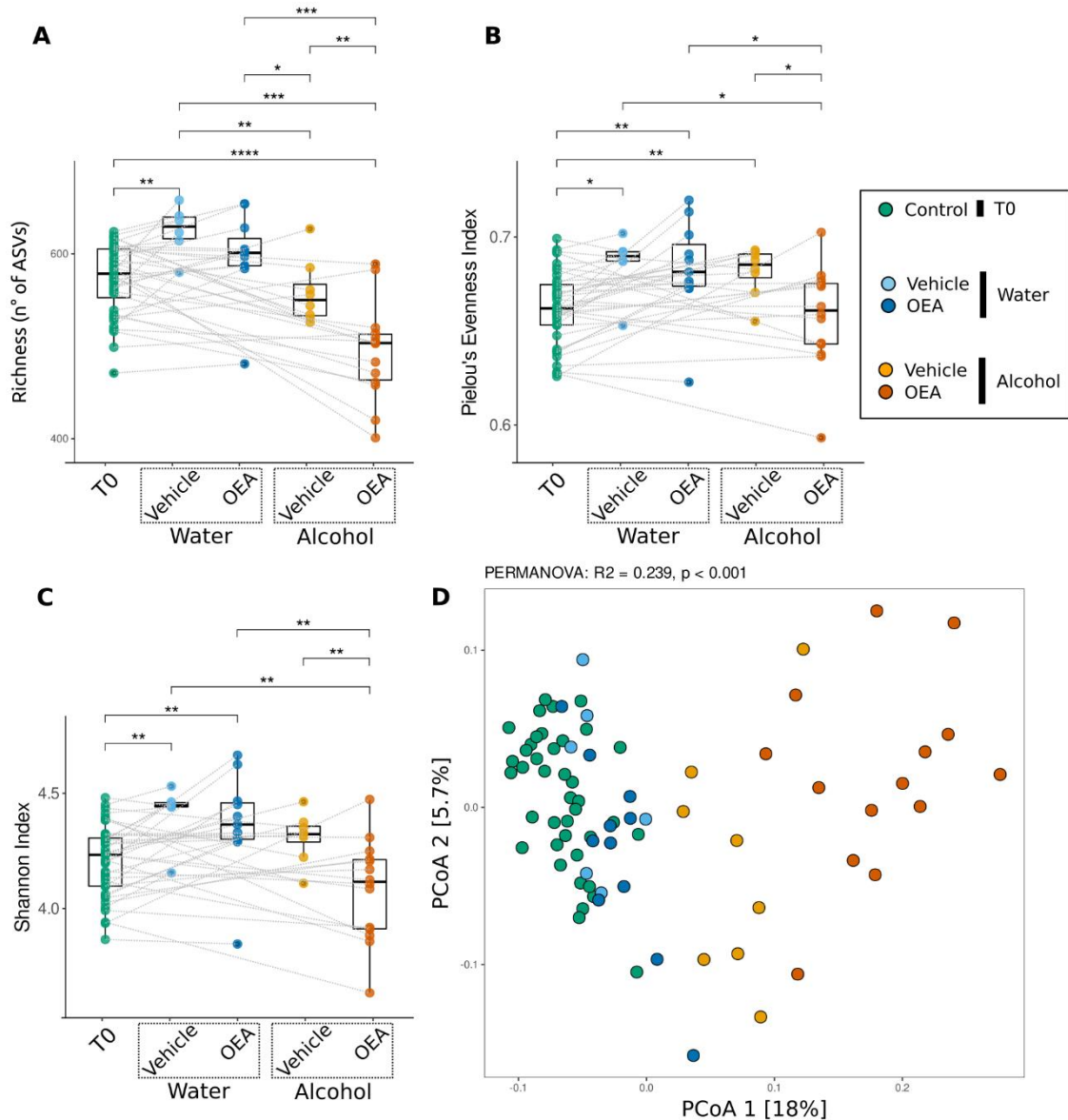


Figure 14: Bacterial community response [α -diversity: A, B, C; β -diversity: D] to alcohol binge drinking and OEA treatment. A) Richness (number of different ASVs); B) Pielou's Evenness index (equitability of the distribution of relative abundances among ASVs), C) Shannon index (diversity of the community) as measures of α -diversity. Differences between groups were tested by Wilcoxon Rank Sum test and reported as notation on the plot (*: p -value < 0.05 ; **: p -value < 0.01 , ***: p -value < 0.001 , ****: p -value < 0.0001). Dotted lines connect the data from the same animal at the two time points for each treatment. D) β -diversity analysis with PCoA ordination among all samples, using the Bray-Curtis distance measure. Notation above the plots reports result of PERMANOVA test. Dotted lines connect the data from the same animal at the two time points for each treatment.

We next evaluated the effect of alcohol binge drinking and the OEA pretreatment on the community composition at the genus level by identifying taxa found at significant different abundance, using LEfSe analysis. As shown in **Figure 15**, comparing alcohol receiving samples with either OEA or vehicle pretreatment, numerous different taxa showed significantly different relative abundance in the two sample groups. Among them, members of the Firmicutes phylum, and in particular, four genera (*Butyricicoccus*, *Clostridium* IV, *Gemmiger*, and *Ruminococcus*) of the *Ruminococcaceae* family, as well as genus *Bifidobacterium* of the Actinobacteria phylum, were more abundant in the vehicle group. OEA-treated samples, conversely, had higher relative abundance of taxa among the Proteobacteria (i.e. *Escherichia/Shigella* and *Pseudomonas*) and Bacteroidetes (genus *Bacteroides*) phylum. At the genus levels, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Blautia*, and *Peptococcus* were more abundant in the OEA pretreatment group, whereas genera *Bifidobacterium*, *Clostridium sensu stricto*, and *Turicibacter* were more abundant in the non OEA pretreatment samples group.

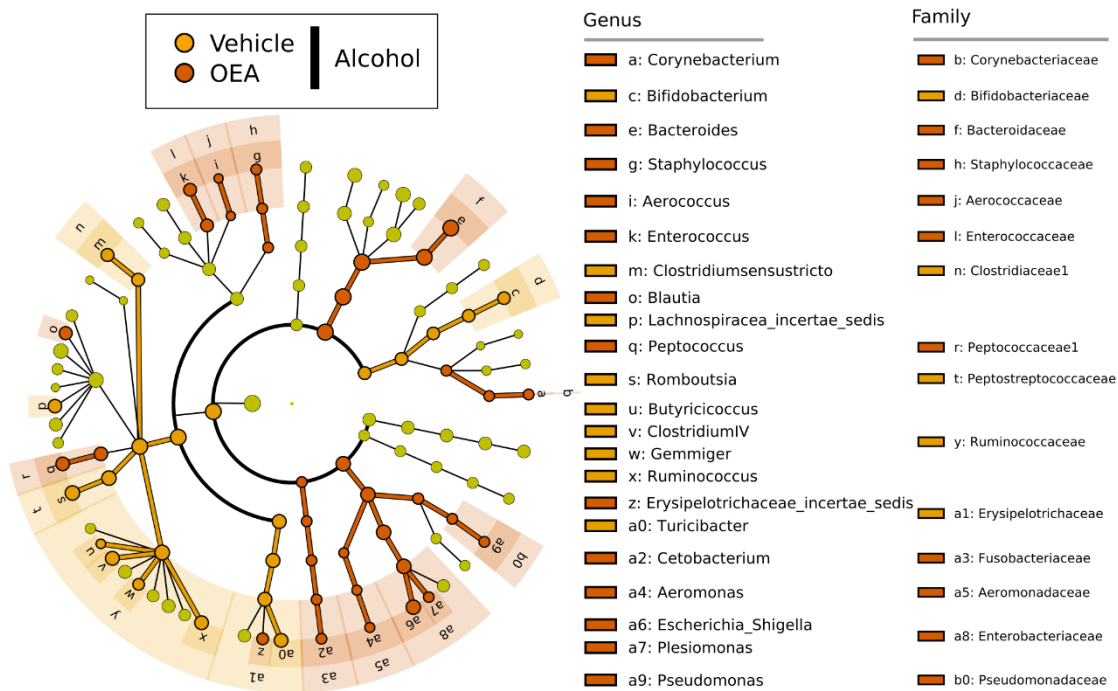


Figure 15: LEfSe biomarker identification for the comparison of genera relative abundance between the OEA supplemented vs the non OEA supplement group of alcohol intoxicated rats. Significant biomarker taxon for each group were obtained with a Kruskal–Wallis test among groups [$\alpha = 0.05$], and only biomarker with a logarithmic linear discriminant analysis score higher than 2.0 were retained.

2.3 Effects of different routes of OEA administration on alcohol-induced dysbiosis

We finally aimed to discern whether **different routes of OEA administration (oral vs i.p.)** may impact differentially on gut microbiota in the context of alcohol binge drinking. **Figure 16** reports the diversity analysis on the alcohol administrated rats receiving oral or i.p. OEA, which are compared with non-OEA alcohol receiving rats in T1 and with respective control rats in T0. The separation of samples in PCoA ordination analysis (Figure 16A) indicated that oral and i.p. OEA administration in alcohol intoxicated animals had a different effect on the structure of microbiota

with respect to the vehicle group (ANOSIM test; $R^2 = 0.50$; $p = 1.00e^{-4}$). This was then confirmed by the pairwise PERMANOVA, which indicated that all the three groups of samples had a significantly different microbial community between each other. The highest differences were found between the vehicle and the oral OEA ($R^2 = 0.2322$; $p = 0.0006$), or the i.p. OEA ($R^2 = 0.1423$; $p=0.0021$).

The difference between the two administration routes was significant ($R^2 = 0.1367$; $p=0.0042$), which suggests that OEA administration route may have a fundamental role in shaping the microbiota in alcohol-treated rats. A similar finding can be observed also for the α -diversity measure of ASVs richness (Figure 16B). The richness appears to decrease in the i.p. and oral OEA in comparison with the vehicle group, but the only significant difference was found with respect to the oral OEA. Thus, oral OEA is also the only one showing a significant decrease in richness from T0 to T1 (Figure 16C).

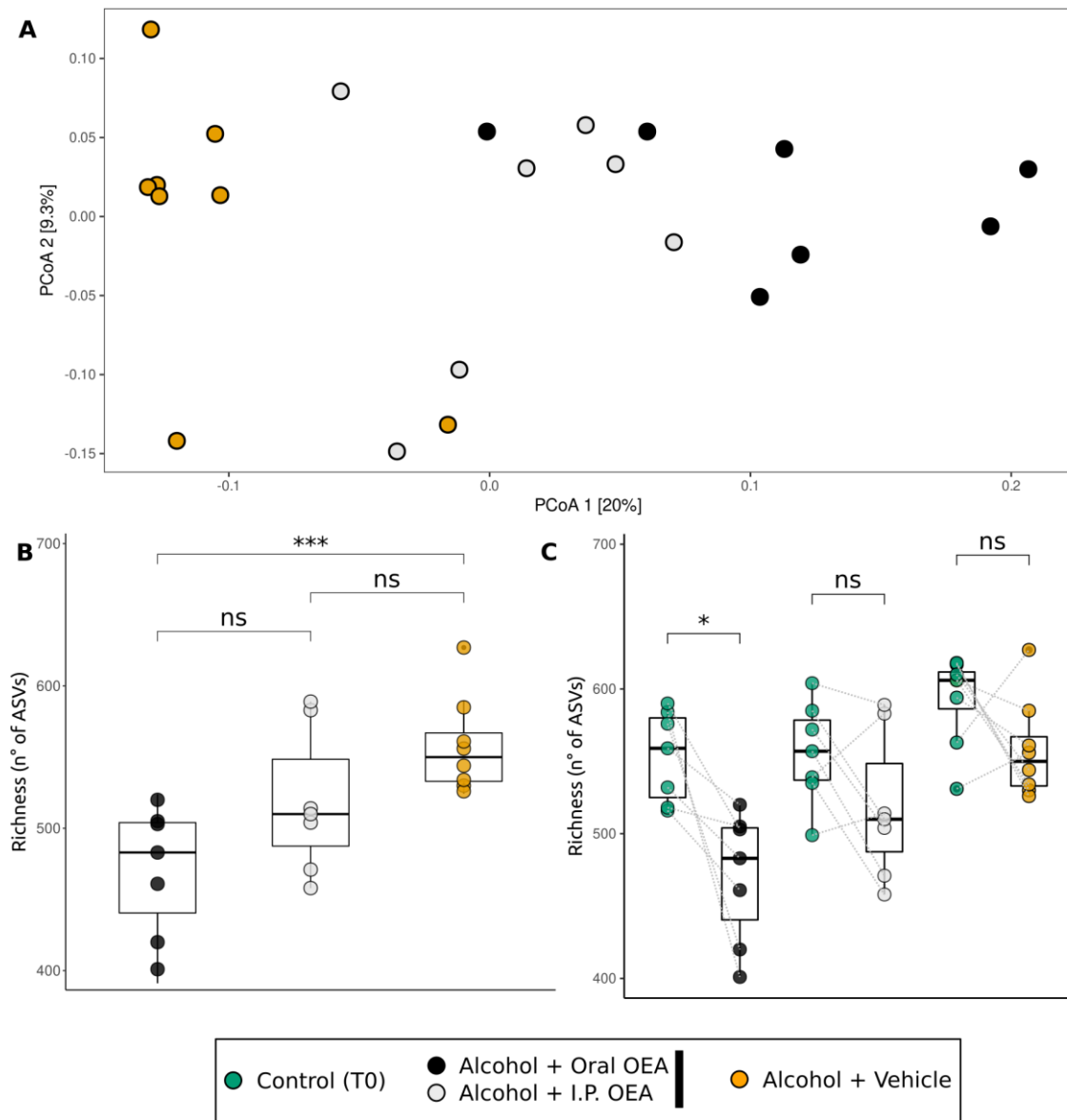


Figure 16: Bacterial community response to different routes of administration of OEA in alcohol intoxicated rats. A) β -diversity analysis with PCoA ordination among oral and i.p. OEA administration route, in comparison to the non-OEA receiving rats. Ordination was constructed using the Bray-Curtis distance measure. B) Richness (number of different ASVs) in the three samples groups. C) Richness (number of different ASVs) in the three sample groups, in comparison with their respective T0 samples. Differences between groups were tested by Wilcoxon Rank Sum test (paired test in panel C) and the resulting p -value was reported as notation on the plot (ns: p -value > 0.05 ; *: p -value < 0.05 ; ***: p -value < 0.001). Dotted lines connect the data from the same animal at the two time points for each treatment.

In conclusion, these results indicate that alcohol binge drinking (T1) reduced richness of the faecal rat microbiota, with a distinguishable bacterial community from T0 (no treatment) and from the T1 water group. Alcohol increased levels of *Clostridium sensu stricto*, *Romboutsia*, *Turicibacter*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides*, and *Enterococcus*; and decreased levels of *Lactobacillus*, *Clostridium XIVa*, *Clostridium XIVb*, and *Oscillibacter*.

Additionally, OEA administration in the water group slightly changed the community structure with respect to the vehicle group but did not change α -diversity. In addition, alcohol and OEA appeared to synergistically interact with the gut microbiota. Pretreatment with OEA in the alcohol administered rats decreased Richness, Evenness and Shannon indexes, and changed community structure to a greater extent in comparison to the alcohol without OEA group. The route of OEA administration had a significant effect in the richness: oral OEA, but not i.p. OEA, significantly decreased richness in comparison with the vehicle group and from T0.

3. ESTUDIO DE LA BARRERA INTESTINAL

3.1 Estudio inicial sobre permeabilidad de bacterias

Con el fin de estudiar el efecto del CAA en la funcionalidad de la barrera intestinal, se realizó un experimento piloto para determinar si el CAA induce un intestino permeable (paso de bacterias intestinales hacia órganos). Así, se chequeó la presencia de bacterias en los **GLMs**, hígado, bazo y sangre en animales expuestos a CAA respecto a los controles. Los resultados mostraron que el CAA da lugar a la translocación de bacterias, principalmente a los GLMs, que representa el primer lugar de entrada de los microorganismos desde el intestino, en el 83% de los animales que consumieron alcohol en atracón; y también al bazo en el 50% de los animales. No se encontraron bacterias ni en el hígado ni en la sangre. En los animales control, que no recibieron alcohol, no se encontró crecimiento bacteriano en ninguno de los tejidos estudiados por encima del límite de detección.

Las especies encontradas en los cultivos incluyen Gram negativas anaerobias facultativas (*Escherichia coli* (*E.coli*), *Proteus vulgaris* y *Klebsiella* spp.), Gram positivas anaerobias (*Clostridium* spp.) y Gram positivas anaerobias facultativas (*Enterococcus* spp. y *Staphylococcus* coagulasa negativo). Entre ellas, *E.coli*, de especial interés por su potencial proinflamatorio y su relación con la endotoxina LPS, componente de su membrana ampliamente estudiado en neuroinflamación, fue la bacteria más aislada en los cultivos (**Figura 17**). El CAA provocó la translocación de *E.coli* a los GLMs en el 83% de los animales, y al bazo en el 33% de los animales que consumieron alcohol.

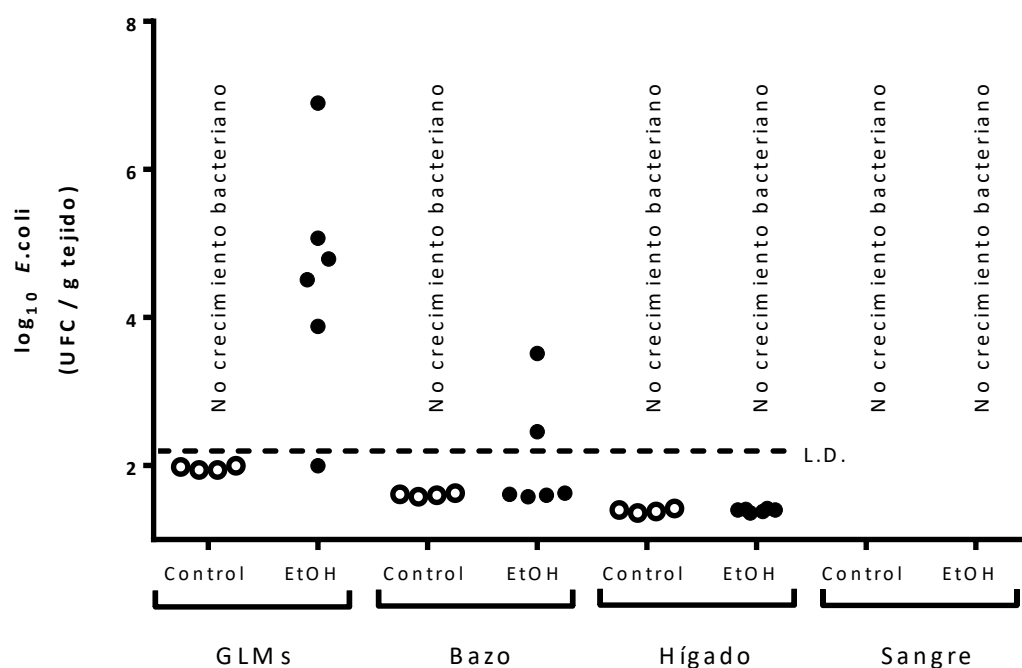


Figura 17: Estudio piloto de la translocación de *E.coli* a los ganglios linfáticos mesentéricos, bazo, hígado y/o sangre tras el consumo de alcohol en atracón. Los datos de los animales que no presentaron crecimiento bacteriano se representan debajo de la línea discontinua que es la línea del límite de detección (L.D.) de la técnica. Cada punto representa una unidad formadora de colonias (UFCs). Los datos están corregidos por los gramos de tejido (excepto en la sangre) y expresados como logaritmo en base 10. Fue un estudio piloto o exploratorio: grupo control n=4; grupo alcohol n=6.

Con este primer experimento, vimos que este modelo de CAA induce la translocación de bacterias a órganos que de manera fisiológica no están presentes en dichos órganos.

Este estudio fue independiente del estudio de la disbiosis ocasionada por el alcohol presentado en el apartado anterior y se utilizaron metodologías muy distintas. En la evaluación de la translocación, el estudio de la composición bacteriana translocada se hizo mediante crecimiento en cultivo e identificación bioquímica. Es una técnica con algunas limitaciones, ya que es muy laboriosa y solo una pequeña parte de la microbiota, aproximadamente el 30%, puede ser cultivada (revisado en (Fraher *et al.*, 2012). Sin embargo, es una técnica económica y en términos de medidas cualitativas de la microbiota translocada a otros órganos, es una técnica muy usada (Martín-Hernández *et al.*, 2016). Por estas limitaciones que se comentan, para el análisis de la microbiota intestinal se usó la técnica de secuenciación del rRNA 16S, que es el estándar de oro de la identificación taxonómica a nivel de especie. Esta técnica también cuenta con limitaciones como el alto coste y el sesgo de la PCR (por ejemplo, la diferente lisis de las células microbianas puede afectar a la aparente composición final de la microbiota), pero permite una cuantificación filogenética, es rápida y es cuantitativa. Por tanto, las técnicas de secuenciación han reemplazado a las técnicas de cultivo en los últimos años (Fraher *et al.*, 2012).

Con la evidencia científica, tras el estudio piloto, de que el CAA produjo translocación bacteriana, se realizaron los siguientes experimentos con el fin de estudiar en detalle el efecto del CAA en el estado inflamatorio, la estructura y la permeabilidad de la barrera intestinal, así como el posible papel protector de la OEA.

3.2 Inflamación colónica

Un estado inflamatorio aumentado podría contribuir al malfuncionamiento de las barreras biológicas. Con el fin de determinar el potencial inflamatorio del CAA en la barrera intestinal se midieron marcadores inflamatorios e inmunes en el colon, pertenecientes a la vía proinflamatoria de señalización por TLR4 (**Figura 18**).

Los resultados mostraron que el CAA produjo el aumento de TLR4 en el colon tanto a nivel del mRNA como a nivel proteico. El alcohol aumentó los niveles de mRNA de TLR4 con independencia del pretratamiento con OEA (Figura 18a; $F_{(1,22)}=19,16$; $p<0,05$). Sin embargo, se observó una interacción entre el alcohol y la OEA en los niveles de proteína de TLR4 (Figura 18b; $F_{(1,23)}=8,21$; $p<0,05$) y el test *post hoc* reveló que los animales que consumieron alcohol en atracón tenían mayores niveles de proteína de TLR4 y que el pretratamiento con OEA previno este efecto ($p<0,05$) (Figura 18b).

Los niveles de mRNA (Figura 18c) y de proteína (Figura 18d) de TNF- α aumentaron tras el CAA ($F_{(1,21)}=17,40$; $p<0,05$ y $F_{(1,22)}=4,76$; $p<0,05$, respectivamente). Se encontró una interacción entre los factores alcohol y OEA en los niveles de mRNA ($F_{(1,21)}=9,22$; $p<0,05$). El test *post hoc* reveló una diferencia entre el control y el grupo alcohol ($p<0,05$) que no se detectó en el grupo que recibió el pretratamiento con OEA y el alcohol ($p>0,05$ n.s.). En el caso de los niveles de la proteína de TNF- α , la OEA no previno el aumento inducido por el alcohol ($p>0,05$ n.s.; aunque es observable cierta tendencia a la baja).

También se midieron los niveles de iNOS y de nitritos (metabolitos estables del óxido nítrico), como índices del estrés nitrosativo. El CAA aumentó los niveles de mRNA de la enzima iNOS (Figura 18e; $F_{(1,22)}=8,78$; $p<0,05$) y los niveles de proteína de esta enzima (Figura 18f; $F_{(1,22)}=9,92$; $p<0,05$). El pretratamiento con OEA no previno el aumento del mRNA de iNOS a consecuencia del consumo de alcohol ($F_{(1,22)}=0,046$; $p>0,05$, n.s.). Sin

embargo, sí que se encontró una interacción muy cerca de la significación estadística entre el alcohol y la OEA ($F_{(1,22)}=4,09$; $p=0,055$, $p>0,05$, n.s.) en los niveles de proteína de iNOS (Figura 18f).

En los niveles de nitritos se observó una interacción entre el alcohol y la OEA (Figura 18g; $F_{(1,20)}=4,44$; $p<0,05$), y el test *post hoc* reveló que el CAA elevó los niveles de nitritos y el pretratamiento con OEA previno este efecto de forma significativa ($p<0,05$).

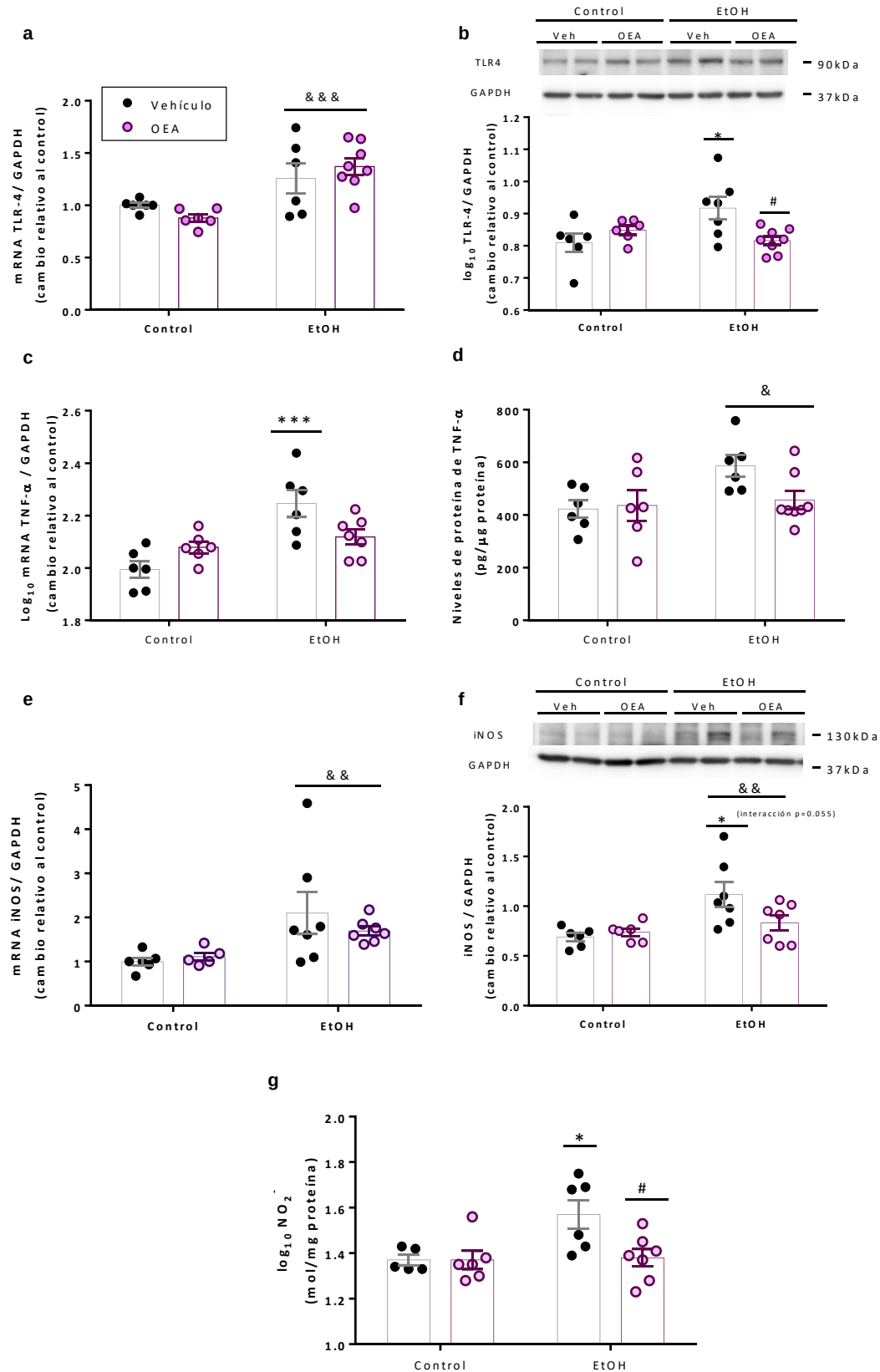


Figura 18. Inflamación en el colon tras el consumo de alcohol en atracón y el papel protector de la OEA i.p.: a) niveles de mRNA de TLR4; b) niveles de proteína de TLR4; c) niveles del mRNA de TNF- α ; d) niveles de proteína de TNF- α ; e) niveles del mRNA de iNOS; f) niveles de proteína de iNOS; g) niveles de nitritos. Datos presentados como la media $\pm$ EEM (n=6-8). Análisis estadístico: ANOVA de dos vías: efecto principal del alcohol: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; test *post hoc* cuando existe interacción: diferencias con respecto al grupo control de la misma condición: $*p < 0,05$; $***p < 0,001$; diferencias entre el grupo alcohol y alcohol + OEA: $\#p < 0,05$.

3.3 Niveles de IgM e IgA en colon y plasma

Una vez explorado el efecto del CAA y de la OEA en la inflamación y en el sistema inmune innato (TLR4) en el apartado anterior, estudiamos entonces los efectos en el sistema inmune adquirido a través de la medida de los niveles de anticuerpos IgA e IgM en colon y sangre. Ambas inmunoglobulinas son secretadas por las células plasmáticas de la barrera intestinal para reforzar la separación física de la microbiota y el epitelio intestinal (**Figura 19**).

Se observó que el CAA, además de afectar el sistema inmune innato también afecta al adquirido. Así, los animales tratados con CAA mostraron reducidos niveles de IgM en colon y en plasma con respecto a los controles (Figura 19 a y b; $F_{(1,21)}=12,27$; $p < 0,05$ y $F_{(1,22)}=4,88$; $p < 0,05$, respectivamente). No se observó ningún efecto de la OEA en la IgM ($F_{(1,21)}=0,34$; $p > 0,05$ y $F_{(1,22)}=1,89$; $p > 0,05$, respectivamente), ni interacción entre los factores alcohol y OEA ni en colon ni en plasma ($F_{(1,21)}=0,82$; $p > 0,05$ n.s. y $F_{(1,22)}=0,1$; $p > 0,05$ n.s., respectivamente).

En los niveles de IgA en el colon se observó una interacción del alcohol y la OEA (Figura 19c; $F_{(1,22)}=5,99$; $p < 0,05$), y el test *post hoc* reveló que el CAA aumentó la expresión de IgA en el colon y que la OEA fue capaz de prevenirlo de forma significativa ($p < 0,05$). En plasma, los niveles de IgA (Figura 19d) también se incrementaron tras el CAA ($F_{(1,23)}=8,65$; $p < 0,05$), aunque en este caso la OEA no previno este efecto ($F_{(1,23)}=0,876$; $p > 0,05$,

n.s.). No hubo interacción entre los factores alcohol y OEA ($F_{(1,23)}=0,49$; $p>0,05$ n.s.).

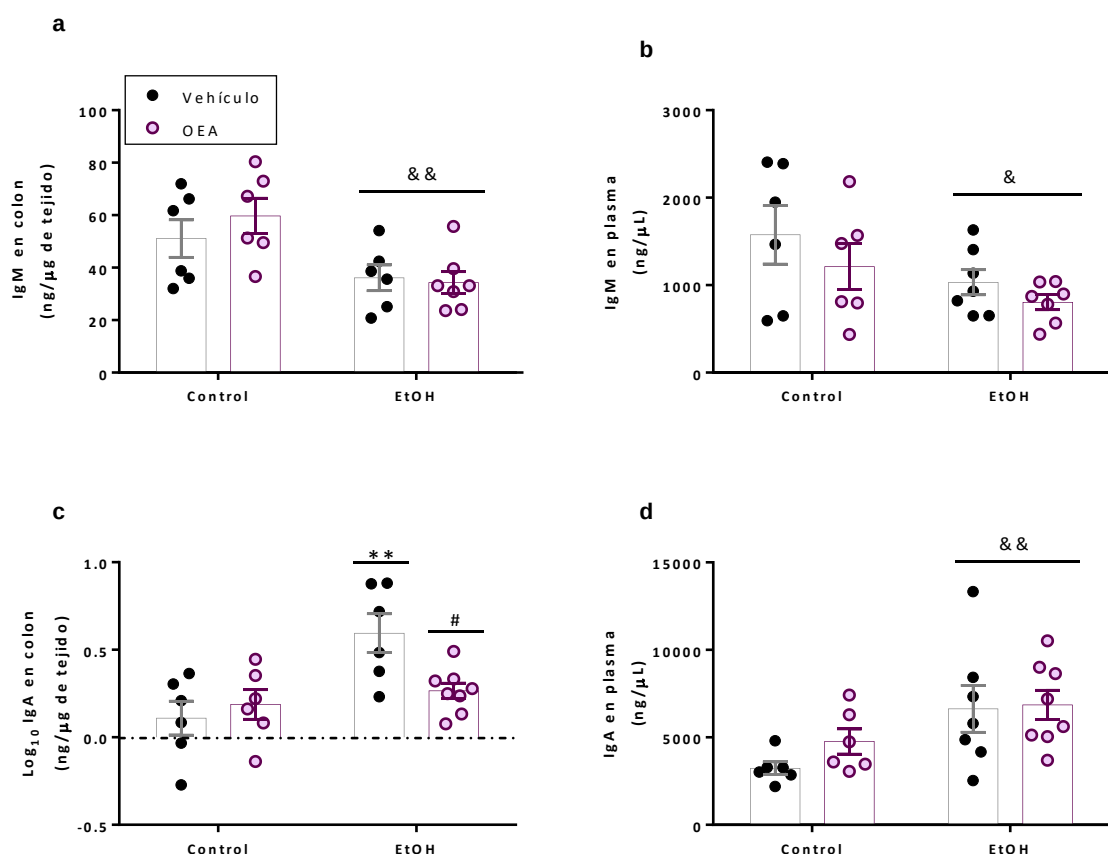


Figura 19. Expresión de IgM e IgA en colon y en plasma tras el consumo de alcohol en atracón y el efecto de la OEA i.p.: a) niveles de IgM en colon; b) niveles de IgM en plasma; c) niveles de IgA en colon; d) niveles de IgA en plasma. Datos presentados como la media ± EEM (n=6-8). Análisis estadístico: ANOVA de dos vías: efecto principal del alcohol: & $p<0,05$; && $p<0,01$; y test *post hoc* cuando existe interacción; diferencias con respecto al grupo control de la misma condición: ** $p<0,01$; diferencias entre el grupo alcohol y alcohol + OEA: # $p<0,05$.

3.4 Las uniones estrechas en el colon

A continuación, decidimos estudiar los efectos del CAA y de la OEA en los niveles de mRNA y de proteína de las moléculas que forman las uniones estrechas que regulan el paso de moléculas entre las células adyacentes del epitelio intestinal en el colon: las proteínas transmembrana ocludina y claudinas 3 y 4, y la proteína citoplasmática ZO-1 (Figura 20).

En cuanto a los niveles de mRNA y proteína de ocludina encontramos interacción entre el alcohol y la OEA (Figura 20 a y b; $F_{(1,22)}=4,09$; $p<0,05$ y $F_{(1,24)}=6,79$; $p<0,05$, respectivamente). El test *post hoc* reveló que el CAA redujo de forma significativa los niveles de proteína de ocludina (Figura 10b; $p<0,05$), pero la disminución de los niveles de mRNA de ocludina por el CAA no fue significativa tras el test *post hoc* (Figura 20a, $p>0,05$ n.s.). El grupo que recibió alcohol con pretratamiento de OEA mostró un aumento significativo de los niveles de mRNA de ocludina (Figura 20a; $p<0,05$) y el pretratamiento con OEA aumentó de forma significativa los niveles de proteína de ocludina que habían sido reducidos por el consumo de alcohol (Figura 10a; $p<0,05$).

También encontramos una interacción entre el alcohol y la OEA en los niveles de mRNA y de proteína de claudina-3 (Figura 20 c y d; $F_{(1,23)}=7,18$; $p<0,05$ y $F_{(1,23)}=4,74$; $p<0,05$, respectivamente). El test *post hoc* reveló que el CAA redujo los niveles de mRNA y de proteína de claudina-3 ($p<0,05$), y que la OEA previno este efecto, pero solo en los niveles de proteína ($p<0,05$).

En cuanto a claudina-4, el alcohol redujo los niveles de mRNA (Figura 20e; $F_{(1,18)}=32,11$; $p<0,05$) , y la OEA no fue capaz de prevenir este efecto (Figura 20e; $F_{(1,18)}=0,068$; $p>0,05$ n.s.). El pretratamiento con OEA aumentó de forma significativa los niveles de proteína de claudina-4 tanto en el grupo control como en el grupo alcohol (Figura 20f; $F_{(1,23)}=6,425$; $p<0,05$). Este efecto también se observó en los niveles de proteína de claudina-1 (datos no mostrados; $F_{(1,23)}=11,45$; $p<0,05$).

El consumo de alcohol no alteró ni los niveles de mRNA ni de proteína de ZO-1 (Figura 20g; $F_{(1,22)}=0,13$; $p>0,05$ n.s.; Figura 20h; $F_{(1,24)}=1,07$; $p>0,05$ n.s., respectivamente). Sin embargo, se encontró un efecto principal de la OEA aumentando los niveles de mRNA ($F_{(1,22)}=11,55$; $p<0,05$) y de proteína ($F_{(1,24)}=4,93$; $p<0,05$) tanto en condiciones de administración de alcohol como en controles.

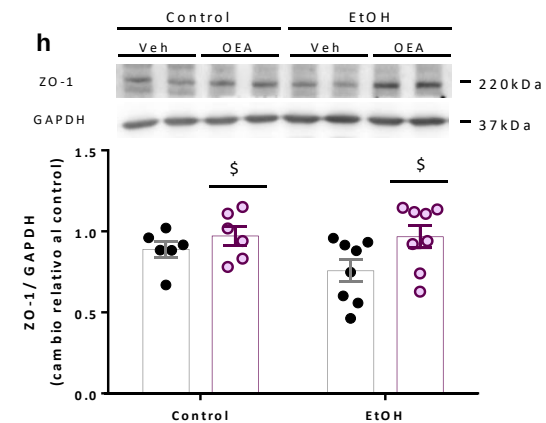
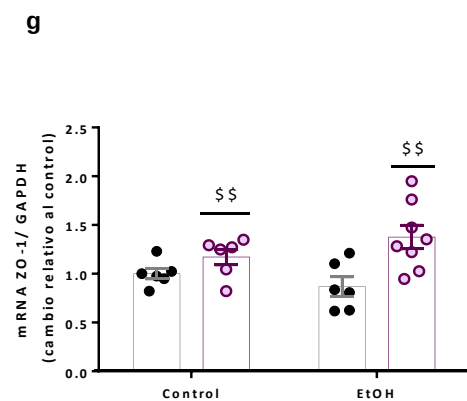
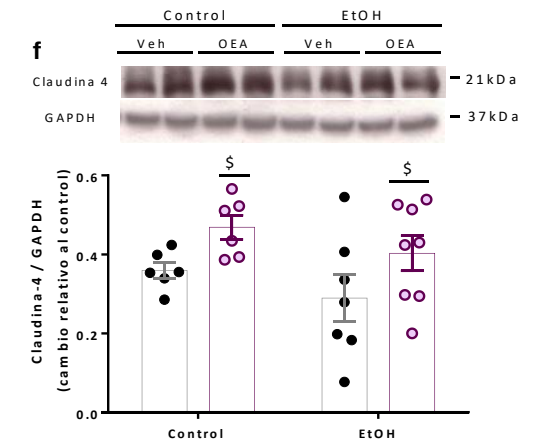
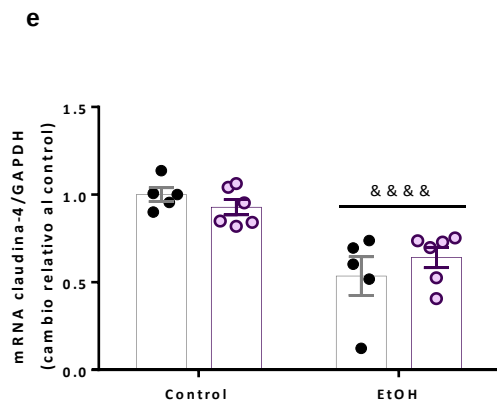
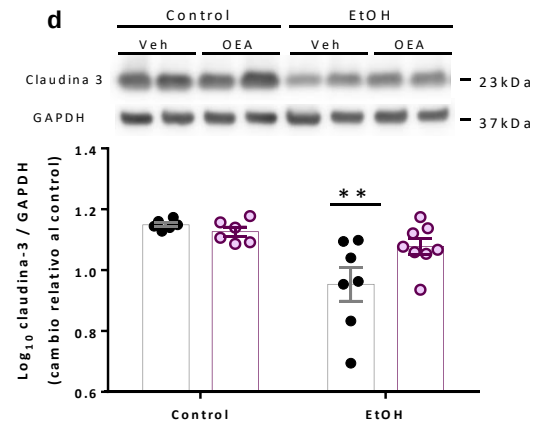
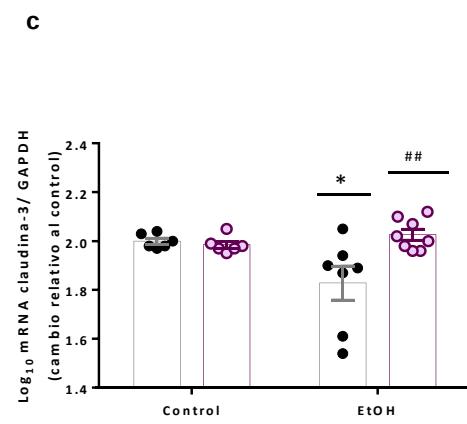
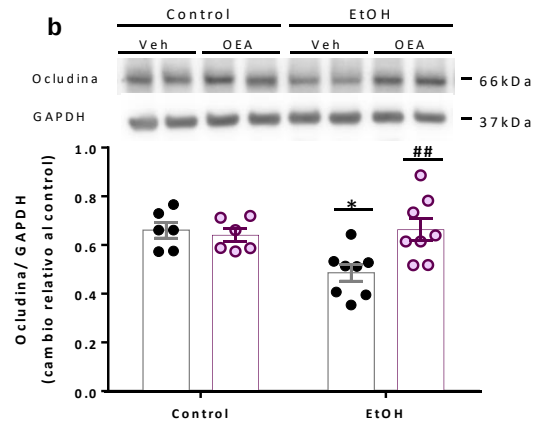
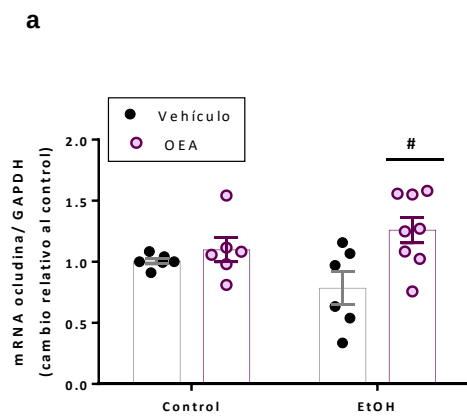


Figura 20. Alteración de las proteínas que forman las uniones estrechas del colon tras el consumo de alcohol en atracón y el papel protector de la OEA i.p.: a) niveles de mRNA ocludina; b) niveles de la proteína de ocludina; c) niveles de mRNA de claudina-3; d) niveles de la proteína de claudina-3; e) niveles de mRNA de claudina-4; f) niveles de proteína de claudina-4; g) niveles de mRNA de ZO-1; h) niveles de la proteína de ZO-1. Datos presentados como la media $\pm$ EEM (n=6-8). Análisis estadístico: ANOVA de dos vías: efecto del alcohol: $p < 0,0001$; efecto de la OEA: $p < 0,05$; $p < 0,01$; y test *post hoc* cuando existe interacción: diferencias con respecto al grupo control de la misma condición: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; diferencias entre el grupo alcohol y alcohol + OEA: $\#p < 0,05$; $\#\#p < 0,01$.

3.5 Ultraestructura de las uniones estrechas del colon

Para verificar el estado de las uniones estrechas del colon tras el CAA, éstas se visualizaron mediante micrografías de microscopía electrónica de transmisión (**Figura 21**). Se muestran unas imágenes representativas de cada grupo experimental de todas las imágenes disponibles (se cuantificaron diferentes espacios intercelulares (n=5-15 por animal, dependiendo de la disponibilidad) en varios animales (n=4-6) de cada grupo experimental).

Las uniones estrechas, que son las regiones entre las células epiteliales adyacentes en las que las membranas celulares se encuentran más cercanas, están indicadas con flechas.

El análisis cuantitativo (Figura 21f) muestra que los animales control tenían una media de 20nm de distancia entre las membranas celulares adyacentes, siendo la máxima distancia cuantificada de 28nm. Los animales que recibieron alcohol en atracón presentaron uniones estrechas más dilatadas ($F_{(1,33)}=6,22$; $p < 0,05$) independientemente del tratamiento de la OEA ($F_{(1,133)}=0,1862$; $p > 0,05$ n.s.). También se cuantificaron las longitudes de las uniones estrechas: grupo control: $0,30 \pm 0,01 \mu\text{m}$; grupo alcohol: $0,36 \pm 0,02 \mu\text{m}$; grupo alcohol+OEA: $0,35 \pm 0,02 \mu\text{m}$; grupo OEA: $0,32 \pm 0,02 \mu\text{m}$, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Test de Kruskal-Wallis $p > 0,05$ n.s.).

A nivel cualitativo, las imágenes del control (Figura 21a) muestran un epitelio intacto, mientras que las del grupo alcohol (Figura 21b) muestran TJ dilatadas, es decir un espacio intercelular mayor y las uniones estrechas parecen estar alteradas (menor densidad electrónica, indicativo de menor cantidad de proteína). Las imágenes del grupo que recibió alcohol y el pretratamiento de OEA (Figura 21c) muestran cierta dilatación con respecto al grupo control; sin embargo, se puede apreciar más densidad electrónica en las uniones estrechas del grupo alcohol + OEA respecto al grupo de alcohol sin pretratamiento (indicativo de mayor preservación de las proteínas en las TJ). Estos datos podrían interpretarse como que el pretratamiento con OEA tiene un efecto parcial sobre la dilatación, si bien el alcohol induce la apertura de la barrera incluso cuando existe OEA, el pretratamiento con este biolípido estaría ayudando a preservar en cierta medida la pérdida de las uniones estrechas inducida por el CAA. Las imágenes del grupo OEA sin alcohol (Figura 21d) son indistinguibles de las del grupo control.

La Figura 21e muestra una representación de la estructura apical, la unión estrecha, el desmosoma y la microvellosidad y su correlación con la micrografía real. En este estudio no se analizaron las diferencias entre grupos en cuanto a la presencia de microvellosidades, superficie epitelial o la estructura de los desmosomas. Es de destacar que las imágenes presentadas parecen presentar diferencias visuales en las microvellosidades intestinales, pero, en ausencia de un estudio exhaustivo, no puede concluirse que esto sea un efecto del alcohol o que sea debido al proceso técnico de fijación del tejido.

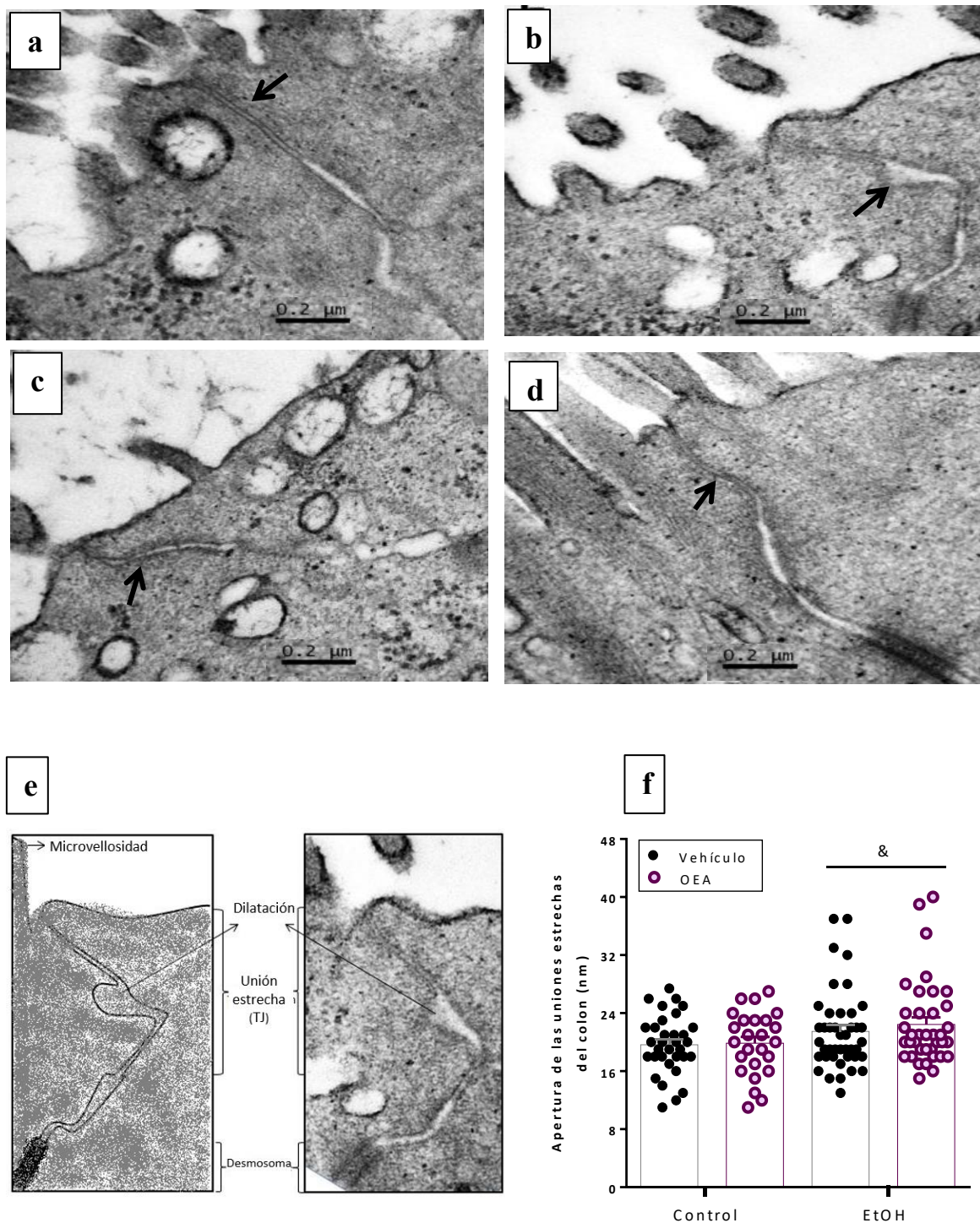


Figura 21. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de las uniones estrechas de las células epiteliales del colon. Las micrografías son representativas de: a) animal control; b) animal que recibió alcohol en atracón; c) animal que recibió alcohol en forma de atracón y el pretratamiento con OEA; d) animal control que fue administrado con OEA; e) representación esquemática de unión estrecha dilatada (derecha: imagen real (80x de aumento); izquierda: representación gráfica); f) cuantificación de la distancia de las uniones estrechas en nm (número de uniones estrechas medidas en diferentes animales del grupo control n=33; grupo alcohol n=42; grupo alcohol+OEA n=37 y grupo OEA n=25. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías: efecto del alcohol: $&p<0,05$. Las flechas indican la ubicación de las uniones estrechas.

3.6 Marcadores apoptóticos en el colon

Los resultados anteriores corresponden a cambios en la vía paracelular de la barrera intestinal. A continuación, en este apartado, estudiamos los cambios en la vía transcelular. Para ello, con el fin de estudiar los efectos del CAA y el papel protector de la OEA sobre la apoptosis en el epitelio del colon, medimos la expresión proteica de diferentes marcadores apoptóticos en el colon (**Figura 22**).

Se observó que el CAA aumentó la expresión de los marcadores de apoptosis Ligando Fas (FasL) y caspasa-9 (Figura 22 a y c, $F_{(1, 19)} = 4,690$, $p < 0,05$; $F_{(1, 20)} = 4,879$, $p < 0,05$, respectivamente) en comparación con el grupo control. Los animales pretratados con OEA y sometidos a CAA presentaron igualmente estos marcadores apoptóticos elevados, ya que no se observó un efecto significativo del pre tratamiento con OEA en los niveles de Fas L ni de caspasa-9 (Figura 22 a y c, $F_{(1, 19)} = 0,06788$, $p > 0,05$, n.s.; $F_{(1, 20)} = 0,7402$, $p > 0,05$, n.s., respectivamente). No hubo interacción entre los factores alcohol y OEA (Figura 22 a y c, $F_{(1, 19)} = 0,3784$, $p > 0,05$, n.s.; $F_{(1, 20)} = 1,406e-005$, $p > 0,05$, n.s., respectivamente).

Sin embargo, al estudiar los niveles de la procaspasa 9 (Figura 22b), la forma inactiva de la caspasa-9, observamos que el alcohol en atracón redujo su expresión ($F_{(1, 19)} = 5,262$, $p < 0,05$) y que la OEA aumentó de forma significativa la expresión de procaspasa 9 tanto en el grupo alcohol+OEA como en el grupo control ($F_{(1, 19)} = 13,76$, $p < 0,05$). El ANOVA de dos vías de los datos representados en la Figura 22b muestra cómo el alcohol tiene un efecto principal sobre la procaspasa-9 (presumiblemente favorece el paso hacia la forma activa caspasa-9) ($F_{(1, 19)} = 5,262$, $p < 0,05$) y la OEA induce el efecto opuesto ($F_{(1, 19)} = 13,76$, $p < 0,05$), aumentando la forma inactiva. No existe interacción entre ambos factores ($F_{(1, 19)} = 0,03521$, $p > 0,05$), porque la OEA produce este efecto tanto en presencia como en ausencia de alcohol, lo que indicaría un papel protector incluso en condiciones fisiológicas.

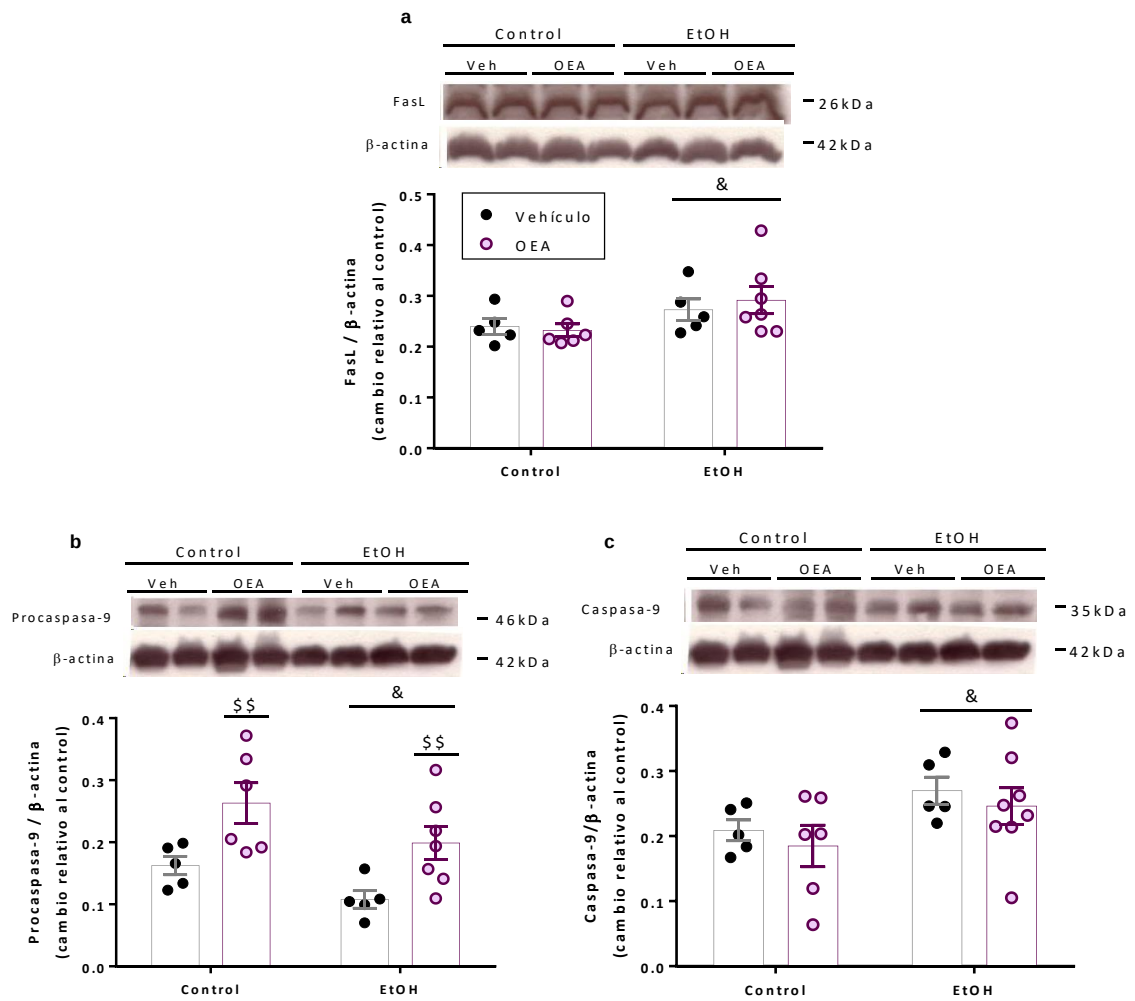


Figura 22. Marcadores apoptóticos en el colon tras el consumo de alcohol en atracón y el pretratamiento con OEA i.p.: a) niveles de proteína de FasL; b) niveles de proteína de procaspasa9; c) niveles de proteína de caspasa-9. Datos presentados como la media $\pm$ EEM (n=5-7). Análisis estadístico: ANOVA de dos vías: efecto del alcohol: $&p<0,05$; efecto de la OEA: $$$p<0,01$.

3.7 Translocación bacteriana a los GLMs

Como se ha comentado en el apartado 3.1, en el estudio piloto se observó que el CAA produjo la translocación de bacterias a otros órganos, mayoritariamente a los GLMs. En este estudio quisimos comprobar, junto con las medidas de inflamación local y expresión de proteínas de uniones estrechas en el colon ya mostradas, si el pretratamiento con OEA era capaz de afectar funcionalmente a la barrera reduciendo dicha translocación.

Como se puede apreciar en la **Figura 23**, no hubo crecimiento bacteriano en los controles, pero sí hubo translocación a los GLMs de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 23a), principalmente de la especie *E. coli* (Figura 23b), en los animales que recibieron alcohol, independientemente de si recibieron pretratamiento con OEA i.p. (T de Student, $p>0,05$, n.s.). El crecimiento de *Enterobacteriaceae*, principalmente de *E. coli*, se detectó en el 90% de los animales tratados con alcohol sin pretratamiento, mientras que esta translocación se observó en el 70% de los animales que recibieron alcohol más el pretratamiento con OEA i.p.

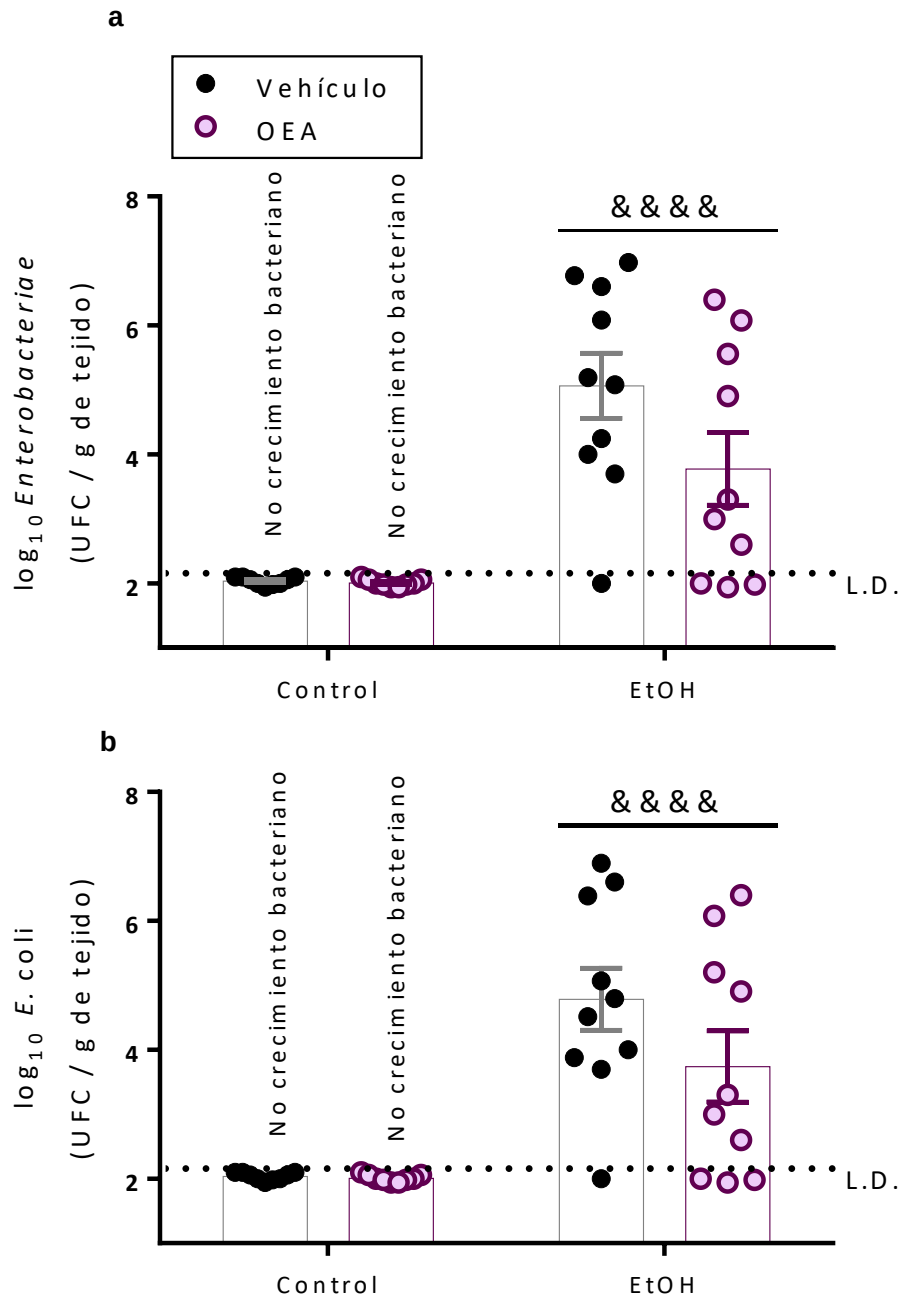


Figura 23. Translocación de *Enterobacteriaceae* (a) y *E. coli* (b) a los ganglios linfáticos mesentéricos tras el consumo de alcohol en atracón y el tratamiento de OEA i.p.: Los puntos representan las unidades formadoras de colonias (UFC). Los animales sin crecimiento bacteriano están representados bajo el límite de detección (L.D.), que es la barra discontinua horizontal. Los datos están corregidos por el peso del tejido y expresados como el logaritmo en base 10 (media $\pm$ EEM, grupos control n=6, grupos alcohol n=10). Bacterias detectadas en los grupos alcohol, pero no en animales control y dependencia entre estas variables (χ^2 15,39; &&&& p<0,0001).

Aunque la idea principal fue investigar el mecanismo de acción de la OEA i.p. siguiendo experimentos previos del grupo, en este estudio se incorporaron también animales para explorar el efecto de la OEA en administración oral. Como puede observarse en la **Figura 24a**, en este caso el CAA indujo la translocación bacteriana de *E. coli* a los GLMs en el 75% de los animales que recibieron alcohol, mientras que solo el 16% de los animales que fueron previamente tratados con OEA oral presentaron translocación bacteriana a los GLMs. La comparación entre los grupos que presentaron translocación bacteriana reveló que la OEA oral fue capaz de reducir de forma significativa la translocación de bacterias en los animales tratados con alcohol (Test de Mann-Whitney, $p<0,05$).

La Figura 24b muestra la comparación entre las distintas vías de administración de OEA (i.p. y oral) y los porcentajes de aumento de los niveles de LPS en plasma de cada grupo con respecto al control como una medida indirecta de translocación bacteriana y sus productos. Los niveles de LPS en los animales tratados con alcohol fue un 57% superior con respecto al control, y en el grupo alcohol+OEA el LPS se redujo al 26% de incremento con respecto a los controles (ver zona superior Figura 24b). A pesar de ello, los análisis estadísticos detectaron un efecto principal del alcohol ($F_{(1,29)}=5,308$; $p<0,05$), pero no de la OEA i.p. ($F_{(1,29)}=0,2001$; $p>0,05$, n.s.). El pretratamiento con OEA mediante la vía oral sólo produjo un aumento de apenas el 4,6% de LPS en plasma con respecto a los controles. Como se observa en la figura 24b, la OEA administrada de forma oral es efectiva a la hora de reducir la translocación de bacterias a los GLMs (Test de Kruskal-Wallis=8,3, $p<0,05$; test *post hoc* de Dunn alcohol vs OEA oral: $p<0,05$). Se observó que existe una dependencia entre la ruta de administración de la OEA y la presencia de bacterias en los GLMs ($\chi^2=4,267$; Df=1; $p<0,05$).

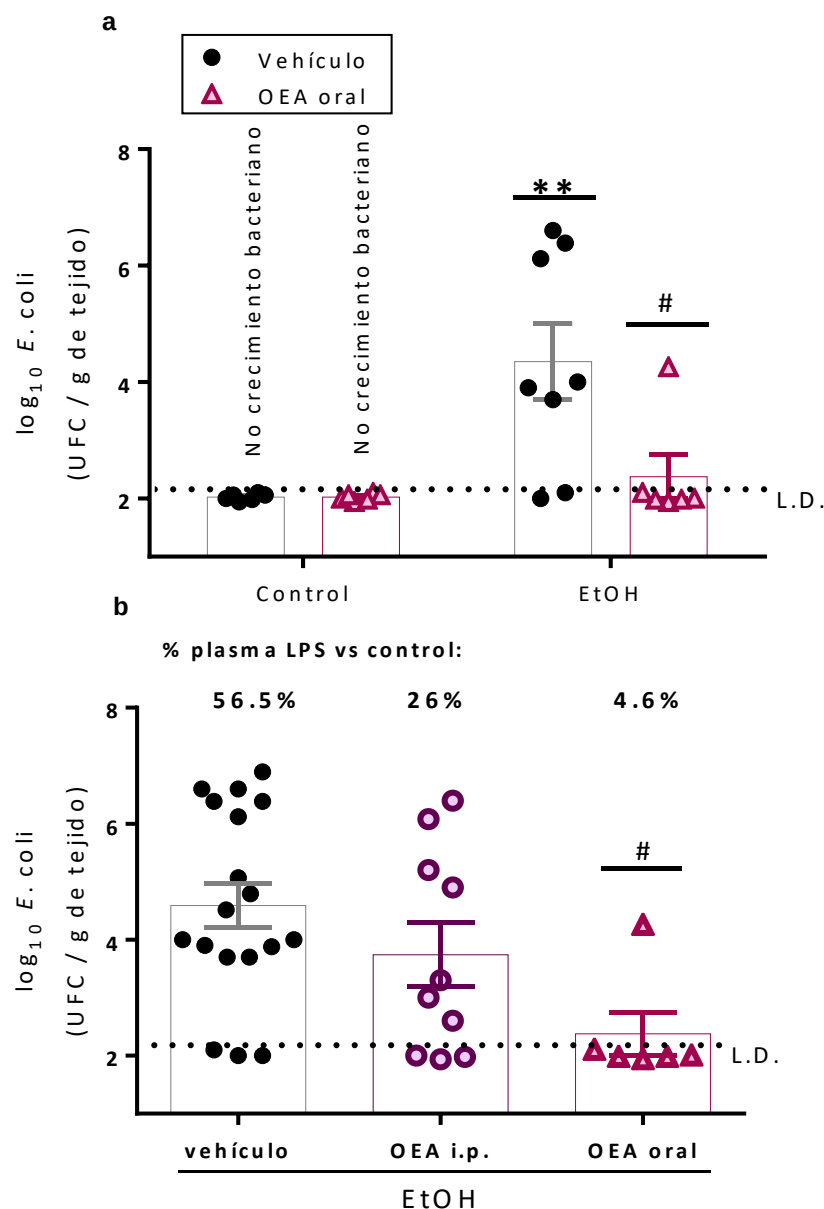


Figura 24. Efectos de la administración de OEA i.p. y oral en la translocación de *E.coli* a los ganglios linfáticos mesentéricos: a) Translocación de *E. coli* en los ganglios linfáticos mesentéricos tras el consumo de alcohol en atracón y el efecto protector de la OEA oral (datos representados como media $\pm$ EEM, n=6-8); b) comparación de las translocación de *E. coli* a los ganglios linfáticos mesentéricos con el pretratamiento de OEA oral e i.p. y los % del incremento de LPS en plasma con respecto al control en el panel superior (datos representados como media $\pm$ EEM; grupo alcohol+vehículo n=18; grupo alcohol+OEA i.p. n=10; grupo alcohol+OEA oral n=6). Los animales sin crecimiento bacteriano están representados bajo el límite de detección (L.D.), que es la barra discontinua horizontal. Los datos están corregidos por el peso del tejido y expresados como el logaritmo en base 10. Diferencias con respecto al grupo control: **p<0,01; diferencias entre el grupo alcohol y alcohol + OEA: #p<0,05. (Mann-Whitney (a); Kruskal-Wallis, test *post hoc* de Dunn (b)).

En el estudio de contingencias, los análisis estadísticos indicaron una dependencia entre la presencia de bacterias en los GLMs y el consumo de alcohol ($\chi^2 = 15,39$, $p < 0,05$ en el grupo de EtOH+OEA i.p.; $\chi^2 = 7,875$, $p < 0,05$, para EtOH+OEA oral). No se detectó una dependencia estadísticamente significativa entre el pretratamiento con OEA ip y la presencia de bacterias en los GLMs en los animales tratados con alcohol ($\chi^2 = 1,250$; $p > 0,05$, n.s.) pero sí en el caso del pretratamiento con OEA oral (Test exacto de Fischer=4,667; g.l. = 1, $p < 0,05$) (Tabla 4).

Los análisis estadísticos revelaron que había una dependencia entre el pretratamiento con OEA oral y la presencia de bacterias en los GLMs (Test exacto de Fischer=4,667; g.l. = 1, $p < 0,05$).

a) Grupos	Animales con presencia de bacterias	Animales con ausencia de bacterias	Dependencia entre EtOH y presencia de bacterias	Dependencia entre OEA i.p. y presencia de bacterias
Control.....	0	9	Si * $p < 0,05$ $\chi^2 = 15,39$, g.l. = 1	No $p > 0,05$, $\chi^2 = 1,250$, g.l. = 1
EtOH.....	9	1		
EtOH+OEA ip....	1	3		
OEA ip.....	0	9		
b) Grupos	Animales con presencia de bacterias	Animales con ausencia de bacterias	Dependencia entre EtOH y presencia de bacterias	Dependencia entre OEA oral y presencia de bacterias
Control.....	0	6	Si * $p < 0,05$ $\chi^2 = 7,875$, g.l. = 1	Si * $p < 0,05$, $\chi^2 = 4,667$, g.l. = 1
EtOH.....	6	2		
EtOH+OEA oral...	1	5		
OEA oral.....	0	6		

Tabla 4. Tabla de contingencias para estudiar la relación de dependencia entre el consumo de alcohol/ el pretratamiento con OEA i.p. u OEA oral y la presencia de bacterias en los ganglios linfáticos mesentéricos. a) Dependencia entre el CAA/ OEA i.p. con la presencia de bacterias en los GLMs; b) Dependencia entre el CAA/OEA oral con la presencia de bacterias en los GLMs. n= número de animales. g.l: grados de libertad.

3.8 Correlaciones entre E.coli y LPS e IgA en plasma

Para entender mejor el significado biológico de estos datos se realizaron correlaciones entre la presencia de *E. coli* en los GLMs y los niveles de LPS. Los resultados mostraron que hay correlación significativa entre la translocación de *E.coli* a GLMs y la presencia de LPS en plasma ($r=0,556$; $p<0,05$).

Es de gran interés señalar que tanto la presencia de *E.coli* en GLMs como los niveles plasmáticos de LPS, correlacionan con los niveles de IgA en plasma ($r=0,551$; $p<0,05$; $r=0,549$; $p<0,05$, respectivamente), lo cual puede indicar que ambas medidas, directa e indirecta, de translocación bacteriana han puesto en marcha ya la activación del sistema inmune adaptativo.

4. ESTUDIO DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

4.1 La barrera hematoencefálica de la corteza frontal

El CAA redujo de forma significativa los niveles de proteína de laminina, un componente de la lámina basal, (**Figura 25a**; efecto del alcohol: $F_{(1,23)}=5,092$; $p<0,05$) y de ocludina, que forma parte de las uniones estrechas (**Figura 25b**; efecto del alcohol $F_{(1,23)}=18,34$; $p<0,05$). Sin embargo, el CAA no alteró los niveles de la proteína ZO-1 (**Figura 25c**; $F_{(1,23)}=0,3721$; $p>0,05$ n.s.).

El pretratamiento con OEA durante el CAA no alteró los niveles de proteína de laminina o de ocludina (**Figura 25a y b**; no efecto de la OEA: $F_{(1,23)}=0,006499$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,23)}=1,982$, $p>0,05$, n.s., respectivamente; y no interacción: $F_{(1,23)}=0,5325$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,23)}=3,872$, $p>0,05$, n.s., respectivamente).

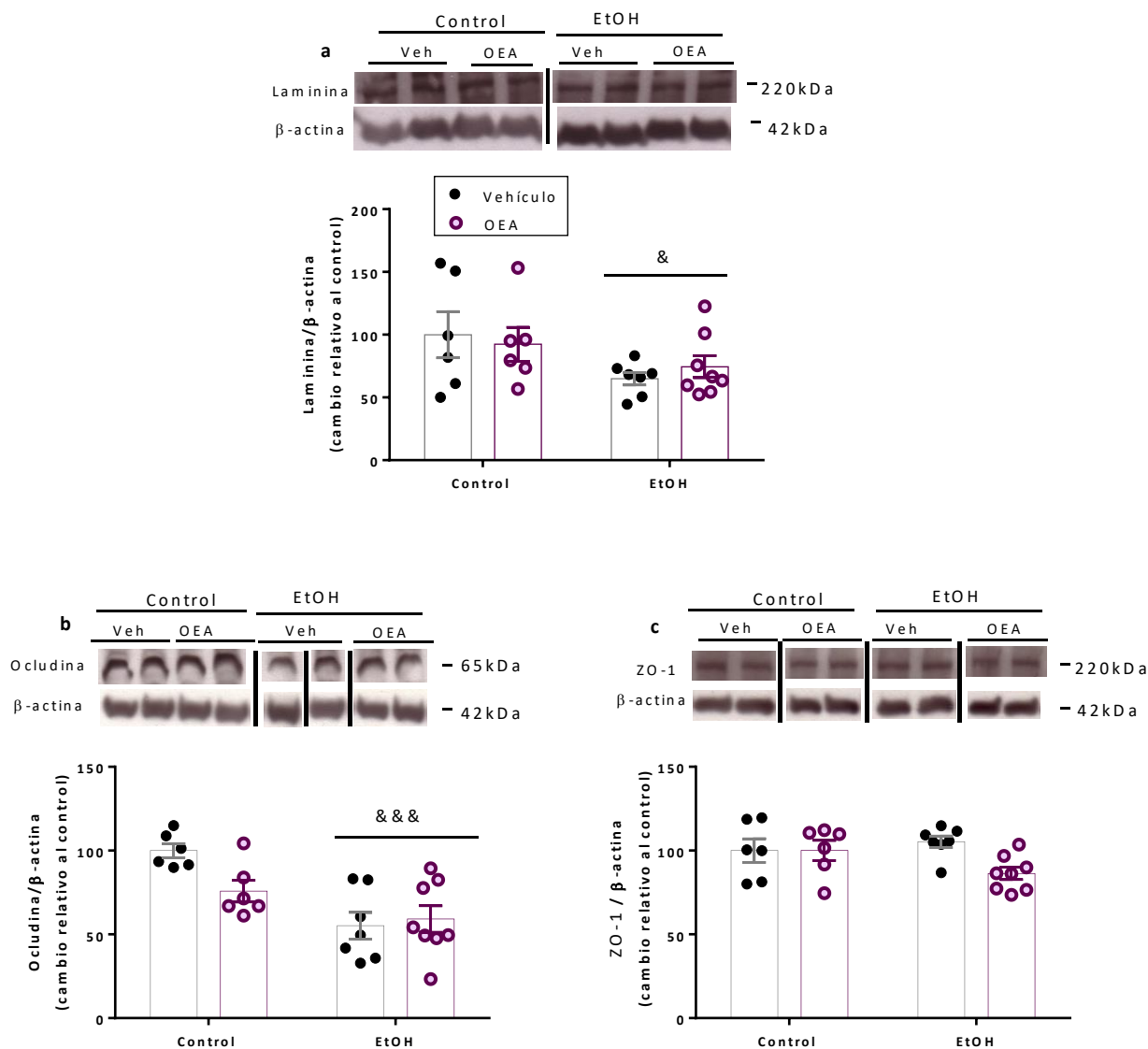


Figura 25. Niveles de proteínas de la BHE en la corteza frontal: a) niveles de laminina; b) niveles de occludina; c) niveles de ZO-1 de la BHE de la corteza frontal. Datos presentados como la media $\pm$ EEM (n=6-8). Efecto del alcohol: & $p < 0,05$; &&& $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías).

4.2 La barrera hematoencefálica del hipocampo

En el hipocampo, el consumo de alcohol no alteró los niveles de laminina, occludina o ZO-1 (**Figura 26a, b, c**; $F_{(1,17)}=0,09565$, $p > 0,05$, n.s.; $F_{(1,16)}=0,1941$, $p > 0,05$, n.s.; $F_{(1,16)}=0,06990$, $p > 0,05$, n.s., respectivamente).

El pretratamiento con OEA no alteró los niveles de dichas proteínas ni en los grupos alcohol ni en los grupos control (Figura 26a, b, c; no efecto de la OEA en laminina, ocludina ni ZO-1: $F_{(1,17)}=0,3670$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,16)}=0,01524$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,16)}=0,6908$, $p>0,05$, n.s.; respectivamente; y no interacción entre OEA y alcohol en laminina, ocludina ni ZO-1: $F_{(1,17)}=0,04906$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,16)}=0,2538$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,16)}=0,5117$, $p>0,05$, n.s.; respectivamente).

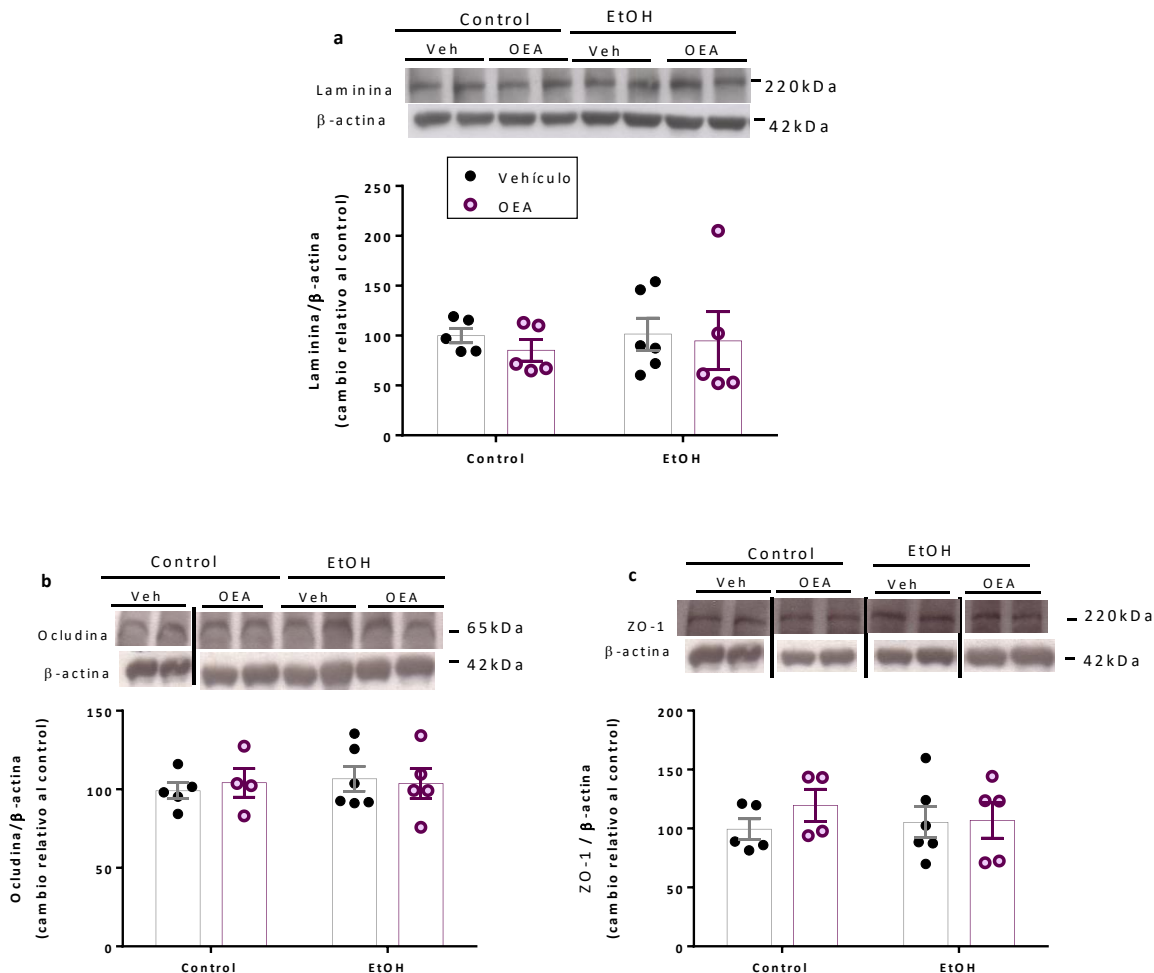


Figura 26. Niveles de proteínas de la BHE en el hipocampo: a) niveles de laminina; b) niveles de ocludina; c) niveles de ZO-1 de la BHE del hipocampo. Datos presentados como la media $\pm$ EEM (n=4-6). Análisis estadístico: ANOVA de dos vías: $p>0,05$ n.s.

4.3 Neuroinflamación en el hipocampo

Los resultados anteriores muestran que el CAA altera los niveles de algunas proteínas que forman la BHE en la corteza frontal, un área cerebral que, de acuerdo con investigaciones previas en nuestro grupo de investigación, presenta elevados niveles de marcadores de neuroinflamación tras un CAA utilizando el mismo modelo que se ha usado en este estudio (Antón *et al.*, 2017). Para continuar estos estudios sobre BHE y neuroinflamación, en esta Tesis Doctoral determinamos, además de la afectación de la BHE, los niveles de marcadores clave de neuroinflamación en el hipocampo tras el CAA, ya que la neuroinflamación en la corteza frontal ha sido descrita con detalle en estudios previos, como se ha comentado.

El CAA no alteró los niveles proteicos de TLR4, MyD88, TNF- α e IL-1 β en el hipocampo, de acuerdo al ANOVA de dos vías (Tabla 5; $F_{(1,16)}=0,6047$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,17)}=0,1318$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,17)}=0,4481$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,16)}=1,1214$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,17)}=0,006256$, $p>0,05$, n.s.; respectivamente). Nótese aquí, no obstante, que los niveles de TNF- α en el grupo alcohol estaban aumentados un 78% con respecto al grupo control ($p<0,005$, test T de Student).

El pretratamiento con OEA no alteró los niveles de proteína de TLR4, MyD88, TNF- α e IL-1 β ni en los grupo control ni en los grupo alcohol (Tabla 5; no efecto de la OEA: $F_{(1,16)}=1,982$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,17)}=0,1151$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,17)}=0,1385$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,16)}=0,2340$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,17)}=1,043$, $p>0,05$, n.s.; respectivamente; y no interacción entre alcohol y OEA: $F_{(1,16)}=0,4436$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,17)}=0,08481$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,17)}=0,2220$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,17)}=0,003129$, $p>0,05$, n.s.; respectivamente en TLR4, MyD88, I κ B α y IL-1 β . Únicamente se halló una interacción entre ambos factores en los niveles de TNF- α : $F_{(1,16)}=5,604$, $p<0,05$, con test *post hoc* no significativo; $p>0,05$, n.s.).

Hipocampo	TLR4	MyD88	I κ B α	TNF- α *	IL-1 β
Control	100,00 ±4,00	100,00 ±8,42	100,00 ±2,81	100,00 ±10,26	100,00 ±15,11
OEA + control	102,62 ±5,56	104,3 ±1,92	94,91 ± 3,34	142,91 ±37,89	88,48 ± 12,16
EtOH + vehículo	100,39 ±1,00	99,50 ± 6,84	101,20 ± 7,75	179,02 ±14,98	100,25 ±6,41
OEA + EtOH	107,71 ±1,34	99,84 ± 8,15	101,80 ± 7,25	114,08 ±14,07	89,92 ± 8,34

Tabla 5. Neuroinflamación en el hipocampo. Niveles de proteína de TLR4, MyD88, I κ B- α , TNF- α e IL-1 β en el hipocampo. Datos presentados como media $\pm$ EEM (n=5-6). TLR4, MyD88 e I κ B α fueron medidos por Western blot y normalizados con β -actina; TNF- α e IL-1 β se midieron mediante kit ELISA. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías y test *post hoc* Bonferroni tras una interacción significativa: $p > 0,05$, n.s. *TNF- α : interacción entre factores ($p < 0,05$).

Por lo tanto, nuestros estudios en conjunto indicarían que el CAA afecta a los niveles de ciertas proteínas de la BHE de la corteza frontal, e induce neuroinflamación. Sin embargo, el hipocampo es una estructura que parece estar más preservada con este protocolo de CAA, ya que no se observaron cambios en los niveles de las proteínas estudiadas de la BHE, ni neuroinflamación en este área y, de existir, sería mucho más leve (sólo afectación de TNF- α) en esta curva temporal. En cualquier caso, el mecanismo de acción de la OEA en su efecto protector de la corteza frontal no parece estar relacionado con alteraciones en la BHE.

5. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO

El CAA puede producir cambios en el comportamiento relacionados con un estado neuroinflamatorio exacerbado (Montesinos *et al.*, 2016; Pascual *et al.*, 2018). Independientemente del consumo de alcohol, tanto las alteraciones en el eje intestino-cerebro como la neuroinflamación se han relacionado con cambios comportamentales (Cryan *et al.*, 2019;

Dantzer *et al.*, 2008). En este estudio investigamos si el protocolo de CAA empleado, que produce neuroinflamación en la corteza frontal y altera el eje intestino-cerebro, se relaciona con cambios comportamentales que puedan ser prevenidos por el tratamiento con OEA.

Así, en este apartado se estudiaron los efectos agudos tras el CAA en el **estado motivacional, ansioso y depresivo**, en un momento en que la neuroinflamación y las alteraciones del eje intestino-cerebro están presentes. Adicionalmente, se estudiaron estas conductas a largo plazo, para ver el estado de recuperación tras el CAA, así como el efecto del pretratamiento con OEA.

5.1 Evaluación del comportamiento motivacional

Con el fin de determinar el estado motivacional en la abstinencia se utilizó el **Test de Preferencia a la Sacarina**, que valora el comportamiento anhedónico. Las propiedades de la OEA en la anhedonia a corto plazo han sido demostradas en condiciones de neuroinflamación tras la inyección sistémica de LPS en estudios previos de nuestro grupo (Sayd *et al.*, 2015). En dicho estudio previo se observó que el pretratamiento con OEA bloquea la neuroinflamación en la corteza frontal y el comportamiento anhedónico 8, 24 y 30 horas después de la inyección de LPS (Sayd *et al.*, 2015). Por ello, en este estudio se muestra sólo el efecto a largo plazo (1 mes) de este biolípido en el comportamiento anhedónico tras el CAA, midiendo los datos acumulados durante 9 horas.

En el presente estudio a largo plazo se observó que el CAA redujo de forma significativa la preferencia a la sacarina incluso 1 mes tras el tratamiento y, en este caso, lo hizo tanto en grupo vehículo como en el tratado con OEA (**Figura 27**, $F_{(1,19)}=8,651$, $p<0,05$). No existe interacción entre OEA y alcohol (Figura 27, $F_{(1,19)}=0,2348$, $p>0,05$) pero se observa un efecto principal de la OEA, que produjo un aumento de la preferencia a la sacarina tanto en animales con CAA como en controles (Figura 27, $F_{(1,19)}=11,16$, $p<0,05$). Estos datos sugieren que la OEA podría ser capaz de

mejorar el estado anímico en condiciones fisiológicas e independientemente del CAA.

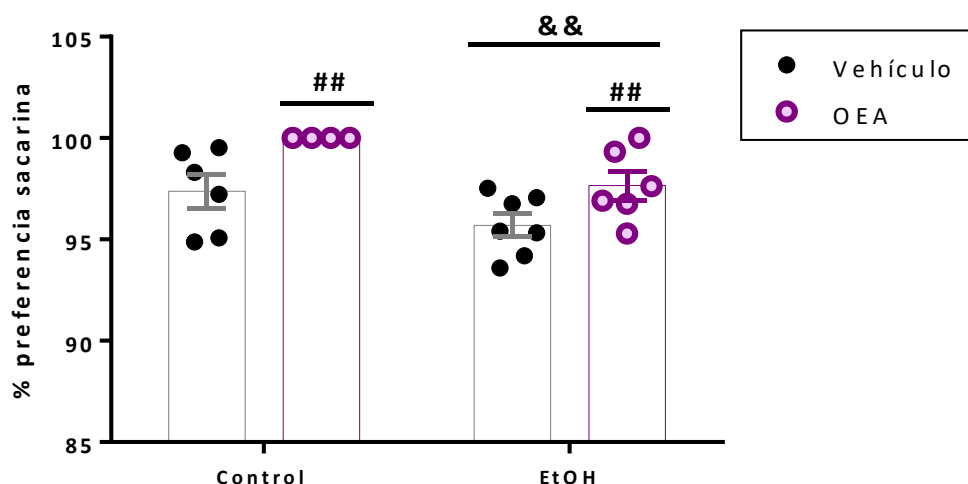


Figura 27. Efectos tras el consumo de alcohol en atracción y el papel del pretratamiento con OEA i.p. en el comportamiento anhedónico a largo plazo: Resultados del test de la preferencia a la sacarina. Datos presentados como la media $\pm$ EEM (n=4-7). Análisis estadístico: ANOVA de dos vías: efecto del alcohol: && p <0,01; efecto de la OEA: ## p <0,01.

5.2 Evaluación del estado ansioso

Para evaluar el efecto de la OEA en el comportamiento ansioso durante la abstinencia de alcohol a corto y largo plazo, se usó el **Test del Laberinto en Cruz Elevado**, 24h y un mes después de la última administración de alcohol, respectivamente (**Figura 28**).

El Test de Kruskal Wallis indicó que los datos del ratio de entradas y tiempo en los brazos abiertos a corto plazo a las 24h están en el límite de una significación estadística (Figura 28 a y b, $H=8,074$, $p=0,05$; $H=7,702$, $p=0,0526$, respectivamente). Se puede apreciar una clara tendencia que

indicaría un efecto ansiogénico del CAA que se prevendría por el pretratamiento con la OEA, pero el test *post hoc* de Dunn no reveló ningún efecto significativo.

A largo plazo, un mes después de la última administración de alcohol, no se observaron estas tendencias y no se encontraron diferencias significativas en el ratio de entradas en brazos abiertos (Figura 28 c, $H=0,4010$; $p>0,05$ n.s.), ni en el ratio de tiempo en los brazos abiertos (Figura 28 d, $F_{(1,22)}=0,4058$; $p>0,05$ n.s.). Esto indicaría que el posible efecto ansiogénico del alcohol se recupera en la abstinencia a largo plazo.

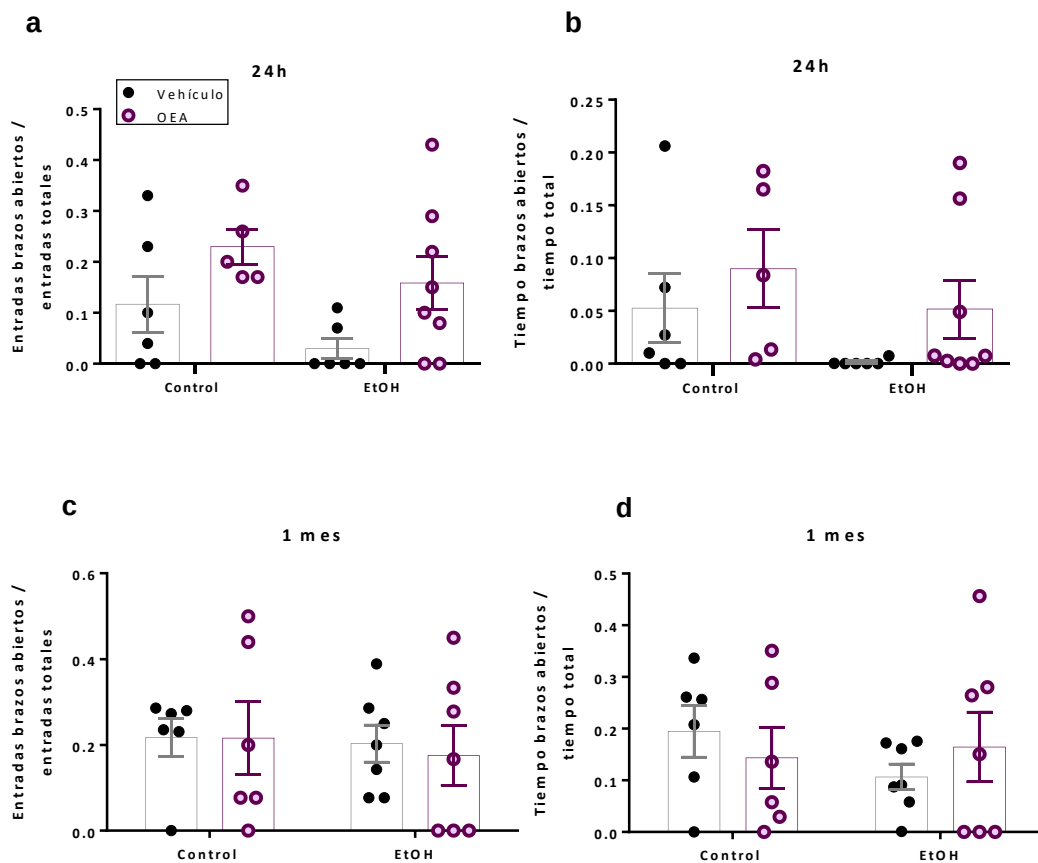


Figura 28. Efectos tras el consumo de alcohol en atracón y el papel del pretratamiento con la OEA i.p. en el comportamiento ansioso a corto y largo plazo: a) número de entradas en brazos abiertos con respecto al total de número de entradas en brazos abiertos y cerrados a corto plazo; b) tiempo en brazos abiertos con respecto al total del tiempo en brazos abiertos y cerrados a corto plazo; c) número de entradas en brazos abiertos con respecto al total de número de entradas en brazos abiertas y cerrados a largo plazo; d) tiempo en brazos abiertos con respecto al total del tiempo en brazos abiertos y cerrados a largo plazo. Datos presentados como la media $\pm$ EEM (n=5-8). Análisis estadístico: Test de Kruskal Wallis, $p\geq 0,05$ n.s. (a,b y c) y ANOVA de dos vías, $p\geq 0,05$ n.s. (d).

5.3 Estudio el comportamiento depresivo

El comportamiento depresivo durante la abstinencia a corto y largo plazo se evaluó mediante el **Test de la Natación Forzada** 48 horas (**Figura 29**) y un mes (**Figura 30**) después de la última administración de alcohol, respectivamente.

En la abstinencia aguda, el CAA redujo de forma significativa el tiempo de escalada, de natación y de latencia de inmovilidad (Figura 29 a, b y d, $F_{(1,21)}=7,33$, $p<0,05$; $F_{(1,21)}=3,28$, $p<0,05$; $F_{(1,21)}=9,53$, $p<0,05$; respectivamente). El CAA incrementó de forma significativa el tiempo de inmovilidad (Figura 29c, $F_{(1,21)}=9,53$, $p<0,05$). El cese del comportamiento de escape del agua (aumento de inmovilidad y tiempo que dedica el animal hasta que desiste en el intento (latencia)) se consideran conductas indicativas de estados anímicos negativos. Es decir, los animales con CAA mostrarían un comportamiento tipo depresivo durante la abstinencia aguda.

La OEA fue capaz de prevenir estos síntomas asociados al comportamiento depresivo, normalizando los parámetros de natación, inmovilidad y latencia de inmovilidad (Figura 29 b, c y d, $F_{(3,21)}=2,93$, $p<0,05$; $F_{(3,21)}=5,77$, $p<0,05$ y $F_{(3,21)}=4,17$, $p<0,05$; respectivamente), aunque no de la escalada (Figura 19 a, $F_{(1,21)}=0,35$, $p>0,05$, n.s.). Se encontró una interacción entre OEA y el alcohol en los parámetros de inmovilidad y latencia (Figura 29 c y d, $F_{(1,21)}=4,43$, $p<0,05$; $F_{(1,21)}=9,53$, $p<0,05$; respectivamente), y el test post hoc reveló un efecto significativo del CAA y de la OEA ($p<0,05$). Esta interacción no se encontró en la escalada ni en la natación (Figura 29 a y b, $F_{(1,21)}=1,08$, $p>0,05$, n.s.; $F_{(1,21)}=2,88$, $p>0,05$, n.s., respectivamente).

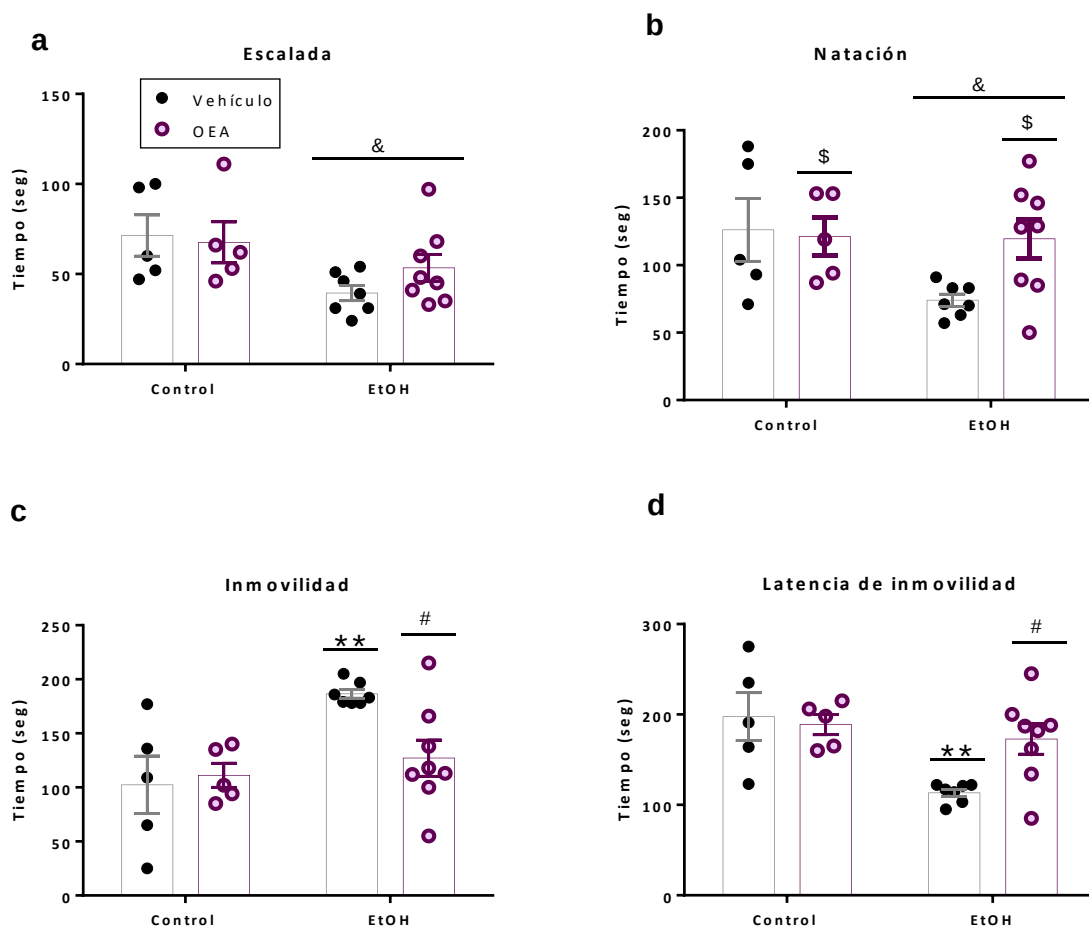


Figura 29. Efectos tras el consumo de alcohol en atracón y el papel protector de la OEA i.p. en el comportamiento depresivo a corto plazo: resultados del test de natación forzada de los parámetros de a) escalada; b) natación; c) inmovilidad; d) latencia de inmovilidad. Datos presentados como la media $\pm$ EEM (n=5-8). Análisis estadístico: ANOVA de dos vías; y test *post hoc* Bonferroni cuando existe interacción: diferencias con respecto al grupo control de la misma condición: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; diferencias entre el grupo alcohol y alcohol + OEA: # $p < 0,05$.

En cuanto al comportamiento depresivo a largo plazo, un mes después de la última administración de alcohol los efectos del CAA a nivel anímico ya no son observables, puesto que no se encontró efecto significativo del CAA en los parámetros escalada, natación, inmovilidad o latencia de inmovilidad (**Figura 30** a, b, c y d, $F_{(1,22)}=1,232$, $p > 0,05$ n.s.; $F_{(1,23)}=0,8233$, $p > 0,05$ n.s.; $F_{(1,23)}=0,3276$, $p > 0,05$ n.s.; $F_{(1,23)}=0,06606$, $p > 0,05$ n.s.; respectivamente). Tampoco se encontró efecto significativo de la OEA

en dichos parámetros (Figura 30 a, b, c y d, $F_{(1,23)}=0,8777$, $p>0,05$ n.s.; $F_{(1,23)}=1,508$, $p>0,05$ n.s.; $F_{(1,22)}=2,193$, $p>0,05$ n.s.; $F_{(1,23)}=0,3821$, $p>0,05$ n.s., respectivamente), ni interacción entre los factores OEA y alcohol (Figura 30 a, b, c y d, $F_{(1,23)}=0,2941$, $p>0,05$ n.s.; $F_{(1,23)}=0,002237$, $p>0,05$ n.s.; $F_{(1,22)}=0,1591$, $p>0,05$ n.s.; $F_{(1,23)}=0,09670$, $p>0,05$ n.s.; respectivamente).

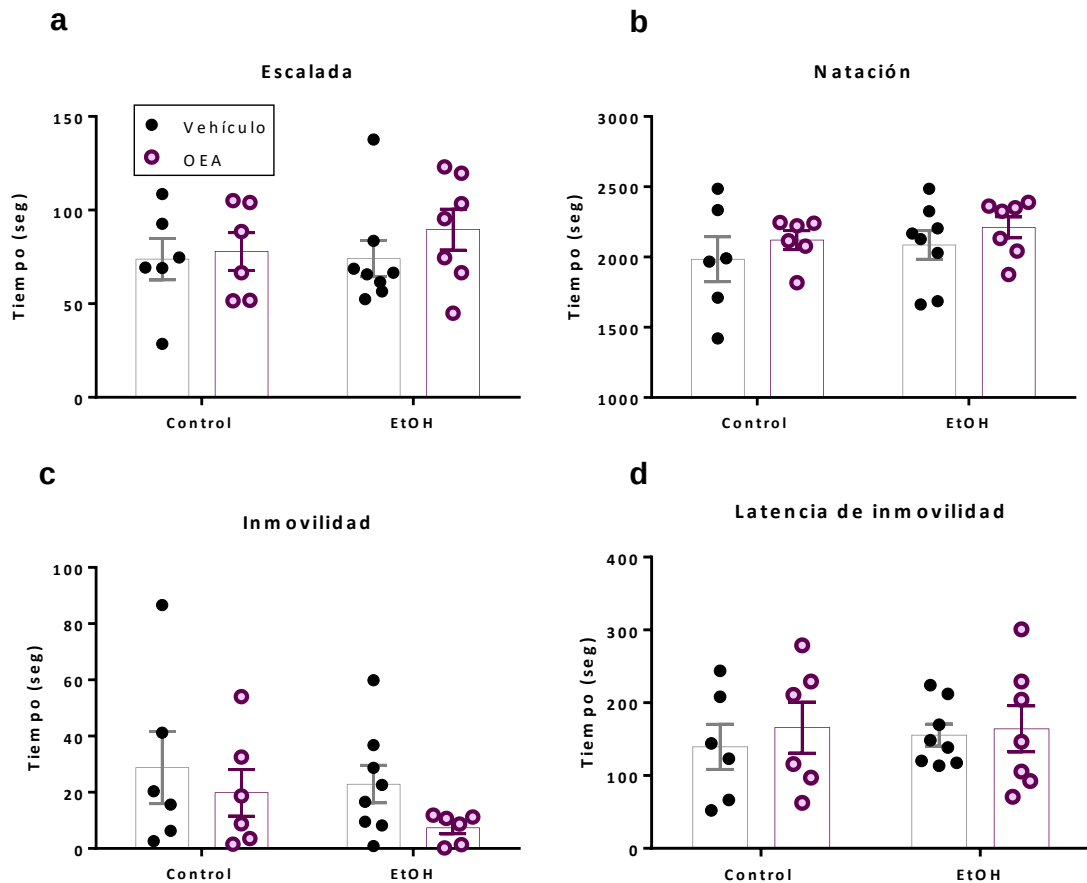


Figura 30. Efectos tras el consumo de alcohol en atracón y el papel del pretratamiento con la OEA i.p. en el comportamiento depresivo a largo plazo: resultados del test de natación forzada de los parámetros de a) escalada; b) natación; c) inmovilidad; d) latencia de inmovilidad. Datos presentados como la media $\pm$ EEM (n=5-8). Análisis estadístico: ANOVA de dos vías: $p>0,05$ n.s.

VII) DISCUSIÓN



A continuación, se discutirán los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral por bloques, para finalmente hacer un apartado de discusión integradora que incluye las limitaciones del estudio y perspectivas futuras.

1. EFECTOS EN LA MICROBIOTA

En relación con los efectos del consumo de alcohol en la microbiota, en esta Tesis Doctoral hemos comprobado que el CAA reduce la diversidad α (riqueza de ASVs) y crea una comunidad claramente distinguible en el análisis de ordenación (diferente diversidad β). En la diversidad β las principales diferencias se dan desde T0 (sin CAA) a T1 (después del último atracón de alcohol) solo en el grupo alcohol. Además, el CAA promueve diferencias en la composición de algunas bacterias en los niveles de género y familia. Particularmente, el CAA disminuye significativamente los niveles de los géneros *Lactobacillus*, *Clostridium* XIVa y b y *Oscillibacter*, y aumenta *Bifidobacterium*, *Clostridium sensu stricto*, *Romboutsia*, *Turicibacter*, *Parabacteroides* y *Enterococcus*.

En cuanto a la diversidad α y β , diferentes estudios han encontrado que el consumo de alcohol disminuye la diversidad α y cambia la diversidad β en ratones usando diferentes modelos: modelo de dieta líquida con alcohol durante 8 semanas (Bull-Otterson *et al.*, 2013), modelo de consumo de 0,8 g/kg/día de alcohol al 4% durante una semana (Lee *et al.*, 2020), modelo de dieta con 5% de alcohol durante 10 días y un *gavage* de 5 g/kg el día 11 (Samuelson *et al.*, 2019); así como en un modelo de rata consumiendo 2-8 g/kg/día de alcohol administrado mediante *gavage* (Mutlu *et al.*, 2009). Sin embargo, en otros estudios no se han observado cambios en estos parámetros, por ejemplo, tras una sola dosis de alcohol de 6 g/kg (Neyrinck *et al.*, 2016). Esto indica la gran complejidad de estos estudios y lo difícil que resulta *a priori* poder extraer conclusiones firmes sobre este estudio.

En el momento de la realización de los experimentos de esta Tesis Doctoral no había estudios concluyentes sobre el efecto del CAA en la microbiota intestinal de ratas. En 2020 se publicó un estudio que analizó el efecto del CAA sobre la microbiota intestinal usando el modelo en ratón de DID con 2h de acceso a alcohol al 20% 5 días a la semana durante 6 semanas. En ese artículo encontraron que el CAA no provocó cambios ni en la diversidad α ni en la β , ni cambios en la composición de la microbiota en los niveles de *phylum* o de familia (Reyes *et al.*, 2020). En el año 2021, se publicó otro artículo que estudió el efecto del CAA en la microbiota (Vetreno *et al.*, 2021). En este artículo usaron un modelo de exposición intermitente al alcohol en la adolescencia (desde P25 a P54) en ratas Wistar macho, que recibieron un *gavage* de alcohol al 20% (5 g/kg) dos días sí, dos días no. En este estudio tampoco encontraron cambios en la diversidad α ni β . Estos resultados contrastan con los datos presentados en esta Tesis, donde el CAA produjo cambios observables en diversidad α y β , en concordancia con otras formas de administración de alcohol, como se ha comentado con anterioridad. Las diferencias respecto a los estudios de CAA mencionados podrían deberse al uso de diferentes especies y/o protocolos de administración de alcohol en atracón. Este campo de estudio de la microbiota intestinal y sus variaciones debidas a diferentes factores es todavía relativamente nuevo, por lo que se necesita más investigación, aislando posibles variables influyentes.

En cuanto a los niveles taxonómicos, previamente se ha reportado que el consumo de alcohol reduce los niveles de *Lactobacillus* usando diferentes patrones de consumo de alcohol en ratón: tras un *gavage* de 6 g/kg de alcohol al 30% (Lamas-Paz *et al.*, 2020); tras la administración intragástrica de soluciones de alcohol entre el 5 y el 35% (Xiao *et al.*, 2018); después de 1 ó 3 semanas de consumo de 39,9 g/kg/día de alcohol (Yan *et al.*, 2011); consumiendo 0,8g/kg/día de alcohol al 4% por una semana (Lee *et al.*, 2020); con dieta líquida con alcohol durante 2 semanas (Hartmann *et al.*, 2013); y en rata consumiendo durante 12 semanas alcohol al 20% en sesiones de acceso voluntario de 22 horas (Kosnicki *et al.*, 2019). Todos estos resultados están en concordancia con los datos obtenidos en nuestro estudio.

De igual manera que en nuestro estudio el CAA elevó los niveles de *Bifidobacterium*, en un estudio reciente en el que se evaluó el efecto del CAA usando un modelo de consumo intermitente de alcohol en ratas Wistar macho se observó también que el alcohol aumentó los niveles de *Bifidobacterium*, lo cual podría representar una respuesta compensatoria para equilibrar la microbiota (Vetreno *et al.*, 2021).

Es interesante comentar que en otras patologías neuropsiquiátricas se han observado cambios similares en la composición de la microbiota, aunque por el momento existe poco consenso en relación con los tipos de cambios que se observan y muchos estudios se han limitado a observaciones correlacionales de alteraciones de la microbiota en poblaciones clínicas. Por ejemplo, una reducción de *Bifidobacterium* y un aumento de *Clostridia* se han observado en el autismo y la reducción de *Bifidobacterium* y de *Lactobacillus* se han observado en depresión (revisado en (Cryan *et al.*, 2019)).

Las consecuencias específicas de los cambios que se han observado en nuestros experimentos son todavía inciertas y su significación biológica no está a nuestro alcance en este momento, ya que estos resultados son descriptivos y no nos permiten sacar conclusiones acerca de las posibles implicaciones para la salud de estas alteraciones en la microbiota.

En cuanto al efecto de la OEA, una de nuestras hipótesis era que parte de los efectos beneficiosos de la OEA en el eje intestino-cerebro en el contexto del CAA podría estar mediada por un efecto protector de la OEA en la microbiota intestinal, previniendo los efectos del CAA sobre la disbiosis. Sin embargo, sorprendentemente, el pretratamiento con OEA en el grupo alcohol, disminuyó la diversidad α (los índices de equidad y de Shannon); y también cambió la diversidad β . Es interesante destacar que los índices de diversidad α de equidad y de Shannon en el grupo alcohol+OEA se asemejan a las poblaciones de animales en T0 (antes de ningún tratamiento) más que cualquier otro grupo. Estos resultados son sorprendentes y carecen de una explicación biológica plausible en estos momentos, ya que se desconoce en gran medida la relevancia de estos

cambios a nivel biológico. Puede que exista algún tipo de interacción farmacocinética entre el alcohol y la OEA que explique este fenómeno, lo cual sería muy interesante de estudiar en un futuro, o incluso, es posible que independientemente del tipo de bacterias presentes, el medio en que las bacterias se encuentran hace que la actividad de éstas varíe, de manera que los metabolitos que generan puedan ser más o menos beneficiosos, algo que también sería de interés para futuros estudios. Puede que también tenga un papel relevante la composición de bacteriófagos (virus que infectan exclusivamente a bacterias), no medidos en este ni en otros muchos estudios de microbiota, que recientemente se ha visto que puede tener efectos en el eje microbiota-intestino-cerebro y en la cognición, y su composición se ve afectada por la dieta (Mayneris-Perxachs *et al.*, 2022). Además, en los grupos tratados con OEA se encontraron mayores niveles de los *phyla* Proteobacteria (géneros *Escherichia/Shigella* y *Pseudomonas*) y Bacteroidetes (género *Bacteroides*).

En cambio, el efecto de la OEA en condiciones fisiológicas (sin CAA) fue muy diferente. En este caso, la OEA no cambió la diversidad α , y sólo cambió de forma leve la diversidad β . A nivel de la composición de la microbiota, la OEA aumentó el género *Bacteroides* y disminuyó el género *Lactobacillus*, entre otros. Estos últimos cambios están en consonancia con los obtenidos en un estudio anterior de los equipos investigadores con los que se llevó a cabo esta colaboración. En dicho estudio se administraron 10 mg/kg de OEA i.p. durante 11 días en ratones sanos y vieron que la OEA incrementó la división Bacteroidetes (*Bacteroides*) y disminuyó Firmicutes (*Lactobacillus*) y cambió la diversidad β ; sin embargo, la OEA no cambió la diversidad α (Di Paola *et al.*, 2018). Como se comenta en la discusión de este artículo, estos resultados sugieren que la OEA promueve un cambio de la microbiota hacia un fenotipo “delgado”, mimetizando los efectos de una dieta baja en grasas y alta en fibra. Es decir, en condiciones fisiológicas (en ausencia de alcohol), sí se observó un efecto de la OEA que puede considerarse beneficioso o saludable.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la OEA puede mejorar el balance de la microbiota intestinal en condiciones fisiológicas, pero no bajo los efectos del CAA. Aunque estos resultados fueron inesperados,

también parecen indicar que los efectos protectores de la OEA en el contexto del CAA no están mediados por un efecto directo en la composición de la microbiota, sino mediante la reducción de la inflamación del colon y del aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal, o mediante la regulación del sistema inmune, acciones antioxidantes o una combinación de estos factores (revisado en (Orio *et al.*, 2019; Rodriguez-Gonzalez & Orio, 2020)), como se verá en esta discusión más adelante.

En esta Tesis también observamos cómo la ruta de administración de la OEA (i.p. vs oral) tiene diferentes efectos sobre la microbiota intestinal. Los resultados indican que la OEA i.p. y oral cambiaron de forma diferente la estructura de la comunidad de la microbiota con respecto al grupo vehículo + alcohol; y que la OEA oral, pero no la i.p., reduce de forma significativa la riqueza de la microbiota en comparación con el grupo vehículo + alcohol y en comparación con T0. En esta Tesis Doctoral también se han visto efectos diferentes en la OEA i.p. y oral en la prevención del paso de bacterias y LPS a otros órganos y al plasma a consecuencia del CAA, siendo la OEA oral más efectiva (ver apartado 2 de la discusión). La reducción de la riqueza en la microbiota no se considera por el momento un efecto beneficioso, pero sí la capacidad de prevenir el paso de bacterias a órganos internos y de LPS a sangre. Este último efecto se discutirá en el siguiente apartado.

Como se ha comentado anteriormente, se desconocen si los cambios observados en la microbiota en estos experimentos tienen relevancia biológica. Sería deseable poder correlacionarlos con cambios comportamentales o con marcadores de inflamación, y por tanto se necesita seguir investigando para ver la implicación de estas alteraciones en el contexto del CAA.

Un punto interesante sería conocer si los cambios en la microbiota son duraderos en el tiempo, ya que es algo que tampoco se conoce. En este estudio recogimos las heces a los 15 días y al mes después de la última administración de alcohol para estudiar si los cambios a consecuencia del CAA en la microbiota son duraderos, pero, por el momento, y debido a

diversas limitaciones relacionadas con la estancia de investigación, estas muestras no han sido procesadas ni analizadas. Con relación a este aspecto sobre la duración de los cambios en la microbiota, se ha publicado recientemente un artículo en el que analizaron la microbiota intestinal de personas con TUA en abstinencia temprana y vieron que la microbiota cambiaba significativamente desde el día 1 al día 5 y desde el día 1 a la semana 3 de abstinencia (Ames *et al.*, 2020). También, en (Vetreno *et al.*, 2021) encontraron que, mientras que algunas bacterias que habían sido modificadas por el CAA volvieron a los niveles del control tras la abstinencia desde P54 a P95, la reducción de *CF231* (Bacteroidetes) y de *Dehalobacterium* (Firmicutes) permanecieron alteradas en el período adulto. Esto sugiere que algunos efectos del CAA en la microbiota podrían ser más duraderos que otros.

En conclusión, estos experimentos muestran los cambios cualitativos originados por el CAA y el pretratamiento con OEA a nivel de la microbiota intestinal. El efecto de la OEA fue diferente en condiciones de presencia o ausencia de alcohol y con ambas vías de administración. Este estudio es meramente descriptivo y se desconoce la perdurabilidad en el tiempo y su posible implicación biológica en el CAA.

2. EFECTOS EN LA BARRERA INTESTINAL

Con respecto a los estudios de la inflamación colónica, en resumen, en esta Tesis Doctoral se ha comprobado que el CAA produce inflamación local y altera tanto la vía paracelular, modificando las TJ del colon, como la vía transcelular, por aumento de la apoptosis del epitelio intestinal, alterando así la estructura y funcionalidad de la barrera intestinal y permitiendo el paso de productos bacterianos como el LPS al plasma, así como el paso de bacterias a los GLMs y bazo. El pretratamiento con OEA i.p. previene la inflamación local colónica y la activación inmune y, de forma parcial, previene la alteración de las TJ que restringen el paso de la vía paracelular. Así, la OEA reduce el paso de LPS a plasma. Respecto a la reducción de la translocación bacteriana a GLMs, se observó el efecto

significativo del pretratamiento con OEA por la vía oral, que además reduce de forma más drástica los niveles de LPS en plasma tras el CAA. En cuanto a la vía paracelular, la OEA no parece prevenir la apoptosis inducida por el CAA en el momento de la toma de muestras, aunque podría estar actuando a nivel de precursores de caspasas, como se comenta más adelante.

Como se ha visto en la introducción, diferentes estudios han demostrado que el consumo de alcohol (usando otros modelos) altera las TJ haciendo más permeable la barrera intestinal. Aunque los mecanismos exactos por los cuales se produce este efecto no se conocen en profundidad, se ha visto que el alcohol a dosis bajas no citotóxicas ($\leq 10\%$) produce la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, modulando así los filamentos de actina y miosina; y separando la proteína ZO-1 de la unión estrecha, lo cual desorganiza la TJ y aumenta la permeabilidad de la barrera (Ma *et al.*, 1999). A dosis moderadas de alcohol usando células Caco-2, una línea celular humana de epitelio intestinal, se ha visto que la reorganización del citoesqueleto de actina y la alteración de TJ y AJ puede deberse a la activación de Rho/ROCK, que fosforilan la miosina y producen la redistribución de ZO-1 y de las proteínas que forman las AJ (Elamin *et al.*, 2014a). Usando biopsias de humanos consumidores de 20 gramos de alcohol mediante administración intraduodenal se vio que la permeabilidad del intestino delgado y grueso había aumentado, pudiendo ser la proteína quinasa activada por mitógenos la responsable de la fosforilación de la miosina, produciendo la redistribución de ZO-1 y ocludina (Elamin *et al.*, 2014b). Además, el alcohol también puede producir la pérdida de integridad de las TJ mediante la hiperacetilación de microtúbulos (Elamin *et al.*, 2012). Otros estudios han demostrado que la disminución de la proteína ZO-1 puede ser debida a la sobreexpresión de microRNA-22 inducido por el alcohol (Tang *et al.*, 2008).

La inflamación que produce el alcohol en el intestino también daña las TJ. La activación de NF- κ B por el alcohol da lugar a inestabilidad en el citoesqueleto de actina y daña la integridad de la barrera intestinal (Banan *et al.*, 2007). En este sentido, la citoquina proinflamatoria TNF- α contribuye a la alteración de las TJ (Chen *et al.*, 2015). Además, el estrés nitrosativo derivado de la activación de iNOS también afecta al citoesqueleto, ya que

los radicales libres que se generan dañan los microtúbulos alterando la integridad del epitelio intestinal (Banan *et al.*, 2000). En un estudio reciente en el que usaron un modelo de CAA (3 dosis orales de alcohol (6 g/kg/dosis a intervalos de 12h) vieron que, tras el consumo de alcohol, las proteínas de las TJ y AJ del intestino delgado eran nitradas por los radicales libres que produce la activación de iNOS y después ubiquitinadas, lo cual inducía su degradación proteosomal. Este estudio demostró por primera vez que la nitración de las proteínas de las TJ y AJ, junto con la apoptosis de enterocitos, contribuye a la permeabilidad intestinal y a la endotoxemia producida por el consumo de alcohol (Cho *et al.*, 2018). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la fuerte inflamación generada por el CAA en el colon podría ser la principal causa de la apertura de las TJ, contribuyendo a la translocación bacteriana.

En esta Tesis Doctoral hemos visto que el CAA induce inflamación (aumento de TLR4 y liberación de citoquinas proinflamatorias) en el colon. La fuente de esa inflamación podría ser la administración de alcohol, así como la presencia de LPS en plasma, ya que ambos son agonistas del receptor TLR4. Estudios recientes sugieren que concentraciones relevantes de LPS causan un aumento de la permeabilidad del colon, mediada por el aumento de la quinasa de la cadena ligera de la miosina en un mecanismo que depende de la vía de señalización de TLR4/MyD88 (Nighot *et al.*, 2017). Diversos estudios han demostrado que el consumo de alcohol tanto a largo (Tamai *et al.*, 2000) como a corto plazo (Tamai *et al.*, 2002) aumentan la absorción del LPS en el intestino delgado. Nuestro grupo de investigación ya vio que el CAA aumenta el LPS en plasma (Antón *et al.*, 2017), y otros grupos también lo han observado tras CAA (Cho *et al.*, 2018).

En cuanto a los efectos protectores de la OEA en el contexto del CAA, éstos podrían estar muy relacionados con su fuerte acción antiinflamatoria en el intestino. Los efectos antiinflamatorios de la OEA i.p. frente al CAA ya habían sido descritos anteriormente tanto en sangre como en la corteza frontal en rata por nuestro grupo de investigación (Antón *et al.*, 2017). Los resultados previos de nuestro grupo mostraron que la OEA i.p. previno el aumento de TLR4 y la producción de citoquinas proinflamatorias y estrés nitrosativo/oxidativo en la corteza frontal, así como el aumento de

citoquinas plasmáticas inducido por el alcohol, usando el mismo modelo de CAA que en esta Tesis (Antón *et al.*, 2017) y tras una inyección de LPS (Sayd *et al.*, 2015). En esta Tesis Doctoral hemos visto que la OEA administrada i.p. tiene un fuerte papel antiinflamatorio también en el colon, previniendo el aumento de TLR4, TNF- α , iNOS y nitritos inducido por el CAA. Este podría ser uno de los factores que pueden ayudar a proteger la barrera intestinal, ya que como hemos visto anteriormente, la inflamación compromete la integridad de la barrera intestinal (Du *et al.*, 2016).

De hecho, los resultados de esta Tesis Doctoral también muestran que la OEA i.p. es capaz de prevenir parcialmente la reducción de ocludina y claudina-3 en colon inducida por el CAA. Además, la OEA aumentó la expresión de ZO-1, claudina-1 y claudina-4 tanto en el grupo de CAA como en el grupo control. Este efecto de la OEA en condiciones fisiológicas de mejora de la barrera intestinal es muy interesante y se ha reportado previamente en modelos *in vitro* (Karwad *et al.*, 2017).

Un componente importante de la barrera intestinal son las inmunoglobulinas. La IgM es el primer anticuerpo que se libera durante la respuesta humoral, que es clave para los procesos inflamatorios y la eliminación de bacterias, y favorece la diversidad bacteriana en condiciones fisiológicas. En ratón casi no se encuentran células plasmáticas secretoras de IgM en la mucosa intestinal, sino que se encuentran en el bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. Se cree que las IgA e IgM podrían tener funciones redundantes, pero la IgM se une a un mayor espectro de bacterias mientras que IgA se une a un conjunto más específico de comensales (revisado en (Chen *et al.*, 2020; Michaud *et al.*, 2020)).

La activación de TLR4 promueve la liberación de IgM (Michaud *et al.*, 2020). Sin embargo, en este estudio el CAA disminuyó los niveles de IgM en plasma y en colon. Estos resultados son más inesperados, aunque podrían indicar que esta inmunoglobulina no se ve afectada dentro de la curva temporal tras el CAA elegida en este estudio; sin embargo, también es importante puntualizar que en humanos que abusan del alcohol no se han visto cambios en los niveles plasmáticos de IgM (Kazbariene *et al.*, 2007).

Por otro lado, la inmunoglobulina más estudiada es la IgA, que se puede encontrar en la mucosa intestinal y en el plasma, y es secretada por las células B plasmáticas que reciben estímulos de las bacterias intestinales. A su vez, la IgA regula la composición, el crecimiento, la invasividad y las funciones inmunometabólicas de la microbiota, mediante la regulación de la transcripción de los genes de las bacterias. La IgA neutraliza toxinas y virus, bloquea la excesiva adherencia de bacterias al epitelio intestinal y reduce la translocación bacteriana. Además, IgA reconoce bacterias, principalmente comensales penetrantes que colonizan el epitelio intestinal, como *E. coli*. Los linfocitos T reguladores activados por IgA ayudan a la expansión de las bacterias beneficiosas Firmicutes mientras que reducen la cantidad de Proteobacterias, potencialmente dañinas (Macpherson *et al.*, 2018).

En esta Tesis hemos visto que el CAA da lugar al aumento de IgA en plasma que correlaciona con la translocación bacteriana y con los niveles de LPS en plasma, lo que indicaría que, en el momento de la toma de muestras, el CAA está ejerciendo una fuerte activación del sistema inmune adquirido. De igual manera, el consumo elevado de alcohol se ha asociado con elevados niveles de IgA en plasma en humanos (Gonzalez-Quintela *et al.*, 2008). Aunque otros estudios no han encontrado cambios (Kazbariene *et al.*, 2007). También hemos comprobado que el CAA aumenta la IgA en intestino, y este efecto está completamente prevenido por el pretratamiento con OEA i.p. Esto sugiere que la OEA tiene un importantísimo papel modulador del sistema inmune, ya que bloquea tanto la inmunidad innata (TLR4) como la adaptativa (IgA) en el intestino.

En cualquier caso, cuando se produce una sobreproducción de mediadores locales inflamatorios, se puede comprometer la barrera intestinal, dando lugar a la migración de componentes inmunes al torrente sanguíneo (Keita & Soderholm, 2010). Por tanto, la presencia de IgA e IgM en plasma se puede considerar un marcador de inflamación periférica.

Probablemente como consecuencia de la inflamación colónica y de la alteración de la barrera intestinal, en este estudio también hemos visto que el CAA da lugar al paso de bacterias a otros órganos como los GLMs. Este efecto ha sido previamente observado, por ejemplo con un modelo de consumo continuo de alcohol de hasta 30,9 g/kg/día durante 21 días (Yan *et al.*, 2011) y tras 28 días con dieta líquida con alcohol al 5% (Souza *et al.*, 2003). Desconocemos si la alteración que observamos en las TJ es suficiente para que se transloquen las bacterias. Por ejemplo, *E. coli* tiene un tamaño promedio de 0,4 x 1 µm, mientras que la distancia máxima que pudimos medir entre célula y célula en el grupo alcohol fue de 51 nm. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las micrografías se tomaron en un momento puntual, y siempre después de que la translocación bacteriana hubiera tenido lugar, por lo que desconocemos si ha podido existir mayor apertura en otro momento del CAA y/o cierta regeneración de la barrera.

La capacidad para translocarse parece depender de la respuesta inflamatoria que producen las bacterias. Por ejemplo, las cepas de *E. coli* de sujetos sanos no alteran las TJ, pero las cepas de *E. coli* presentes en sujetos con colitis ulcerosa, que producen α -hemolisina, pueden causar una pérdida de la integridad de las TJ, que contribuye a la patogénesis de la enfermedad (Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2016). En este sentido, el ambiente alrededor de las bacterias puede modificar su actividad y la secreción de metabolitos por parte de éstas. Por esto mismo, y por la falta de información acerca de cómo los cambios en la microbiota afectan a la homeostasis, los resultados del estudio del efecto del CAA en la microbiota (apartado 1) no aporta información acerca de cómo actúan las bacterias en nuestro modelo. Podría haber ocurrido que no hubiésemos encontrado cambios en la microbiota entre los diferentes grupos y que existiesen aún así cambios biológicos importantes.

Como se ha demostrado, el CAA parece tener una acción deletérea sobre la vía paracelular del intestino, y la OEA previene al menos parcialmente este efecto. Sin embargo, hay que tener en cuenta que también la apoptosis puede jugar un papel muy importante en la translocación de las bacterias a través de la barrera intestinal mediante la vía transcelular. En este sentido, vimos que el CAA puede aumentar los

marcadores apoptóticos FasL y caspasa-9 en el colon. Además, obtuvimos unos resultados interesantes con respecto a procaspasa-9, la forma inactiva de la caspasa-9. Observamos que el CAA redujo su expresión (presumiblemente favorece el paso hacia la forma activa caspasa-9) y la OEA aumentó de forma significativa la expresión de procaspasa 9 tanto en el grupo alcohol+OEA como en el grupo control. Estos resultados son muy interesantes porque podrían estar indicando que la OEA podría interferir en la conversión de procaspasa a caspasa-9, la forma activa, en una forma de inhibición de la vía apoptótica. En la curva temporal en que se midieron estos parámetros (2-5h tras el CAA) el posible efecto de la OEA sobre la disminución de caspasa-9 pudiera no ser todavía apreciable. En cuanto a caspasa-9 y FasL, el pretratamiento con OEA i.p. no previno el aumento de estos marcadores apoptóticos, lo cual podría explicar que la OEA i.p. no evitara el paso de bacterias por esta vía a los GLMs, aunque sí reduce los niveles de LPS plasmáticos. Sin embargo, ambos efectos sí que fueron prevenidos por la administración de OEA oral.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral era estudiar los mecanismos de acción del pretratamiento con OEA i.p. sobre el CAA, ya que eran conocidas sus acciones protectoras en neuroinflamación y ciertas conductas. En estos estudios no se han investigado los mecanismos de acción de la administración oral de la OEA, ya que esta ruta solamente se utilizó de forma exploratoria en los estudios de microbiota e intestino por su posible efecto diferencial en el tracto digestivo. Faltan, por tanto, datos comparativos en todos los estudios de esta Tesis para poder extraer conclusiones sólidas respecto a diferencias en las vías de administración de este compuesto. No obstante, nuestros datos sugieren que el efecto de la OEA en el lado apical de las células que forman la barrera intestinal (ruta oral) podría ser más fuerte que cuando la OEA ejerce su acción por el lado basal de las células (ruta i.p.) (ver esquema en imagen 31).

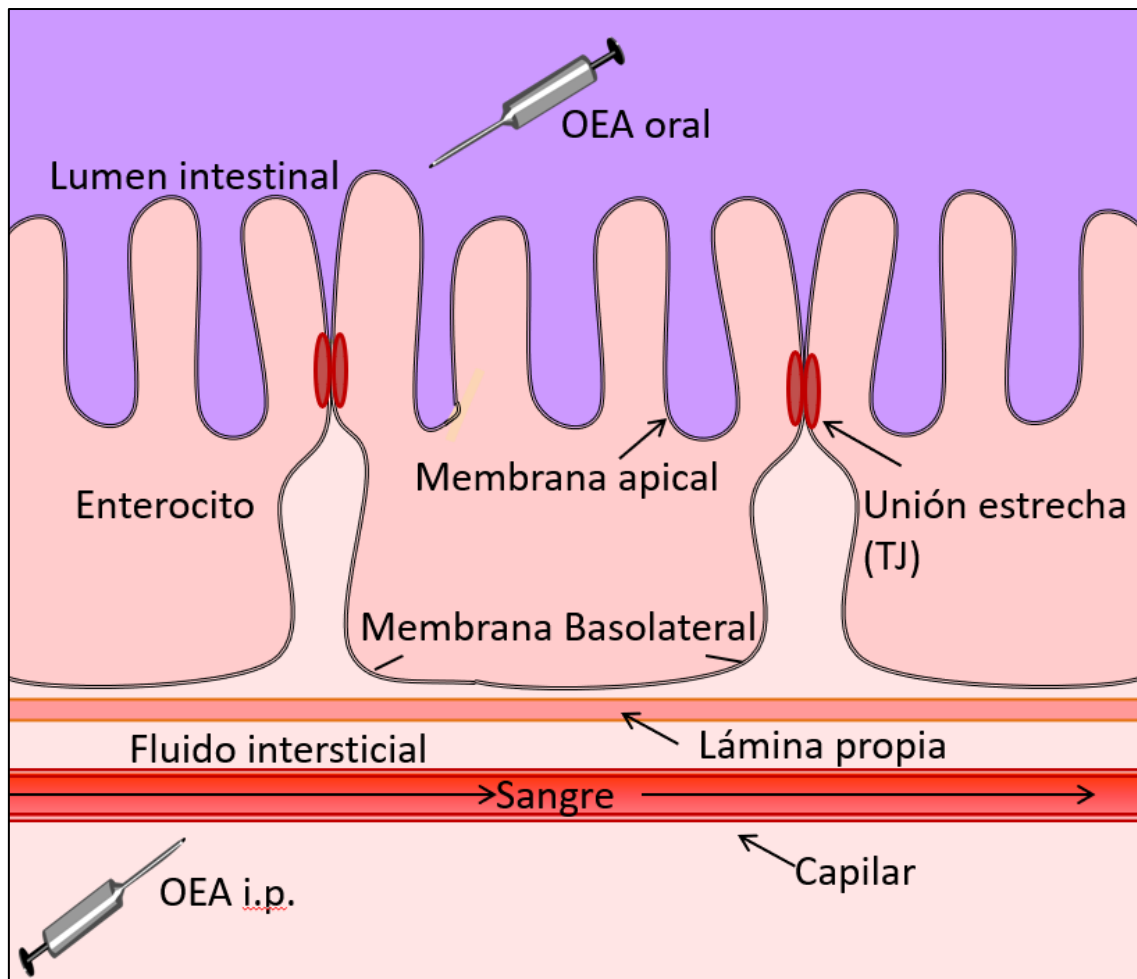


Imagen 31: Representación esquemática de las diferentes vías de administración de oleoiletanolamida (OEA). La OEA administrada intraperitonealmente (i.p.) correspondería al lado basal de las células que forman la barrera intestinal, mientras que la OEA oral, correspondería con el lado apical.

En relación con las vías de administración de la OEA, en un estudio reciente que utiliza la línea celular Caco-2 vieron efectos opuestos de la OEA en la permeabilidad en función de la localización de su administración: la OEA administrada en la lado apical de la monocapa de células aumenta la resistencia transepitelial (indicativo de disminución de la permeabilidad), sin embargo, la OEA administrada por el lado basolateral disminuye esta resistencia, lo que sugiere que aumenta la permeabilidad intestinal (Karwad *et al.*, 2017). En este artículo explican que estos efectos opuestos de la OEA se podrían deber a que está mediado por diferentes receptores (TRPV1 vs PPAR- α , respectivamente). En nuestros estudios, como se ha comentado anteriormente, no se ha investigado en profundidad a qué se deben los

diferentes efectos de las distintas vías de administración de la OEA, tanto en translocación bacteriana como en la diversidad bacteriana y, por lo tanto, esta es un línea de investigación que todavía puede seguir siendo desarrollada en el futuro.

Futuras investigaciones podrían ayudar a dilucidar si las diferencias en los efectos protectores de la OEA oral e i.p. observados en nuestros estudios pudieran ser debidas, por ejemplo, a un mayor efecto de la vía oral previniendo las alteraciones de las TJ, o una mayor efecto protector de la OEA oral frente la apoptosis del epitelio intestinal inducida por el CAA. En cualquier caso, el pretratamiento con la OEA, independientemente de su ruta de administración, presenta un efecto beneficioso en la estructura y/o función de la barrera intestinal alterada por el CAA.

3. EFECTOS EN LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Con relación a la otra barrera biológica estudiada en esta Tesis Doctoral, la BHE, hemos visto que el CAA promueve la disminución de la laminina, que es un componente de la lámina basal, así como de la proteína ocludina (aunque no de ZO-1) en la corteza frontal que forma las uniones estrechas, indicativo de posibles alteraciones en la BHE de la rata en esta estructura. Estas observaciones podrían tener una gran relación con resultados previos de nuestro laboratorio que han demostrado que el CAA induce neuroinflamación en la corteza frontal de la rata (Antón *et al.*, 2017). Una posible debilitación de la BHE podría facilitar el daño que el CAA provoca en la corteza frontal. De acuerdo con esta teoría, según los resultados que se han obtenido en esta Tesis, el CAA no altera los niveles de proteínas de la BHE en el hipocampo y tampoco induce neuroinflamación evidente en este área en la curva temporal estudiada tras el CAA, más allá del aparente aumento de TNF- α . No podemos descartar que el hipocampo se vea alterado a otros tiempos tras el CAA o con otros protocolos de administración de alcohol, ya que se ha visto que es una estructura afectada por el alcohol (Zhao *et al.*, 2013). No obstante, estos resultados podrían sugerir que la corteza frontal podría ser más vulnerable

a los efectos del CAA, al menos con el modelo utilizado en este experimento.

Las uniones estrechas tienen un papel esencial en la formación y mantenimiento de la función de la BHE, confiriendo integridad estructural y baja permeabilidad a la barrera (Romero *et al.*, 2003). Se ha visto que el consumo crónico de alcohol altera la BHE disminuyendo los niveles de las proteínas que forman las uniones estrechas, lo cual hace que aumente su permeabilidad (Muneer *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta la fecha se han publicado pocos estudios que hayan analizado los efectos del CAA en la BHE.

Por un lado, un grupo observó en ratones que el CAA, usando un modelo de inyección i.p. de alcohol al 20%, aumentó el paso del colorante *Evans Blue* desde la periferia hasta el parénquima cerebral con respecto a los controles (Jimenez *et al.*, 2018). Por otro lado, Rubio-Araiz y colaboradores usaron un modelo de DID en ratones y encontraron que éstos tenían menos laminina y mayor extravasación de IgG en el hipocampo 24 horas después de la última administración de alcohol. También encontraron que los ratones que habían consumido alcohol en atracón tenían niveles más altos de MyD88 en hipocampo, lo que podría estar parcialmente de acuerdo con nuestros resultados que aparentemente muestran mayores niveles de TNF- α en ese mismo área cerebral. Además, vieron que la corteza frontal de cerebros *post mortem* de personas adictas al alcohol tenían menos niveles de claudina-5 y colágeno IV, así como mayor activación de la MMP-9, que degrada la matriz extracelular, en comparación con los sujetos controles (Rubio-Araiz *et al.*, 2017).

Sin embargo, otros autores, al igual que nosotros, han reportado una BHE sin cambios en el hipocampo tras usar el mismo modelo de CAA que se ha usado en esta Tesis Doctoral, y han reportado también la ausencia de neuroinflamación en ese área (Marshall *et al.*, 2013; Marshall *et al.*, 2016; Zahr *et al.*, 2010), aunque existen datos contradictorios respecto a la neuroinflamación en el hipocampo usando este mismo modelo (Zhao *et al.*, 2013). Los resultados son, por lo tanto, controvertidos respecto a este

punto y una investigación en mayor profundidad será necesaria en el futuro para discernir el posible efecto del CAA en la BHE hipocampal y la neuroinflamación en esta estructura cerebral.

En relación con la inflamación periférica, un aumento de las citoquinas periféricas podría alterar la permeabilidad de la BHE (Varatharaj & Galea, 2017), pero también se ha visto que las citoquinas pueden llegar al cerebro mediante transportadores saturables de citoquinas de la BHE o incluso mediante los órganos circunventriculares, carentes de BHE (revisado en (Dantzer *et al.*, 2008)). La acción protectora de la OEA en el cerebro podría estar relacionada entonces con estos mecanismos de paso mencionados, debido al fuerte efecto antiinflamatorio que la OEA ejerce a nivel periférico, y no con alteraciones en la estructura de la BHE. Por otro lado, tampoco se puede descartar la idea de que, aunque la OEA no altere los niveles de las proteínas de las TJ, pueda alterar otros tipos de transporte de la BHE, como los transportadores tipo ABC o específicos de soluto o de transcitosis. Tampoco es descartable que la OEA actúe directamente en el cerebro, ejerciendo allí su acción antiinflamatoria, ya que hay estudios que demuestran que la OEA cruza la BHE (Plaza-Zabala *et al.*, 2010), aunque estos resultados son controvertidos (Campolongo *et al.*, 2009).

Ambas acciones de la OEA, periférica y central, serían posibles. De hecho, en contextos diferentes al consumo de alcohol, y teniendo en cuenta el papel modulador de la saciedad de esta sustancia, se han descrito las acciones de la OEA tanto a nivel del área postrema (Romano *et al.*, 2017) como su acción periférica actuando en las fibras vagales sensitivas (Fonseca *et al.*, 2001). Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que la desaferenciación de las fibras vagales del intestino eliminó el efecto de reducción de la autoadministración de alcohol, así como que la administración de OEA directamente en el núcleo accumbens tampoco alteró la autoadministración de alcohol (Bilbao *et al.*, 2016).

Por lo tanto, de estos resultados se desprende que el mecanismo por el cual la OEA reduce la neuroinflamación en la corteza frontal (Antón *et al.*, 2017) no parece implicar alteraciones locales en la BHE, ya que no hemos

detectado un efecto protector de la OEA en los niveles de las proteínas de la BHE alterados por el CAA en esta estructura. Otros mecanismos, como su papel protector en la prevención del aumento de la permeabilidad en la barrera intestinal y de la inflamación periférica podrían ser más robustos para explicar su efecto sobre el eje intestino-cerebro.

4. EFECTOS EN EL COMPORTAMIENTO

Con respecto al comportamiento, en esta Tesis Doctoral hemos descrito que el CAA promueve en abstinencia a corto plazo comportamientos de tipo depresivo, así como una tendencia al comportamiento ansioso. La OEA mostró tener propiedades antidepresivas y una tendencia a prevenir las conductas ansiosas inducidas por el CAA. A largo plazo, el CAA induce anhedonia, que fue prevenida por el pretratamiento con OEA, que incluso mejora los aspectos motivacionales relacionados con el consumo de bebidas con sacarina en condiciones fisiológicas.

Recientemente se ha publicado un interesante estudio en ratones en el que se ha demostrado que un consumo crónico de alcohol promovió cambios en la microbiota que pudieran haber contribuido al desarrollo de comportamiento de tipo ansioso durante la abstinencia, y que el trasplante fecal desde los ratones que consumieron alcohol a los ratones controles hizo que estos últimos desarrollasen signos de comportamiento tipo depresivo inducido por la abstinencia a alcohol. Estos datos sugieren que la microbiota intestinal puede estar involucrada en el desarrollo de comportamiento tipo ansioso durante la abstinencia a alcohol, al menos este modelo de consumo crónico en ratón (Xiao *et al.*, 2018).

Respecto al comportamiento anhedónico y motivacional, en un estudio previo en nuestro laboratorio se demostró que la OEA previene el comportamiento anhedónico a corto plazo en un modelo de inducción de neuroinflamación en la corteza frontal por inyección i.p. de LPS, mediante

un mecanismo mediado por la disminución de la activación inmune, la neuroinflamación y la peroxidación lipídica de la corteza frontal (Sayd *et al.*, 2015). En esta Tesis Doctoral se estudió la anhedonia a largo plazo, observándose que el comportamiento anhedónico inducido por el CAA se mantiene al mes tras tratamiento con alcohol, periodo en que los efectos beneficiosos de la OEA son todavía observables. La anhedonia, relacionada con el circuito del refuerzo fronto-estriatal, también se ha asociado con otros mecanismos como alteraciones en el circuito de la dopamina y de la serotonina (revisado en (Husain & Roiser, 2018)). A su vez, estudios han demostrado que la inflamación crónica atenúa la función dopaminérgica, posiblemente debido a que produce la oxidación de un cofactor necesario para la formación de dopamina (revisado en (Felger & Treadway, 2017)).

El efecto antidepresivo de la OEA ha sido descrito también por otros autores (Costa *et al.*, 2018), y podría estar relacionado con el perfil antioxidante y antiinflamatorio de la OEA, pero también se han propuesto otros mecanismos como la regulación del factor neurotrófico derivado del cerebro en la corteza frontal y el hipocampo, así como la regulación del eje HHA (Jin *et al.*, 2015). Además, recientemente se ha visto que pacientes que toman antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina tienen mayores niveles de NAEs, especialmente OEA (Romero-Sanchiz *et al.*, 2019). En animales de experimentación también se ha observado que los niveles de OEA aumentan en la corteza frontal y en el hipocampo tras la administración de antidepresivos (Smaga *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que la OEA podría tener un papel importante en el mecanismo de acción de los antidepresivos.

El comportamiento depresivo y la tendencia hacia la ansiogénesis inducidas por el protocolo de CAA en este estudio ya no son observables al mes de la última administración de alcohol, pero sí el comportamiento anhedónico. Desconocemos si a largo plazo existe neuroinflamación en nuestro modelo de CAA. En estudios previos en nuestro laboratorio comprobamos que 24 horas después del CAA, se mantenían elevados los niveles de I κ B α , pero no de las citoquinas proinflamatorias como el TNF- α o la IL-1 β , que tienen un patrón fluctuante (Antón *et al.*, 2017). En un estudio reciente expusieron a ratas a alcohol en vapor durante 5 días

consecutivos (2h cada día) y un mes después observaron alteraciones en las conductas inhibitorias, en la coordinación motora y en la memoria, así como un aumento de NF- κ B y caspasa-3 en el cerebelo (Lamont *et al.*, 2020). De igual manera, en otro estudio se observó a largo plazo (3 semanas) disfunciones motoras y un aumento de COX-2 e iNOS en el hipocampo, cerebro y neocórtex tras un modelo de administración i.p. de alcohol al 25% a una dosis de 3g/kg dos días consecutivos a intervalos de 48h durante 14 días en ratas (Pascual *et al.*, 2007). Además, usando este mismo modelo, se observó que a largo plazo (3 semanas) había alteraciones en la plasticidad sináptica y mayores niveles de p65 en la corteza frontal, y alteraciones en el refuerzo, así como en el comportamiento ansioso, pero no en el anhedónico. Además, observaron que el TLR4 tenía un papel muy importante, ya que los ratones deficientes en este receptor estaban protegidos de estas alteraciones moleculares y comportamentales (Montesinos *et al.*, 2016).

En conclusión, el CAA produce alteraciones comportamentales que se han relacionado con neuroinflamación a corto y largo plazo, que son parcialmente prevenidas por el pretratamiento con OEA. Otros estudios también han demostrado que la OEA previene conductas relacionadas con el síndrome de abstinencia del alcohol como los temblores y la rigidez (Bilbao *et al.*, 2016). Todos estos resultados sugieren que la OEA tiene un efecto beneficioso en el contexto del consumo de alcohol y sus efectos asociados en el comportamiento durante la abstinencia, como son el comportamiento tipo depresivo (y quizás ansioso también) y anhedónico.

5. DISCUSIÓN GLOBAL, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En esta Tesis Doctoral, usando un modelo de CAA en rata, hemos descrito los efectos de este tipo de consumo de alcohol en el eje intestino-cerebro, así como el efecto protector del biolípido antiinflamatorio OEA. Estudios previos en el laboratorio donde se realizó esta Tesis Doctoral demostraron que este modelo de CAA induce neuroinflamación en la corteza frontal, a través de la activación de la ruta inflamatoria del TLR4, así

como un aumento de LPS en plasma. Estos efectos fueron parcialmente prevenidos por la administración i.p. de OEA antes de cada atracón (Antón *et al.*, 2017). Además, en adultos jóvenes consumidores habituales de alcohol en atracón también se demostró un aumento plasmático de marcadores inflamatorios relacionados con la vía del TLR4, y un aumento del LPS (Orio *et al.*, 2018), así como del biolípido OEA y otros biolípidos relacionados, posiblemente como un mecanismo homeostático de protección (Antón *et al.*, 2018). Como continuación de estos estudios se realizó esta Tesis Doctoral, para aumentar el conocimiento de los efectos del CAA en el eje intestino-cerebro y del efecto protector de la OEA, así como para explorar los mecanismos por los cuáles la OEA ejerce esa protección.

Así, hemos encontrado que el CAA afecta a la composición de la microbiota intestinal y aumenta la permeabilidad del intestino, dando lugar a la translocación de bacterias a otros órganos. El CAA afecta también a la composición de algunas proteínas que forman la BHE y produce alteraciones en conductas relacionadas con neuroinflamación. El pretratamiento con OEA es parcialmente protector ya que previene la inflamación en el colon, afectando al sistema inmune innato y adquirido, y previene el intestino permeable inducido por el alcohol, mejorando, a nivel comportamental, el comportamiento tipo depresivo y la anhedonia asociados a la abstinencia aguda y a largo plazo, respectivamente. El mecanismo de acción de la OEA no parece involucrar cambios protectores a nivel de la composición de la microbiota intestinal ni en la BHE.

Aunque esta Tesis supone un gran avance en el conocimiento en este área, tiene algunas limitaciones que se exponen a continuación. Una de las mayores limitaciones es no disponer de todos los estudios con la administración oral de OEA. En principio, se utilizó la OEA i.p. como vía principal siguiendo los estudios previos en nuestro laboratorio, y se hicieron algunos experimentos exploratorios con la OEA oral. Sin embargo, dado que finalmente los mejores resultados a nivel de translocación bacteriana y de LPS se han obtenido con la administración oral de OEA, sería muy interesante explorar los efectos de la vía oral en otros parámetros medidos con OEA i.p., como por ejemplo en los niveles de las proteínas que forman las TJ del colon y de la BHE, la inflamación colónica, la apoptosis intestinal,

la neuroinflamación o el comportamiento. En este sentido, hay que tener en cuenta la cantidad de OEA oral que se debe administrar y el coste de la realización de dichos estudios, factores que han sido también limitantes a la hora de plantear estudios exhaustivos con esta vía de administración de OEA. Pero sin duda, teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la translacionalidad de los estudios, ya que la administración oral sería la prioritaria en humanos, sería conveniente completar todos los experimentos con la OEA oral. En este trabajo se han usado dosis i.p. y oral de OEA que han demostrado ser farmacológicamente activas en estudios previos. Sin embargo, la equivalencia entre dosis es todavía desconocida, y serían necesarios más estudios al respecto en este sentido.

Así mismo, aunque los resultados se muestran en este orden para poder describir de forma ordenada los efectos del CAA y de la OEA en el eje intestino-cerebro, cabe señalar que casi todos los bloques corresponden a estudios independientes que se fueron realizando en ocasiones de forma paralela (y prácticamente en orden inverso al expuesto). Por esta razón, los resultados beneficiosos de la OEA oral, siendo más interesantes que los de la OEA i.p., fueron descubiertos en las últimas fases de experimentación, lo que condicionó que no se hubiera considerado esta vía en otros, como los estudios de BHE y comportamiento.

Es interesante añadir que en los experimentos de la microbiota se usaron muestras fecales como aproximación para estudiar la microbiota del colon. A pesar de que las diferencias entre las comunidades microbianas de la materia fecal y de la mucosa del colon están siendo cada vez más investigadas, las heces siguen siendo la muestra más usada para el estudio de la microbiota intestinal. Esto se debe a que se obtiene de forma natural, no invasiva y se puede obtener de forma repetida (Tang *et al.*, 2020). Así mismo, no podemos concluir que los resultados obtenidos hubieran sido iguales si se hubiesen tomado muestras del intestino delgado. De hecho, se ha observado que el consumo crónico de alcohol tiene un impacto diferente en la microbiota del colon y del intestino (Fan *et al.*, 2018).

El estudio de cómo el CAA y la OEA afectan a la microbiota intestinal es observacional, y sería deseable que en futuros estudios estos cambios

podrían correlacionarse con medidas de inflamación periférica, neuroinflamación y conducta que esclarezcan qué papel tienen los cambios de la microbiota en la fisiopatología y psicobiología del abuso del alcohol. Además, cabe destacar que podría haber ocurrido que no hubiésemos encontrado cambios en la microbiota entre los diferentes grupos y que existiesen aún así cambios biológicos importantes.

En cuanto a la BHE, en estos estudios solamente hemos medido los niveles de ciertas proteínas que forman la barrera. Los estudios publicados al respecto apuntan que la disminución de las proteínas que forman las TJ y la lámina propia podrían hacer que la BHE fuese más permeable. Sin embargo, para poder concluir que la BHE está dañada a nivel funcional, se deberían realizar medidas de tipo funcional para completar estos experimentos. Así, se proponen como líneas futuras de investigación la realización de medidas directas de la permeabilidad de la BHE, como por ejemplo la extravasación de IgG al parénquima cerebral. Ya que, el hecho de que los niveles de ciertas proteínas no estén alterados no implica necesariamente que la barrera no esté comprometida, ya que se puede dar el caso de que sean otras proteínas (no medidas en esta Tesis) las que hayan disminuido o dichas proteínas se hayan redistribuido al interior del citoplasma, o a otra zona de la membrana celular y en la nueva localización no puedan llevar a cabo su función. De igual manera, el hecho de que ciertas proteínas estén disminuidas no quiere decir la que BHE sea más permeable, ya que otras proteínas pueden estar llevando a cabo esas funciones.

Por último, con respecto al comportamiento, es algo muy complejo, ya que los modelos animales son la primera vía de investigación, pero los datos no pueden extrapolarse directamente a lo que ocurre en el comportamiento humano. Así como también es muy complejo relacionar distintos niveles de análisis (factores moleculares con conducta). El comportamiento, como es sabido, depende de muchos más factores moleculares de los estudiados en esta Tesis Doctoral, como por ejemplo los niveles de neurotransmisores tanto cerebrales como entéricos y hormonas, y por supuesto de factores ambientales, no estudiados directamente en este trabajo. Aún así, todo conocimiento requiere de unas fases de investigación previas, y con esta Tesis Doctoral se sugiere que modulando ciertos aspectos del eje intestino-cerebro se podrían modular algunas

conductas relacionadas con la neuroinflamación y el CAA en modelos animales (Ver Figura 32). Para complementar los estudios comportamentales también se podría realizar en un futuro el test de reconocimiento de objetos o el test de alternancia espontánea, para evaluar si el consumo de alcohol en atracón en este modelo animal afecta a la memoria, tal y como sugieren algunos estudios en humanos, como se explicó en la Introducción (Orio *et al.*,2018). También se podrían emplear en el futuro otros tests adicionales para medir comportamientos de ansiedad y depresivo, como una variante del test en campo abierto o el test de suspensión de la cola, entre otros.

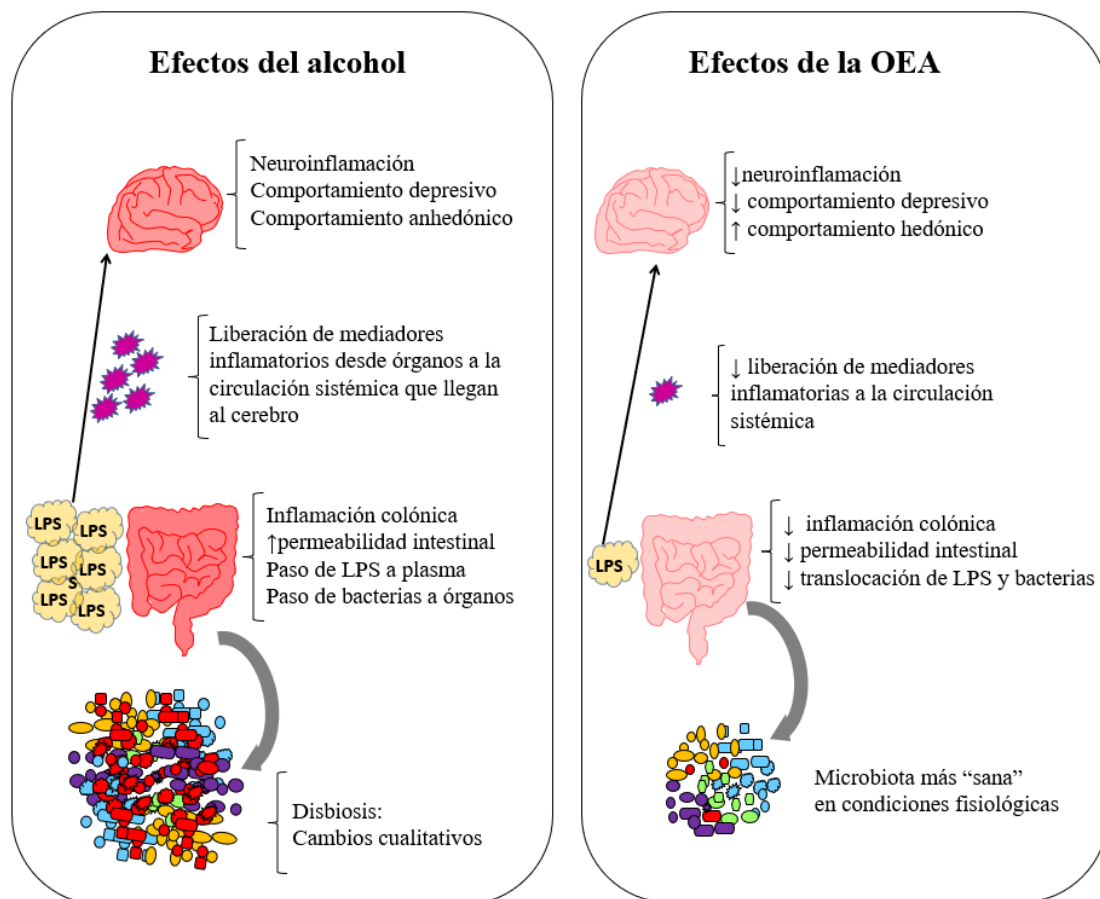


Imagen 32: Resumen gráfico de los principales resultados de esta Tesis Doctoral. En esta Figura se resumen los principales resultados encontrados acerca del efecto del alcohol y de la OEA en el eje intestino-microbiota-cerebro.

En resumen, la administración exógena de OEA ejerce potentes acciones protectoras y antiinflamatorias en el contexto del consumo de alcohol en atracón. Aunque no se han podido elucidar por completo los mecanismos por los cuales la OEA ejerce estas funciones, estos podrían ser algunos de ellos. En primer lugar, en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que la OEA no modifica los niveles de alcohol de los animales expuestos a un CAA (Antón *et al.*, 2017). La OEA reduce la neuroinflamación de la corteza prefrontal relacionada con la activación de la vía TLR4 tras el CAA, reduciendo los niveles de este receptor y de las moléculas proinflamatorias que se generan a consecuencia de su activación, como IL-1 β , MCP-1 y HMGB1 (que a su vez es agonista de TLR4), así como el estrés nitrosativo, que activa la apoptosis o muerte celular. En relación con la prevención de la neuroinflamación, hay evidencias de que la OEA administrada i.p. llega al cerebro tras cruzar la BHE (Plaza-Zabala *et al.*, 2010). Aunque por el momento, se desconoce si la OEA ejerce sus acciones protectoras frente a la neuroinflamación (y en general) mediante el receptor TRPV1 o mediante el receptor PPAR- α .

Otro mecanismo, estudiado en esta Tesis Doctoral, es que la OEA es capaz de proteger a la barrera intestinal de los daños asociados con el CAA, previniendo la reducción de los niveles de proteínas que forman las uniones estrechas. Como consecuencia, la OEA previene el paso a plasma de LPS (agonista del TLR4), lo cual supone una fuente de inflamación periférica, que puede impactar en el cerebro. La reducción de las citoquinas proinflamatorias periféricas inducidas por el CAA tras el pretratamiento con este biolípido (Antón *et al.*, 2017) podría suponer un mecanismo de la OEA frente a la neuroinflamación, ya que esas citoquinas son capaces de transducir señales inflamatorias al parénquima cerebral a través de la BHE, y pueden llegar al parénquima cerebral mediante sistemas saturables de transporte y a través de los órganos circunventriculares carentes de BHE (revisado en (Gonçalves & De Felice, 2021)), y mucho más si la BHE está alterada por el alcohol, como se ha visto en esta Tesis. En relación con esta barrera, en esta Tesis Doctoral hemos visto que la OEA no parece mediar sus efectos neuroprotectores mediante la protección de la BHE, sino que su efecto principal parece ser en la barrera intestinal. También estudios en este laboratorio han demostrado que el CAA eleva los niveles plasmáticos de corticosterona en animales y que la OEA previene este aumento (Antón

et al., 2017), lo cual es muy importante ya que elevados niveles periféricos de corticosterona parecen mediar parcialmente los efectos neurotóxicos de los atracones de alcohol (Cippitelli *et al.*, 2014).

Que la OEA actúe a nivel central o periférico, no son hechos excluyentes. Por un lado, se han descrito las acciones de la OEA a nivel del área postrema (Romano *et al.*, 2017), y, por otro lado, a nivel periférico actuando en las fibras vagales sensitivas (Fonseca *et al.*, 2001). Estudios en nuestro laboratorio apuntan más hacia el papel modulador de la OEA a nivel periférico como se ha demostrado en (Bilbao *et al.*, 2016) y en los resultados de esta Tesis Doctoral, como se ha comentado.

En este sentido, la OEA tiene un papel beneficioso sobre la microbiota intestinal en condiciones fisiológicas, pero de los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral no podemos confirmar que los cambios de la OEA en la microbiota en el contexto del CAA supongan un mecanismo por el cual ejerce sus acciones neuroprotectoras, aunque se necesita seguir investigando esta vía.

Por último, el hecho de que la OEA, mediante los mecanismos que se acaban de explicar, reduzca la neuroinflamación, podría explicar la prevención del comportamiento anhedónico y de tipo depresivo. Así, se ha demostrado que la neuroinflamación puede dar lugar a este tipo de comportamiento anhedónico o de falta de motivación (Dantzer *et al.*, 2008). La integridad del receptor PPAR- α , junto con otros, parece ser indispensable para los efectos antidepresivos de la OEA (Provinsi *et al.*, 2017). Aún siendo este el principal receptor asociado a los efectos de la OEA y muy relacionado con inflamación, todavía no se ha estudiado su implicación directa en el eje microbiota-intestino-cerebro mencionado en esta Tesis Doctoral.

En conjunto, y a pesar de estas limitaciones, los resultados de esta Tesis aportan información valiosa acerca del impacto que tiene en la salud un patrón de consumo de alcohol cada vez más practicado, y el cual no ha sido tan ampliamente estudiado como el consumo crónico. Por su parte, la OEA muestra un perfil muy beneficioso para prevenir muchos aspectos

negativos relacionados con el consumo de alcohol en atracón. Estos resultados nos ayudan a comprender mejor el potencial de la OEA como compuesto protector en el contexto del consumo del alcohol, lo cual la posiciona como una buena opción terapéutica, junto con la terapia psicológica.

VIII) CONCLUSIONES / CONCLUSIONS



1. CONCLUSIONES

1. El CAA disminuye la diversidad α y da lugar a una comunidad que se distingue entre el comienzo y el final del tratamiento de alcohol y con respecto al grupo control (diferente diversidad β). El alcohol aumenta los niveles de *Clostridium sensu stricto*, *Romboutsia*, *Turicibacter*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides*, y *Enterococcus*; y disminuye los niveles de *Lactobacillus*, *Clostridium XIVa*, *Clostridium XIVb*, y *Oscillibacter*.
2. La administración de OEA en condiciones fisiológicas (en ausencia de alcohol) cambia ligeramente la diversidad β , pero no la diversidad α , y altera la composición de la microbiota hacia un perfil considerado más saludable. Sin embargo, el pretratamiento con OEA en el contexto del CAA reduce la diversidad α , y cambia la diversidad β .
3. El CAA induce inflamación en el colon, observado en el incremento de los parámetros inflamatorios TNF- α , iNOS y NO $_2^-$, de la inmunidad innata (TLR4) así como de la inmunidad adaptativa (IgA). El pretratamiento con OEA durante el CAA previene parcialmente la inflamación colónica y la activación inmune.
4. El CAA altera la estructura de la barrera intestinal. Disminuye los niveles de mRNA y de proteínas que forman las uniones estrechas en el colon: ocludina, claudina-3 y 4; y, a consecuencia, produce una dilatación de la distancia intercelular de dichas uniones estrechas. El pretratamiento con OEA durante el CAA previene parcialmente estos cambios; la OEA aumenta los niveles de mRNA y de proteína de ZO-1 incluso en ausencia del alcohol.
5. Los marcadores apoptóticos FasL y caspasa-9 aumentan en el colon tras el CAA, indicando muerte celular. El pretratamiento con la OEA no modifica FasL ni la caspasa-9, pero aumenta los niveles de la forma inactiva de esta última, la procaspasa-9.
6. El CAA produce translocación bacteriana, con gran predominancia de *E. coli*, desde el lumen intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos (y en menor medida a bazo), así como el paso de LPS al plasma. El pretratamiento con OEA por la vía i.p. durante el CAA previene parcialmente el paso de LPS al plasma mientras que la OEA oral tiene una acción reforzada en la prevención del paso de LPS al plasma y bloquea la translocación de bacterias a los ganglios linfáticos mesentéricos.

7. El CAA altera los niveles de proteínas de la BHE en la corteza frontal pero no en el hipocampo. En la corteza frontal disminuye la proteína ocludina que forma las uniones estrechas, así como la laminina, componente de la lámina basal. El pretratamiento con OEA no es capaz de prevenir este efecto. El CAA no modifica los marcadores proinflamatorios TLR4, MyD88, I κ B α ni IL-1 β en el hipocampo.
8. El CAA induce alteraciones comportamentales durante la abstinencia aguda, induciendo un comportamiento de tipo depresivo, que es prevenido por el pretratamiento con OEA.
9. El CAA produce un comportamiento anhedónico durante la abstinencia a largo plazo. El pretratamiento con OEA induce un aumento del comportamiento hedónico en los animales en el contexto del CAA y en condiciones fisiológicas.

2. CONCLUSIONS

1. ABD reduces the bacterial α -diversity and creates a clearly distinguishable community (different β -diversity), with main differences observed from the beginning to the end of the treatment with alcohol and in comparison, to the control group. Specifically, alcohol increases the levels of *Clostridium sensu stricto*, *Romboutsia*, *Turicibacter*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides*, and *Enterococcus*; and decreases levels of *Lactobacillus*, *Clostridium XIVa*, *Clostridium XIVb*, and *Oscillibacter*.
2. OEA administration in the water group slightly changes the community structure with respect to the vehicle group but does not change α -diversity and it alters the microbial composition towards a “healthier” profile. However, the OEA pretreatment in the ABD context reduces the α -diversity, changes the β -diversity.
3. ABD induces colonic inflammation, observed in the increment of inflammatory parameters (TNF- α , iNOS and NO $_2^-$), innate immunity (TLR4), as well as adaptative immunity (IgA). The OEA pretreatment during the ABD partially prevents the colonic inflammation and the immune activation.
4. ABD alters the structure of the gut barrier. ABD decreases the levels of mRNA and protein forming the colonic tight junctions: occludin, claudin 3 and 4; and, as a consequence, promotes the dilatation of the intercellular

distance of these tight junctions. OEA pretreatment during ABD partially prevents these changes; OEA increases mRNA and protein levels of ZO-1 even in the absence of alcohol.

5. The apoptotic markers FasL and caspase-9 are increased in colon after ABD, indicating cellular death. OEA pretreatment does not change FasL or caspase-9, but increases the levels of the inactive form of the latter, pro-caspase-9.
6. ABD promotes the translocation of bacteria, especially *E. coli*, from the intestinal lumen to the mesenteric lymph nodes (and to a lesser extent to the spleen), as well as the passage of LPS to plasma. I.p. OEA pretreatment during ABD partially prevents the passage of LPS to the plasma, while oral OEA has a stronger effect in the prevention of LPS leakage to plasma and blocks the translocation of bacteria to mesenteric lymph nodes.
7. ABD alters the levels of proteins of the blood-brain barrier in the frontal cortex, but not in the hippocampus. In the frontal cortex, ABD diminishes occludin, which forms part of the tight junctions, as well as the laminin, a basal lamina component. OEA pretreatment does not prevent this effect. ABD does not modify the pro-inflammatory markers TLR4, MyD88, I κ B α or IL-1 β in the hippocampus.
8. ABD induces behavioral changes during early abstinence, promoting a depressive-like behavior that is counteracted by OEA pretreatment.
9. ABD promotes an anhedonic-like behavior during long-term abstinence. OEA increases the hedonic-like behavior in animals both after alcohol consumption and in physiological conditions.

IX) REFERENCIAS



- Abbott, N. J. (2005). Dynamics of CNS barriers: Evolution, differentiation, and modulation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 5(1):5-23. doi://doi.org/10.1007/s10571-004-1374-y
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2009). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13-25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41-53. doi:10.1038/nrn1824
- Abreu, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: How bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 131-144. doi:10.1038/nri2707
- Afshar, M., Netzer, G., Salisbury-Afshar, E., Murthi, S., & Smith, G. S. (2015). Injured patients with very high blood alcohol concentrations. *Injury*, 47(1), 83-88. doi:10.1016/j.injury.2015.10.063
- Ait-Belgnaoui, A., Colom, A., Braniste, V., Ramalho, L., Marrot, A., Cartier, C., . . . Tompkins, T. (2014). Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 26(4), 510-520. doi:10.1111/nmo.12295
- Albanese, D., Fontana, P., De Filippo, C., Cavalieri, D., & Donati, C. (2015). MICCA: A complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. *Scientific Reports*, 5(1), 9743. doi:10.1038/srep09743
- Alhouayek, M., & Muccioli, G. G. (2014). Harnessing the anti-inflammatory potential of palmitoylethanolamide. *Drug Discovery Today*, 19(10), 1632-1639. doi:10.1016/j.drudis.2014.06.007
- American Psychiatric Association (APA). (2014). Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (5th ed. [DSM-5]). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Ames, N. J., Barb, J. J., Schuebel, K., Mudra, S., Meeks, B. K., Tuason, R. T. S., . . . Goldman, D. (2020). Longitudinal gut microbiome changes in alcohol use disorder are influenced by abstinence and drinking quantity. *Gut Microbes*, 11(6), 1608-1631. doi:10.1080/19490976.2020.1758010
- Antón, M., Alen, F., Heras, R. G. d., Serrano, A., Pavon, F. J., Leza, J. C., . . . Orio, L. (2017). Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addiction Biology*, 22(3), 724-741. doi:10.1111/adb.12365
- Antón, M., Rodríguez-González, A., Rodríguez-Rojo, I. C., Pastor, A., Correias, A., Serrano, A., . . . Orio, L. (2018). Increased plasma oleoylethanolamide and palmitoleoylethanolamide levels correlate with inflammatory changes in alcohol binge drinkers: The case of HMGB1 in women. *Addiction Biology*, 23(6), 1242-1250. doi:10.1111/adb.12580
- Antonini, M., Lo Conte, M., Sorini, C., & Falcone, M. (2019). How the interplay between the commensal microbiota, gut barrier integrity, and mucosal immunity regulates brain autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 10, 1937. doi:10.3389/fimmu.2019.01937
- Asai, K., Buurman, W. A., Reutelingsperger, C. P. M., Schutte, B., & Kaminishi, M. (2003). Low concentrations of ethanol induce apoptosis in human intestinal cells. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 38(11), 1154-1161. doi:10.1080/00365520310006252
- Atkinson, K. J., & Rao, R. K. (2001). Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(6), 1280. doi:10.1152/ajpgi.2001.280.6.G1280
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014:360438. doi:10.1155/2014/360438

- Banan, A., Fields, J. Z., Decker, H., Zhang, Y., & Keshavarzian, A. (2000). Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294(3), 997-1008.
- Banan, A., Keshavarzian, A., Zhang, L., Shaikh, M., Forsyth, C. B., Tang, Y., & Fields, J. Z. (2007). NF-kappaB activation as a key mechanism in ethanol-induced disruption of the F-actin cytoskeleton and monolayer barrier integrity in intestinal epithelium. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 41(6), 447-460. doi:S0741-8329(07)00127-9
- Banks, W. A., Gray, A. M., Erickson, M. A., Salameh, T. S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., . . . Reed, M. J. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: Roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), 223. doi:10.1186/s12974-015-0434-1
- Berni Canani, R., Di Costanzo, M., Leone, L., Pedata, M., Meli, R., & Calignano, A. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol*, 17(12), 1519-1528. doi:10.3748/wjg.v17.i12.1519
- Bilbao, A., Blanco, E., Luque-Rojas, M. J., Suarez, J., Palomino, A., Vida, M., . . . Rodriguez de Fonseca, F. (2013). Oleoylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPARalpha receptor-independent mechanism. *Addiction Biology*, 18(1), 78-87. doi:10.1111/adb.12006
- Bilbao, A., Serrano, A., Cipitelli, A., Pavón, F. J., Giuffrida, A., Suárez, J., . . . Rodríguez De Fonseca, F. (2016). Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addict Biol*, 21(4), 859-72. doi:10.1111/adb.12276
- Bishehsari, F., Magno, E., Swanson, G., Desai, V., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2017). Alcohol and gut-derived inflammation. *Alcohol Research: Current Reviews*, 38(2), 163-171.
- Blanco, A. M., Valles, S. L., Pascual, M., & Guerri, C. (2005). Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *The Journal of Immunology*, 175(10), 6893-6899. doi:10.4049/jimmunol.175.10.6893
- Bode, C., & Bode, J. C. (2003). Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(4), 575-592. doi:10.1016/S1521-6918(03)00034-9
- Bode, J. C., Bode, C., Heidelberg, R., Durr, H. K., & Martini, G. A. (1984). Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepato-Gastroenterology*, 31(1), 30-34.
- Boschloo, L., Vogelzangs, N., Smit, J. H., van den Brink, W., Veltman, D. J., Beekman, A. T. F., & Penninx, Brenda W. J. H. (2011). Comorbidity and risk indicators for alcohol use disorders among persons with anxiety and/or depressive disorders: Findings from the Netherlands study of depression and anxiety (NESDA). *Journal of Affective Disorders*, 131(1-3), 233-242. doi:10.1016/j.jad.2010.12.014
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Toth, M., . . . Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*, 6(263), 263ra158. doi:10.1126/scitranslmed.3009759
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., . . . Cryan, J. F. (2011). Ingestion of lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 16050-16055. doi:10.1073/pnas.1102999108
- Brozinsky, S., Fani, K., Grosberg, S. J., & Wapnick, S. (1978). Alcohol ingestion-induced changes in the human rectal mucosa: Light and electron microscopic studies. *Diseases of the Colon and Rectum*, 21(5), 329-335.

- Bull-Otterston, L., Feng, W., Kirpich, I., Wang, Y., Qin, X., Liu, Y., . . . Barve, S. (2013). Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of lactobacillus rhamnosus GG treatment. *PloS One*, 8(1), e53028. doi:10.1371/journal.pone.0053028
- Butera, A., Di Paola, M., Vitali, F., De Nitto, D., Covotta, F., Borrini, F., . . . Boirivant, M. (2020). IL-13 mRNA tissue content identifies two subsets of adult ulcerative colitis patients with different clinical and mucosa-associated microbiota profiles. *Journal of Crohn's & Colitis*, 14(3), 369-380. doi:10.1093/ecco-jcc/jjz154
- Bystrowska, B., Smaga, I., Frankowska, M., & Filip, M. (2014). Changes in endocannabinoid and N-acyl ethanolamine levels in rat brain structures following cocaine self-administration and extinction training. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 50, 1-10. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.12.002
- Cacabelos, R., Torrellas, C., Fernandez-Novoa, L., & Lopez-Munoz, F. (2016). Histamine and immune biomarkers in CNS disorders. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1924603. doi:10.1155/2016/1924603
- Campolongo, P., Roozendaal, B., Trezza, V., Cuomo, V., Astarita, G., Fu, J., . . . Piomelli, D. (2009). Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19), 8027-8031. doi:10.1073/pnas.0903038106
- Carbia, C., López-Caneda, E., Corral, M., & Cadaveira, F. (2018). A systematic review of neuropsychological studies involving young binge drinkers. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 90, 332-349. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.04.013
- Cederbaum, A. I., PhD. (2012). Alcohol metabolism. *Clinics in Liver Disease*, 16(4), 667-685. doi:10.1016/j.cld.2012.08.002
- Chari, S., Teyssen, S., & Singer, M. V. (1993). Alcohol and gastric acid secretion in humans. *Gut*, 34(6), 843-847.
- Chen, K., Magri, G., Grasset, E. K., & Cerutti, A. (2020). Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nature Reviews. Immunology*, 20(7), 427-441. doi:10.1038/s41577-019-0261-1
- Chen, P., Stärkel, P., Turner, J. R., Ho, S. B., & Schnabl, B. (2015). Dysbiosis-induced intestinal inflammation activates tumor necrosis factor receptor I and mediates alcoholic liver disease in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 61(3), 883-894. doi:10.1002/hep.27489
- Cho, Y., Yu, L., Abdelmegeed, M. A., Yoo, S., & Song, B. (2018). Apoptosis of enterocytes and nitration of junctional complex proteins promote alcohol-induced gut leakiness and liver injury. *Journal of Hepatology*, 69(1), 142-153. doi:10.1016/j.jhep.2018.02.005
- Cippitelli, A., Damadzic, R., Hamelink, C., Brunnuell, M., Thorsell, A., Heilig, M., & Eskay, R. L. (2014). Binge-like ethanol consumption increases corticosterone levels and neurodegeneration whereas occupancy of type II glucocorticoid receptors with mifepristone is neuroprotective. *Addiction Biology*, 19(1), 27-36. doi:10.1111/j.1369-1600.2012.00451.x
- Costa, A., Cristiano, C., Cassano, T., Gallelli, C. A., Gaetani, S., Ghelardini, C., . . . Provensi, G. (2018). Histamine-deficient mice do not respond to the antidepressant-like effects of oleoylethanolamide. *Neuropharmacology*, 135, 234-241. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.03.033
- Crews, F. T., Sarkar, D. K., Qin, L., Zou, J., Boyadjieva, N., & Vetreno, R. P. (2015). Neuroimmune function and the consequences of alcohol exposure. *Alcohol Research: Current Reviews*, 37(2), 331.
- Crews, F. T., Walter, T. J., Coleman, L. G., & Vetreno, R. P. (2017). Toll-like receptor signaling and stages of addiction. *Psychopharmacology*, 234(9-10), 1483-1498. doi:10.1007/s00213-017-4560-6

- Crews, F. T., Vetreno, R. P., Broadwater, M. A., & Robinson, D. L. (2016). Adolescent alcohol exposure persistently impacts adult neurobiology and behavior. *Pharmacol Rev*, 68(4):1074-1109. doi:10.1124/pr.115.012138
- Crumeyrolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Dauge, V., . . . Rabot, S. (2014). Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 42, 207-217. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.01.014
- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews.Neuroscience*, 13(10), 701-712. doi:10.1038/nrn3346
- Cryan, J., O'Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., . . . Dinan, T. G. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews*, 99(4), 1877-2013. doi:10.1152/physrev.00018.2018
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5), 238-245. doi:10.1016/s0165-6147(02)02017-5
- Danielski, L., Danielski, L., Giustina, A., Giustina, A., Badawy, M., Badawy, M., . . . Petronilho, F. (2018). Brain barrier breakdown as a cause and consequence of neuroinflammation in sepsis. *Molecular Neurobiology*, 55(2), 1045-1053. doi:10.1007/s12035-016-0356-7
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews.Neuroscience*, 9(1), 46-56. doi:10.1038/nrn2297
- Detke, M. J., Rickels, M., & Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, 121(1), 66-72. doi:10.1007/BF02245592
- Di Paola, M., Bonechi, E., Provensi, G., Costa, A., Clarke, G., Ballerini, C., . . . Passani, M. B. (2018). Oleoylethanolamide treatment affects gut microbiota composition and the expression of intestinal cytokines in peyer's patches of mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12. doi:10.1038/s41598-018-32925-x
- Dinan, T. G., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biological Psychiatry*, 74(10), 720-726. doi:10.1016/j.biopsych.2013.05.001
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017a). The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 46(1):77-89 doi:10.1016/j.gtc.2016.09.007
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017b). Brain-gut-microbiota axis in psychiatry: Novel paradigm or false dawn? *Psychosomatic Medicine*, 79(8), 920-926. doi:10.1097/PSY.0000000000000519
- Du, L., Kim, J. J., Shen, J., & Dai, N. (2016). Crosstalk between inflammation and ROCK/MLCK signaling pathways in gastrointestinal disorders with intestinal hyperpermeability. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016, 7374197. doi:10.1155/2016/7374197
- Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: Improved error-correction for illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv*. doi: 10.1101/081257.
- Ek, M., Kurosawa, M., Lundberg, T., & Ericsson, A. (1998). Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: Role of endogenous prostaglandins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(22), 9471-9479. doi:10.1097/PSY.0000000000000519
- Elamin, E., Jonkers, D., Juuti-Uusitalo, K., van Ijzendoorn, S., Troost, F., Duimel, H., . . . Masclee, A. (2012). Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: In vitro study in a three dimensional intestinal epithelial cell culture model. *PloS One*, 7(4), e35008. doi:10.1371/journal.pone.0035008
- Elamin, E., Masclee, A., Dekker, J., & Jonkers, D. (2014a). Ethanol disrupts intestinal epithelial tight junction integrity through intracellular calcium-mediated rho/ROCK activation.

- American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(8), 677. doi:10.1152/ajpgi.00236.2013
- Elamin, E., Masclee, A., Troost, F., Pieters, H. J., Keszthelyi, D., Aleksa, K., . . . Jonkers, D. (2014b). Ethanol impairs intestinal barrier function in humans through mitogen activated protein kinase signaling: A combined in vivo and in vitro approach. *PloS One*, 9(9), e107421. doi:10.1371/journal.pone.0107421
- Elmas, I., Küçük, M., Kalayci, R. B., Cevik, A., & Kaya, M. (2001). Effects of profound hypothermia on the blood-brain barrier permeability in acute and chronically ethanol treated rats. *Forensic Science International*, 119(2), 212-216. doi:10.1016/s0379-0738(00)00429-1
- Engen, P. A., Green, S. J., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2015). The gastrointestinal microbiome: Alcohol effects on the composition of intestinal microbiota. *Alcohol Research: Current Reviews*, 37(2), 223.
- Erny, D., Angelis, Anna Lena Hrabec De, Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., . . . Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, 18(7), 965-977. doi:10.1038/nn.4030
- ESPAD Group. (2020). *ESPAD report 2019: Results from the european school survey project on alcohol and other drugs* EMCDDA Joint Publications, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., . . . Madsen, K. L. (2008). Secreted bioactive factors from bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(5), 1025. doi:10.1152/ajpgi.90227.2008
- Fan, Y., Ya-E, Z., Ji-Dong, W., Yu-Fan, L., Ying, Z., Ya-Lun, S., . . . Rui-Ling, Z. (2018). Comparison of microbial diversity and composition in jejunum and colon of the alcohol-dependent rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(11), 1883-1895. doi:10.4014/jmb.1806.06050
- Felger, J. C., & Treadway, M. T. (2017). Inflammation effects on motivation and motor activity: Role of dopamine. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(1), 216-241. doi:10.1038/npp.2016.143
- Fergusson, D. M., Boden, J. M., & Horwood, L. J. (2009). Tests of causal links between alcohol abuse or dependence and major depression. *Archives of General Psychiatry*, 66(3), 260-266. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2008.543
- Fezza, F., Bari, M., Florio, R., Talamonti, E., Feole, M., & Maccarrone, M. (2014). Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(11), 17078-17106. doi:10.3390/molecules191117078
- Flores-Bastías, O., & Karahanian, E. (2018). Neuroinflammation produced by heavy alcohol intake is due to loops of interactions between toll-like 4 and TNF receptors, peroxisome proliferator-activated receptors and the central melanocortin system: A novel hypothesis and new therapeutic avenues. *Neuropharmacology*, 128, 401-407. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.11.003
- Folgueira-Ares, R., Cadaveira, F., Rodríguez Holguín, S., López-Caneda, E., Crego, A., & Pazo-Álvarez, P. (2017). Electrophysiological anomalies in Face-Name memory encoding in young binge drinkers. *Frontiers in Psychiatry*, 8, 216. doi:10.3389/fpsy.2017.00216
- Fonseca, F. R. d., Navarro, M., Gomez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., . . . Piomelli, D. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 414(6860), 209-212. doi:10.1038/35102582
- Fourrier, C., Singhal, G., & Baune, B. T. (2019). Neuroinflammation and cognition across psychiatric conditions. *CNS Spectrums*, 24(1), 4-15. doi:10.1017/S1092852918001499
- Fraher, M. H., O'Toole, P. W., & Quigley, E. M. M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 9(6), 312-322. doi:10.1038/nrgastro.2012.44

- France, M. M., & Turner, J. R. (2017). The mucosal barrier at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(2), 307-314. doi:10.1242/jcs.193482
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., . . . Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480), 446-450. doi:10.1038/nature12721
- Gabbard, S. L., Lacy, B. E., Levine, G. M., & Crowell, M. D. (2014). The impact of alcohol consumption and cholecystectomy on small intestinal bacterial overgrowth. *Digestive Diseases and Sciences*, 59(3), 638-644. doi:10.1007/s10620-013-2960-y
- Garcia-Marchena, N., Pavon, F. J., Pastor, A., Araos, P., Pedraz, M., Romero-Sanchiz, P., . . . Serrano, A. (2017). Plasma concentrations of oleoylethanolamide and other acylethanolamides are altered in alcohol-dependent patients: Effect of length of abstinence. *Addiction Biology*, 22(5), 1366-1377. doi:10.1111/adb.12408
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., & Blumberg, R. S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*, 352(6285), 539-544. doi:10.1126/science.aad9378
- Gershman, H., & Steeper, J. (1991). Rate of clearance of ethanol from the blood of intoxicated patients in the emergency department. *Journal of Emergency Medicine*, 9(5), 307-311. doi:10.1016/0736-4679(91)90371-L
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., . . . Reid, G. (2017). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75
- Giuffrida, A., Rodríguez de Fonseca, F., & Piomelli, D. (2000). Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 280(1), 87-93. doi:10.1006/abio.2000.4509
- Gloor, S. M., Wachtel, M., Bolliger, M. F., Ishihara, H., Landmann, R., & Frei, K. (2001). Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Research Reviews*, 36(2-3), 258-264. doi:10.1016/s0165-0173(01)00102-3
- Gonçalves, R. A., & De Felice, F. G. (2021). The crosstalk between brain and periphery: Implications for brain health and disease. *Neuropharmacology*, 197. doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108728
- Gonzalez-Aparicio, R., & Moratalla, R. (2014). Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 62, 416-425. doi:10.1016/j.nbd.2013.10.008
- Gonzalez-Quintela, A., Alende, R., Gude, F., Campos, J., Rey, J., Meijide, L. M., . . . Vidal, C. (2008). Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol*, 151(1), 42-50. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03545.x
- Gottfried, E. B., Korsten, M. A., & Lieber, C. S. (1978). Alcohol-induced gastric and duodenal lesions in man. *The American Journal of Gastroenterology*, 70(6), 587-592.
- Griffin, W. C., Lopez, M. F., & Becker, H. C. (2009). Intensity and duration of chronic ethanol exposure is critical for subsequent escalation of voluntary ethanol drinking in mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 33(11), 1893-1900. doi:10.1111/j.1530-0277.2009.01027.x
- Guerri, C., & Pascual, M. (2010). Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. *Alcohol*, 44(1), 15-26. doi:10.1016/j.alcohol.2009.10.003
- Guerri, C., & Pascual, M. (2018). Impact of neuroimmune activation induced by alcohol or drug abuse on adolescent brain development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 77, 89-98. doi:10.1016/j.ijdevneu.2018.11.006

- Hansen, H. S., & Vana, V. (2018). Non-endocannabinoid N-acylethanolamines and 2-monoacylglycerols in the intestine. *British Journal of Pharmacology*, 176, 1443–1454. doi:10.1111/bph.14175
- Haorah, J., Heilman, D., Knipe, B., Chrastil, J., Leibhart, J., Ghorpade, A., . . . Persidsky, Y. (2005). Ethanol-Induced activation of myosin light chain kinase leads to dysfunction of tight junctions and Blood-Brain barrier compromise. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29(6), 999-1009. doi:10.1097/01.ALC.0000166944.79914.0A
- Hartmann, P., Chen, P., Wang, H. J., Wang, L., McCole, D. F., Brandl, K., . . . Schnabl, B. (2013). Deficiency of intestinal mucin-2 ameliorates experimental alcoholic liver disease in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 58(1), 108-119. doi:10.1002/hep.26321
- Hartmann, P., Seebauer, C., & Schnabl, B. (2015). Alcoholic liver disease: The gut microbiome and liver crosstalk. *Alcohol Clin Exp Res*, 39, 763-775. doi:10.1111/acer.12704
- Hasin, D. S., & Grant, B. F. (2015). The national epidemiologic survey on alcohol and related conditions (NESARC) waves 1 and 2: Review and summary of findings. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 50(11), 1609-1640. doi:10.1007/s00127-015-1088-0
- Hauer, D., Schelling, G., Gola, H., Campolongo, P., Morath, J., Roozendaal, B., . . . Kolassa, I. T. (2013). Plasma concentrations of endocannabinoids and related primary fatty acid amides in patients with post-traumatic stress disorder. *PloS One*, 8(5), e62741. doi:10.1371/journal.pone.0062741
- Henry, R. J., Kerr, D. M., Flannery, L. E., Killilea, M., Hughes, E. M., Corcoran, L., . . . Roche, M. (2017). Pharmacological inhibition of FAAH modulates TLR-induced neuroinflammation, but not sickness behaviour: An effect partially mediated by central TRPV1. *Brain, Behavior, and Immunity*, 62, 318-331. doi:10.1016/j.bbi.2017.02.016
- Hernández, J. A., López-Sánchez, R. C., & Rendón-Ramírez, A. (2016). Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1543809-15. doi:10.1155/2016/1543809
- Hill, M. N., Miller, G. E., Carrier, E. J., Gorzalka, B. B., & Hillard, C. J. (2009). Circulating endocannabinoids and N -acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology*, 34(8), 1257-1262. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.03.013
- Hiller-Sturmhöfel, S., & Spear, L. P. (2018). Binge drinking's effects on the developing Brain—Animal models. *Alcohol Research: Current Reviews*, 39(1), 77-86.
- Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T., & Nakatsu, C. H. (2017). Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and Environments*, 32(4), 300-313. doi:10.1264/jsme2.ME17017
- Hosoi, T., Okuma, Y., & Nomura, Y. (2000). Electrical stimulation of afferent vagus nerve induces IL-1 β expression in the brain and activates HPA axis. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(1), 141-147. doi:10.1152/ajpregu.2000.279.1.R141
- Hoyles, L., Snelling, T., Umlai, U., Nicholson, J. K., Carding, S. R., Glen, R. C., & McArthur, S. (2018). Microbiome–host systems interactions: Protective effects of propionate upon the blood–brain barrier. *Microbiome*, 6(1), 55. doi:10.1186/s40168-018-0439-y
- Hug, H., Mohajeri, M. H., & La Fata, G. (2018). Toll-like receptors: Regulators of the immune response in the human gut. *Nutrients*, 10(2), 203. doi:10.3390/nu10020203
- Husain, M., & Roiser, J. P. (2018). Neuroscience of apathy and anhedonia: A transdiagnostic approach. *Nature Reviews. Neuroscience*, 19(8), 470-484. doi:10.1038/s41583-018-0029-9
- Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Mark Welch, D., Welch, D. M., Relman, D. A., & Sogin, M. L. (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics*, 4(11), e1000255. doi:10.1371/journal.pgen.1000255
- Jacobus, J., & Tapert, S. F. (2013). Neurotoxic effects of alcohol in adolescence. *Annual Review of Clinical Psychology*, 9(1), 703-721. doi:10.1146/annurev-clinpsy-050212-185610

- Jeanblanc, J., Rolland, B., Gierski, F., Martinetti, M. P., & Naassila, M. (2018). Animal models of binge drinking, current challenges to improve face validity. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 106:112-121. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.05.002
- Jimenez, J., Victor, Moreno, R., Settles, E., Currie, B. J., Keim, P., & Monroy, F. P. (2018). A mouse model of binge alcohol consumption and burkholderia infection. *PloS One*, 13(11), e0208061. doi:10.1371/journal.pone.0208061
- Jin, P., Yu, H., Tian-Lan, Zhang, F., & Quan, Z. (2015). Antidepressant-like effects of oleoylethanolamide in a mouse model of chronic unpredictable mild stress. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 133, 146-154. doi:10.1016/j.pbb.2015.04.001
- Joshi, N. A., & Fass, J. N. (2011). *Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (version 1.33) [software]*
- Jung, C., Hugot, J., & Barreau, F. (2010). Peyer's patches: The immune sensors of the intestine. *International Journal of Inflammation*, 2010, 823710-12. doi:10.4061/2010/823710
- Kakiyama, G., Pandak, W. M., Gillevet, P. M., Hylemon, P. B., Heuman, D. M., Daita, K., . . . Bajaj, J. S. (2013). Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 58(5), 949-955. doi:10.1016/j.jhep.2013.01.003
- Kanny, D., Brewer, R. D., Mesnick, J. B., Paulozzi, L. J., Naimi, T. S., & Lu, H. (2015). Vital signs: Alcohol poisoning deaths--united states, 2010-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63(53), 1238.
- Karelina, K., Gaier, K. R., Prabhu, M., Wenger, V., Corrigan, T., & Weil, Z. M. (2017). Binge ethanol in adulthood exacerbates negative outcomes following juvenile traumatic brain injury. *Brain Behav Immun*, (60), 304-311. doi:10.1016/j.bbi.2016.11.009.
- Karwad, M. A., Macpherson, T., Wang, B., Theophilidou, E., Sarmad, S., Barrett, D. A., . . . O'Sullivan, S. E. (2017). Oleoylethanolamine and palmitoylethanolamine modulate intestinal permeability in vitro via TRPV1 and PPAR alpha. *FASEB Journal*, 31(2), 469-481. doi:10.1096/fj.201500132
- Kazbariene, B., Kalibatas, J., Krikstaponiene, A., Zabulyte, D., & Monceviute-Eringiene, E. (2007). Alterations of human immune system functions in relation to environmental contamination, gender and alcohol consumption intensity. *Cent Eur J Public Health*, 15(1), 13-7. doi:10.21101/cejph.a3404.
- Kealy, J., Greene, C., & Campbell, M. (2020). Blood-brain barrier regulation in psychiatric disorders. *Neuroscience Letters*, 726, 133664. doi:10.1016/j.neulet.2018.06.033
- Keaney, J., & Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS Journal*, 282(21), 4067-4079. doi:10.1111/febs.13412
- Keita, A. V., & Soderholm, J. D. (2010). The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(7), 718-733. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01498.x
- Kelly, S. J., Bonthius, D. J., & West, J. R. (1987). Developmental changes in alcohol pharmacokinetics in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 11(3), 281-286. doi:10.1111/j.1530-0277.1987.tb01308.x
- Klingensmith, N., Yoseph, B., Liang, Z., Lyons, J., Burd, E., Margoles, L., . . . Coopersmith, C. (2017). Epidermal growth factor improves intestinal integrity and survival in murine sepsis following chronic alcohol ingestion. *Shock (Augusta, Ga.)*, 47(2), 184-192. doi:10.1097/SHK.0000000000000709
- Koob, G. F. (2015). The dark side of emotion: The addiction perspective. *European Journal of Pharmacology*, 753, 73-87. doi:10.1016/j.ejphar.2014.11.044
- Kosnicki, K. L., Penprase, J. C., Cintora, P., Torres, P. J., Harris, G. L., Brasser, S. M., & Kelley, S. T. (2019). Effects of moderate, voluntary ethanol consumption on the rat and human gut microbiome. *Addiction Biology*, 24(4), 617-630. doi:10.1111/adb.12626
- Kuntsche, E., & Gmel, G. (2013). *Alcohol consumption in late adolescence and early adulthood where is the problem?*. Switzerland: Swiss medical weekly. doi:10.4414/smw.2013.13826

- Lahti, L., Shetty, S., & et al. (2019). Tools for microbiome analysis in R. microbiome package version 1.7.21. *Bioconductor*, Retrieved from <http://microbiome.github.com/microbiome>
- Lamas-Paz, A., Morán, L., Peng, J., Salinas, B., López-Alcántara, N., Sydor, S., . . . Cubero, F. J. (2020). Intestinal epithelial cell-derived extracellular vesicles modulate hepatic injury via the gut-liver axis during acute alcohol injury. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 603771. doi:10.3389/fphar.2020.603771
- Lambert, J. C., Zhou, Z., Wang, L., Song, Z., McClain, C. J., & Kang, Y. J. (2003). Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *305*(3), 880-886. doi:10.1124/jpet.102.047852
- Lamont, M. G., McCallum, P., Head, N., Blundell, J., & Weber, J. T. (2020). Binge drinking in male adolescent rats and its relationship to persistent behavioral impairments and elevated proinflammatory/proapoptotic proteins in the cerebellum. *Psychopharmacology*, *237*(5), 1305-1315. doi:10.1007/s00213-020-05458-3
- Lee, J., Ha, J. S., Park, H., & Lee, E. (2020). Alteration of gut microbiota composition by short-term low-dose alcohol intake is restored by fermented rice liquor in mice. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *128*, 108800. doi:10.1016/j.foodres.2019.108800
- Lees, B., Mewton, L., Stapinski, L. A., Squeglia, L. M., Rae, C. D., & Teesson, M. (2019). Neurobiological and cognitive profile of young binge drinkers: A systematic review and meta-analysis. *Neuropsychology Review*, *29*(3), 357-385. doi:10.1007/s11065-019-09411-w
- Litwinowicz, K., Choroszy, M., & Waszczuk, E. (2019). Changes in the composition of the human intestinal microbiome in alcohol use disorder: A systematic review. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, *46*(1), 4-12. doi:10.1080/00952990.2019.1669629
- Luissint, A., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., & Couraud, P. (2012). Tight junctions at the blood brain barrier: Physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids and Barriers of the CNS*, *9*(1), 23. doi:10.1186/2045-8118-9-23
- Ma, T. Y., Nguyen, D., Bui, V., Nguyen, H., & Hoa, N. (1999). Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *American Journal of Physiology*, *39*(4), G965. doi:10.1152/ajpgi.1999.276.4.G965
- Macpherson, A. J., Yilmaz, B., Limenitakis, J. P., & Ganai-Vonarburg, S. C. (2018). IgA function in relation to the intestinal microbiota. *Annual Review of Immunology*, *36*, 359-381. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053238
- Majchrowicz, E. (1975). Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacologia*, *43*(3), 245-254. doi:10.1007/BF00429258
- Maldonado-Contreras, A., & McCormick, B. (2011). Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. *Cell and Tissue Research*, *343*(1), 5-12. doi:10.1007/s00441-010-1082-5
- Marshall, S. A., McClain, J. A., Kelso, M. L., Hopkins, D. M., Pauly, J. R., & Nixon, K. (2013). Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. *Neurobiology of Disease*, *54*, 239-251. doi:10.1016/j.nbd.2012.12.016
- Marshall, S. A., Geil, C. R., & Nixon, K. (2016). Prior binge ethanol exposure potentiates the microglial response in a model of alcohol-induced neurodegeneration. *Brain Sciences*, *6*(2) doi:10.3390/brainsci6020016
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, *17*(1), 10-12. doi:10.14806/ej.17.1.200
- Martín-Hernández, D., Caso, J. R., Bris, Á G., Maus, S. R., Madrigal, J. L. M., García-Bueno, B., . . . Leza, J. C. (2016). Bacterial translocation affects intracellular neuroinflammatory pathways in a depression-like model in rats. *Neuropharmacology*, *103*, 122-133. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.12.003

- Mascia, P., Pistis, M., Justinova, Z., Panlilio, L. V., Luchicchi, A., Lecca, S., . . . Goldberg, S. R. (2011). Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors. *Biological Psychiatry*, 69(7), 633-641. doi:10.1016/j.biopsych.2010.07.009
- Mayneris-Perxachs, J., Castells-Nobau, A., Arnoriaga-Rodríguez, M., Garre-Olmo, J., Puig, J., Ramos, R., . . . , Fernández-Real, J.M. (2022). Caudovirales bacteriophages are associated with improved executive function and memory in flies, mice, and humans. *Cell Host Microbe*, 1931-3128(22)00049-X. doi: 10.1016/j.chom.2022.01.013.
- McClain, J. A., & Nixon, K. (2016). Alcohol induces parallel changes in hippocampal histone H3 phosphorylation and c-fos protein expression in male rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 40(1), 102-112. doi:10.1111/acer.12933
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*, 8(4), e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217
- Mesa, M. D., Loureiro, B., Iglesia, I., Fernandez Gonzalez, S., Llurba Olivé, E., García Algar, O., . . . Cabañas, F. (2020). The evolving microbiome from pregnancy to early infancy: A comprehensive review. *Nutrients*, 12(1), 133. doi:10.3390/nu12010133
- Michaud, E., Mastrandrea, C., Rochereau, N., & Paul, S. (2020). Human secretory IgM: An elusive player in mucosal immunity. *Trends in Immunology*, 41(2), 141-156. doi:10.1016/j.it.2019.12.005
- Michel, L., & Prat, A. (2016). One more role for the gut: Microbiota and blood brain barrier. *Annals of Translational Medicine*, 4(1), 15. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.10.16
- Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Du, Z., Struve, C., Charbon, G., Karczewski, J., Krogfelt, K. A., . . . Wells, J. M. (2016). Secretion of alpha-hemolysin by escherichia coli disrupts tight junctions in ulcerative colitis patients. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7, e149. doi:10.1038/ctg.2016.3
- Monroe, P., Vlahcevic, Z. R., & Swell, L. (1981). Effects of acute and chronic ethanol intake on bile acid metabolism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 5(1), 92-100. doi:10.1111/j.1530-0277.1981.tb04871.x
- Montesinos, J., Alfonso-Loeches, S., & Guerri, C. (2016). Impact of the innate immune response in the actions of ethanol on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res*, 40(11):2260-2270. doi:10.1111/acer.13208
- Montesinos, J., Pascual, M., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., & Guerri, C. (2016). Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. *Brain, Behavior, and Immunity*, 53, 159-171. doi:10.1016/j.bbi.2015.12.006
- Morais, L. H., Screiber, H. L., & Mazmanian, S. K. (2020). The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology*, 19, 241–255. doi:10.1038/s41579-020-00460-0
- Morris, S. A., Kelso, M. L., Liput, D. J., Marshall, S. A., & Nixon, K. (2010). Similar withdrawal severity in adolescents and adults in a rat model of alcohol dependence. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 44(1), 89-98. doi:10.1016/j.alcohol.2009.10.017
- Mu, C., Yang, Y., & Zhu, W. (2016). Gut microbiota: The brain peacekeeper. *Frontiers in Microbiology*, 7, 345. doi:10.3389/fmicb.2016.00345
- Muneer, P. M., Alikunju, S., Szlachetka, A., & Haorah, J. (2012). The mechanisms of cerebral vascular dysfunction and neuroinflammation by MMP-mediated degradation of VEGFR-2 in alcohol ingestion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(5), 1167-1177. doi:10.1161/ATVBAHA.112.247668
- Murty, V. P., Calabro, F., & Luna, B. (2016). The role of experience in adolescent cognitive development: Integration of executive, memory, and mesolimbic systems. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 70, 46-58. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.07.034

- Mutlu, E. A., Keshavarzian, A., Engen, P., Forsyth, C. B., Sikaroodi, M., & Gillevet, P. (2009). Intestinal dysbiosis: A possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 33(10), 1836-1846. doi:10.1111/j.1530-0277.2009.01022.x
- Mutlu, E. A., Gillevet, P. M., Rangwala, H., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Engen, P. A., . . . Keshavarzian, A. (2012). Colonic microbiome is altered in alcoholism. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9), 966-978. doi:10.1152/ajpgi.00380.2011
- Napolitano, L. M., Koruda, M. J., Zimmerman, K., McCowan, K., Chang, J., & Meyer, A. A. (1995). Chronic ethanol intake and burn injury: Evidence for synergistic alteration in gut and immune integrity. *The Journal of Trauma*, 38(2), 198-207. doi:10.1097/00005373-199502000-00008
- Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., & Foster, J. A. (2011). Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 23(3), 64, e119. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x
- Neyrinck, A. M., Etxeberria, U., Taminiau, B., Daube, G., Hul, M. V., Everard, A., . . . Delzenne, N. M. (2016). Rhubarb extract prevents hepatic inflammation induced by acute alcohol intake, an effect related to the modulation of the gut microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research*, doi:10.1002/mnfr.201500899
- NIAAA. (2004). NIAAA council approves definition of binge drinking, NIAAA newsletter, no. 3. *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*
- Nielsen, M. J., Petersen, G., Astrup, A., & Hansen, H. S. (2004). Food intake is inhibited by oral oleoylethanolamide. *Journal of Lipid Research*, 45(6), 1027-1029. doi:10.1194/jlr.C300008-JLR200
- Nighot, M., Nighot, P., Al-Sadi, R., Guo, S., Rawat, M., Watterson, M. D., & Ma, T. Y. (2017). Lipopolysaccharide-induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by toll-like receptor 4/myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) activation of myosin light chain kinase expression. *The American Journal of Pathology*, 187(12), 2698-2710. doi:10.1016/j.ajpath.2017.08.005
- Nixon, K., & McClain, J. A. (2010). Adolescence as a critical window for developing an alcohol use disorder: Current findings in neuroscience. *Current Opinion in Psychiatry*, 23(3), 227-232. doi:10.1097/YCO.0b013e32833864fe
- Obermeier, B., Verma, A., & Ransohoff, R. M. (2016). The blood-brain barrier. *Handbook of clinical neurology*, 133, 39-59. doi:10.1016/B978-0-444-63432-0.00003-7
- Obernier, J. A., Bouldin, T. W., & Crews, F. T. (2002a). Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(4), 547-557. doi:10.1111/j.1530-0277.2002.tb02573.x
- Obernier, J. A., White, A. M., Swartzwelder, H. S., & Crews, F. T. (2002b). Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 72(3), 521-532. doi:S0091305702007153
- Okamoto, Y., Tsuboi, K., & Ueda, N. (2009). Enzymatic formation of anandamide. *Vitamins and Hormones*, 81, 1-24. doi:10.1016/S0083-6729(09)81001-7
- O'Mahony, S. M., Marchesi, J. R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A., Quigley, E. M. M., . . . Dinan, T. G. (2009). Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: Implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biological Psychiatry*, 65(3), 263-267. doi:10.1016/j.biopsych.2008.06.026
- Orio, L., Alen, F., Pavón, F. J., Serrano, A., & García-Bueno, B. (2019). Oleoylethanolamide, neuroinflammation, and alcohol abuse. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 490. doi:10.3389/fnmol.2018.00490
- Orio, L., Anton, M., Rodriguez-Rojo, I. C., Correias, A., Garcia-Bueno, B., Corral, M., . . . Cadaveira, F. (2018). Young alcohol binge drinkers have elevated blood endotoxin,

- peripheral inflammation and low cortisol levels: Neuropsychological correlations in women. *Addiction Biology*, 23(5):1130-1144. doi:10.1111/adb.12543
- Orio, L., Pavon, F. J., Blanco, E., Serrano, A., Araos, P., Pedraz, M., . . . de Fonseca, F. R. (2013). Lipid transmitter signaling as a new target for treatment of cocaine addiction: New roles for acylethanolamides and lysophosphatidic acid. *Current Pharmaceutical Design*, 19(40), 7036-7049. doi:CPD-Epub-20130405-4
- Panduro, A., Rivera-Iniguez, I., & Sepulveda-Villegas, M. (2017). Genes, emotions and gut microbiota: The next frontier for the gastroenterologist. *World J Gastroenterol.*, (17), 3030-3042. doi:10.3748/wjg.v23.i17.3030
- Park, J., Wang, Q., Wu, Q., Mao-Draayer, Y., & Kim, C. H. (2019). Bidirectional regulatory potentials of short-chain fatty acids and their G-protein-coupled receptors in autoimmune neuroinflammation. *Scientific Reports*, 9(1), 17511-2. doi:10.1038/s41598-019-54276-x
- Pascual, M., Blanco, A. M., Cauli, O., Minarro, J., & Guerri, C. (2007). Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *The European Journal of Neuroscience*, 25(2), 541-550. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05298.x
- Pascual, M., Montesinos, J., & Guerri, C. (2018). Role of the innate immune system in the neuropathological consequences induced by adolescent binge drinking. *Journal of Neuroscience Research*, 96(5), 765-780. doi:10.1002/jnr.24203
- Pascual, M., Montesinos, J., Marcos, M., Torres, J., Costa-Alba, P., García-García, F., . . . Guerri, C. (2017). Gender differences in the inflammatory cytokine and chemokine profiles induced by binge ethanol drinking in adolescence. *Addiction Biology*, 22(6), 1829-1841. doi:10.1111/adb.12461
- Paulson, J. N., Talukder, H., Pop, M., & Bravo, H. C. (2013). metagenomeSeq: Statistical analysis for sparse high-throughput sequencing. bioconductor package: 1.24.1. Retrieved from <http://cbcb.umd.edu/software/metagenomeSeq>
- Pavón, F. J., Araos, P., Pastor, A., Calado, M., Pedraz, M., Campos-Cloute, R., . . . Rodríguez de Fonseca, F. (2013). Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: Impact of psychiatric comorbidity. *Addiction Biology*, 18(6), 955-969. doi:10.1111/adb.12107
- Pedraz, M., Araos, P., García-Marchena, N., Serrano, A., Romero-Sanchiz, P., Suárez, J., . . . Pavón, F. J. (2015). Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. *Frontiers in Psychiatry*, 6, 17. doi:10.3389/fpsyt.2015.00017.
- Persson, J., Berg, N. O., Sjolund, K., Stenling, R., & Magnusson, P. H. (1990). Morphologic changes in the small intestine after chronic alcohol consumption. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 25(2), 173-184. doi:10.3109/00365529009107940
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews: Immunology*, 14(3), 141-153. doi:10.1038/nri3608
- Plaza-Zabala, A., Berrendero, F., Suarez, J., Bermudez-Silva, F. J., Fernandez-Espejo, E., Serrano, A., . . . Robledo, P. (2010). Effects of the endogenous PPAR-alpha agonist, oleoylethanolamide on MDMA-induced cognitive deficits in mice. *Synapse (New York, N.Y.)*, 64(5), 379-389. doi:10.1002/syn.20733
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730-732. doi:10.1038/266730a0
- Preedy, V. R., Marway, J. S., Siddiq, T., Ansari, F. A., Hashim, I. A., & Peters, T. J. (1993). Gastrointestinal protein turnover and alcohol misuse. *Drug Alcohol Depend*, 34(1):1-10. doi:10.1016/0376-8716(93)90040-W
- Provinsi, G., Fabbri, R., Munari, L., Costa, A., Baldi, E., Bucherelli, C., . . . Passani, M. B. (2017). Histaminergic neurotransmission as a gateway for the cognitive effect of oleoylethanolamide in contextual fear conditioning. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20(5), 392-399. doi:10.1093/ijnp/pyw110

- Qamar, N., Castano, D., Patt, C., Chu, T., Cottrell, J., & Chang, S. L. (2019). Meta-analysis of alcohol induced gut dysbiosis and the resulting behavioral impact. *Behavioural Brain Research*, 376, 112196. doi:10.1016/j.bbr.2019.112196
- Rea, K., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiology of Stress*, 4, 23-33. doi:10.1016/j.ynstr.2016.03.001
- Reyes, R. E. N., Al Omran, A. J., Davies, D. L., & Asatryan, L. (2020). Antibiotic-induced disruption of commensal microbiome linked to increases in binge-like ethanol consumption behavior. *Brain Research*, 1747, 147067. doi:10.1016/j.brainres.2020.147067
- Ridlon, J. M., Kang, D., Hylemon, P. B., & Bajaj, J. S. (2015). Gut microbiota, cirrhosis, and alcohol regulate bile acid metabolism in the gut. *Digestive Diseases*, 33(3), 338-345. doi:10.1159/000371678
- Rieder, R., Wisniewski, P. J., Alderman, B. L., & Campbell, S. C. (2017). Microbes and mental health: A review. *Brain, Behavior, and Immunity*, doi:10.1016/j.bbi.2017.01.016
- Risher, M., Fleming, R. L., Risher, W. C., Miller, K. M., Klein, R. C., Wills, T., . . . Swartzwelder, H. S. (2015). Adolescent intermittent alcohol exposure: Persistence of structural and functional hippocampal abnormalities into adulthood. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 39(6), 989-997. doi:10.1111/acer.12725
- Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gomez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., . . . Piomelli, D. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 414(6860), 209-212. doi:10.1038/35102582
- Rodriguez-Gonzalez, A., & Orio, L. (2020). Microbiota and alcohol use disorder: Are psychobiotics a novel therapeutic strategy? *Current Pharmaceutical Design*, 26(20), 2426-2437. doi:10.2174/1381612826666200122153541
- Romano, A., Gallelli, C. A., Koczwara, J. B., Braegger, F. E., Vitalone, A., Falchi, M., . . . Gaetani, S. (2017). Role of the area postrema in the hypophagic effects of oleoylethanolamide. *Pharmacological Research*, 122, 20-34. doi:10.1016/j.phrs.2017.05.017
- Romero, I. A., Radewicz, K., Jubin, E., Michel, C. C., Greenwood, J., Couraud, P., & Adamson, P. (2003). Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neuroscience Letters*, 344(2), 112-116. doi:10.1016/S0304-3940(03)00348-3
- Romero-Sanchiz, P., Nogueira-Arjona, R., Pastor, A., Araos, P., Serrano, A., Boronat, A., . . . Rodríguez de Fonseca, F. (2019). Plasma concentrations of oleoylethanolamide in a primary care sample of depressed patients are increased in those treated with selective serotonin reuptake inhibitor-type antidepressants. *Neuropharmacology*, 149, 212-220. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.02.026
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 9(5), 313-323. doi:10.1038/nri2515
- Rubio-Araiz, A., Porcu, F., Pérez-Hernández, M., García-Gutiérrez, M. S., Aracil-Fernández, M. A., Gutierrez-López, M. D., . . . Colado, M. I. (2017). Disruption of blood-brain barrier integrity in postmortem alcoholic brain: Preclinical evidence of TLR4 involvement from a binge-like drinking model. *Addiction Biology*, 22(4), 1103-1116. doi:10.1111/adb.12376
- Sacks, J. J., Gonzales, K. R., Bouchery, E. E., Tomedi, L. E., & Brewer, R. D. (2015). 2010 national and state costs of excessive alcohol consumption. *American Journal of Preventive Medicine*, 49(5), e73-e79. doi:10.1016/j.amepre.2015.05.031
- SAMHSA. (2017). Key substance use and mental health indicators in the united states: Results from the 2016 national survey on drug use and health. *HHS Publication No. SMA17-5044, NSDUH Series H-52*. Rockville, MD: Center for Behavioral Health Statistics and Quality, Substance Abuse and Mental Health Services Administration.

- Sampson, T., & Mazmanian, S. (2015). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 565-576. doi:10.1016/j.chom.2015.04.011
- Samuelson, D. R., Gu, M., Shellito, J. E., Molina, P. E., Taylor, C. M., Luo, M., & Welsh, D. A. (2019). Intestinal microbial products from Alcohol-Fed mice contribute to intestinal permeability and peripheral immune activation. *Alcohol Clin Exp Res*, 43(10):2122-2133. doi:10.1111/acer.14176
- Sarkar, A., Harty, S., Lehto, S. M., Moeller, A. H., Dinan, T. G., Dunbar, R. I. M., . . . Burnet, P. W. J. (2018). The microbiome in psychology and cognitive neuroscience. *Trends in Cognitive Sciences*, 22(7), 611-636. doi:10.1016/j.tics.2018.04.006
- Sarkar, A., Lehto, S. M., Harty, S., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Burnet, P. W. J. (2016). Psychobiotics and the manipulation of Bacteria–Gut–Brain signals. *Trends in Neurosciences*, 39(11), 763-781. doi:10.1016/j.tins.2016.09.002
- Sayd, A., Anton, M., Alen, F., Caso, J. R., Pavon, J., Leza, J. C., . . . Orio, L. (2015). Systemic administration of oleoylethanolamide protects from neuroinflammation and anhedonia induced by LPS in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, 18(6), 10.1093/jnp/pyu111. doi:10.1093/jnp/pyu111
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60
- Sellers, R. S., & Morton, D. (2014). The colon. *Toxicologic Pathology*, 42(1), 67-81. doi:10.1177/0192623313505930
- Seth, A., Basuroy, S., Sheth, P., & Rao, R. K. (2004). L-glutamine ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in caco-2 cell monolayer. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(3), 510. doi:10.1152/ajpgi.00058.2004
- Sharma, R., Sahota, P., & Thakkar, M. M. (2021). Rats exposed to chronic alcohol display protracted insomnia and daytime sleepiness-like behavior during alcohol withdrawal☆. *Physiology & Behavior*, 228, 113200. doi:10.1016/j.physbeh.2020.113200
- Sharma, R., Sharma, A., Sahota, P., & Thakkar, M. M. (2020). Orexin gene expression is downregulated in alcohol dependent rats during acute alcohol withdrawal. *Neuroscience Letters*, 739, 135347. doi:10.1016/j.neulet.2020.135347
- Sheth, P., Seth, A., Atkinson, K. J., Gheyi, T., Kale, G., Giorgianni, F., . . . Rao, R. (2007). Acetaldehyde dissociates the PTP1B-E-cadherin-beta-catenin complex in caco-2 cell monolayers by a phosphorylation-dependent mechanism. *The Biochemical Journal*, 402(2), 291. doi:10.1042/BJ20060665
- Shifflett, D. E., Clayburgh, D. R., Koutsouris, A., Turner, J. R., & Hecht, G. A. (2005). Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure in vivo. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 85(10), 1308-1324. doi:10.1038/labinvest.3700330
- Shindo, K., Machida, M., Miyakawa, K., & Fukumura, M. (1993). A syndrome of cirrhosis, achlorhydria, small intestinal bacterial overgrowth, and fat malabsorption. *The American Journal of Gastroenterology*, 88(12), 2084-2091.
- Shukla, S. D., Pruett, S. B., Szabo, G., & Arteel, G. E. (2013). Binge ethanol and liver: New molecular developments. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(4), 550-557. doi:10.1111/acer.12011
- Singh, A. K., Jiang, Y., Gupta, S., & Benlhabib, E. (2007). Effects of chronic ethanol drinking on the blood–brain barrier and ensuing neuronal toxicity in alcohol-preferring rats subjected to intraperitoneal LPS injection. *Alcohol and Alcoholism*, 42(5), 385-399. doi:10.1093/alcalc/agl120
- Sivaprakasam, S., Prasad, P. D., & Singh, N. (2016). Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacology & Therapeutics*, 164, 144-151. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.04.007

- Smaga, I., Bystrowska, B., Gawlinski, D., Pomiermy, B., Stankowicz, P., & Filip, M. (2014). Antidepressants and changes in concentration of endocannabinoids and N-acylethanolamines in rat brain structures. *Neurotoxicity Research*, 26(2), 190-206. doi:10.1007/s12640-014-9465-0
- Souza, H. S., Elia, C. C., Braulio, V. B., Côrtes, M. Q., Furtado, V. C., Garrofé, H. C., & Martinusso, C. A. (2003). Effects of ethanol on gut-associated lymphoid tissues in a model of bacterial translocation: A possible role of apoptosis. *Alcohol*, 30(3), 183-91. doi:10.1016/s0741-8329(03)00134-4
- Spear, L. P. (2018). Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour. *Nature Reviews. Neuroscience*, 19(4), 197-214. doi:10.1038/nrn.2018.10
- Stärkel, P., Leclercq, S., de Timary, P., & Schnabl, B. (2018). Intestinal dysbiosis and permeability: The yin and yang in alcohol dependence and alcoholic liver disease. *Clin Sci (Lond)*, 132(2), 199-212. doi:10.1042/CS20171055
- Strong, M. N., Yoneyama, N., Fretwell, A. M., Snelling, C., Tanchuck, M. A., & Finn, D. A. (2010). "Binge" drinking experience in adolescent mice shows sex differences and elevated ethanol intake in adulthood. *Hormones and Behavior*, 58(1), 82-90. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.10.008
- Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(4), 631-659. doi:10.1007/s00018-012-1070-x
- Szabo, G., & Lippai, D. (2014). Converging actions of alcohol on liver and brain immune signaling. *International review of neurobiology*, 118:359-80. doi:10.1016/B978-0-12-801284-0.00011-7
- Tajes, M., Ramos-Fernandez, E., Weng-Jiang, X., Bosch-Morato, M., Guivernau, B., Eraso-Pichot, A., . . . Munoz, F. J. (2014). The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Molecular Membrane Biology*, 31(5), 152-167. doi:10.3109/09687688.2014.937468
- Tajuddin, N., Moon, K., Marshall, S. A., Nixon, K., Neafsey, E. J., Kim, H., & Collins, M. A. (2014). Neuroinflammation and neurodegeneration in adult rat brain from binge ethanol exposure: Abrogation by docosahexaenoic acid. *PloS One*, 9(7), e101223. doi:10.1371/journal.pone.0101223
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., & Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *Plos One*, 9(8), e105592. doi:10.1371/journal.pone.0105592
- Tamai, H., Kato, S., Horie, Y., Ohki, E., Yokoyama, H., & Ishii, H. (2000). Effect of acute ethanol administration on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 24(3), 390-394.
- Tamai, H., Horie, Y., Kato, S., Yokoyama, H., & Ishii, H. (2002). Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysaccharides in rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 26(8 Suppl), 75S-80S. doi:10.1097/01.ALC.0000026981.32386.FD
- Tamburini, E., Doni, L., Lussu, R., Meloni, F., Cappai, G., Carucci, A., . . . Vitali, F. (2020). Impacts of anthropogenic pollutants on benthic prokaryotic communities in mediterranean touristic ports. *Frontiers in Microbiology*, 11:1234. doi:10.3389/fmicb.2020.01234
- Tang, Q., Jin, G., Wang, G., Liu, T., Liu, X., Wang, B., & Cao, H. (2020). Current sampling methods for gut microbiota: A call for more precise devices. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 151. doi:10.3389/fcimb.2020.00151
- Tang, Y., Banan, A., Forsyth, C. B., Fields, J. Z., Lau, C. K., Zhang, L. J., & Keshavarzian, A. (2008). Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 32(2), 355-364. doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00584.x
- Thompson, K. J., Nazari, S. S., Jacobs, W. C., Grahame, N. J., & Mckillop, I. H. (2017). Use of a crossed high alcohol preferring (cHAP) mouse model with the NIAAA-model of chronic-

- binge ethanol intake to study liver injury. *Alcohol Alcohol*, 52(6):629-637. doi:10.1093/alcalc/agx063
- Tordesillas, L., & Berin, M. C. (2018). Mechanisms of oral tolerance. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 55(2), 107-117. doi:10.1007/s12016-018-8680-5
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 799-809. doi:10.1038/nri2653
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1843(11), 2563-2582. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014
- Ueda, N., Tsuboi, K., & Uyama, T. (2013). Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: Canonical and alternative pathways. *The FEBS Journal*, 280(9), 1874-1894. doi:10.1111/febs.12152
- Ueda, N., Tsuboi, K., & Uyama, T. (2010). Enzymological studies on the biosynthesis of N-acylethanolamines. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(12), 1274-1285. doi:10.1016/j.bbalip.2010.08.010
- Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K. M., Ruhn, K. A., Yu, X., Koren, O., . . . Hooper, L. V. (2011). The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*, 334(6053), 255-258. doi:10.1126/science.1209791
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 60, 1-12. doi:10.1016/j.bbi.2016.03.010
- Vassallo, G., Mirijello, A., Ferrulli, A., Antonelli, M., Landolfi, R., Gasbarrini, A., & Addolorato, G. (2015). Review article: Alcohol and gut microbiota - the possible role of gut microbiota modulation in the treatment of alcoholic liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 41(10), 917-927. doi:10.1111/apt.13164
- Vetreno, R. P., Massey, V., & Crews, F. T. (2021). Long-lasting microbial dysbiosis and altered enteric neurotransmitters in adult rats following adolescent binge ethanol exposure. *Addiction Biology*, 26(1), e12869. doi:10.1111/adb.12869
- Vetreno, R. P., Yaxley, R., Paniagua, B., Johnson, G. A., & Crews, F. T. (2017). Adult rat cortical thickness changes across age and following adolescent intermittent ethanol treatment. *Addiction Biology*, 22(3), 712-723. doi:10.1111/adb.12364
- Visapaa, J. P., Tillonen, J., & Salaspuro, M. (2002). Microbes and mucosa in the regulation of intracolonic acetaldehyde concentration during ethanol challenge. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 37(4), 322-326. doi:10.1093/alcalc/37.4.322
- Wang, H. X., & Wang, Y. P. (2016). Gut microbiota-brain axis. *Chinese Medical Journal*, 129(19), 2373-2380. doi:10.4103/0366-6999.190667
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267. doi:10.1128/AEM.00062-07
- Wang, S., Harvey, L., Martin, R., van der Beek, Eline M, Knol, J., Cryan, J. F., & Renes, I. B. (2018). Targeting the gut microbiota to influence brain development and function in early life. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 95, 191-201. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.09.002
- Wang, W., Xu, M., Cai, Y., Zhou, Z., Cao, H., Mukhopadhyay, P., . . . Gao, B. (2017). Inflammation is independent of steatosis in a murine model of steatohepatitis. *Hepatology*, 66(1), 108-123. doi:10.1002/hep.29129
- Waszkiewicz, N., Galińska-Skok, B., Nestsiarovich, A., Kułak-Bejda, A., Wilczyńska, K., Simonienko, K., . . . Konarzewska, B. (2018). Neurobiological effects of binge drinking help in its detection and differential diagnosis from alcohol dependence. *Disease Markers*, 2018, 5623683-9. doi:10.1155/2018/5623683

- WHO. (2018). World health organization. global status report on alcohol and health 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0/IGO., Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274603>
- Xiao, H., Ge, C., Feng, G., Li, Y., Li, H., Luo, D., . . . Fan, S. (2018). Gut microbiota modulates alcohol withdrawal-induced anxiety in mice. *Toxicology Letters*, 287, 23-30. doi:10.1016/j.toxlet.2018.01.021
- Yan, A. W., Fouts, D. E., Brandl, J., Starkel, P., Torralba, M., Schott, E., . . . Schnabl, B. (2011). Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology*, doi:10.1002/hep.24018
- Yao, E., Zhang, G., Huang, J., Yang, X., Peng, L., Huang, X., . . . Jin, X. (2019). Immunomodulatory effect of oleoylethanolamide in dendritic cells via TRPV1/AMPK activation. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 18392-18407. doi:10.1002/jcp.28474
- Yao, Y., Han, X., Li, Z., Lian, L., Nan, J., & Wu, Y. (2017). Acanthoic acid can partially prevent alcohol exposure-induced liver lipid deposition and inflammation. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 134. doi:10.3389/fphar.2017.00134
- Yu, Q., & Yang, Q. (2009). Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier. *Cell Biology International*, 33(1), 78-82. doi:10.1016/j.cellbi.2008.09.007
- Zahr, N. M., Luong, R., Sullivan, E. V., & Pfefferbaum, A. (2010). Measurement of serum, liver, and brain cytokine induction, thiamine levels, and hepatopathology in rats exposed to a 4-Day alcohol binge protocol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(11), 1858-1870. doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01274.x
- Zhao, Y., Wang, F., Fan, Y., Ping, G., Yang, J., & Wu, C. (2013). Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behavioural Brain Research*, 236(1), 270-282. doi:10.1016/j.bbr.2012.08.052
- Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., . . . Xie, P. (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Molecular Psychiatry*, 21(6), 786-796. doi:10.1038/mp.2016.44
- Zhou, Y., Qin, H., Zhang, M., Shen, T., Chen, H., Ma, Y., . . . Liu, Z. (2010). Lactobacillus plantarum inhibits intestinal epithelial barrier dysfunction induced by unconjugated bilirubin. *The British Journal of Nutrition*, 104(3), 390-401. doi:10.1017/S0007114510000474
- Zhou, Y., Yang, L., Ma, A., Zhang, X., Li, W., Yang, W., . . . Jin, X. (2012). Orally administered oleoylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Neuropharmacology*, 63(2), 242-249. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.03.008
- Zhu, Y., Li, H., Xu, X., Li, C., & Zhou, G. (2016). The gut microbiota in young and middle-aged rats showed different responses to chicken protein in their diet. *BMC Microbiol*, 16(1):281. doi:10.1186/s12866-016-0895-0
- Zolezzi, J. M., Santos, M. J., Bastías-Candia, S., Pinto, C., Godoy, J. A., & Inestrosa, N. C. (2017). PPARs in the central nervous system: Roles in neurodegeneration and neuroinflammation. *Biological Reviews*, 92(4), 2046-2069. doi:10.1111/brv.12320
- Zólkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., & Feleszko, W. (2020). Postbiotics? A step beyond pre- and probiotics. *Nutrients*, 12(8) doi:10.3390/nu12082189

X) ANEXOS



Los principales resultados de esta tesis doctoral están recogidos en las siguientes publicaciones:

Artículo 1

Rodríguez-González, A. *, Vitali, F. *, Moya, M., De Filippo, C., Passani, M.B., & Orio, L. (2021). Effects of alcohol binge drinking and oleoylethanolamide pretreatment in the gut microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11:731910. doi: 10.3389/fcimb.2021.731910

**Equal contribution*



Effects of Alcohol Binge Drinking and Oleoylethanolamide Pretreatment in the Gut Microbiota

Alicia Rodríguez-González^{1†}, Francesco Vitali^{2†}, Marta Moya¹, Carlotta De Filippo², Maria Beatrice Passani³ and Laura Orio^{1,4*}

¹ Laboratory of Psychobiology, Department of Psychobiology and Methods in Behavioral Science, Faculty of Psychology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, ² Institute of Agricultural Biology and Biotechnology (IBBA), National Research Council (CNR), Pisa, Italy, ³ Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Firenze, Firenze, Italy, ⁴ Red de Trastornos Adictivos (RTA), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Edoardo Puglisi,
Catholic University of the Sacred
Heart, Italy

Reviewed by:

Shiyu Tao,
Huazhong Agricultural University,
China
Maria de los Angeles Serradell,
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas (CONICET),
Argentina

*Correspondence:

Laura Orio
lorio@psi.ucm.es

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Microbiome in Health and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 28 June 2021

Accepted: 26 October 2021

Published: 23 November 2021

Citation:

Rodríguez-González A, Vitali F,
Moya M, De Filippo C, Passani MB
and Orio L (2021) Effects of Alcohol
Binge Drinking and
Oleoylethanolamide Pretreatment in
the Gut Microbiota.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:731910.
doi: 10.3389/fcimb.2021.731910

Introduction: Chronic alcohol consumption is known to cause gut dysbiosis (changes in microbiota composition and/or function, disruptive of the normal host–microbiota interactions). However, little is known about the changes that alcohol binge drinking induces in the gut microbiota. Here, we have tested the hypothesis that a protocol of alcohol binge drinking, known to induce neuroinflammation in previous studies, also promotes intestinal dysbiosis, and we explored how oleoylethanolamide (OEA, an acylethanolamide proven to counteract alcohol binge drinking-induced neuroinflammation) pretreatment modulates alcohol-induced dysbiosis.

Methods: Alcohol binges were forced by gavage three times per day during 4 consecutive days; OEA pretreatment (intraperitoneal or intragastric) was administered before each alcohol gavage. Stool microbiota composition was assessed by next-generation 16S rRNA gene sequencing, prior and after the 4-day alcohol binge protocol.

Results: Alcohol binge drinking reduced the richness of the gut microbiota and changed the microbial community, reducing *Lactobacillus* among other genera. Pretreatment with OEA in the alcohol-administered rats decreased the richness, evenness, and Shannon indices to a greater extent with respect to alcohol alone, also changing the community structure. Microbial interactions in the association network were further decreased following OEA administration in the alcohol group, with respect to the water administration. The synergistic interaction between alcohol binge and OEA was affected by the route of administration of OEA, since oral and i.p. administrations differently changed the community structure.

Conclusion: Results suggest that alcohol binge drinking produces a clear dysbiosis in animals; we observed that the well-known protective actions of OEA in the context of alcohol abuse might not be related to OEA-induced changes in alcohol-induced dysbiosis. These are observational results, and thus, further research will be needed for a complete understanding of the biological significance of the observed changes.

Keywords: fecal microbiota, alcohol, OEA, microbiome, substance abuse, binge, dysbiosis

HIGHLIGHTS

- After an alcohol binge drinking protocol (T1) in rats, we observed reduced richness of the fecal microbiota, with a distinguishable bacterial community from T0 (no treatment) and from the T1 water group. Alcohol increased the levels of *Clostridium sensu stricto*, *Romboutsia*, *Turicibacter*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides*, and *Enterococcus* and decreased the levels of *Lactobacillus*, *Clostridium* XIVa, *Clostridium* XIVb, and *Oscillibacter*.
- OEA administration in the water group slightly changed the community structure with respect to the vehicle group but did not change the α -diversity. Microbial interactions in the association network were increased following OEA administration in the water group.
- Alcohol and OEA appeared to synergistically interact with the gut microbiota. Pretreatment with OEA in the alcohol-administered rats decreased the richness, evenness, and Shannon indices and changed the community structure to a greater extent in comparison with the alcohol without OEA group. Microbial interactions in the association network were further decreased following OEA administration in the alcohol group with respect to the water group.
- The route of OEA administration had a significant effect in the altered community structure induced by alcohol. Oral OEA reduced richness and i.p. OEA created a more fragmented association network, with more non-interconnected nodes, in comparison with vehicle administration in alcohol rats.

INTRODUCTION

Alcohol abuse is a risk factor for many diseases and mortality worldwide. Alcohol binge drinking is a pattern of alcohol abuse defined as the consumption of more than four or five drinks in about 2 h for women and men, respectively, resulting in blood alcohol levels (BAL) ≥ 80 mg/dl (NIAAA, 2004). In 2015, in the National Survey on Drug Use and Health, it was shown that 26.9% of U.S. adults older than 18 years old reported binge drinking in the past 30 days (SAMHSA, 2017). Other reports indicate that 38 million of U.S. adults drink alcohol in this pattern four times per month, consuming eight drinks on average, and that half of the 88,000 deaths resulting from alcohol consumption are due to binge drinking (Kanny et al., 2015).

Alcohol binge drinking appears to promote alterations in the gut–brain axis. We have previously demonstrated that the binge drinking protocol used in this study induces gut barrier alterations, with consequences in peripheral inflammation and immune activation, neuroinflammation, and behavioral changes. On one hand, binge drinking induces colonic inflammation and a decrement of tight junction (TJ) protein expression in the colonic barrier, an indication of its loss of integrity. As a result, the cell wall component of Gram-negative bacteria, i.e., lipopolysaccharide (LPS), is found in the blood after alcohol binges, and interestingly, we also observed the passage of bacteria

from the intestinal lumen to other organs, including the mesenteric lymph nodes (MLNs) and spleen. This pattern of alcohol binge drinking strongly activates the innate and adaptive immune systems and induces peripheral inflammation and corticosterone rise in plasma (Antón et al., 2017; Antón et al., 2018). On the other hand, it is well-known that binge drinking induces neuroinflammation in the frontal cortex, which has been related to anxiety and depressive-like behavior during early withdrawal (Antón et al., 2017).

The microbiota–gut–brain axis is a bidirectional communication between the microorganisms present in the gut and the brain that uses the immune system and neural and neuroendocrine pathways (Cryan and Dinan, 2012). Gut microbiota is composed of a plethora of microorganisms (predominantly bacteria, but also archaea, viruses, fungi, and protozoa among others) that live in different niches of our gastrointestinal tract, especially in the colon, in a symbiotic relationship with the host, cooperating in different functions such as digestion, immunity, inflammation, and intestinal barrier regulation (Wang and Wang, 2016). Additionally, it has been proposed that the gut microbiota participates in the regulation of brain function, mood, and behavior through modulation of the gut–brain axis (Cryan and Dinan, 2012).

Alterations in this axis have been well documented in several brain disorders and conditions (Sherwin et al., 2018), including alcohol use disorders (AUD) (Rodríguez-González and Orio, 2020). It has been recently shown that AUD leads to gut dysbiosis in humans by altering the composition and/or function of the microbiota (Litwinowicz et al., 2019). In experimental models, alcohol generally increases bacteria from the phyla Proteobacteria and Firmicutes and decreases bacteria from the phylum Bacteroidetes (Engen et al., 2015). Alcohol-induced gut dysbiosis, together with the disrupted intestinal barrier and the LPS leakage to the systemic circulation, is associated with alcoholic liver disease, which is a leading cause of mortality worldwide (Hartmann et al., 2015; Meroni et al., 2019), and with behavioral abnormalities in alcohol-dependent subjects (Leclercq et al., 2014; Temko et al., 2017). Indeed, alcohol-induced alterations in gut microbiota may account for withdrawal symptoms such as anxiety, depression, craving, and reward-seeking behaviors (Hillemacher et al., 2018). However, alcohol consumption does not always cause gut dysbiosis, highlighting that there may be other factors involved (Mutlu et al., 2012; Timary et al., 2015) and that patterns of alcohol consumption must be taken into account. The actions of binge drinking on neuroinflammation are very well known, and we recently described binge drinking-induced dysfunction of the gut barrier that may influence cortical neuroinflammation (Antón et al., 2018; Orio, 2020; Rodríguez-González and Orio, 2020). Further research is needed to understand whether the gut–brain axis alterations induced by this pattern of alcohol consumption involve also changes in the gut microbiota composition and possible modulatory pharmacotherapies. In this sense, addressing the gut microbiota composition could offer a new therapeutic option to combat alcohol-induced neuroinflammation and toxicity.

Previous studies in Orio's laboratory showed that pharmacological pretreatment with oleoylethanolamide (OEA)

before each binge episode prevents the alcohol-induced harmful effects on the gut–brain axis. OEA showed potent anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective actions by blockade of Toll-like receptors (TLR)-4 and its agonists in the frontal cortex of rats. For example, 1) OEA ameliorates LPS-induced neuroinflammation in the frontal cortex and modulates motivated behaviors such as anhedonia (Sayd et al., 2015) and 2) OEA reduces alcohol binge-induced neuroinflammation in the frontal cortex and depressive-like behavior during abstinence (Antón et al., 2017). In Antón et al. (2018), we showed that OEA is able to reduce the leakage of bacterial components such as LPS (a TLR-4 agonist) from the gut to the blood and even the passage of whole bacteria to the MLNs, since it prevents alcohol-induced gut inflammation and decreases tight junction (TJ) proteins of the colonic barrier (Antón et al., 2018). These findings provide an exciting evidence of the participation of OEA in the dysregulation of the gut–brain axis induced by alcohol. However, the role of OEA in the modulation of microbiota composition, as part of the mentioned microbiota–gut–brain axis, has not been studied yet in the context of alcohol abuse.

Independently, Passani's and de Filippo's laboratories studied the effect of OEA administration on microbiota profile in healthy mice, showing that OEA changes the gut microbiota composition, expanding the microbial diversity, increasing Bacteroidetes, and decreasing Firmicutes, which is very similar to a lean-like phenotype fed with a fiber-rich diet (Di Paola et al., 2018). Thus, in the present study, we joined the expertise of the three previously mentioned research groups, to ascertain the specific effects of OEA pretreatment in the gut microbiota profile in the context of alcohol binge drinking consumption.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty-two young adult male Wistar rats (Envigo®, Barcelona, Spain) 8–9 weeks old, weighing around 160–220 g, were used. Rats were housed in cages in groups of three to four rats with a reverse 12-h light/dark cycle under standard temperature and humidity at the SPF Animal Care Facility of Complutense University of Madrid. Animals were allowed free access to standard food (A04 SAFE, Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France) and tap water. Rats were maintained and daily surveilled for 10 days under constant conditions before the experiments. All studies were designed in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010) and adhered to the guidelines of the Animal Welfare Committee of Complutense University of Madrid (reference: PROEX 420/15) according to European legislation (2010/63/UE). The study groups were as follows: experimental groups: T0 rats (before any treatment) and T1 groups (after treatments): water + vehicle group, water + oral/i.p. OEA group, and alcohol + oral/i.p. OEA group.

Alcohol Binge Intoxications

Alcohol (30%, v/v) or vehicle (tap water) was intragastrically administered with specific cannulae (16G needle, Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA) at a maximum of three times/day during 4 consecutive days, following a standard paradigm of alcohol binge drinking (Obernier et al., 2002; Antón et al., 2017; Antón et al., 2018). The doses were titrated by blood alcohol levels (BAL) and by the observed behavioral signs related to alcohol intoxication (Antón et al., 2017; Antón et al., 2018). The average dose of alcohol per rat was 8.30 g/kg/day in this experiment.

The number of rats per group was initially higher in the alcohol-fed groups, since this protocol often induces mortality. In this experiment, the mortality was around 8%, similar to other studies (Obernier et al., 2002; Antón et al., 2017; Antón et al., 2018).

Drugs

OEA was synthesized as described in Giuffrida et al. (2000). OEA i.p. was dissolved in 5% Tween 80 in saline (vehicle) and administered at 5 mg/kg i.p., 10 min before the alcohol binges, except for the loading initial dose that was 10 mg/kg. Control rats were injected with vehicle i.p. This protocol of OEA administration has been proven to reduce binge drinking-induced peripheral inflammation and neuroinflammation (Antón et al., 2017; Antón et al., 2018).

OEA orally administered was dissolved in 1% carboxymethylcellulose in saline and administered at 20 mg/kg i.g. (3 ml/kg) 20 min before each alcohol gavage with specific cannulae (16G needle, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). This dose of OEA oral administration has been previously shown to prevent the binge drinking-induced bacterial translocation from the intestinal lumen to other organs, such as the MLNs, as well as the passage of LPS to the systemic blood (Antón et al., 2018).

BAL Determination

Blood samples were collected (20 µl) from the rat tail 2 h after the second alcohol administration every experimental day (at 3 p.m.). BAL were measured by enzymatic reaction using electrochemical detection with AM1 Alcohol Analyzer (Analox Instruments, London, UK). This protocol of alcohol binge drinking led to a sedation/ataxia behavior and relatively constant intoxicating BAL (average alcohol levels/day: 252.42 ± 165.58 mg/dl).

Fecal Sample Collection and Bacterial Genomic DNA Extraction

Feces were collected in sterile conditions before treatments (T0) and at the end of the 4-day protocol, 3 h after the last alcohol/water administration (T1), and stored at -80°C until nucleic acid extraction. Bacterial genomic DNA was extracted using DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (Qiagen®, Hilden, Germany) following the instruction of the manufacturer. DNA quality was examined by gel electrophoresis.

16S Ribosomal DNA Sequencing

For microbiota analysis, the V3–V4 hypervariable regions of the bacterial 16S rRNA gene were amplified using a specific primer set (341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' and 805r: 5'-GACTACNVGGGTWTCTAATCC-3') (Takahashi et al., 2014). Sequencing was performed with Illumina MiSeq

(Illumina, San Diego, CA, USA) with V3 chemistry (600 cycles) with a PE 2X300 protocol at the IGA Technology Services (Udine, Italy) following their internal protocol. Raw reads data are available at the European Nucleotide Archive (ENA) database under accession number PRJEB44965.

Sequencing Data Processing and Statistical Analysis

Similar to previous reports (Butera et al., 2020; Tamburini et al., 2020), the obtained sequence libraries were pretreated by removing sequencing primer with CUTADAPT (Martin, 2011) and the low-quality ends at 5' by using Sickel (Joshi and Fass, 2011) with a quality cutoff of 20. Pretreated sequences were then analyzed using MICCA v 1.7.2 (Albanese et al., 2015) to perform joining of forward and reverse reads and to perform amplicon sequence variance (ASV) picking using the UNOISE3 algorithm (Edgar, 2016). Taxonomy assignment to representative sequences of the identified ASVs was performed using RDP classifier and database v. 2.11 (Wang et al., 2007). Data were then analyzed using R software with a variety of dedicated packages. Phyloseq v.1.28.0 (McMurdie and Holmes, 2013) was used to import and handle ASV table and taxonomy files obtained through MICCA as well as to calculate PCoA ordination analysis (using the Bray–Curtis distance measure). Rarefaction to the smallest library size was used to normalize ASV counts prior to α -diversity analysis, which was performed using the microbiome package v 1.6.0 (Lahti et al., 2017). Other analyses were performed on the cumulative sum scaling (CSS transform, followed by log2 scaling) normalized ASV count table, as implemented in the metagenomeSeq version 1.26.3 (Paulson et al., 2013). PERMANOVA analysis was performed using the vegan package and using 9,999 permutations, and comparisons in α -diversity analysis were performed with the Wilcoxon rank-sum test. To identify plausible biomarkers of sample classes, we used linear discriminant analysis effect size (LEfSe) (Segata et al., 2011) on the CSS-transformed abundances. Network inferences were obtained with SPIEC-EASI (SParse Inverse Covariance Estimation for Ecological Association Inference) (Kurtz et al., 2015) using the untransformed ASV count table. This method does not imply correlation analysis to construct microbiota networks; nevertheless, a connection between two nodes (i.e., an edge of the network) denotes a significant linear relationship between the abundance of two ASVs (i.e., nodes of the network). The microbiota interaction network was plotted with the igraph (Csardi and Nepusz, 2006) package.

RESULTS

Effects of Alcohol Binges on Gut Microbiota Profile

We firstly aimed at assessing the effects of alcohol binge drinking on the gut microbiota. To do so, analysis was focused on the subset of animals that did not receive OEA pretreatment, and the effects in the alcohol groups were checked at two time points:

before (T0) and after (T1) alcohol binge protocol. Diversity analysis results (reported in **Figure 1**) suggest that alcohol binge drinking had a major effect on the fecal microbiota. Alcohol lowered the richness of the community, which otherwise is significantly increasing from T0 to T1 in the control group (**Figure 1A**), but did not significantly affect the evenness nor the Shannon index (**Figures 1B, C**). In addition, alcohol caused a clearly distinguishable community composition in PCoA ordination analysis, with the alcohol-treated samples forming a distinct cluster along the first ordination axis, significantly different with respect to other samples (**Figure 1D**, see PERMANOVA reported as notation on the ordination graph).

As further confirmation of the strong effect of alcohol binge drinking on the fecal microbiota, we observed a high number of different genera at significantly different relative abundance values among the three sample groups (see **Supplementary Figure 1** for an overall analysis of genera which significantly changed among the three groups, as tested by one-way ANOVA analysis).

LEfSe analysis (**Figure 2**) was used to discover biomarkers associated to each of the sample groups. To identify those most likely linked to a biological effect, we inspected their relative abundance (i.e., biomarkers with very low median relative abundance in a class are less indicative of a biological effect connected to that class) as well as their frequency distribution (i.e., those markers found in all samples of a class can be considered more likely connected to a biological effect, than those found in only few samples of a class). By doing so, we identify *Clostridium sensu stricto*, *Romboutsia*, *Turicibacter*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides*, and *Enterococcus* as valuable markers for the T1 alcohol group (**Supplementary Figure 2**), and these were found to have high relative abundance levels in ethanol-administrated rats. Conversely, *Lactobacillus*, *Clostridium XIVa*, *Clostridium XIVb*, and *Oscillibacter* were found as markers of T0 samples and displayed a significantly decreasing trend in relative abundance from T0 to T1 (**Supplementary Figure 1**). As such, they could be considered as markers of the normal weaning process. However, given that their decrease in relative abundance was more evident in ethanol-administrated rats, we can attribute it to a specific effect of ethanol on these genera.

Effects of OEA Treatment on Gut Microbiota Profile

After assessing the overall effects of alcohol binge drinking on fecal microbiota, we aimed at analyzing the specific effect of OEA administration per se and in the context of alcohol binge drinking. **Figure 3** reports microbiota α - and β -diversity analysis on all sample sets. Higher richness values were observed in the groups of rats receiving water and vehicle, showing no significant difference with respect to the groups of rats receiving water and OEA, but with a significant difference with respect to samples collected at T0 and to the alcohol-receiving rats (both vehicle- and OEA-treated ones). Alternatively, the lowest richness values were observed in the

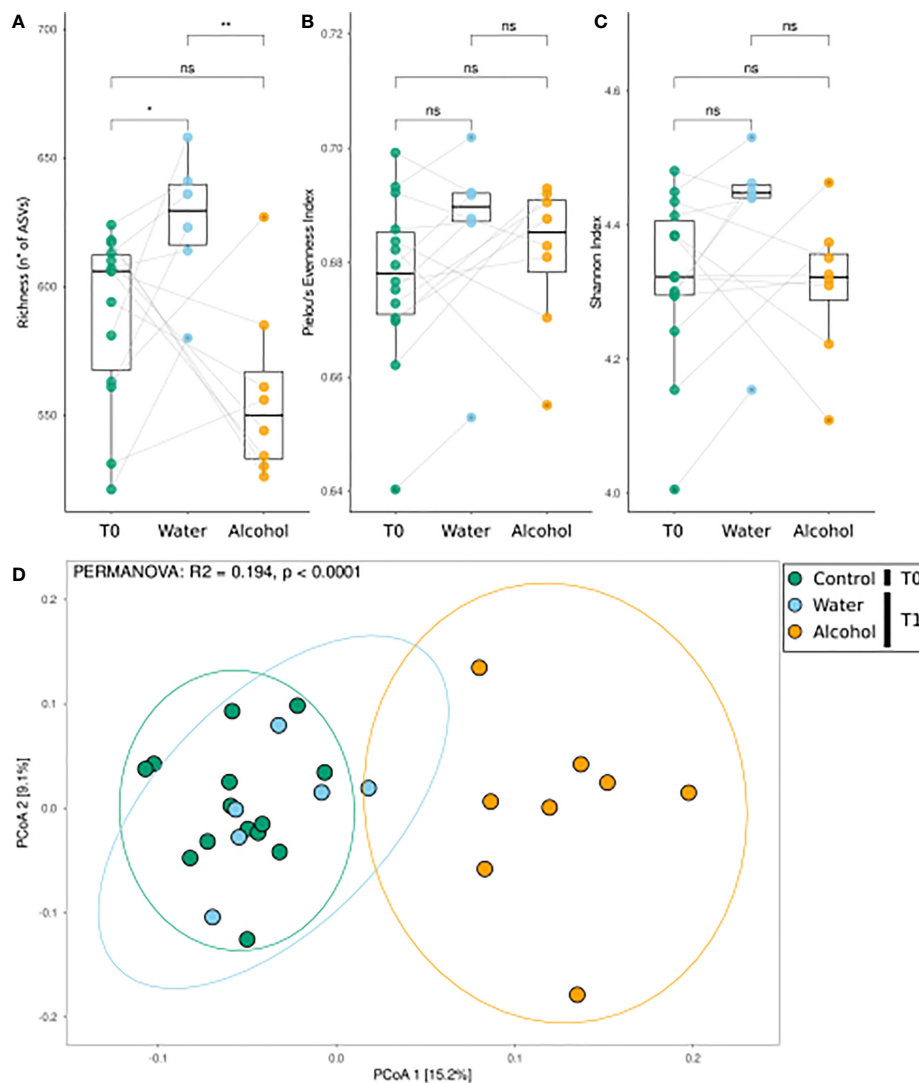


FIGURE 1 | Bacterial community response to alcohol binge drinking. Analyses were performed on the non-OEA-treated sample subset, including the T1 alcohol- and water-administered rats, and the corresponding T0 samples. **(A)** Richness [number of different amplicon sequence variants (ASVs)], **(B)** Pielou's evenness index (equitability of the distribution of relative abundances among ASVs), and **(C)** Shannon index (diversity of the community) as measures of α -diversity. Differences between groups were tested by the Wilcoxon rank-sum test and reported as notation on the plot (ns, p -value > 0.05 ; * p -value < 0.05 ; ** p -value < 0.01). Dotted lines connect the data from the same animal at the two time points for each treatment. **(D)** β -Diversity analysis with PCoA ordination using the Bray–Curtis distance measure. T0 group, $n = 14$; water group, $n = 6$; alcohol group, $n = 8$. Notation above the plots reports the result of the PERMANOVA test.

group of rats receiving alcohol and OEA (**Figure 3A**), with a statistically significant difference *versus* all the other sample groups. The evenness and Shannon indices showed similar trends as both were increased from T0 to T1 except for the group of rats receiving alcohol and OEA, which showed significantly lower values with respect to all other T1 samples and, interestingly, similar to those observed in T0 samples (untreated animals) (**Figures 3B, C**).

β -Diversity analysis (**Figure 3D**) indicated that the community was significantly different in the groups, as confirmed by PERMANOVA results (see notation above the

ordination plot in **Figure 3D**). As previously observed, water samples overlap with T0 samples (pairwise PERMANOVA between T0 and water samples were significant but showed low R^2 values; T0 *vs.* water + vehicle: $R^2 = 0.055$, p -value: 0.001; T0 *vs.* water + OEA: $R^2 = 0.062$, p -value: 0.001), showing a separation along the second ordination axis between the vehicle- and OEA-treated groups (pairwise PERMANOVA: water + vehicle *vs.* water + OEA: $R^2 = 0.098$, p -value: 0.024). Regarding alcohol-treated samples (**Figure 3D**), they are clearly separated from the others along the first ordination axis (representing 18% of total data variance), also showing a

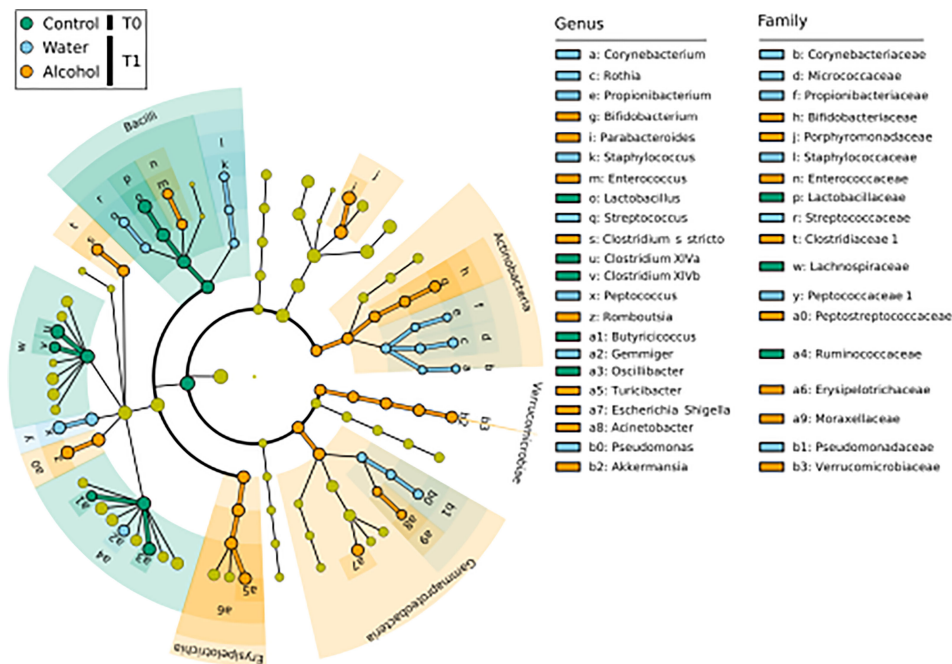


FIGURE 2 | LefSe biomarker identification for the comparison of genera relative abundance between the T1 ethanol-administered rats, the T1 water-administered rats, and the corresponding T0 samples. Significant biomarker taxon for each group was obtained with a Kruskal–Wallis test among classes ($\alpha = 0.05$), and only biomarkers with a logarithmic linear discriminant analysis score higher than 2.0 were retained. T0 group, $n = 14$; water group, $n = 6$; alcohol group, $n = 8$.

difference between OEA and vehicle treatment (pairwise PERMANOVA: alcohol + vehicle vs. alcohol + OEA: $R^2 = 0.142$, p -value: 0.001).

To further assess the effects of alcohol binge drinking and the effect of OEA administration in the gut microbiota, we used network analysis to evaluate if the complex interactions between ASVs in each group of samples were different (**Figure 4** and **Table 1**). Overall, the microbial networks in the vehicle-treated samples were most similar (**Figures 4A, C, E**). In both water and alcohol groups, the higher frequency of node degree was 4 and both networks were made of a single connected component (**Figure 4E, Table 1**), with the alcohol network resulting as slightly more complex, displaying a higher number of nodes and edges. On the other hand, OEA deeply affected the microbial network structure both in the water and in the alcohol groups, in an opposite direction. The microbial network in the OEA + water group (**Figures 4D, E, Table 1**) was the most complex, even in respect to the vehicle networks, with more relations between ASVs (the value of node degree with higher frequency was 5) and with the highest overall number of nodes (ASVs) and edges (significant relations). Notwithstanding, in the alcohol group, OEA administration (**Figures 4B, E, Table 1**) had a different effect on the microbial community, leading also to its fragmentation (see the number of components in **Table 1**). In brief, in this network, the value of node degree with higher frequency was 2 and a substantially higher frequency of nodes with node degree equal to 1 or 0 was observed, with respect to the other networks. This means that, in the alcohol + OEA network,

63% of the nodes are linked with only one or two other nodes, whereas 3% of the nodes are not related with any other nodes (unconnected nodes).

These results suggest that OEA supplementation has a significant different outcome with respect to bacterial community structure and complexity, when combined either with water or alcohol administration. The 10 most abundant genera for each OEA-receiving sample group are reported in **Table 2**. Samples are ordered based on magnitude of the difference in relative abundance between the water and the alcohol sample groups, with one-way ANOVA to test for statistically significant differences. The genera *Bacteroides*, *Escherichia/Shigella*, and *Parabacteroides* were significantly more abundant (with a difference higher than 5%) in the alcohol group, while *Clostridium XIVa*, *Lactobacillus*, and *Clostridium IV* genera were significantly more abundant (with a difference higher than 5%) in the water group.

We next evaluated the effect of alcohol binge drinking and OEA pretreatment on the community composition at the genus level by identifying taxa found at significant different abundance, using LefSe analysis. As shown in **Figure 5**, comparing alcohol-receiving samples with either OEA or vehicle pretreatment, numerous different taxa showed significantly different relative abundance in the two sample classes. Among them, members of the Firmicutes phylum and, in particular, four genera (*Butyrivibrio*, *Clostridium IV*, *Gemmiger*, and *Ruminococcus*) of the *Ruminococcaceae* family, as well as the genus *Bifidobacterium* of the Actinobacteria phylum, were more

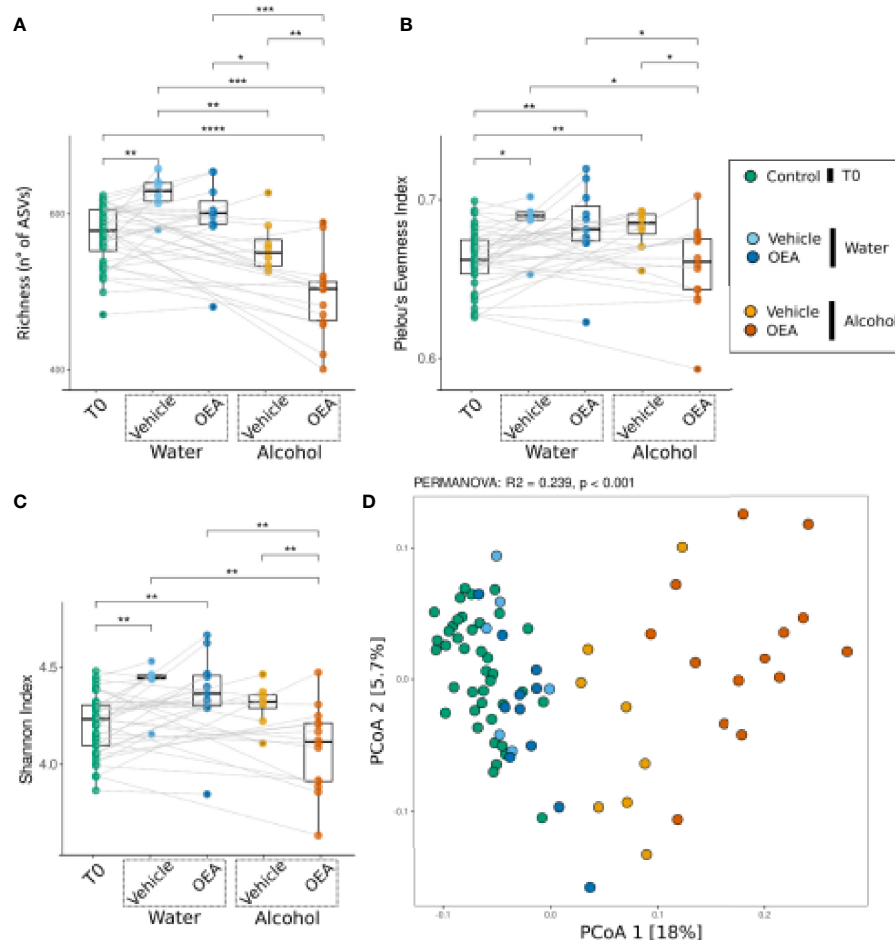


FIGURE 3 | Bacterial community response [α -diversity: (A–C); β -diversity: (D)] to alcohol binge drinking and oleoylethanolamide (OEA) treatment. (A) Richness (number of different ASVs), (B) Pielou's evenness index (equitability of the distribution of relative abundances among ASVs), and (C) Shannon index (diversity of the community) as measures of α -diversity. Differences between groups were tested by Wilcoxon rank-sum test and reported as notation on the plot (* p -value < 0.05; ** p -value < 0.01, *** p -value < 0.001, **** p -value < 0.0001). Dotted lines connect the data from the same animal at the two time points for each treatment. (D) β -Diversity analysis with PCoA ordination among all samples, using the Bray–Curtis distance measure. Notation above the plots reports the result of the PERMANOVA test. T0 group, $n = 40$; water + vehicle group, $n = 6$; water + OEA group, $n = 11$; alcohol + vehicle group, $n = 8$; alcohol + OEA group, $n = 14$. Notation above the plots reports the result of the PERMANOVA test. Dotted lines connect the data from the same animal at the two time points for each treatment.

abundant in the vehicle group. The OEA-treated samples, conversely, had higher relative abundance of taxa among the Proteobacteria (i.e., *Escherichia/Shigella* and *Pseudomonas*) and Bacteroidetes (genus *Bacteroides*) phyla. At the genus levels, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Blautia*, and *Peptococcus* were more abundant in the OEA pretreatment group, whereas the genera *Bifidobacterium*, *Clostridium sensu stricto*, and *Turicibacter* were more abundant in the non-OEA pretreatment sample groups.

Effects of OEA Route of Administration (i.p. vs. Oral) on Gut Microbiota Profile

Having assessed the general effect of OEA on gut microbiota, we finally aimed to discern whether different routes of OEA administration (oral vs. i.p.) had a differential impact on gut microbiota in the context of alcohol binge drinking. **Figure 6**

reports the diversity analysis on the alcohol-administrated rats receiving oral or i.p. OEA, which are compared with non-OEA alcohol-receiving rats in T1 and with the respective control rats in T0. The separation of samples in the PCoA ordination analysis (**Figure 6A**) indicated that oral and i.p. OEA administration in alcohol-intoxicated animals had a different effect on the structure of microbiota with respect to the vehicle group (ANOSIM test; $R^2 = 0.50$; $p = 1.00 \times 10^{-4}$). This was then confirmed by the pairwise PERMANOVA, which indicated that all the three groups of samples had a significantly different microbial community between each other. The highest differences were found between the vehicle and the oral OEA ($R^2 = 0.2322$; $p = 0.0006$) or the i.p. OEA ($R^2 = 0.1423$; $p = 0.0021$). The difference between the two administration routes was significant ($R^2 = 0.1367$; $p = 0.0042$), which suggests that the OEA administration route may have a fundamental role in shaping the microbiota in alcohol-treated rats.

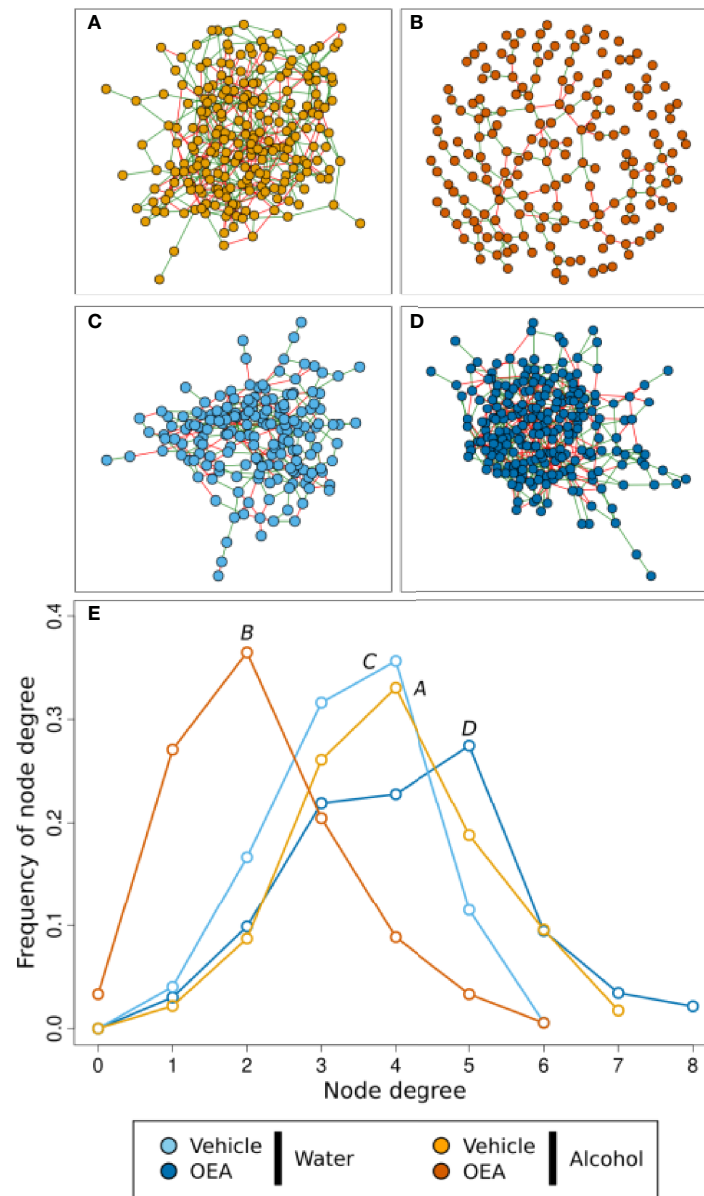


FIGURE 4 | Microbiota association network on the T1 sample subset. **(A–D)** Graphic representation of inferred networks for each group, as indicated by the color of nodes. The graphical representation of the association network is composed of nodes (i.e., circles) connected by edges (i.e., the segments between nodes). Each node represents an ASV of the community, while each edge represents the presence of a significant association between two ASVs. There is a positive association when edges are green, while there is a negative association when edges are red. **(E)** Frequency distribution of the node degree statistic of the four inferred networks. In this representation, we report the frequencies (i.e., % of total) of nodes in the network for each value of node degree (i.e., a statistic representing the number of nodes connected to each node). Each network is represented as a different line, color coded as reported in the legend. Water + vehicle group, $n = 6$; water + OEA group, $n = 11$; alcohol + vehicle group, $n = 8$; alcohol + OEA group, $n = 14$.

TABLE 1 | Properties of the networks reported in **Figure 4**.

Network	Total nodes	Total edges	Positive edges (%)	Negative edges (%)	Components	Shortest avg. path length
Alcohol + OEA	175	196	146 (75%)	50 (25%)	7	9.06
Water + OEA	233	483	278 (57%)	205 (43%)	1	4.35
Alcohol + vehicle	230	452	285 (63%)	167 (37%)	1	4.56
Water + vehicle	174	292	174 (59%)	118 (41%)	1	5.08

TABLE 2 | The 10 most differentiating genera in OEA-supplemented samples (water + OEA and alcohol + OEA).

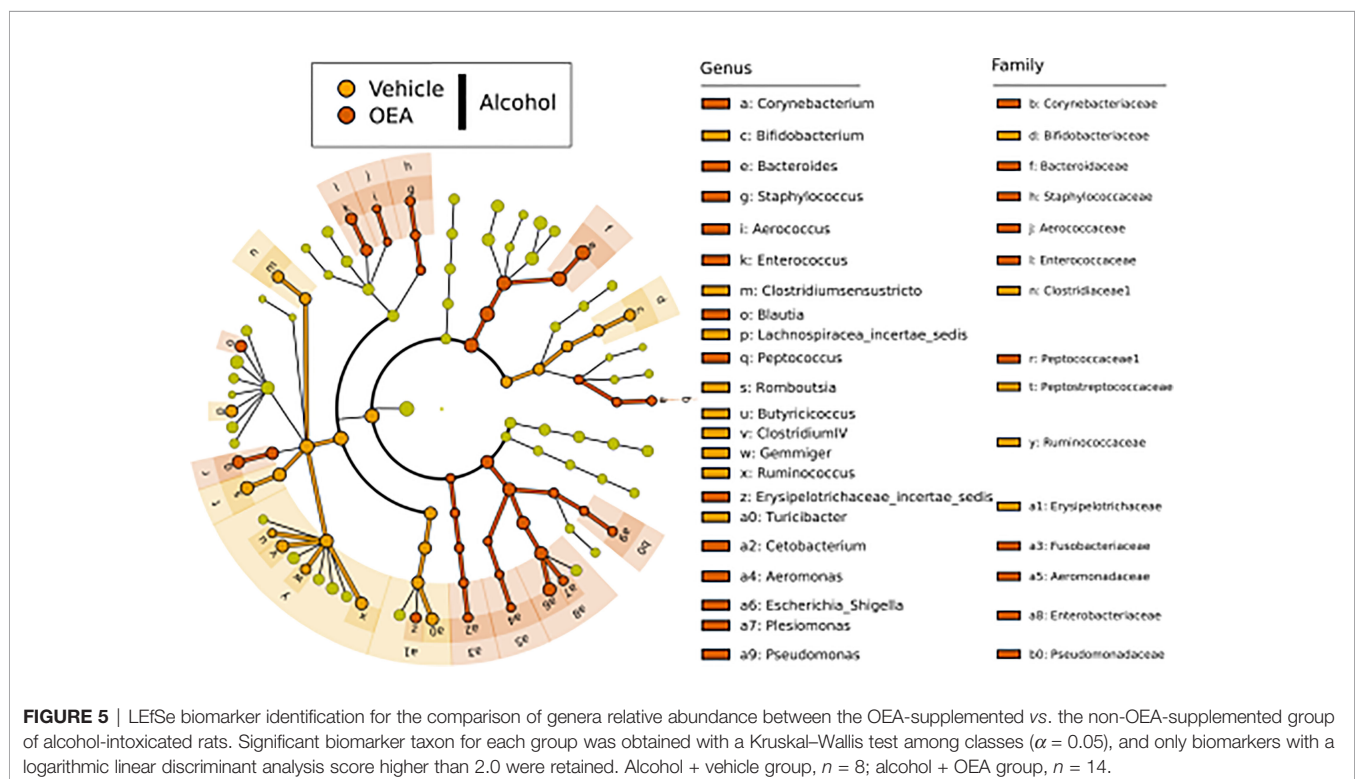
Bacterial genus	Water + OEA Mean % (SD)	Alcohol + OEA Mean % (SD)	p-value (ANOVA)
<i>Bacteroides</i>	26.5 (7.94)	40.3 (9.77)	*
<i>Escherichia/Shigella</i>	0.12 (0.08)	7.59 (6.88)	*
<i>Parabacteroides</i>	7.74 (2.97)	14.3 (5.6)	*
<i>Peptococcus</i>	2.00 (1.41)	2.72 (1.32)	ns
<i>Roseburia</i>	1.19 (1.02)	1.84 (1.63)	ns
<i>Flavonifractor</i>	2.12 (1.74)	2.11 (2.63)	ns
<i>Alistipes</i>	6.08 (1.86)	5.99 (3.11)	ns
<i>Romboutsia</i>	2.51 (1.34)	1.88 (1.56)	ns
<i>Ruminococcus</i>	2.40 (1.93)	1.19 (1.06)	ns
<i>Oscillibacter</i>	3.81 (0.978)	2.06 (1.70)	*
<i>Lachnospiraceae inc. Sedis</i>	4.15 (3.98)	0.37 (0.37)	*
<i>Clostridium IV</i>	6.06 (4.31)	0.77 (0.98)	*
<i>Lactobacillus</i>	10.2 (4.47)	0.62 (0.59)	*
<i>Clostridium XIVa</i>	18.5 (7.97)	7.67 (6.89)	*

One-way ANOVA: * $p < 0.05$. ns > 0.05 .

A similar finding can be observed also for the α -diversity measure of ASV richness (**Figure 6B**). The richness index appears to decrease in the i.p. and oral OEA in comparison with the vehicle group, but the only significant difference was found with respect to the oral OEA. Thus, oral OEA is also the only one showing a significant decrease in richness from T0 to T1 (**Figure 6C**).

We further assessed the different effects of oral and i.p. OEA in the alcohol-administered group by evaluating microbiota interactions using network analysis (**Figure 7**). The microbial network induced by i.p. OEA pretreatment (**Figure 7A**) is distinguishable from the one induced by oral OEA pretreatment (**Figure 7B**). The i.p. OEA network was sparser, with roughly 19 nodes less than the oral OEA one, but with

almost half the edges (142 vs. 246) (**Table 3**). Consequently, the network has a high number of non-interconnected node modules, composed of 13 different components and a frequency distribution of node degree statistic dramatically skewed toward low values (**Figure 7C** and **Table 3**). Interestingly, the same effect was not found for the sample group with water administration (**Figure 7C**), in which there were little differences between i.p. and oral OEA administration. This difference is likely not linked to general ASV richness reduction (i.e., less total ASVs in the community would have less interactions and less nodes); as in **Figure 6**, we showed an opposite trend (higher richness in i.p. OEA with respect to oral OEA with no significant differences).



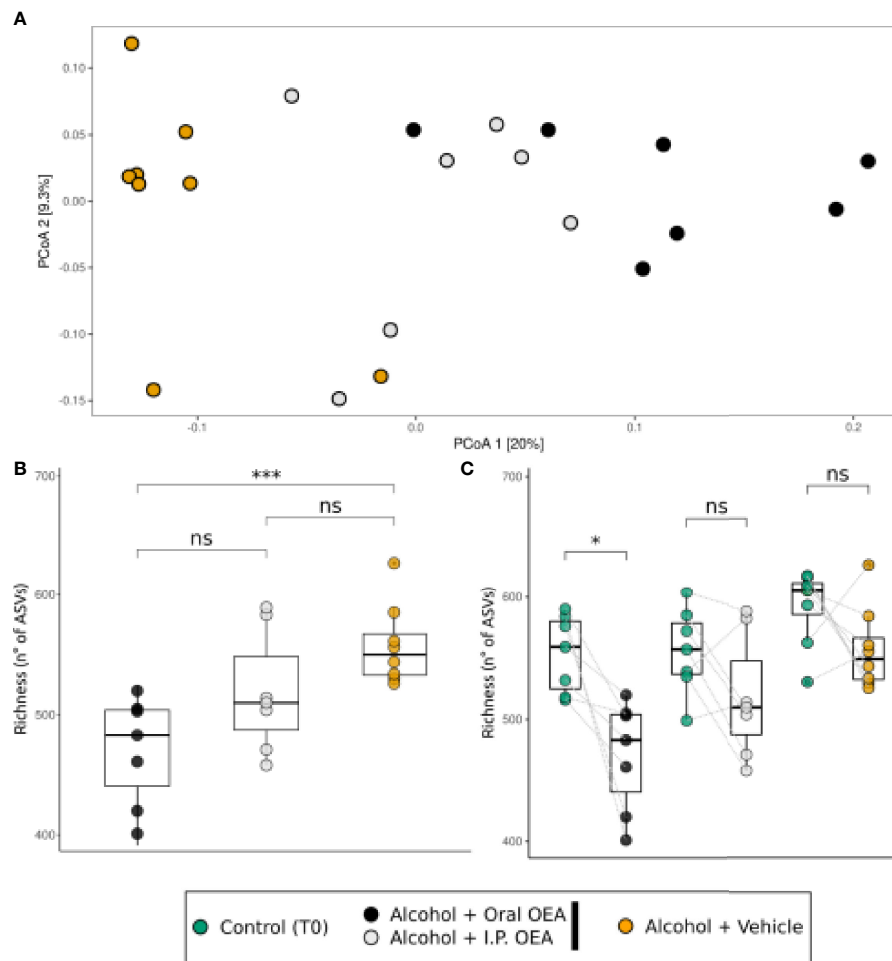


FIGURE 6 | Bacterial community response to different routes of administration of OEA in alcohol-intoxicated rats. **(A)** β -Diversity analysis with PCoA ordination among the oral and i.p. OEA administration route, in comparison with the non-OEA-receiving rats. Ordination was constructed using the Bray–Curtis distance measure. **(B)** Richness (number of different ASVs) in the three sample groups. **(C)** Richness (number of different ASVs) in the three sample groups, in comparison with their respective T0 samples. Differences between groups were tested by Wilcoxon rank-sum test [paired test in panel **(C)**] and the resulting p -value was reported as notation on the plot (ns, p -value > 0.05; * p -value < 0.05; *** p -value < 0.001). Dotted lines connect the data from the same animal at the two time points for each treatment. T0 group, $n = 22$; alcohol + vehicle group, $n = 8$; alcohol + oral OEA group, $n = 7$; alcohol + i.p. OEA group, $n = 7$.

To elucidate possible mechanisms, we simulated the changes between the i.p. and oral networks by gradually removing 19 ASVs from the data (i.e., the difference in total nodes between the two networks) of the oral OEA samples, recalculating the network, and measuring the frequency distribution of node degree statistic (Figure 7D and Supplementary Figure 3). We simulated two mechanisms of community reassembly following i.p. OEA administration: a random loss of ASVs (Supplementary Figure 3) and a “targeted” loss of ASVs in decreasing order of node *betweenness* (i.e., in decreasing importance for the network structure). We were able to reproduce the same frequency distribution of node degree observed for the i.p. network, by the removal of 11 ASVs in decreasing *betweenness* order in the community of the oral sample, while we did not always reproduce the same distribution when nodes were randomly removed (in 20 repeated simulations).

These results indicate that the difference between the community in the oral and i.p. sample groups seems to be at the single ASV level, likely originating from the loss of some specific and highly interacting ASVs and not from random ASV loss.

DISCUSSION

In this paper, we describe the changes that alcohol binge drinking promotes in the gut microbiota during a 4-day protocol *versus* control (water) animals and the influence of i.p. and oral OEA administration in healthy conditions and in alcohol-induced dysbiosis.

Our results indicate that alcohol binge drinking reduces the bacterial α -diversity (richness of ASVs) and creates a clearly distinguishable community in ordination analysis (different

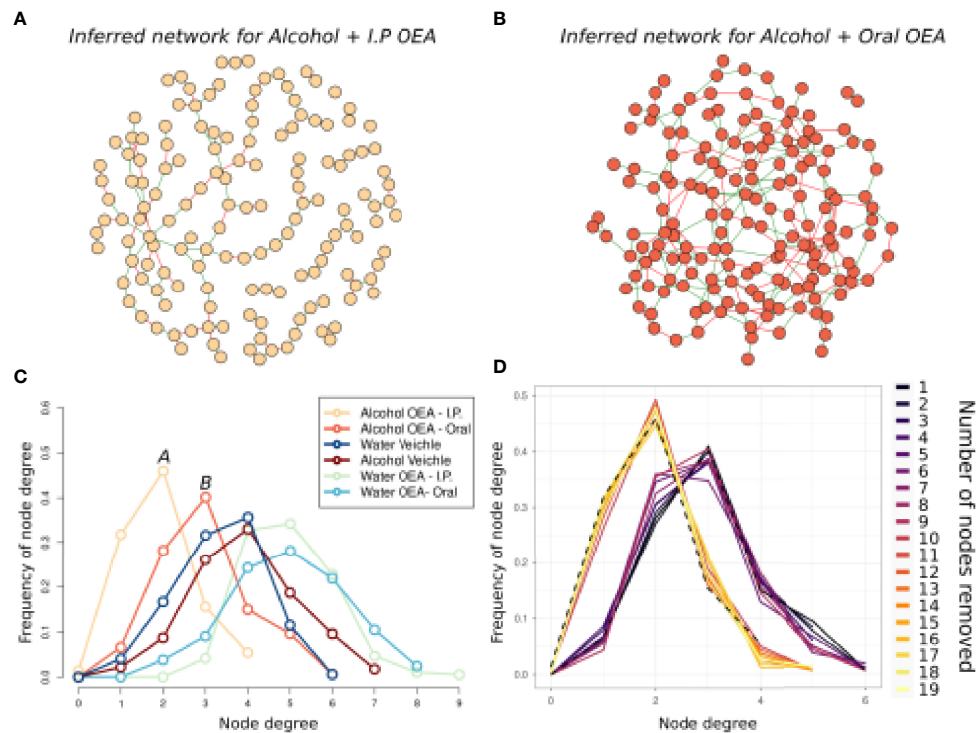


FIGURE 7 | Microbiota association network on the alcohol-intoxicated samples, comparing the oral and i.p. administration routes of OEA. Graphic representation of inferred networks for the i.p. OEA (**A**) and oral OEA (**B**)-receiving rat groups, as indicated by the color of nodes and title. The graphical representation of the association network is composed of nodes (i.e., circles) connected by edges (i.e., the segments between nodes). Each node represents an ASV of the community, while each edge represents the presence of a significant association between two ASVs; there is a positive association when edges are green, while there is a negative association when edges are red. (**C**) Frequency distribution of the node degree statistic of all the inferred networks. In this representation, we report the frequencies (i.e., % of total) of nodes in the network for each value of node degree (i.e., a statistic representing the number of nodes connected to each node). Each network is represented as a different line, color coded as reported in the legend. (**D**) Frequency distribution of the node degree statistic in the oral OEA network, during the “attack” on node betweenness. This is graphically represented as in (**C**), but in this case, a single line for each iteration of the test is represented, and they all represent the oral OEA network from which a node is removed every iteration. Dotted lines represent i) the starting frequency distribution of the “undisturbed” oral OEA network (on the right) and ii) the frequency distribution of the i.p. OEA network. Each line represents the frequency distribution of node degree of a different network, reobtained after removal of one node (and recalculation) of the previous network. After the removal of 11 nodes, the frequency distribution of node degree in the oral OEA community resembles well the frequency distribution of the node degree in the i.p. OEA community. Alcohol + oral OEA group, $n = 7$; alcohol + i.p. OEA group, $n = 7$.

β -diversity), with main differences observed from T0 (no treatment) to T1 (last day of binge) in the binge drinking group only. Also, alcohol binge drinking promotes some bacterial community compositional differences at the genus and family levels. Remarkably, alcohol binge drinking promotes a significant decrease in *Lactobacillus*, *Clostridium*, and *Oscillibacter* genera and the increment of *Bifidobacterium*, *Turicibacter*, *Parabacteroides*, and *Romboutsia*. An alcohol-induced decrement of *Lactobacillus* was previously reported in animal models using different patterns of alcohol consumption (Yan et al., 2011; Hartmann et al., 2013; Xiao et al., 2018;

Kosnicki et al., 2019; Lee et al., 2019; Lamas-paz et al., 2020). Regarding α - and β -diversity, other studies using different alcohol models have obtained diverging results, some showing alcohol-induced reduction in α -diversity and/or changes in β -diversity (Mutlu et al., 2009; Bull-Otterson et al., 2013; Lee et al., 2019; Samuelson et al., 2019; Zallar et al., 2019) and others without significant changes in α - or β -diversity (Neyrinck et al., 2016; Reyes et al., 2020). At the time of the present study, the specific impact of alcohol on gut microbiota when consumed in a binge drinking pattern remained elusive. A recent study has shown that mice under a drinking in the dark (DID) alcohol

TABLE 3 | Properties of the networks reported in Figure 7.

Networks	Total nodes	Total edges	Positive edges	Negative edges	Components	Shortest avg. path length
OEA i.p.	148	142	93 (65%)	49 (35%)	13	10.31
OEA oral	167	246	148 (60%)	98 (40%)	2	5.96

binge model neither show changes in α -diversity (Shannon, Simpson, and Chao1 indices) or β -diversity nor show significant changes in bacteria community composition at the phylum or family level (Reyes et al., 2020). As mentioned before, in the present study, we observed alterations in both α - and β -diversity with a 4-day alcohol binge drinking protocol in rats. Differences in the protocol and/or the animal species may account for these discrepancies.

It is very interesting to note that changes in bacterial composition have been observed in different neurological disorders, although their causal roles remain elusive, and observations often remain limited to a correlational level. For example, a reduced abundance of *Bifidobacterium* and an increment of *Clostridia* were observed in autism, while a reduced abundance of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* was observed in depression (reviewed in Cryan et al., 2019). Additionally, the use of psychobiotics (probiotics that when consumed promote a beneficial effect on mental health; Dinan et al., 2013) has been shown to improve concentration and decrease anxiety and depression symptomatology both in preclinical and clinical studies (reviewed in Scriven et al., 2018). The specific consequences of alcohol binge-induced dysbiosis presented in this study are at present unknown as our results are descriptive and, thus, do not allow for mechanistic speculation about possible implications of these bacterial changes in a healthy status.

Previous experiments in Orio's lab indicated that OEA pretreatment before each alcohol gavage has protective actions against multiple alcohol-induced effects, such as neuroinflammation, leaky gut, anhedonia, or depressive-like behavior in abstinence (Sayd et al., 2015; Antón et al., 2017; Antón et al., 2018; Orio et al., 2019; Orio, 2020). The actions of OEA were particularly interesting in the gut, since this biolipid was able to strongly reduce gut inflammation and colonic TJ disruption, providing protection against the bacteria translocation and also reducing alcohol-induced alterations in the immune system. Here, we aimed to fully characterize the actions of OEA in the gut by studying its impact on microbiota in the context of binge drinking. We hypothesized that some of the protective actions of OEA in the gut-brain axis could be mediated by amelioration of alcohol-induced gut dysbiosis. Results obtained in the present study are intriguing, since the effects of OEA significantly differ when this biolipid is administered in control or in alcohol-treated animals. Surprisingly, pretreatment with OEA in the alcohol-administered rats decreased the α -diversity by a reduction in evenness and Shannon indices, as well as changed β -diversity. Additionally, OEA pretreatment induced major changes in *Bacteroides*, *Clostridium*, *Escherichia/Shigella*, and *Rombustia* genera and promoted a fragmentation of the microbial network in the alcohol group. The latter evidence can be interpreted as indicative of a detrimental effect of the administration of OEA in conjunction with alcohol treatment. In fact, a more complex interaction network (i.e., with a frequency distribution skewed toward a higher degree) is indicative of a more diverse and more functional community in the intestinal environment, whereas shorter average path

length values can be interpreted as increasing the speed at which the network responds to perturbations (Faust and Raes, 2012). It is to note that the α -diversity indices in the combined OEA and alcohol group are more similar to untreated rats (T0) than any other groups.

Nevertheless, the effect of OEA in physiological conditions (no administration of alcohol) appears to be different, showing no changes in α -diversity and only a slight change in β -diversity. At the community composition level, OEA increased *Bacteroides* and reduced *Lactobacillus*, among other genera. These results agree with our previous results using 10 mg/kg i.p. OEA during 11 consecutive days (Di Paola et al., 2018). In the mentioned paper, OEA increased Bacteroidetes phylum (*Bacteroides*) and decreased Firmicutes (*Lactobacillus*) and changed β -diversity; OEA, though, did not induce significant changes in α -diversity (Di Paola et al., 2018). As commented in the discussion of the cited paper, these results suggest that OEA treatment promotes a shift in gut microbiota toward a "lean-like phenotype", mimicking the effects of a low-fat and high-polysaccharide/fiber-rich diet. Intriguingly, contrary to what was previously observed, OEA treatment without alcohol administration led to opposite changes in the microbial interaction network, which could be interpreted as positive. OEA treatment in this case increased the node degree value with higher frequency, skewing its distribution to the right, and increased total nodes and edges in comparison with the control group.

These results suggest that OEA may ameliorate the balance of gut bacteria in physiological conditions, but not under alcohol intoxications. Although unexpected, those results may also indicate that the beneficial effects of OEA pretreatment in the context of alcohol binge drinking are not mediated by changes in gut bacterial composition. Whether bacteria change their activity in different settings (with and without alcohol or its products, in conjunction to OEA pretreatment or not) is for us at present unknown. Other mechanisms, such as reduction of colonic inflammation, tight junction disruption and bacterial translocation, regulation of the immune system, antioxidant actions, and/or reduction of neuroinflammation, have been proposed to explain the protective actions of OEA in alcohol binge (Orio et al., 2019; Orio, 2020; Rodríguez-González and Orio, 2020).

It is intriguing that the water group varies from T0 to T1. The reasons for the α -diversity changes from T0 to T1 in this control group are not fully understood. It has been suggested elsewhere that they could reflect the normal aging of animals (Flemer et al., 2017), although our experiment was too short to question this hypothesis. It is to note that the present experiment was designed to depict the specific effects of OEA in gut microbiota, and because of that, all animals in T1, including the water group, were injected with vehicle or with OEA. This means that, with this experimental design, we cannot discard the effect of the vehicle in the water-administered animals. Indeed, significant effects of vehicle in gut microbiota were found in some studies using long-lasting oral treatments, although the effects were considered detrimental. For example, continued oral administration of 1% Tween 80 or carboxymethylcellulose, as dietary emulsifiers, induced microbiota alterations and changed β -diversity when given in drinking water for 12 weeks

(Chassaing et al., 2015; Holder et al., 2019). Our experiment was designed to question the specific effects of OEA in gut microbiota, and although the time of treatments was shorter, our experimental design did not allow to discard or confirm any vehicle effect.

Another interesting finding of this study is that the route of administration of OEA may affect differently the gut microbiota. Results indicate that oral OEA, but not i.p. OEA, significantly reduced richness in comparison with the vehicle + alcohol group, as well as oral and i.p. OEA differently changed bacterial community structure with respect to the mentioned group. Although the biological significance of many of the bacterial changes observed in this study is still unknown, we observed that i.p. OEA administration resulted in a more fragmented network with more non-interconnected nodes, suggesting a more detrimental effect on the microbial network with respect to oral administration. This difference in network community may be due to the loss of some specific highly interacting ASVs. It is to note that we previously observed differences between oral and i.p. OEA pretreatment in the context of alcohol binge drinking using the same animal model. As mentioned before, we showed that i.p. OEA was able to prevent the alcohol binge drinking-induced neuroinflammation in the frontal cortex, colonic inflammation, and decrement of gut tight junction proteins. However, oral OEA resulted to be more effective in preventing alcohol-induced gut bacteria translocation to MLNs and spleen and the passage of the high inflammatory component, LPS, to the systemic circulation (Antón et al., 2018).

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first paper studying the effect of alcohol binge drinking on fecal microbiota using this model and exploring the potential protective effect of pretreatment with the biolipid OEA on dysbiosis induced by binge drinking. They are both unexplored fields, and some of the results we have obtained are different from our initial hypothesis, which has caused difficulties in interpreting the results and understanding the biological meaning. Some of these difficulties arise from possible limitations of this study. For example, we did not have the possibility of measuring any biological marker (i.e., proinflammatory cytokines TNF- α or IL-1 β in plasma) to correlate with the gut microbiota changes; this would have helped us to better understand the biological meaning of the observed microbial changes. Also, here, we used fecal samples as proxies for colonic microbiota content. Despite differences in the composition between fecal and mucosal communities being increasingly investigated, feces remain the most used sample source for gut microbiota analysis because it is naturally collected and non-invasive and can be obtained repeatedly (Tang et al., 2020). However, we cannot rule out that a similar analysis performed on samples of small intestine could produce different results than those presented here. In fact, it has been shown that chronic alcohol consumption may have a different impact on microbiota composition structure in the colon and in the jejunum (Fan et al., 2019). In conclusion, we carried out observational experiments, and despite the limitations, the observed results set the basis for future research to understand the biological meaning of these alterations.

To sum up, our results suggest that the protective actions of OEA in the context of alcohol abuse are not related to changes in alcohol-induced dysbiosis. Other mechanisms previously identified such as the prevention of leaky gut and anti-inflammatory actions may account for the protective effects.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Datasets are uploaded in the European Nucleotide Archive (ENA) database with accession number PRJEB44965.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Animal Welfare Committee of Complutense University of Madrid (reference: PROEX 420/15).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AR-G, MM, and LO were in charge of the experiment design and activity related to alcohol binge drinking in laboratory animals and sample collection. FV, CF, and MBP were in charge of microbiota analyses and statistical measures. AR-G, FV, and LO drafted the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by FEDER (European Union)/Ministerio de Ciencia e Innovación/Agencia Estatal de Investigación (Spain) (grant number: Retos 2018; RTI2018-099535-B-I00 to LO). AR-G was a recipient of a fellowship from Consejería de Educación, Juventud y Deporte (Comunidad de Madrid/Fondo Social Europeo). MBP was supported by JPI Nutricog, grant “Ambrosiac”.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca for providing OEA used in the pilot studies.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.731910/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Comparison of genera relative abundance between the T1 alcohol administered rats, the T1 water administered rats, and the corresponding T0 samples. Only the genera with significant (with p-value < 0.05) difference in one way ANOVA were reported.

Supplementary Figure 2 | Best subset of identified microbiota markers, as reported in Figure 2. Histograms report relative abundance distribution among individual samples, grouping samples in the T1 alcohol and T1 water administered rats, and the corresponding T0 rats. The best marker were identified by evaluating their prevalence (i.e. the presence in multiple samples of a class) and relative abundance (i.e. by evaluating mean and median group abundances, reported as solid and dashed lines, respectively).

Supplementary Figure 3 | Microbiota association network on the alcohol intoxicated samples, comparing oral and i.p administration route of OEA. Image

REFERENCES

- Albanese, D., Fontana, P., De Filippo, C., Cavalieri, D., and Donati, C. (2015). MICCA: A Complete and Accurate Software for Taxonomic Profiling of Metagenomic Data. *Sci. Rep.* 5, 9743. doi: 10.1038/srep09743
- Antón, M., Alen, F., Heras, R., Serrano, A., Pavon, F. J., Leza, J. C., et al. (2017). Oleoylethanolamide Prevents Neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B Danger Signaling in Rat Frontal Cortex and Depressive-Like Behavior Induced by Ethanol Binge Administration. *Addict. Biol.* 22, 724–741. doi: 10.1111/adb.12365
- Antón, M., Rodríguez-González, A., Ballesta, A., González, N., Pozo, A., Fonseca, F. R., et al. (2018). Alcohol Binge Disrupts the Rat Intestinal Barrier: The Partial Protective Role of Oleoylethanolamide. *Brit. J. Pharmacol.* 175, 4464–4479. doi: 10.1111/bph.14501
- Bull-Ottersen, L., Feng, W., Kirpich, I., Wang, Y., Qin, X., Liu, Y., et al. (2013). Metagenomic Analyses of Alcohol Induced Pathogenic Alterations in the Intestinal Microbiome and the Effect of Lactobacillus Rhamnosus GG Treatment. *PLoS One* 8, e53028. doi: 10.1371/journal.pone.0053028
- Butera, A., Di Paola, M., Vitali, F., De Nitto, D., Covotta, F., Borriani, F., et al. (2020). IL-13 mRNA Tissue Content Identifies Two Subsets of Adult Ulcerative Colitis Patients With Different Clinical and Mucosa-Associated Microbiota Profiles. *J. Crohns Colitis* 14 (3), 369–380. doi: 10.1093/ecco-jcc/ijz154
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., et al. (2015). Dietary Emulsifiers Impact the Mouse Gut Microbiota Promoting Colitis and Metabolic Syndrome. *Nature* 519 (7541), 92–96. doi: 10.1038/nature14232
- Cryan, J. F., and Dinan, T. G. (2012). Mind-Altering Microorganisms: The Impact of the Gut Microbiota on Brain and Behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 701–712. doi: 10.1038/nrn3346
- Cryan, J., O'Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaansen, T. F. S., Boehme, M., et al. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol. Rev.* 99, 1877–2013. doi: 10.1152/physrev.00018.2018
- Csardi, G., and Nepusz, T. (2006). The Igraph Software Package for Complex Network Research. *InterJournal Complex Syst.* 1695 (5), 1–9.
- Dinan, T. G., Stanton, C., and Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic. *Biol. Psychiatry* 74, 720–726. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.05.001
- Di Paola, M., Bonechi, E., Provensi, G., Costa, A., Clarke, G., Ballerini, C., et al. (2018). Oleoylethanolamide Treatment Affects Gut Microbiota Composition and the Expression of Intestinal Cytokines in Peyer's Patches of Mice. *Sci. Rep.* 8, 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-32925-x
- Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: Improved Error-Correction for Illumina 16S and ITS Amplicon Sequencing. *BioRxiv*, 081257. doi: 10.1101/081257
- Engen, P. A., Green, S. J., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., and Keshavarzian, A. (2015). The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Res. Curr. Rev.* 37, 223.
- Fan, Y., Ya-E, Z., Ji-Dong, W., Yu-Fan, L., Ying, Z., Ya-Lun, S., et al. (2018). Comparison of Microbial Diversity and Composition in Jejunum and Colon of the Alcohol-Dependent Rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (11), 1883–1895. doi: 10.4014/jmb.1806.06050
- Faust, K., and Raes, J. (2012). Microbial Interactions: From Networks to Models. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 538–550. doi: 10.1038/nrmicro2832
- Flemer, B., Gaci, N., Borrel, G., Sanderson, I. R., Chaudhary, P. P., Tottey, W., et al. (2017). Fecal Microbiota Variation Across the Lifespan of the Healthy Laboratory Rat. *Gut Microbes* 8 (5), 428–439. doi: 10.1080/19490976.2017.1334033
- Giuffrida, A., Rodríguez de Fonseca, F., and Piomelli, D. (2000). Quantification of Bioactive Acylethanolamides in Rat Plasma by Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* 280, 87–93. doi: 10.1006/abio.2000.4509
- Hartmann, P., Chen, P., Wang, H. J., Wang, L., McCole, D. F., Brandl, K., et al. (2013). Deficiency of Intestinal Mucin-2 Ameliorates Experimental Alcoholic Liver Disease in Mice. *Hepatology* 58, 108–119. doi: 10.1002/hep.26321
- Hartmann, P., Seebauer, C. T., and Schnabl, B. (2015). Alcoholic Liver Disease: The Gut Microbiome and Liver Cross Talk. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39, 763. doi: 10.1111/acer.12704
- Hillemacher, T., Bachmann, O., Kahl, K. G., and Frieling, H. (2018). Alcohol, Microbiome, and Their Effect on Psychiatric Disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 85, 105–115. doi: 10.1016/j.pnpb.2018.04.015
- Holder, M. K., Peters, N. V., Whylings, J., Fields, C. T., Gewirtz, A. T., Chassaing, B., et al. (2019). Dietary Emulsifiers Consumption Alters Anxiety-Like and Social-Related Behaviors in Mice in a Sex-Dependent Manner. *Sci. Rep.* 9 (1), 172. doi: 10.1038/s41598-018-36890-3
- Joshi, N. A., and Fass, J. N. (2011). *Sickle: A Sliding-Window, Adaptive, Quality-Based Trimming Tool for FastQ Files (Version 1.33) [Software]*.
- Kanny, D., Brewer, R. D., Mesnick, J. B., Paulozzi, L. J., Naimi, T. S., and Lu, H. (2015). Vital Signs: Alcohol Poisoning Deaths—United States 2010–2012. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 63, 1238.
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., and Altman, D. G. (2010). Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Brit. J. Pharmacol.* 160, 1577–1579. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x
- Kosnicki, K. L., Penprase, J. C., Cintora, P., Torres, P. J., Harris, G. L., Brasser, S. M., et al. (2019). Effects of Moderate, Voluntary Ethanol Consumption on the Rat and Human Gut Microbiome. *Addict. Biol.* 24, 617–630. doi: 10.1111/adb.12626
- Kurtz, Z. D., Müller, C. L., Miraldi, E. R., Littman, D. R., Blaser, M. J., and Bonneau, R. A. (2015). Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks. *PLoS Comput. Biol.* 11 (5), e1004226. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004226
- Lahti, L., and Shetty, S. (2017). “Tools for Microbiome Analysis in R. Microbiome Package Version 1.7.21,” in *Bioconductor*. Available at: <http://microbiome.github.com/microbiome>.
- Lamas-paz, N., Sydor, S., Lamas-Paz, A., Morán, L., Salinas, B., Peng, J., et al. (2020). Intestinal Epithelial Cell-Derived Extracellular Vesicles Modulate Hepatic Injury via the Gut-Liver Axis During Acute Alcohol Injury. *Front. Pharmacol.* 11, 603771. doi: 10.3389/fphar.2020.603771
- Leclercq, S., Matamoros, S., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Jamar, F., Starkel, P., et al. (2014). Intestinal Permeability, Gut-Bacterial Dysbiosis, and Behavioral Markers of Alcohol-Dependence Severity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4485. doi: 10.1073/pnas.1415174111
- Lee, J., Ha, J. S., Park, H., and Lee, E. (2019). Alteration of Gut Microbiota Composition by Short-Term Low-Dose Alcohol Intake Is Restored by Fermented Rice Liquor in Mice. *Food Res. Int.* 128, 108800. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108800
- Litwinowicz, K., Choroszy, M., and Waszczuk, E. (2019). Changes in the Composition of the Human Intestinal Microbiome in Alcohol Use Disorder: A Systematic Review. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 46, 4–12. doi: 10.1080/00952990.2019.1669629
- Martin, M. (2011). Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet J.* 17 (1), 10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200
- McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- Meroni, M., Longo, M., and Dongiovanni, P. (2019). Alcohol or Gut Microbiota: Who Is the Guilty? *Int. J. Mol. Sci.* 20:4568. doi: 10.3390/ijms20184568
- Mutlu, E. A., Gillevet, P. M., Rangwala, H., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Engen, P. A., et al. (2012). Colonic Microbiome Is Altered in Alcoholism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302, 966. doi: 10.1152/ajpgi.00380.2011

- Mutlu, E., Keshavarzian, A., Engen, P., Forsyth, C. B., Sikaroodi, M., and Gillevet, P. (2009). Intestinal Dysbiosis: A Possible Mechanism of Alcohol-Induced Endotoxemia and Alcoholic Steatohepatitis in Rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 33, 1836–1846. doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.01022
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism [NIAAA]. (2004). *NIAAA Council Approves Definition of Binge Drinking* (Bethesda: National Institutes of Health).
- Neyrinck, A. M., Etcheberria, U., Taminiau, B., Daube, G., Van Hul, M., Everard, A., et al. (2016). Rhubarb Extract Prevents Hepatic Inflammation Induced by Acute Alcohol Intake, an Effect Related to the Modulation of the Gut Microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* 61 (1), 1–21. doi: 10.1002/mnfr.201500899
- Obernier, J. A., Boudin, T. W., and Crews, F. T. (2002). Binge Ethanol Exposure in Adult Rats Causes Necrotic Cell Death. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26, 547–557. doi: 10.1111/j.1530-0277.2002.tb02573.x
- Orio, L. (2020). The Multifaceted Potential of the Lipid Transmitter Oleoylethanolamide to Treat Alcohol-Induced Neuroinflammation and Alcohol Use Disorders. *Neural Regen. Res.* 15, 71–72. doi: 10.4103/1673-5374.264457
- Orio, L., Alen, F., Pavón, F. J., Serrano, A., and García-Bueno, B. (2019). Oleoylethanolamide, Neuroinflammation, and Alcohol Abuse. *Front. Mol. Neurosci.* 11:490. doi: 10.3389/fnmo.2018.00490
- Paulson, J. N., Talukder, H., Pop, M., and Bravo, H. C. (2013). *MetagenomeSeq: Statistical Analysis for Sparse High-Throughput Sequencing*. Available at: <http://ccb.umd.edu/software/metagenomeSeq>.
- Reyes, R. E. N., Al Omran, A. J., Davies, D. L., and Asatryan, L. (2020). Antibiotic-Induced Disruption of Commensal Microbiome Linked to Increases in Binge-Like Ethanol Consumption Behavior. *Brain Res.* 1747, 147067. doi: 10.1016/j.brainres.2020.147067
- Rodríguez-González, A., and Orio, L. (2020). Microbiota and Alcohol Use Disorder: Are Psychobiotics a Novel Therapeutic Strategy? *Curr. Pharm. Des.* 26, 2426–2437. doi: 10.2174/1381612826666200122153541
- SAMHSA. (2017). *Key Substance Use and Mental Health Indicators in the United States: Results From the 2016 National Survey on Drug Use and Health*.
- Samuelson, D. R., Gu, M., Shellito, J. E., Molina, P. E., Taylor, C. M., Luo, M., et al. (2019). Intestinal Microbial Products From Alcohol-Fed Mice Contribute to Intestinal Permeability and Peripheral Immune Activation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 43, 2122. doi: 10.1111/acer.14176
- Sayd, A., Anton, M., Alen, F., Caso, J. R., Pavon, J., Leza, J. C., et al. (2015). Systemic Administration of Oleoylethanolamide Protects From Neuroinflammation and Anhedonia Induced by LPS in Rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18 (6), pii:pyu111. doi: 10.1093/ijnp/pyu111
- Scriven, M., Dinan, T. G., Cryan, J. F., and Wall, M. (2018). Neuropsychiatric Disorders: Influence of Gut Microbe to Brain Signalling. *Diseases* 6 (3):78. doi: 10.3390/diseases6030078
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., et al. (2011). Metagenomic Biomarker Discovery and Explanation. *Genome Biol.* 12 (6), 1–18. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60
- Sherwin, E., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2018). Recent Developments in Understanding the Role of the Gut Microbiota in Brain Health and Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1420, 5–25. doi: 10.1111/nyas.13416
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., and Nishijima, M. (2014). Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing. *PloS One* 9, e105592. doi: 10.1371/journal.pone.0105592
- Tamburini, E., Doni, L., Lussu, R., Meloni, F., Cappai, G., Carucci, A., et al. (2020). Impacts of Anthropogenic Pollutants on Benthic Prokaryotic Communities in Mediterranean Touristic Ports. *Front. Microbiol.* 11, 1234. doi: 10.3389/fmicb.2020.01234
- Tang, Q., Jin, G., Wang, G., Liu, T., Liu, X., Wang, B., et al. (2020). Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 10, 151. doi: 10.3389/fcimb.2020.00151
- Temko, J. E., Bouhlal, S., Farokhnia, M., Lee, M. R., Cryan, J. F., and Leggio, L. (2017). The Microbiota, the Gut and the Brain in Eating and Alcohol Use Disorders: A 'Ménage À Trois'? *Alcohol Alcohol. (Oxford Oxfordshire)* 52, 403–413. doi: 10.1093/alcalc/agx024
- Timary, P. D., Leclercq, S., Stärkel, P., and Delzenne, N. (2015). A Dysbiotic Subpopulation of Alcohol-Dependent Subjects. *Gut Microbes* 6, 388–391. doi: 10.1080/19490976.2015.1107696
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences Into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 16, 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07
- Wang, H., and Wang, Y. (2016). Gut Microbiota-Brain Axis. *Chin. Med. J.* 129, 2373–2380. doi: 10.4103/0366-6999.190667
- Xiao, H., Ge, C., Feng, G., Li, Y., Li, H., Luo, D., et al. (2018). Gut Microbiota Modulates Alcohol Withdrawal-Induced Anxiety in Mice. *Toxicol. Lett.* 287, 23–30. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.01.021
- Yan, A. W., Fouts, D. E., Brandl, J., Stärkel, P., Torralba, M., Schott, E., et al. (2011). Enteric Dysbiosis Associated With a Mouse Model of Alcoholic Liver Disease. *Hepatology* 3 (1), 96–105. doi: 10.1002/hep.24018
- Zallar, L. J., Beurmann, S., Tunstall, B. J., Fraser, C. M., Koob, G. F., Vendruscolo, L. F., et al. (2019). Ghrelin Receptor Deletion Reduces Binge-Like Alcohol Drinking in Rats. *J. Neuroendocrinol.* 31 (7), e12663. doi: 10.1111/jne.12663

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Rodríguez-González, Vitali, Moya, De Filippo, Passani and Orio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Artículo 2

Antón, M.*, **Rodríguez-González, A.***, Ballesta, A., González, N., del Pozo, A., de Fonseca, F. R., Gómez-Lus, M. L., Leza, J. C., García-Bueno, B., Caso, J. R. & Orio, L. (2018). Alcohol binge disrupts the rat intestinal barrier: the partial protective role of oleoylethanolamide. *British Journal of Pharmacology*. 175: 4464–4479. doi: 10.1111/bph.14501

**Equal contribution*

RESEARCH PAPER

Alcohol binge disrupts the rat intestinal barrier: the partial protective role of oleoylethanolamide

Correspondence Laura Orio, Department of Psychobiology and Behavioral Science Methods, Faculty of Psychology, Complutense University of Madrid (UCM), Campus de Somosaguas s/n. 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid. E-mail: lorio@psi.ucm.es

Received 14 February 2018; **Revised** 4 September 2018; **Accepted** 12 September 2018

M Antón^{1,*}, A Rodríguez-González^{1,*}, A Ballesta¹, N González³, A del Pozo¹, F R de Fonseca¹, M L Gómez-Lus³, J C Leza², B García-Bueno², J R Caso² and L Orio¹ 

¹Department of Psychobiology and Behavioral Science Methods, Faculty of Psychology, Complutense University, Madrid (UCM), and Red de Trastornos Adictivos (RTA) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, ²Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, UCM, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Imas12 and IUINQ, Madrid, Spain, and ³Department of Medicine Microbiology, Faculty of Medicine, UCM, Madrid, Spain

*The authors contributed equally to this work.

BACKGROUND AND PURPOSE

Chronic alcohol consumption alters the gut–brain axis, but little is known about alcohol binge episodes on the functioning of the intestinal barrier. We investigated the influence of ethanol binges on bacterial translocation, gut inflammation and immunity, and tight junction (TJ) structure and the ability of the bio lipid oleoylethanolamide (OEA) to prevent ethanol binge-induced intestinal barrier dysfunction.

EXPERIMENTAL APPROACH

OEA was injected i.p. before repeated ethanol administration by oral gavage. Plasma, spleen, liver and mesenteric lymph nodes (MLN) were collected in sterile conditions for determination of bacterial load. Immune/inflammatory parameters, TJ proteins and apoptotic markers were determined in colonic tissue by RT-PCR and Western blotting. TJ ultrastructure was examined by transmission electron microscopy.

KEY RESULTS

Ethanol binges induced bacterial translocation to the MLN (mainly) and spleen. Colonic tissues showed signs of inflammation, and activation of innate (Toll-like receptor-4) and adaptive (IgA) immune systems and TJ proteins (occludin and claudin-3) were decreased after ethanol binges. Pretreatment with OEA reduced intestinal inflammation and immune activation and partially preserved the TJ structure affected by alcohol binges but had no effect on alcohol-induced apoptosis. Ultrastructural analyses of colonic TJs revealed dilated TJs in all ethanol groups, with less electron-dense material in non-pretreated rats. The protective effects of i.p. OEA did not reduce bacterial translocation to the MLN. However, intragastric OEA administration significantly reduced plasma LPS levels and bacterial translocation to the MLN.

CONCLUSION AND IMPLICATIONS

OEA-based pharmacotherapies could potentially be useful to treat disorders characterized by intestinal barrier dysfunction, including alcohol abuse.

Abbreviations

BEL, blood ethanol levels; CFU, colony-forming units; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MLN, mesenteric lymph nodes; OEA, oleoylethanolamide; TJ, tight junction; TLR4, Toll-like receptor-4; ZO, zonula occludens

Introduction

Chronic alcohol consumption damages the gastrointestinal barrier, allowing the entry of microorganisms and bacterial products, such as **LPS**, to inner organs and/or the systemic circulation. Alcohol can act in two ways: (i) via transepithelial mechanisms, whereby molecules pass directly through the epithelial cells, possibly because the cell membrane is weakened and damaged due to oxidative stress caused by ROS and (ii) via paracellular mechanisms, where molecules pass through the junctions between the epithelial cells by disrupting tight junction (TJ) proteins. Increased gut permeability allows bacteria and their toxins to leave the gut and infiltrate other organs through the bloodstream (reviewed in Bishehsari *et al.*, 2017). This phenomenon, called *leaky gut*, has been demonstrated in experimental models of chronic alcohol intake and in alcohol-dependent subjects (Keshavarzian *et al.*, 2009; Leclercq *et al.*, 2012). Alcohol affects mucosal immunity by suppressing one of the intestine's main lines of defence against bacteria, namely, the Paneth cells that secrete antibacterial compounds. Fewer antibacterial compounds result in additional intestinal bacterial overgrowth and allow endotoxin-derived bacteria in the gut to trigger an inflammatory response (reviewed in Bishehsari *et al.*, 2017). LPS recognition by the innate immune **Toll-like receptor-4** (TLR4) initiates the release of a cascade of pro-inflammatory mediators, which can reach the brain by several signalling pathways, ultimately inducing neuroinflammation, mood alterations and cognitive decline (Dantzer *et al.*, 2008; Pascual *et al.*, 2014).

A pattern of alcohol consumption in binge episodes has become popular with alcohol drinkers, with increased rates of morbidity (DHS, 2008). A single alcohol binge has been shown to induce a transient increase in serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy subjects (Bala *et al.*, 2014). We have recently reported that repeated alcohol binges increase plasma LPS in rats (Antón *et al.*, 2017a) and humans (Orio *et al.*, 2017) and promote an inflammatory response that may have consequences for neurocognitive performance. However, the effects of binge drinking on intestinal barrier integrity, bacterial translocation and the mechanisms involved in gut barrier dysfunction have yet to be comprehensively investigated.

The gastrointestinal barrier is a continuous multilayer barrier, formed by a mucus layer, epithelial cells and innate or acquired immune factors that allows nutrient absorption from the lumen and restricts the passage of toxic compounds to the systemic circulation. The permeability of the barrier is partly regulated by TJs located in the apical part of the epithelial cells, which are formed by integral transmembrane proteins (occludin and claudins) spreading through the lipid bilayer so that one end contacts the interior of the cell and the other the exterior, and cytoplasmic proteins [zonula occludens (ZO)], which link the TJ to the actin cytoskeleton and form a binding site (Suzuki, 2013). The TJs then create a barrier, which regulates the paracellular movement of the molecules through the epithelial sheets, maintaining tissue homeostasis. A disruption of the intestinal barrier allows enhanced mucosal penetration of intestinal luminal toxic substances, pathogens and antigens that can lead to intestinal mucosal injury and inflammation. Intestinal barrier

dysfunction may be either causative or consequential, since immune activation and pro-inflammatory factors, such as the cytokines **TNF- α** , **IL-1 β** and **IL-6**, contribute to the barrier disruption increasing the gut permeability in a detrimental self-propagating cycle (Keita and Soderholm, 2010; Du *et al.*, 2016).

In previous studies, we demonstrated that pharmacological pretreatment with **oleoylethanolamide** (OEA), a lipid mediator part of the acylethanolamide family, during the alcohol binge episodes has potent anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective properties against the effects of alcohol and partially reduced alcohol binge-induced increases in plasma LPS levels in rats (Antón *et al.*, 2017a). In humans, we observed that regular alcohol binge drinkers show elevated plasma levels of LPS and inflammatory markers (Orio *et al.*, 2017) and increased plasma levels of OEA and similar biolipids (Antón *et al.*, 2017b), suggesting a homeostatic role for this biolipid in regulating alcohol responses (Bilbao *et al.*, 2016). The main hypothesis that we tested in this study was whether the anti-inflammatory actions of OEA may have a local action in the gut, regulating inflammation and barrier permeability.

Methods

Animals

Sixty-eight adult (7–8 weeks old) male Wistar rats (*Rattus Norvegicus* from Envigo, Barcelona, Spain) were used, weighing 250–300 g. We selected the same animal species and binge model as in our previous studies (Antón *et al.*, 2017a) since this study is a continuation of this research. Animals were housed in groups of $n = 3$ –4 (medium density) rats per cage on a reverse 12 h light/dark cycle under standard temperature and humidity conditions at the conventional SPF Animal Care Facility at the Complutense University of Madrid. Polysulfone cages were Eurostandard type IV (Tecniplast, Exton, PA, USA) with dimensions of 55.6 × 33.4 cm (lower space), 60.0 × 38.0 cm (upper space) and 19.5 cm high, with a surface area of 1875 cm². Cages were filled with chopo ecopure chips6 premium (ENVIGO, Barcelona, Spain). Standard food (A04 SAFE, Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France) and tap water were available *ad libitum* in the home cage. Animals were maintained under constant conditions for 10 days before the start of the experiments and under daily surveillance by veterinary staff and/or experimenters.

The animals were monitored during the experiment. When physical signs unrelated to alcohol intoxication were observed, the criteria of humane endpoint were applied. As humane endpoint criteria, we followed the main recommendations of Morton *et al.* (1999). In detail, changes in body weight, physical appearance and behaviour were scored as previously reported (Morton *et al.*, 1999). All experimental protocols were approved and adhered to the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Complutense University of Madrid (ethical approval reference: PROEX 420/15) according to European legislation (2010/63/UE). Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny *et al.*, 2010).

Randomization and blinding

The animals were randomly assigned to the experimental groups, and pharmacological treatments were counter-balanced in a random way. The animals were killed following the alternation of experimental groups, and the subjects were selected in a random manner inside a group. Blinding was used when possible. The experimenters were aware of the pharmacological treatments in each group. Tissue collection and preparation, quantification of blots and so on was done in a blind manner. TJ quantification was subjected to double blinding and done by three different investigators.

Drug administration

Animals were treated with intragastric (i.g.) ethanol three times per day using specific cannulae (16G needle, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following a standard paradigm of a 4-day binge alcohol intoxication protocol previously used by our group (Antón *et al.*, 2017a) and by others (Obernier *et al.*, 2002a, 2002b). Ethanol-treated rats received an initial loading dose of $5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of ethanol in a 30% solution (wv^{-1}) and then a maximum of $3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for subsequent doses, which were determined based on the animals' blood ethanol levels (BELs) and behaviour. Thus, the maximum theoretical dose received by an animal was $9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$. In practice, the doses were titrated by observing behavioural signs related to high blood intoxication levels (i.e. loss of righting reflexes and limb ataxia) (Majchrowicz, 1975) and by measuring BELs at certain points during the binge protocol (2 h after the 15:00 h ethanol administration). In this study, the average dose of ethanol per rat was $8.07 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$. This repeated binge-pattern ethanol paradigm maintained relatively constant intoxicating BEL in a range of sedation/ataxia (BEL average per group-day $^{-1}$: ethanol $1995 \pm 124 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and OEA + ethanol $2089 \pm 88 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) according to the 6-point behavioural ethanol intoxication scale (Majchrowicz, 1975). The mortality in the ethanol groups was 9%, similar to that in other studies (Obernier *et al.*, 2002a, 2002b; Antón *et al.*, 2017a).

OEA (was synthesized as described by Giuffrida *et al.*, 2000 and dissolved in 5% Tween-80 in saline) was administered at $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.p. ten minutes before each administration of ethanol (first loading OEA dose was $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.p.). This protocol of OEA administration was previously used to demonstrate its anti-inflammatory effect in binge drinking (Antón *et al.*, 2017a). Additionally, OEA was also administered p.o. to examine its effect on bacterial translocation. For this OEA (dissolved in 1% carboxymethylcellulose in saline) was administered at $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.g. ($3 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 20 min before each ethanol administration using specific cannulae (16G needle, Fisher Scientific). This dose was chosen as previous studies had shown this to be an effective pharmacological dose of OEA p.o. (Nielsen *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2012).

BEL determination and tissue/plasma collection

To verify intoxication, blood samples ($20 \mu\text{L}$) from rat tails were taken 120 min before the 15:00 h ethanol i.g. administration, and BELs were ascertained by using electrochemical

detection of an enzymatic reaction with an AM1 Alcohol Analyzer (Analox Instruments, London, UK).

Samples were taken ~3 h after the last ethanol gavage following a lethal dose of sodium pentobarbital ($300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p., Dolethal®, Spain). Blood was collected by cardiac puncture using trisodium citrate ($3.15\% \text{ w.v}^{-1}$) as an anticoagulant. Plasma was obtained by blood centrifugation (2000 g) 15 min at 4°C and stored at -20°C until used. Samples of colon were used for biochemical analysis of intestinal barrier elements and gut inflammation. Specifically, the distal 8 cm portion of the colon was removed, cut longitudinally and frozen at -80°C until assayed or processed fresh for transmission electron microscopy. Mesenteric lymph nodes (MLN), liver and spleen were removed under sterile conditions and processed for bacterial translocation studies, as described below.

Bacterial translocation studies

Samples of the MLN, liver and spleen were weighed and homogenized in sterile saline. Aliquots (2 mL) of serial 10-fold dilutions of the suspension were plated onto 5% blood agar and MacConkey's agar plates for recovery of aerobic bacteria and Brucella blood agar plates supplemented with vitamin K1 and hemin for anaerobic bacteria. After 24 and 48 h of incubation at 37°C , for aerobic and anaerobic cultures, respectively, colonies were counted. Quantitative culture results are expressed as the number of colony-forming units (CFU)· g^{-1} of tissue. Any positive MLN, liver or spleen cultures were considered indicative of bacterial translocation from the intestinal lumen. Positive growth of bacteria only in the MLN may therefore provide the required information as these anatomical localizations are normally sterile in healthy individuals. Bacterial strains were identified by Gram stain, biochemical tests (oxidase, catalase and coagulase) and culture media (mannitol and bile esculin agar). Enterotube II (BD DIFCO™, Fisher Scientific, S.L., Madrid, Spain) was used for Gram-negative bacteria identification.

RT-PCR and Western blot analyses

RNA was prepared from samples of distal colon using TRIZOL® reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Aliquots were converted to cDNA using random hexamer primers. Semi-quantitative changes in mRNA levels were estimated by real-time PCR in the presence of SYBR green probe using a 20- μL reaction in a Rotor-Gene (Corbett Research®, Mortlake, NSW, Australia). mRNA expression was measured using a comparative quantification method based on the second differential maximum method to calculate single reaction efficiencies. This method calculates a 'take off' value for each individual sample based on the rate of change in fluorescence. A control sample is used as a calibrator, and relative amounts are calculated against this calibrator. The results were normalized with the housekeeping gene GAPDH present in each sample. Additional information and the primer sequences, accession numbers and other details can be found in the Supporting Information.

For Western blots, colonic samples were homogenized in $300 \mu\text{L}$ of PBS ($\text{pH} = 7.4$) mixed with a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche®, Madrid, Spain) and RIPA buffer in a TissueLyser (Quiagen, Hilden, Germany). The frequency used was 50 oscillations for 4 min, followed by centrifugation at $12000\times \text{g}$ for 10 min at 4°C . After adjusting protein

levels, homogenates were mixed with Laemmli sample buffer (Bio-Rad®, Alcobendas, Madrid, Spain) containing β -mercaptoethanol ($50 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ of Laemmli), to get a final concentration of $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, and $15 \mu\text{L}$ was loaded into an electrophoresis gel. Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane (Amersham Ibérica®, Madrid, Spain) with a semidry transfer system (Bio-Rad), incubated with specific primary and secondary antibodies (see Supporting Information) and revealed by use of the ECL™-kit (Amersham Ibérica). Blots were imaged using an Odyssey® Fc System (Li-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska USA). The band intensities were quantified by densitometric analysis using ImageJ (NIH ImageJ® software, National Biosciences, Lincoln, NE, USA). Raw densitometric data in different blots were transformed as fold change of the control mean, expressed in arbitrary units of OD, and the housekeeping GAPDH or β -actin proteins were used as loading controls.

Plasma LPS levels

Plasma LPS levels were determined using a colour-based enzymatic reaction kit (Hycult Biotech, Uden, Netherlands), following the manufacturer's instructions. See Supporting Information.

Plasma and colonic IgA and IgM

Plasma and colonic IgA and IgM levels were measured by commercial ELISA-based kits (Elabscience, Biotechnology Co., Ltd, Wuhan, China), following the manufacturer's instructions. Tissue data were normalized to the total amount of protein. Additional details are in the Supporting Information.

Pro-inflammatory cytokine levels in the colon

Protein levels of TNF- α in distal colon samples were determined by commercially available ELISA kit (RayBiotech®, Norcross, Georgia), with similar tissue preparation as that used for colonic Ig determinations and following the manufacturer's instructions. See Supporting Information for details.

Colon nitrites (NO_2^-) levels

Samples of distal colon were homogenized in four volumes of PBS (pH = 7.4) mixed with a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche) followed by centrifugation at $12\,000\times g$ for 10 min, and supernatants were used. Nitrites (NO_2^-) were measured using the Griess method: briefly, in an acidic solution with 1% sulphonylamide and 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine, nitrites are converted into a pink compound that is measured spectrophotometrically at 540 nm in a microplate reader (Synergy 2; BioTek, Swindon, United Kingdom).

Protein assay

Protein levels were measured using Bradford's method based on the principle of protein-dye binding.

Transmission electron microscopy

Fresh colonic segments were fixed for 4 h in a solution of 4% paraformaldehyde/2% glutaraldehyde, cryoprotected overnight in PBS at 4°C , then postfixed in 1% osmium tetroxide and finally embedded in SPURR resin. Ultrathin sections (70 nm) were collected on 200 mesh copper grids and stained with 2% uranyl acetate/3% lead citrate. Sections were examined under a JEOL JEM 1010 transmission electron

microscope at the Spanish National Centre for Electron Microscopy (Madrid, Spain). To evaluate changes in TJs, the junctional regions of several sections of longitudinally sectioned villi per animal were examined by a member of the team blinded to the conditions of the experiment. We evaluated 5–15 TJs per animal ($n = 4$ –6) in each experimental group. When possible, we measured the separation between the cell membranes of the adjacent epithelial cells along the length of the TJ complex [TJ length was $0.33 \mu\text{m}$ approximately (see results)] from the apical membrane and reported the maximum distance found between cell membranes for each TJ measured. Quantification was performed using the Image J software (NIH ImageJ, National Biosciences).

Statistical analyses

The data and statistical analyses comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis *et al.*, 2015). Group sizes were designed taking into account the fact that some animals could be lost due to alcohol intoxication, since this binge ethanol protocol has been reported to induce a mortality rate of around 13–15% (Obenier *et al.*, 2002a,b; Antón *et al.*, 2017a). In order to correct for possible losses of animals, group sizes were unequal at the beginning of the experiment, with more subjects assigned to the ethanol-treated groups. Group sizes were previously calculated using a specialized software (STATGRAPHICS Centurion XVI, UCM licence), considering the mortality induced by alcohol intoxication. Initial subjects were randomly assigned to the groups: control $n = 9$, OEA $n = 9$, ethanol $n = 11$ and ethanol + OEA $n = 11$. Two animals in the ethanol groups died during binge intoxication, as expected in view of our previous experience and the reported mortality with this alcohol binge protocol. The final sample was, therefore, control $n = 9$, OEA $n = 9$, ethanol $n = 10$ and ethanol + OEA $n = 10$ (Figure 7). To determine the large number of proteins and markers in the study, we randomly selected $n = 6$ –8 per group for each marker. The number of animals was set to obtain a difference of $1.8 \times$ sigma with a test potency of 80% with a level of significance of 0.05. Any variation in this size per group in the Western blot, PCR or ELISA was due to methodological pitfalls or outliers (trimming). 'n' represents biological replicates (number of animals) throughout the manuscript (and not technical replicates).

The data and figures in the text are expressed as scatterplots, with mean $\pm$ SEM. The study of the composition of the microbiota in bacterial translocation has methodological limitations. We used two different approaches to visualize and analyse data from microbiological culture media; there were groups with no bacterial growth. We first included a minimum bacterial presence ($1 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) corrected to g of tissue for each animal, which is under the technique's detection limit. Statistical analyses were performed on groups with bacterial translocation (We excluded experimental groups with a total absence of bacterial growth.). We then included all groups and created contingency tables to study the dependence between the variables *ethanol* or *treatment* and *bacterial presence*, analysing the data with Fisher's exact test and χ^2 .

All data were subjected to the Kolmogorov–Smirnov normality test and then parametric or non-parametric analyses were chosen accordingly. If the data were not normally distributed, a non-parametric test (Mann–Whitney test to compare two groups or Kruskal–Wallis test with Dunn's *post hoc*

test to compare three groups) was performed. If the data were found to follow a Gaussian distribution, parametric tests were done (Student's two-tailed *t*-test for comparisons between two groups or one/two-way ANOVA). The data in ANOVA were first checked for inhomogeneity of variances by Barlett's test and transformed to log₁₀ when appropriate. The data from PCR were normalized to the mean value of the control group (mean value shown as 1) and presented as fold change of the control mean. The data in Western blots were presented as fold change of the control mean, expressed in arbitrary units. Normalizations in Western blot and PCR were done in order to compare samples run in different blots/sets and to control for unwanted sources of variation. Data subjected to ANOVA were followed by *post hoc* tests only when the *F* value attained $P < 0.05$ and there was no significant inhomogeneity of variances. Two-way ANOVA was used to compare the factors [alcohol/water] versus [OEA/vehicle]. The Bonferroni *post hoc* test in the two-way ANOVA was run only when a significant interaction (*F* value $P < 0.05$) was found between factors. Correlation analyses were performed using Spearman's rank coefficients (*r*). A *P* value < 0.05 was set as the threshold for statistical significance. The data were analysed using GraphPad Prism 5 for Windows, version 5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Harding *et al.*, 2018), and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18 (Alexander *et al.*, 2017a,b).

Results

Ethanol binge induces *Escherichia coli* translocation to different organs

Bacteria CFUs were found mainly in the MLN but also in the spleen, whereas there was no presence of bacteria in liver or blood after ethanol binge treatment. Specifically, 83% and 50% of ethanol-treated animals presented bacterial CFUs in MLN and spleen respectively. No bacteria were found in any tissue from control animals. Species isolated included Gram-negative (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* and *Klebsiella* spp.), Gram-positive (*Enterococcus* spp. and coagulase-negative *Staphylococcus*) and anaerobic bacteria (*Clostridium* spp). Among them, *E. coli* represented the majority of bacteria isolated (Figure 1). In this way, ethanol binge induced *E. coli* translocation to the MLN and spleen in 83% and 33% of animals respectively.

This exploratory experiment indicated that ethanol binges induce bacterial translocation, so in the following experiments we studied the integrity of the intestinal barrier to test the pharmacological effects of OEA.

Colonic inflammation after ethanol binge administration and repeated OEA pretreatment

Ethanol binge administration induced the up-regulation of TLR4 in colonic tissue (Figure 2). There was an overall

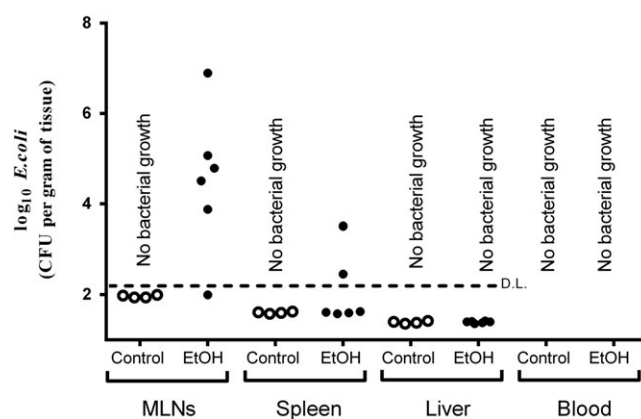


Figure 1

Bacteria CFUs of *Escherichia coli* in mesenteric lymph nodes (MLNs), spleen, liver and blood after ethanol binge exposure. Ethanol binge administration induced *E. coli* translocation to MLN in 83% of animals in the ethanol group and to the spleen in 33% of animals. Animals with no bacterial growth are represented under the detection limit (D.L.; discontinued horizontal line). Data are corrected by tissue weight (except blood samples) and expressed as log₁₀. exploratory (pilot) study: control group $n = 4$; EtOH group $n = 6$.

effect of the alcohol on mRNA expression of TLR4 (Figure 2A; $F_{(1, 22)} = 19.16$; $P < 0.05$) that was not prevented by OEA pretreatment. However, we observed an interaction (ethanol administration $\times$ OEA pretreatment) on TLR4 protein levels (Figure 2B; $F_{(1, 23)} = 8.21$; $P < 0.05$), and *post hoc* analysis determined that ethanol-treated animals showed increased TLR4 expression compared with controls, and OEA pretreatment counteracted this effect (Figure 2B).

TNF- α mRNA (Figure 2C) and protein levels (Figure 4D) were up-regulated after ethanol binge ($F_{(1, 21)} = 17.40$, $P < 0.05$ and $F_{(1, 22)} = 4.76$, $P < 0.05$ respectively). There was an interaction between alcohol and OEA at the mRNA level ($F_{(1, 21)} = 9.22$; $P < 0.05$). *Post hoc* analyses identified a difference between the control and the alcohol group that was not found in the alcohol + OEA group (Figure 2C).

Inducible NOS (iNOS) and stable NO metabolites (nitrites) were measured as indexes of nitrosative stress. Ethanol binge administration induced a robust elevation in iNOS mRNA (Figure 2E; alcohol effect: $F_{(1, 22)} = 8.78$; $P < 0.05$) and protein expression (Figure 2F; $F_{(1, 22)} = 9.92$; $P < 0.05$). OEA pretreatment did not counteract this increase in iNOS mRNA (no interaction and no OEA effect: ($F_{(1, 22)} = 0.046$; n.s.)), but there was an interaction (alcohol $\times$ OEA pretreatment) very close to significance ($F_{(1, 22)} = 4.09$, $P = 0.055$) at the protein level (Figure 2F). We also measured nitrites, the final and stable product of NO and potential inducers of biomolecular nitrosation and lipid peroxidation. Nitrite levels were clearly elevated after ethanol binge (alcohol $\times$ OEA interaction: $F_{(1, 20)} = 4.44$; $P < 0.05$). This increase in nitrites observed in the ethanol group versus controls was completely prevented by OEA pretreatment (Figure 2G).

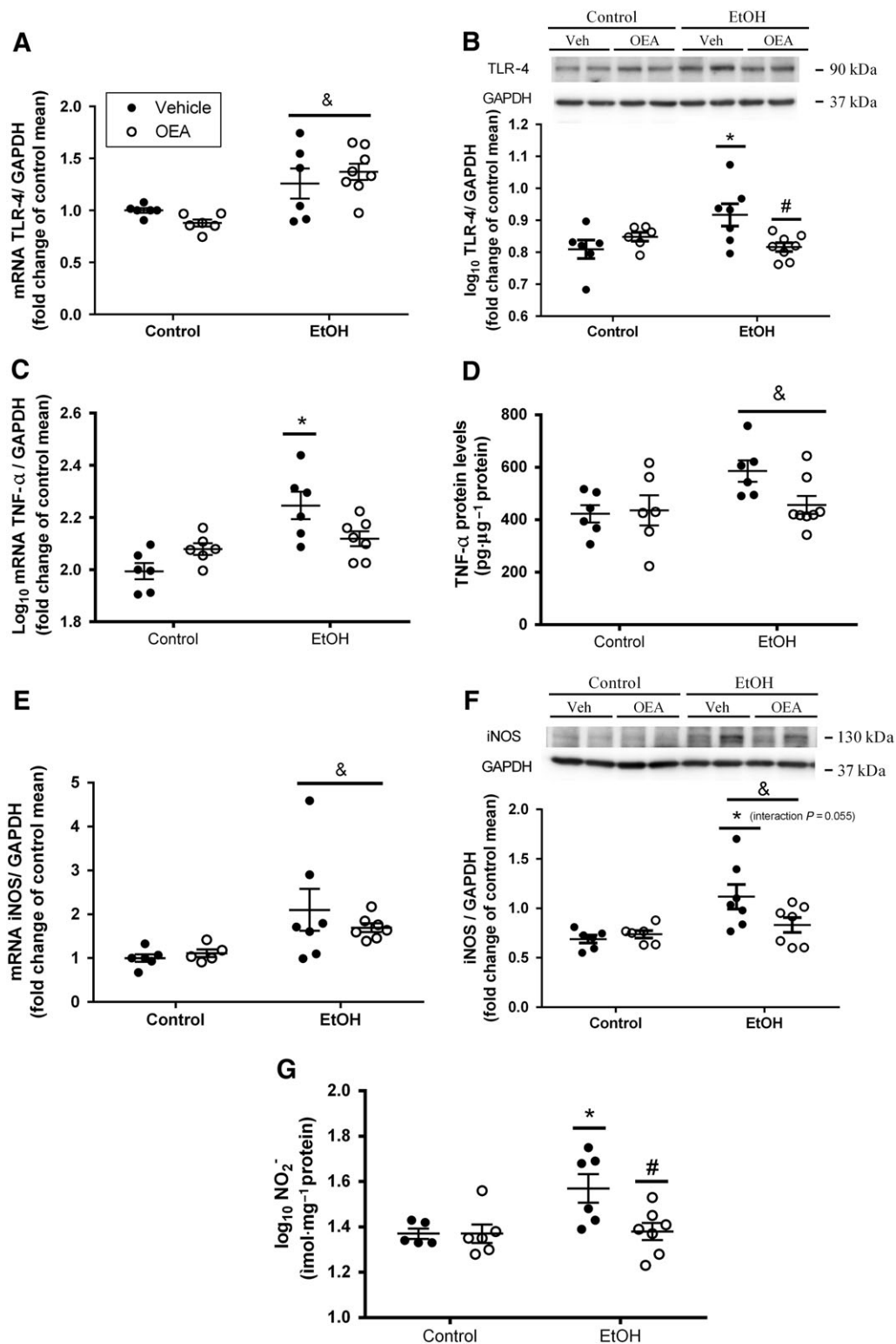


Figure 2

Activation of inflammatory components in distal colon after binge ethanol administration and effects of OEA i.p. pretreatment. (A) Relative mRNA levels of innate immunity receptor TLR4; (B) protein levels of TLR4; (C) relative mRNA levels of TNF-α; (D) protein levels of TNF-α; (E) relative mRNA levels of iNOS; (F) protein levels of iNOS; (G) quantification of nitrite levels in homogenized colonic samples. Results are presented as biological samples [Control + Vehicle (Veh) $n = 6$; Control + OEA $n = 6$; EtOH + Veh $n = 7$; EtOH + OEA $n = 8$] with the mean $\pm$ SEM. Overall ethanol effect: $\&P < 0.05$ (two-way ANOVA). Different from control group in the same condition: $*P < 0.05$; differences between ethanol and ethanol + OEA groups: $\#P < 0.05$ (two-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test after interaction).

IgM and IgA levels in colon and plasma after ethanol binge administration and OEA pretreatment

IgG are secreted to attack the antigens present in the structure of some microorganisms such as bacteria. IgM is one of the first lines of defence endogenously generated, mainly in blood and lymphatic tissue, to combat infections, whereas IgA is more abundant in mucosal membranes, including the gastrointestinal tract.

Ethanol binge treatment decreased the colonic and blood levels of IgM (Figure 3A, B; overall ethanol effect: $F_{(1, 21)} = 12.27$, $P < 0.05$; $F_{(1, 22)} = 4.88$, $P < 0.05$, respectively) regardless of OEA pretreatment (no interaction and no OEA effect: $F_{(1, 21)} = 0.34$, n.s.; $F_{(1, 22)} = 1.89$, n.s. respectively). However, regarding colonic IgA levels (Figure 3C), we observed an interaction between ethanol $\times$ OEA ($F_{(1, 22)} = 5.99$, $P < 0.05$), and *post hoc* analyses revealed that ethanol binge induced a robust increase in IgA expression in the colon that was totally abolished by OEA pretreatment. Plasma levels of IgA (Figure 3D) were also increased after ethanol (overall effect: $F_{(1, 23)} = 8.65$, $P < 0.05$), regardless of the OEA pretreatment (no interaction and no OEA effect: $F_{(1, 23)} = 0.876$, $P > 0.05$, n.s.).

Intestinal barrier integrity after alcohol binge administration and effects of OEA pretreatment

We checked the integrity of colonic membrane-bound (occludin and claudins) and scaffolding (ZO) proteins after the bacterial translocation process. Occludin and claudin-3 are highly expressed in colonic tissue. A reduction in their expression would be indicative of loss of integrity of the intestinal barrier.

We found interactions (ethanol $\times$ OEA pretreatment) in occludin mRNA and protein levels (Figure 4A, B; $F_{(1, 22)} = 4.09$, $P = 0.05$ and $F_{(1, 24)} = 6.97$, $P < 0.05$, respectively). Alcohol binge administration reduced the expression of occludin at the protein level (Figure 4B) but the decrease did not reach significance at the mRNA level (Figure 4A). We observed a significant up-regulation of occludin mRNA in animals pretreated with OEA within the ethanol-treated groups (Figure 4A), and, similarly, OEA counteracted the ethanol-induced reduction in occludin protein (Figure 4B).

There were also interactions between alcohol $\times$ OEA pretreatment in claudin-3 mRNA (Figure 4C; $F_{(1, 23)} = 7.18$, $P < 0.05$) and protein levels (Figure 4D; $F_{(1, 23)} = 4.74$, $P < 0.05$). Whereas alcohol reduced claudin-3 mRNA and protein, OEA pretreatment was able to clearly counteract this effect on mRNA (Figure 4C) but not protein (Figure 4D) expression. Claudin-4 mRNA decreased in both ethanol groups (Figure 4E; $F_{(1, 18)} = 32.11$; $P < 0.05$), and OEA pretreatment increased claudin-4 (Figure 4F; $F_{(1, 23)} = 6.425$, $P < 0.05$) and claudin-1 (data not shown; $F_{(1, 21)} = 11.45$; $P < 0.05$) protein levels in both control and ethanol-treated animals.

Ethanol binge administration did not modify ZO-1 mRNA or protein levels (Figure 4G; $F_{(1, 22)} = 0.13$; n.s.; Figure 4H; $F_{(1, 24)} = 1.07$; n.s., respectively), although an overall effect of OEA pretreatment on mRNA ($F_{(1, 22)} = 11.55$; $P < 0.05$) and protein levels ($F_{(1, 24)} = 4.93$; $P < 0.05$) was found.

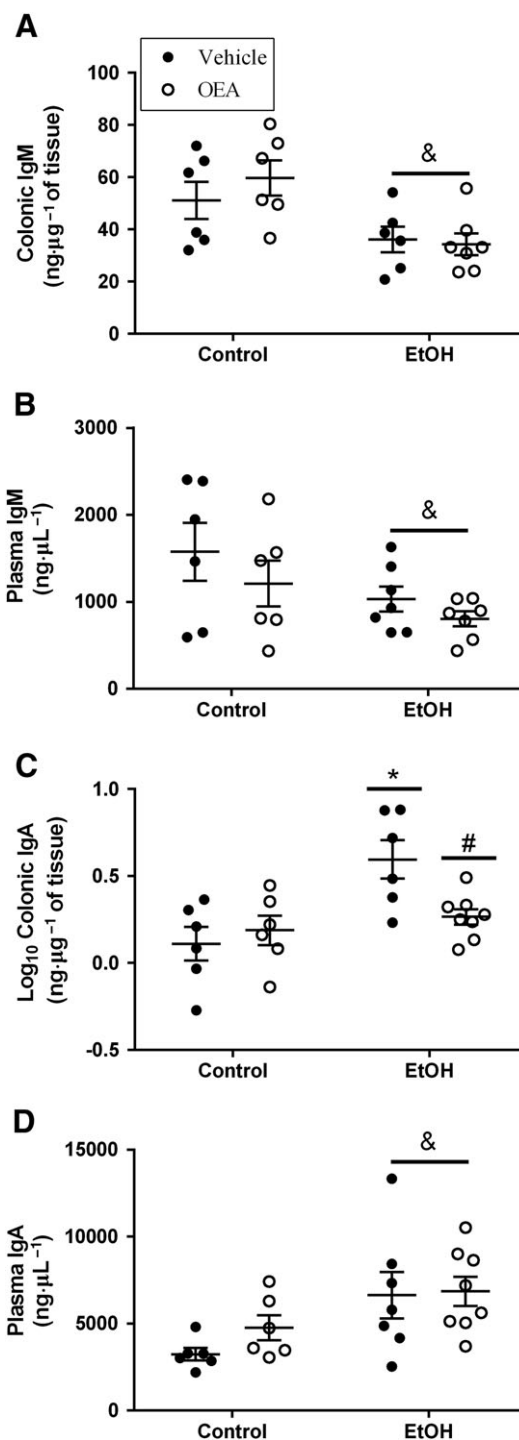


Figure 3

Expression of colonic and plasma IgM and IgA induced by ethanol binge exposure and effects of OEA i.p. pretreatment. (A) Colonic IgM levels; (B) plasma IgM levels; (C) colonic IgA levels; and (D) plasma IgA levels. Results are expressed as biological samples [Control + Vehicle (Veh) $n = 6$; Control + OEA $n = 6$; EtOH + Veh $n = 7$; EtOH + OEA $n = 8$] with mean (horizontal line) $\pm$ SEM (vertical line). Overall ethanol effect: $^{\&}P < 0.05$ (two-way ANOVA). Different from control group in the same condition: $^*P < 0.05$ and differences between ethanol and ethanol + OEA groups: $^{\#}P < 0.05$ (two-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test after interaction).

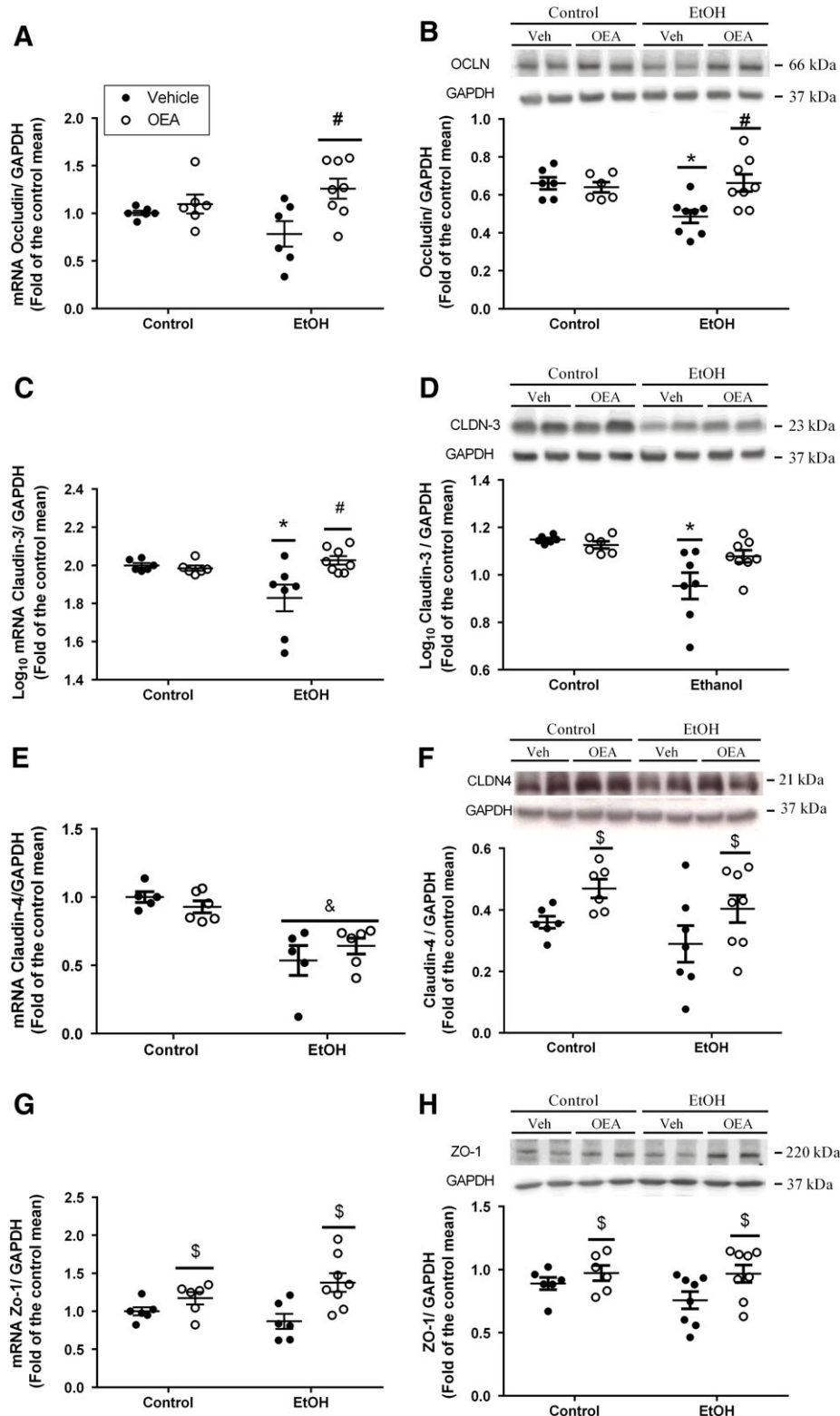


Figure 4

Alterations in colonic tight junction elements forming the intestinal barrier by ethanol binge administration and OEA i.p. pretreatment. Relative mRNA levels (left panels) and Western blot analyses (right panels) of (A, B) occludin, (C, D) claudin-3, (E, F) claudin-4 and (G, H) ZO-1. Results are presented as biological samples [Control + Vehicle (Veh) $n = 6$; Control + OEA $n = 6$; EtOH + Veh $n = 8$; EtOH + OEA $n = 8$] with the mean $\pm$ SEM. Overall OEA effect: $^{\$}P < 0.05$ (two-way ANOVA). Different from control group in the same condition: $^{*}P < 0.05$; differences between ethanol and ethanol + OEA groups: $^{\#}P < 0.05$ (two-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test after interaction).

Ultrastructural analysis of colonic TJs in ethanol binge-treated animals and effects of OEA pretreatment

In order to test the state and recovery of colonic TJs after the bacterial translocation process, we applied transmission electron microscopy for ultrastructural analysis of TJ complexes in the colon. Figure 5 shows selected micrographs of the total TJs quantified for each experimental group ($n = 25\text{--}42$). TJs are the membrane bilayers localized in the apical zone, near the brush border that are indicated by arrows in the figure. Qualitative analyses revealed that control animals (Figure 5A) showed an intact apical intercellular ultrastructure, whereas ethanol-treated animals (Figure 5B) showed dilated (larger) intercellular spaces and disrupted TJs (TJs contained less electron-dense material) in areas indicated by the arrows. OEA-pretreated ethanol binge animals (Figure 5C) showed similar dilated TJs as those in the vehicle pretreated ethanol rats, although the TJ electron-dense material in those appears to be more preserved than in these, which may suggest that some TJ proteins are maintained to some extent. Control animals with OEA pretreatment (Figure 5D) were morphologically indistinguishable from controls. The microvilli or the surface of the enterocytes may appear different in the micrographs due to

the fixation process. This study did not analyse the differences between the different experimental groups in terms of the presence of microvilli, enterocyte surface and desmosome structure. Figure 5E shows a representation of the apical structure, with the TJ, desmosome and microvilli and their correlates in a real micrograph.

Quantitative analyses (Figure 5F) showed that control animals had an average distance of 20 nm between adjacent membranes along the length of the TJ, with a maximum opening of 28 nm detected in a control animal. Ethanol-treated animals presented some dilated TJs (alcohol effect: $F_{(1, 133)} = 6220$, $P < 0.05$) regardless of the OEA i.p. treatment (no interaction found: $F_{(1, 133)} = 0$, 1862 , $P > 0.05$). The length of the TJs in each experimental group was also quantified: control: $0.30 \pm 0.01 \mu\text{m}$; EtOH: $0.36 \pm 0.02 \mu\text{m}$; EtOH + OEA: $0.35 \pm 0.02 \mu\text{m}$; and OEA: $0.32 \pm 0.02 \mu\text{m}$, with no significant effects among groups (Kruskal–Wallis test $P > 0.05$).

Apoptotic markers in colonic samples after ethanol binge administration and OEA pretreatment

In order to test whether ethanol induced the translocation of bacteria through an alternative mechanism other than the

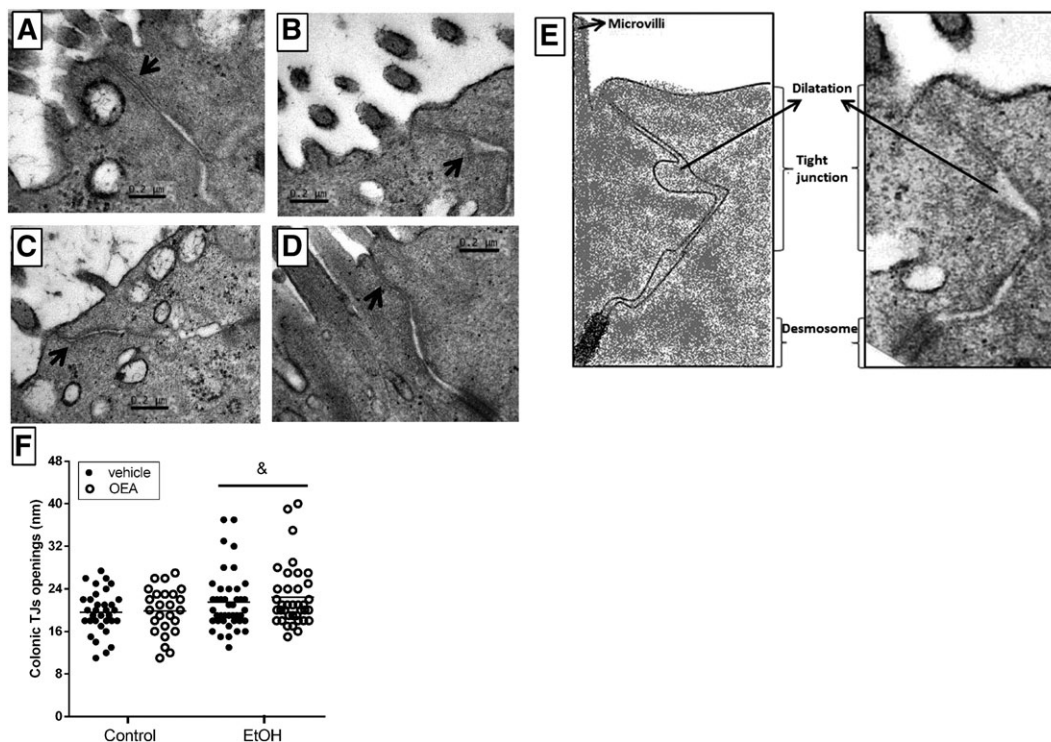


Figure 5

Transmission electron micrographs of colonic TJs in epithelial cells from: (A) control animals ($n = 6$), (B) ethanol binge-treated animals ($n = 4$); (C) OEA i.p. pretreated ethanol animals ($n = 4$); (D) OEA control animals ($n = 4$); (E) schematic representation of the apical structure of the gut; (F) quantification of TJs per experimental group (control: $n = 33$; EtOH $n = 42$; EtOH + OEA $n = 37$; OEA $n = 25$). Ethanol binge-treated animals showed dilated and disrupted TJs (arrow) compared with controls, which maintain the TJs ultrastructure preserved. Similar openings in TJs were observed in OEA-pretreated ethanol animals versus ethanol treated rats (ethanol effect: $^{\&}P < 0.05$, two-way ANOVA), although the presence of electron-dense material was greater in that group. No difference between control and OEA-pretreated control animals was observed. For quantitative analysis, two outliers in the ethanol group (51 and 89 nm) and one in the EtOH + OEA group (63 nm) were excluded. Arrows indicate TJ ultrastructure.

paracellular pathway (i.e. a transcellular pathway), we studied the markers of enterocyte apoptosis in colonic samples. We observed that repeated ethanol binge administration induced an up-regulation of pro-apoptotic molecules **Fas ligand** (FasL) (Figure 6A; $F_{(1, 19)} = 4690$, $P < 0.05$) and **caspase-9** (Figure 6C; $F_{(1, 20)} = 4879$, $P < 0.05$) compared to controls, implying apoptotic damage in enterocytes. We also examined procaspase-9, as shown in Figure 6B: whereas ethanol groups revealed a reduction in procaspase-9 levels ($F_{(1, 19)} = 5262$, $P < 0.05$), OEA pretreatment had a clear incremental effect on these levels in both the ethanol and control groups ($F_{(1, 19)} = 13,76$, $P < 0.05$), suggesting that OEA pretreatment may interfere with the conversion of procaspase-9 to the active caspase-9, although the effect in our study was insufficient to produce any significant changes in caspase-9.

Effects of repeated OEA administration on ethanol binge-induced bacterial translocation to MLNs

Once it was determined that alcohol binge induced the translocation of bacteria to the MLN (Figure 1) and that OEA exerted partial protective effects on the intestinal barrier (Figures 2–5), we studied the bacterial growth in MLN in animals pretreated with OEA i.p. As expected, there was no evidence of bacterial translocation to the MLN in control animals, whereas the ethanol groups showed translocation of *Enterobacteriaceae* (Figure 7A), mainly *E. coli* (Figure 7B), to the MLNs. The comparison between the groups with bacterial growth revealed no differences due to OEA pretreatment (Student's *t*-test). Ethanol binge exposure induced *Enterobacteriaceae* (mainly *E. coli*) translocation to MLNs in 90% of ethanol-treated animals, whereas bacterial growth in MLN was present in 70% of OEA-pretreated animals (Figure 7). Statistical analyses indicated a dependence between the presence of bacteria in MLN and the ethanol treatment ($\chi^2 = 15.39$, $P < 0.05$), but no significant dependence between OEA i.p. pretreatment and bacterial presence in ethanol-treated animals ($\chi^2 = 1.250$; n.s.) (Table 1).

Correlations between *Escherichia coli* presence in MLN, plasma LPS and IgA plasma levels

Levels of LPS in plasma were evaluated as an indirect measure of gut permeability to endotoxins. As we previously demonstrated (Antón *et al.*, 2017a), this protocol of ethanol binge administration significantly increased the levels of LPS in plasma. In the present study, the levels of LPS increased by about 57% versus controls, and OEA-pretreated ethanol animals showed an increase of 27% in LPS levels. Statistical analyses reflected an overall alcohol effect ($F_{(1,29)} = 5.308$, $P < 0.05$), regardless of OEA pretreatment (no interaction found: $F_{(1,29)} = 0.2001$, $P > 0.05$), similar to our previously published results.

We observed positive correlations between *E. coli* presence in MLN with LPS levels in plasma ($r = 0.556$) and plasma IgA ($r = 0.551$), as well as correlations between plasma LPS and IgA levels themselves ($r = 0.549$).

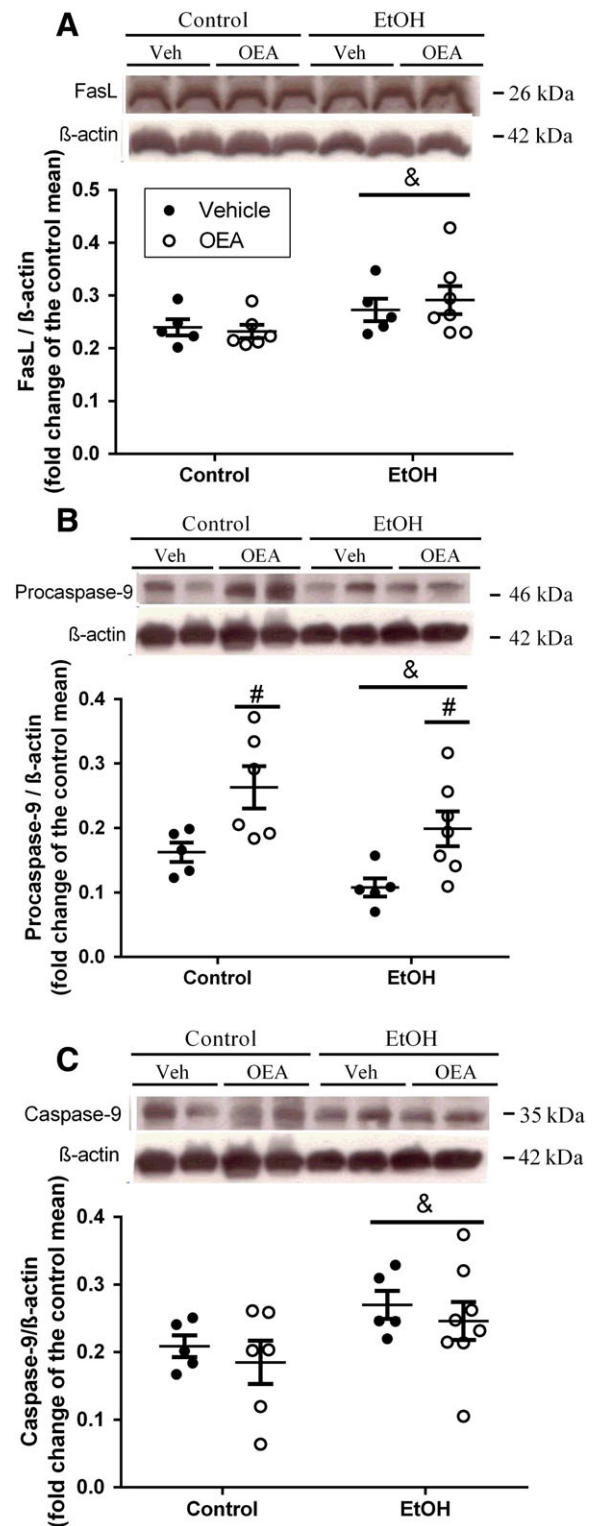


Figure 6

Apoptotic markers in colonic samples after ethanol binge administration and OEA pretreatment. (A) FasLigand (FasL); (B) Procaspase-9; (C) Caspase-9. Results are presented as biological samples [Control + Vehicle (Veh) $n = 5$; Control + OEA $n = 6$; EtOH + Veh $n = 5$; EtOH + OEA $n = 7$] with the mean $\pm$ SEM. Overall ethanol effect: & $P < 0.05$ and overall OEA effect # $P < 0.05$ (two-way ANOVA).

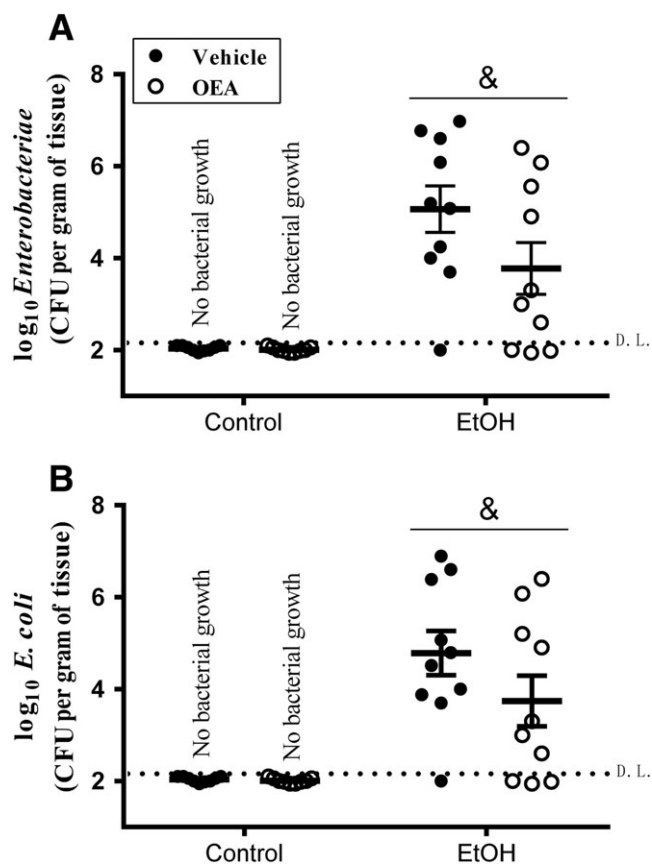


Figure 7

(A) *Enterobacteriaceae* and (B) *Escherichia coli* translocation to MLNs in rats exposed to the alcohol binge protocol and pharmacological OEA i.p. pretreatment. Dots indicate CFUs, and horizontal bars represent the mean. Animals with no bacterial growth are represented under the detection limit (D.L.; discontinued horizontal line). Data were corrected for tissue weight and expressed as $\log_{10}$ of mean (horizontal bars) $\pm$ SEM (vertical bars). (Control groups $n = 6$; EtOH groups $n = 10$). Bacteria were detected in ethanol binge rats but not in control animals, and there is a dependence between these variables ($\chi^2 15.39$, $^{\&}P < 0.05$). There were no significant differences between OEA- or vehicle-pretreated animals within the ethanol groups (Student's *t*-test, $P > 0.05$).

Comparison between i.p. and p.o. administration of OEA in ethanol-induced translocation of LPS and bacteria

The main objective of our current study was to discern the possible protective mechanisms of OEA in the intestinal barrier that could be related to the anti-inflammatory and protective effects observed in our previous work using i.p. administration of OEA (Antón *et al.*, 2017a). However, we further hypothesized here that p.o. administration of OEA could be even more effective at preserving the integrity of the colonic barrier. Thus, we measured plasma LPS levels and bacterial translocation under OEA i.g. treatment.

Figure 8A contains a schematic representation of the sites of action of the different routes of OEA administration. Figure 8B shows that ethanol binge administration induced *E. coli* translocation to MLNs in 75% of ethanol-treated

animals, whereas only 16% of p.o. OEA-pretreated animals presented bacterial growth in MLN. The Fisher's exact test (χ^2) indicated a dependence between pretreatment with p.o. OEA and the presence/absence of bacteria in MLNs ($\chi^2 = 4.667$; d.f. = 1; $P < 0.05$). The comparison between groups with bacterial growth revealed that pretreatment with p.o. OEA was able to reduce bacterial translocation in ethanol binge-treated animals (Mann–Whitney test).

Figure 8C shows the comparison between the effects of different routes of OEA administration on bacterial translocation (scatter plots) and the % increase in plasma LPS levels over the controls in each experimental group (upper panel, Figure 8B). OEA p.o. is effective at reducing *E. coli* translocation in MLN in ethanol-treated animals (Kruskal–Wallis test = 8.3, $P < 0.05$; Dunn's *post hoc* EtOH vs. oral OEA, $P < 0.05$), and there is a dependence between the route of administration and the bacteraemia in MLN ($\chi^2 = 4.267$; d.f. = 1; $P < 0.05$). We also observed a trend in the reduction of alcohol-induced increases in plasma LPS levels after the pretreatment with OEA that was clearly more pronounced with the p.o. OEA; indeed, the LPS levels in p.o. OEA-treated animals were near the control values. These results are in agreement with the bacterial translocation data presented in the scatter plots of Figure 8B.

Discussion

The main findings of this study were as follows: (i) ethanol binge episodes induced local gut inflammation and alterations in colonic TJ complexes, disrupting the intestinal barrier and allowing the passage of bacterial products (LPS) to plasma and bacterial translocation to the MLN (mainly) and spleen but not to the liver or bloodstream. (ii) Pretreatment with OEA i.p. reduced local gut inflammation and immune activation and to some extent preserved the structure of the colonic TJ proteins altered by ethanol binges but did not block ethanol-induced apoptosis. However, these effects did not alter bacterial translocation to the MLN after ethanol exposure. (iii) OEA p.o. had a stronger effect, drastically reducing the entry of LPS into the bloodstream and inhibiting the translocation of bacteria to the MLNs. These results suggest that pharmacological treatment with OEA i.p. may partially preserve the integrity of the intestinal barrier after the bacterial translocation induced by alcohol and that p.o. OEA may be more powerfully protective against ethanol binge-induced bacterial translocation. The different mechanisms of the effects of i.p. and p.o. OEA are discussed, but should be studied in more detail in future research.

There is growing evidence indicating that alcohol abuse alters intestinal permeability to toxic substances, although the direct mechanisms are not completely understood. A recent study showed that mice fed an alcohol-containing diet exhibited decreased apical junctional proteins leading to colonic hyper-permeability (Forsyth *et al.*, 2017). Inflammation may exacerbate barrier dysfunction in a synergistic manner. For example, TLR4 and the pro-inflammatory cytokine TNF- α have been shown to modulate colonic TJ permeability (Li *et al.*, 2013; Al-Sadi *et al.*, 2016), and anti-IL-6 antibody treatment improved ileum barrier function and reduced inflammation after a combined binge treatment and burn

Table 1Contingency tables to study the dependence between the variables *ethanol/pharmacological pretreatment* and the *bacterial presence* in MLNs

(a)	Bacterial presence (n)	No bacterial presence (n)	Dependence between EtOH and presence of bacteria?	Dependence between OEA i.p. pretreatment and bacterial presence?
Control	0	9	Yes * $P < 0.05$ $\chi^2 = 15.39$, d.f. = 1	No $P > 0.05$, $\chi^2 = 1.250$, d.f. = 1
Ethanol	9	1		
EtOH + OEA i.p.	7	3		
OEA i.p.	0	9	–	
(b)	Bacterial presence (n)	No bacterial presence (n)	Dependence between EtOH and presence of bacteria?	Dependence between p.o. OEA pretreatment and bacterial presence?
Control	0	6	Yes * $P < 0.05$ $\chi^2 = 7.875$, d.f. = 1	Yes * $P < 0.05$, $\chi^2 = 1.250$, d.f. = 1
Ethanol	6	2		
EtOH + p.o. OEA	1	5		
OEA p.o.	0	6	–	

Results indicate that ethanol binge drinking is associated with bacterial translocation in MLNs. The presence of MNL bacteria in ethanol-treated animals is not affected by the (a) OEA i.p. pretreatment but it is affected by the (b) p.o. OEA pretreatment. n = number of animals.

injury (Zahs *et al.*, 2013). Here, we provide *in vivo* evidence that repeated ethanol binges induce an up-regulation of the colonic TLR4 and pro-inflammatory cytokines as well as modifications in the intestinal TJs ultrastructure and connection proteins. The source of this inflammation could be a combined effect of the i.g. ethanol administration and the presence of bacterial products such as LPS, since both are TLR4 agonists. Recent studies suggest that physiologically relevant concentrations of LPS (0–1 ng·mL⁻¹) cause an increase in colonic epithelial TJ permeability that was mediated by the up-regulation of myosin light-chain kinase in a mechanism dependent on the TLR-4/MyD88 signal transduction pathway (Nighot *et al.*, 2017). Both long-term (Tamai *et al.*, 2002) and acute ethanol administration (Tamai *et al.*, 2000) enhance small intestine absorption of LPS, and we demonstrated that this also occurs after repeated binge episodes (Antón *et al.*, 2017a and current study).

The anti-inflammatory actions of OEA against alcohol binge have been described both peripherally and within the brain (Antón *et al.*, 2017a). The i.p. administration of OEA reduced TLR4 expression and the production of pro-inflammatory cytokines and oxidative/nitrosative stress in the frontal cortex after repeated ethanol binges (Antón *et al.*, 2017a) or LPS administration (Sayd *et al.*, 2014). In the current study, we showed that this anti-inflammatory profile extended to local actions in the colon, since we observed reduced levels of colonic TLR4, TNF- α , iNOS and nitrites after OEA i.p. pretreatment in ethanol binge animals. It has been shown that alcohol-induced colonic barrier dysfunction is mediated by an up-regulation of iNOS, NO overproduction and oxidation/nitration of cytoskeletal proteins *in vitro* (Banan *et al.*, 2000) and in an animal model of alcoholic liver injury (Tang *et al.*, 2009). We also showed a partial effect of OEA inhibiting ethanol binge-induced iNOS and NO expression *in vivo*, so local anti-inflammatory actions of OEA on TLR4, cytokines and iNOS may contribute to a partial protective effect on intestinal barrier dysfunction, since inflammation has been shown to compromise epithelial barrier integrity in the colon and small intestine (Du *et al.*, 2016).

Surveillance against pathogens is carried out by the innate and the adaptive immune systems. LPS or other pathogen-associated molecular patterns are first recognized by innate immunity receptors, such as TLR4, inducing local inflammatory mediators that may activate T and B lymphocytes to produce IgA and IgM as part of adaptive immune system activation. Overproduction of local inflammatory mediators may compromise the integrity of the intestinal barrier, allowing the migration of immune components to the bloodstream or *vice versa* (Keita and Soderholm, 2010). Thus, increased plasma IgA levels may be considered as a peripheral marker of inflammation. Here, we showed that repeated ethanol binges induced an up-regulation of plasma IgA expression that correlated with bacterial translocation and plasma LPS levels.

Still more pronounced was the elevation in intestinal IgA after ethanol treatment, which was completely blocked by OEA pretreatment, suggesting that OEA blocks both the immune (TLR4) and adaptive (IgA) components of the intestinal immune system. IgA is a major immunoglobulin isotype in the intestine and plays a role in gut homeostasis, protecting the epithelium from pathogenic microorganisms and regulating the gut microbiome (Inamine and Schnabl, 2018). Acute alcohol has been demonstrated to increase the number of IgA-immunoreactive cells by a mechanism involving endogenous NO (Budeč *et al.*, 2007), which is in accordance with our data. The effects of ethanol binge on IgM production were unexpected, since the drug decreased plasma and gut IgM levels. The reason for this result is at the moment unknown, and further research is needed to understand this adaptation to alcohol binge exposure.

Our results show that repeated ethanol binges alter the integrity of some colonic TJ proteins, such as claudin-3 and occludin (and claudin-4 mRNA). OEA pretreatment modulated the colonic expression of occludin and claudin-3 in alcohol-administered animals, showing protective actions against alcohol binge-induced disruption of the intestinal barrier. In this sense, an occludin deficiency in mice promoted ethanol-induced epithelial TJ alterations and colonic

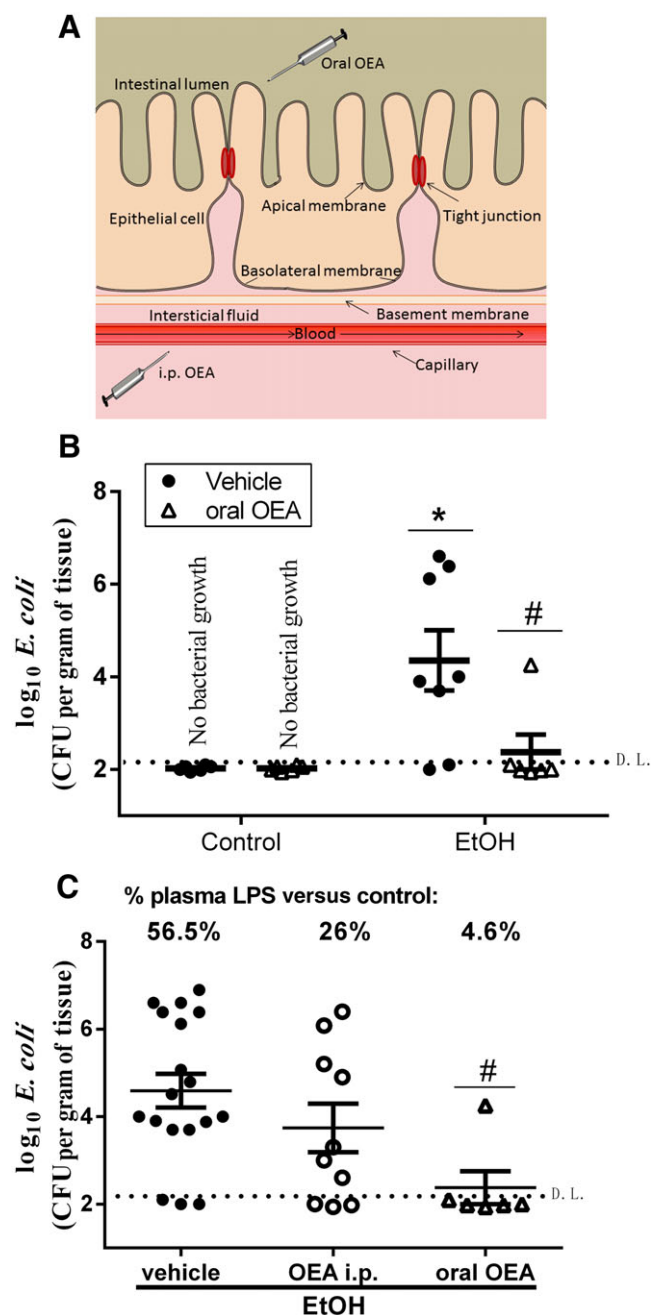


Figure 8

Effects of p.o. OEA administration on ethanol-induced bacterial and LPS translocation in MLN. (A) Schematic representation of the different routes of administration of OEA (i.p. and p.o.). (B) Effect of p.o. OEA pretreatment on ethanol-induced bacterial translocation in MLN. Data are expressed as biological samples [controls $n = 6$, OEA $n = 6$, EtOH + Vehicle (Veh) $n = 8$, EtOH + oral OEA $n = 6$] with mean $\pm$ SEM. (C) Comparison between effects of i.p. and p.o. OEA pretreatments on bacterial translocation (scatter plots) and on percentage increase in LPS in plasma (upper panel). Data are expressed as biological replicates (EtOH + Veh $n = 18$, EtOH + i.p. OEA $n = 10$, EtOH + oral OEA $n = 6$) and the mean $\pm$ SEM. Animals with no bacterial growth are represented under the detection limit (D.L.; discontinued horizontal line). Different from control group: * $P < 0.05$. Different from EtOH + Veh: # $P < 0.05$ [(B) Mann–Whitney; (C) Kruskal–Wallis with Dunn's *post hoc* test].

barrier dysfunction (Mir *et al.*, 2016). OEA pretreatment increased the expression of ZO-1, claudin-1 and claudin-4 under control and alcohol conditions. This possible defensive effect of OEA in physiological conditions is very interesting and deserves further investigation. A modulatory role of OEA on the intestinal barrier under control conditions has been suggested *in vitro* (Karwad *et al.*, 2017).

It is unclear whether the disruption of TJs observed in this study was sufficient to induce bacterial translocation. *E. coli* has an average size of $0.4 \times 1 \mu\text{m}$, but it should be noted that we observed the structure of the TJ complexes at one specific moment after the translocation. Bacterial size appears not to be the limiting factor for translocation, since enteric bacteria have been shown to differ in their fibrogenic capability to alter barrier integrity. These differences appear to be linked to the type of inflammatory response they produce. Whereas *E. coli* strains from healthy controls did not disrupt TJs, *E. coli* producing α -haemolysin in inflammatory-related diseases such as ulcerative colitis can cause a rapid loss of TJ integrity, which contributes to the pathophysiology of the disease (Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2016). The bacterial passage to the inner organs may therefore depend synergistically on different factors such as the inflammatory conditions and the TJ ultrastructure. The influence of pathogenic and commensal bacteria on epithelial barrier function also has severe implications in promoting bacterial translocation, and further work is thus necessary to elucidate how bacterial presence after repeated ethanol consumption modulates TJ permeability. In any case, in our study, we visualized TJ complexes when the bacterial translocation had already taken place, so we cannot exclude the possibility that the openings of the TJ complexes were larger at the specific moment of translocation. We can only demonstrate the consequences of the bacterial passage on TJ structure. Apical junctional complex structure can be dynamic, and the precise location of some of the component parts may influence the final outcome (Karwad *et al.*, 2017). We observed that in animals pretreated with OEA i.p. the intestinal barrier was preserved at the level of inflammation, immune activation and certain TJ proteins.

Recent evidence suggests that elevated inflammation in the gut combined with high levels of nitrosative stress could affect epithelial junctional complexes such as TJ proteins and contribute to gut leakiness and serum endotoxin levels (Cho *et al.*, 2018). TNF- α , through its receptor TNFR1, is known to contribute to the disruption of TJs and associated dysbiosis (Chen *et al.*, 2015). Our results concur with these discoveries, since we observed elevated TNF- α levels, iNOS expression and nitrite production in ethanol-treated animals, together with disruption of TJ proteins such as claudin-3 and occludin.

In spite of the promising protective effects of OEA in the gut barrier, we did not observe any significant reductions in plasma LPS or bacterial translocation to the MLN after its administration i.p. We cannot rule out the possibility that the passage of bacteria after ethanol binges could be related to other mechanisms that affect cell viability. Oxidative stress-induced damage to the cell membrane could explain the leakage of bacterial products through transepithelial mechanisms. However, recent *in vitro* studies indicate that the influence of OEA on intestinal permeability is not related to pore formation, destruction of the epithelial monolayer or

cell viability effects. OEA (apically applied) induces changes in the proteins that facilitate cell adhesion such as F-actin, indicating morphological changes in the filament arrangements (Karwad *et al.*, 2017). However, it is unclear how the change in apical morphology may connect to changes in cell–cell junctional complexes and render the interactions tighter. Our current study focused on the integrity of TJ proteins rather than on the structure of the microvilli and desmosome or the enterocyte surface. Nevertheless, we measured certain factors related to other mechanisms that could explain the bacterial leakage, such as the apoptosis of enterocyte cells. We found that ethanol binges increased FasL and caspase-9 in colonic samples, signalling enterocyte apoptotic damage. Whereas OEA inhibited nitrosative stress, inflammation and some TJ protein degradation, it failed to inhibit apoptosis, which could explain the absence of a significant effect on bacterial translocation after i.p. treatment. Other markers of enterocyte viability such as Krt20 should be verified in future studies.

Unlike i.p. treatment, i.g. administration of OEA was highly effective in reducing LPS and bacterial leakage, suggesting that the action from the apical side of the epithelial cells is stronger than from the basal side. This concurs with a recent *in vitro* study showing opposing actions of OEA on intestinal hyperpermeability when applied to the apical or basolateral compartments (Karwad *et al.*, 2017). In this study, the ionic conductance of the paracellular pathway was measured in human Caco-2 cells, as a proxy for TJ integrity. Whereas OEA increased the transepithelial resistance of the Caco-2 cell monolayer in a dose-dependent manner when applied to the apical membrane – indicating a decrease in intestinal permeability – the application of OEA to the basolateral membrane decreased TEER, suggesting increased intestinal permeability. These opposing actions of OEA were apparently mediated by different receptors (TRPV1 and PPAR- α respectively).

According to current knowledge, OEA is produced by the small intestine after feeding and is released into the blood as an incretin that regulates a number of body functions (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001), an action that in this experiment was simulated by i.p. OEA administration. Increased OEA release in the small intestine was observed in response to alcohol *in vivo* (Bilbao *et al.*, 2016) and to inflammation *in vitro* (Karwad *et al.*, 2017), suggesting a local role of OEA in regulating alcohol responses and intestinal permeability respectively. The idea that inflammation may trigger the release of OEA has been also proposed in our previous studies, in which we observed exacerbated inflammatory responses and increased plasma OEA levels in human alcohol binge drinkers (Orío *et al.*, 2017; Antón *et al.*, 2017b). Alcohol also induced neuroinflammation and OEA release in the frontal cortex of laboratory animals (Bilbao *et al.*, 2016; Antón *et al.*, 2017a). It is not clear whether OEA is synthesized from the enterocytes or the mucosal layer. The administration of OEA p.o. simulates a specific action on the mucosal side of the gut. The different results obtained with the two routes of administration indicate that the action of OEA is stronger from the apical side of the epithelial cells than from the basal side. The mechanisms involved in the action of oral OEA are unknown at present, and this study points to the need for

further research in this area. OEA may permeate the macrophage-containing submucosa and exert its anti-inflammatory actions there. Alternatively, due to the lipid amine nature of OEA, changes in the structure of the lipid bilayer and the lipid raft composition could be future targets of investigation, since ethanol- or LPS-induced translocation and clustering of TLR4 and signalling molecules into lipid rafts and lipid raft disrupting agents abolished the ethanol-induced TLR4 signalling pathway (Fernández-Lizarbe *et al.*, 2008).

In summary, alcohol binge episodes induced a dysfunction in the intestinal barrier characterized by an increased intestinal inflammatory response, activation of the innate and adaptive immune systems, loss of TJ protein complexes in the apical zone of the intestinal epithelium and apoptosis of enterocytes, which resulted in elevated plasma LPS levels and bacterial translocation to the MLN. Pretreatment with OEA i.p. ameliorated the local inflammatory and innate/adaptive immune responses, partially preventing the damage to TJ proteins induced by an alcohol binge but failed to block the apoptotic mechanisms associated with the transcellular pathway. As a consequence, OEA i.p. treatment did not inhibit alcohol binge-induced bacterial translocation. However, p.o. administration of OEA significantly reduced LPS levels and bacterial leakage to the MLNs, indicating that the route of administration is an important variable in the protective effects of OEA in alcohol abuse. Our results have important implications for clinical practice, suggesting that OEA-based pharmacotherapies, at least as a co-adjuvant strategy, could be potentially useful to treat disorders characterized by intestinal barrier dysfunction, including alcohol abuse.

Acknowledgements

This study has been supported by the *Plan Nacional sobre Drogas* ref: 2015/005 (*Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*) to L.O. A.R.G. is a recipient of a fellowship from *Consejería de Educación, Juventud y Deporte* (Comunidad de Madrid/Fondo Social Europeo).

Author contributions

L.O. conceived the study and obtained the funding. M.A., A.R.G. and L.O. designed the study. B.G.B., M.A., A.R.G., A.B., A.P. and L.O. performed the drug administration, tissue collection and biochemical experiments. J.R.C., N.G. and M.L.G.L. were in charge of microbiological studies. F.R.F. provided synthesized OEA. J.C.L. provided methodological support and revised the manuscript. M.A., A.R.G. and L.O. analysed the data, and L.O. drafted the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of transparency and scientific rigour

This **Declaration** acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

References

- Alexander SPH, Fabbro D, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E *et al.* (2017a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18: Catalytic receptors. *Br J Pharmacol* 174: S225–S271.
- Alexander SPH, Fabbro D, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E *et al.* (2017b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18: Enzymes. *Br J Pharmacol* 174: S272–S359.
- Al-Sadi R, Guo S, Ye D, Rawat M, Ma TY (2016). TNF- α modulation of intestinal tight junction permeability is mediated by NIK/IKK- α axis activation of the canonical NF- κ B pathway. *Am J Pathol* 186: 1151–1165.
- Antón M, Alén F, Gómez de Heras R, Serrano A, Pavón FJ, Leza JC *et al.* (2017a). Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addict Biol* 22: 724–741.
- Antón M, Rodríguez-González A, Rodríguez-Rojo IC, Pastor A, Correas Á, Serrano A *et al.* (2017b). Increased plasma oleoylethanolamide and palmitoleoylethanolamide levels correlate with inflammatory changes in alcohol binge drinkers: the case of HMGB1 in women. *Addict Biol*. <https://doi.org/10.1111/adb.12580>.
- Bala S, Marcos M, Gattu A, Catalano D, Szabo G (2014). Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. *PLoS One* 9: e96864.
- Banan A, Fields JZ, Decker H, Zhang Y, Keshavarzian A (2000). Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 997–1008.
- Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavón FJ, Giuffrida A, Suárez J *et al.* (2016). Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addict Biol* 21: 859–872.
- Bishehsari F, Magno E, Swanson G, Desai V, Voigt RM, Forsyth CB *et al.* (2017). Alcohol and gut-derived inflammation. *Alcohol Res* 38: 163–171.
- Budeč M, Koko V, Todorović V, Marković D, Poštić M, Drndarević N *et al.* (2007). Possible mechanism of acute effect of ethanol on intestinal IgA expression in rat. *Int Immunopharmacol* 7: 858–863.
- Chen P, Stärkel P, Turner JR, Ho SB, Schnabl B (2015). Dysbiosis-induced intestinal inflammation activates tumor necrosis factor receptor I and mediates alcoholic liver disease in mice. *Hepatology* 61: 883–894.
- Cho YE, Yu LR, Abdelmegeed MA, Yoo SH, Song BJ (2018). Apoptosis of enterocytes and nitration of junctional complex proteins promote alcohol-induced gut leakiness and liver injury. *J Hepatol* 69: 142–153.
- Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SP, Giembycz MA *et al.* (2015). Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172: 3461–3471. <https://doi.org/10.1111/bph.12856>.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9: 46–56.
- DEUTSCHE HAUPTSELLE FÜR SCHTFRAGUEN e.V. (DHS) (2008). Binge Drinking and Europe. DHS: Hamm.
- Du L, Kim JJ, Shen J, Dai N (2016). Crosstalk between inflammation and ROCK/MLCK signaling pathways in gastrointestinal disorders with intestinal hyperpermeability. *Gastroenterol Res Pract* 2016, 7374197: 1–9.
- Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Gascon MS, Blanco A, Guerri C (2008). Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. *Mol Immunol* 45: 2007–2016.
- Forsyth CB, Shaikh M, Bishehsari F, Swanson G, Voigt RM, Dodiya H *et al.* (2017). Alcohol feeding in mice promotes colonic hyperpermeability and changes in colonic organoid stem cell fate. *Alcohol Clin Exp Res* 41: 2100–2113.
- Giuffrida A, Rodriguez de Fonseca F, Piomelli D (2000). Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry. *Ann Biochem* 280: 87–93.
- Harding SD, Sharman JL, Faccenda E, Southan C, Pawson AJ, Ireland S *et al.* (2018). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to IMMUNOPHARMACOLOGY. *Nucleic Acids Res* 46: D1091–D1106.
- Inamine T, Schnabl B (2018). Immunoglobulin A and liver diseases. *J Gastroenterol* 53: 691–700.
- Karwad MA, Macpherson T, Wang B, Theophilidou E, Sarmad S, Barrett DA *et al.* (2017). Oleoylethanolamine and palmitoylethanolamine modulate intestinal permeability in vitro via TRPV1 and PPAR α . *FASEB J* 31: 469–481.
- Keita AV, Soderholm JD (2010). The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil* 22: 718–733.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Animal research: Reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.
- Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB, Rangan J, Jakate S, Shaikh M *et al.* (2009). Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatol* 50: 538–547.
- Leclercq S, Cani PD, Neyrinck AM, Stärkel P, Jamar F, Mikolajczak M *et al.* (2012). Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain Behav Immun* 26: 911–918.
- Li X, Wang C, Nie J, Lv D, Wang T, Xu Y (2013). Toll-like receptor 4 increases intestinal permeability through up-regulation of membrane PKC activity in alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 47: 459–465.
- Majchrowicz E (1975). Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacologia* 43: 245–254.
- Mir H, Meena AS, Chaudhry KK, Shukla PK, Gangwar R, Manda B *et al.* (2016). Occludin deficiency promotes ethanol-induced disruption of colonic epithelial junctions, gut barrier dysfunction and liver damage in mice. *Biochim Biophys Acta* 1860: 765–774.
- Mirsepasi-Lauridsen HC, Du Z, Struve C, Charbon G, Karczewski J, Krogfelt KA *et al.* (2016 Mar). Secretion of Alpha-Hemolysin by

Escherichia coli Disrupts Tight Junctions in Ulcerative Colitis Patients. *Clin Transl Gastroenterol* 7: e149.

Morton DB (1999). Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research, Humane endpoints in animal experimentation for biomedical research: Ethical, legal and practical aspects. The Royal Society Medical Press: London, pp. 5–12.

Nielsen MJ, Petersen G, Astrup A, Hansen HS (2004). Food intake is inhibited by oral oleoylethanolamide. *J Lipid Res* 45: 1027–1029.

Nighot M, Al-Sadi R, Guo S, Rawat M, Nighot P, Watterson MD *et al.* (2017). Lipopolysaccharide-induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by Toll-like receptor 4/myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) activation of myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 187: 2698–2710.

Obernier JA, Boudin TW, Crews FT (2002a). Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcohol Clin Exp Res* 26: 547–557.

Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS, Crews FT (2002b). Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 521–532.

Orio L, Anton M, Rodriguez-Rojo IC, Correas A, Garcia-Bueno B, Corral M *et al.* (2017). Young alcohol binge drinkers have elevated blood endotoxin, peripheral inflammation and low cortisol levels: neuropsychological correlations in women. *Addict Biol.* <https://doi.org/10.1111/adb.12543>.

Pascual M, Pla A, Minarro J, Guerri C (2014). Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol Alcohol* 49: 187–192.

Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J *et al.* (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 414: 209–212.

Sayd A, Anton M, Alen F, Caso JR, Pavon J, Leza JC *et al.* (2014). Systemic administration of oleoylethanolamide protects from

neuroinflammation and anhedonia induced by LPS in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 18. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu111>.

Suzuki T (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 70: 631–659.

Tamai H, Kato S, Horie Y, Ohki E, Yokoyama H, Ishii H (2000). Effect of acute ethanol administration on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 24: 390–394.

Tamai H, Horie Y, Kato S, Yokoyama H, Ishii H (2002). Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysaccharides in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 26: 75S–80S.

Tang Y, Forsyth CB, Farhadi A, Rangan J, Jakate S, Shaikh M *et al.* (2009). Nitric oxide-mediated intestinal injury is required for alcohol-induced gut leakiness and liver damage. *Alcohol Clin Exp Res* 33: 1220–1230.

Zahs A, Bird MD, Ramirez L, Choudhry MA, Kovacs EJ (2013). Anti-IL-6 antibody treatment but not IL-6 knockout improves intestinal barrier function and reduces inflammation after binge ethanol exposure and burn injury. *Shock* 39: 373–379.

Zhou Y, Yang L, Ma A, Zhang X, Li W, Yang W *et al.* (2012). Orally administered oleoylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor α . *Neuropharmacology* 63: 242–249.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

<https://doi.org/10.1111/bph.14501>

Data S1 RT-PCR, Western Blot and ELISA details.

Artículo 3

Rodríguez-González, A. & Orio, L. (2020). Microbiota and Alcohol Use Disorder: Are Psychobiotics a Novel Therapeutic Strategy? *Current Pharmaceutical Design*. 26: 1–12. doi: 10.2174/1381612826666200122153541

MINI-REVIEW ARTICLE

Microbiota and Alcohol Use Disorder: Are Psychobiotics a Novel Therapeutic Strategy?

Alicia Rodriguez-Gonzalez and Laura Orio*

Department of Psychobiology and Methods in Behavioural Sciences, Faculty of Psychology, Complutense University of Madrid, Spain

ARTICLE HISTORY

Received: November 11, 2019
Accepted: December 30, 2019

DOI:

10.2174/1381612826666200122153541

Abstract: In recent years, there has been an exciting focus of research attempting to understand neuropsychiatric disorders from a holistic perspective in order to determine the role of gut microbiota in the aetiology and pathogenesis of such disorders. Thus, the possible therapeutic benefits of targeting gut microbiota are being explored for conditions such as stress, depression or schizophrenia. Growing evidence indicates that there is bidirectional communication between gut microbiota and the brain that has an effect on normal CNS functioning and behavioural responses. Alcohol abuse damages the gastrointestinal tract, alters gut microbiota and induces neuroinflammation and cognitive decline. The relationship between alcohol abuse and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation, inflammation and immune regulation has been well documented. In this review, we explore the connection between microbiota, brain function and behaviour, as well as the mechanisms through which alcohol induces microbiota dysbiosis and intestinal barrier dysfunction. Finally, we propose the study of psychobiotics as a novel pharmaceutical strategy to treat alcohol use disorders.

Keywords: Alcohol, microbiome, gut-brain axis, dysbiosis, AUD.

1. MICROBIOTA-GUT-BRAIN AXIS: THE PSYCHOMICROBIOME

The influence of the gastrointestinal (GI) microbiota in brain processes has been termed *psychomicrobiome*. The vast quantity of microbes that reside in the human gut has physiological functions for the host, including the regulation of behavioural, emotional and cognitive responses of the human brain (1). We live in alliance with a plethora of microorganisms, predominantly bacteria, viruses, fungi, protozoa and archaea (2), and there is increasing evidence pointing to a role for these microorganisms to control neurodevelopment (*i.e.* microglia maturation (3)), adult brain homeostasis (*i.e.* blood-brain barrier (BBB) function (4)), the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and the immune system (5).

The maintenance of the homeostasis in the gut-brain axis is essential for good mental health since GI microbiota affects different functions in the physiology of the host, including brain function, mood and behaviour (1). In fact, there is a high comorbidity rate between GI disorders (inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome) and some neuropsychiatric disorders (anxiety and depression) (6,7). Independent studies have reported changes in the GI microbiota in different psychiatric disorders such as depression (8), autism (9) and alcohol dependence (10).

Dysbiosis of the microbiota refers to alterations in the composition and/or function of the normal microbiota, which involves a shift from a typical beneficial status to another condition that may negatively affect an individual's health. Significant changes in the GI microbial composition may alter the absorption of essential nutrients, such as vitamins, polyunsaturated fatty acids or essential amino acids, as well as promoting malabsorption of carbohydrates,

abnormal fermentation of fibre or may increase the synthesis of toxic compounds, such as ammonia (11,12). It is worth noting that certain specific bacteria survive better in conditions of GI inflammation, such as the *Enterobacteriaceae* family (13), and that an overgrowth and colonization of the GI tract with pathogenic bacteria, such as *Helicobacter pylori*, leads to recognised disorders such as ulcers, which are highly influenced by psychological stress (14).

Evidence of behavioural regulation resulting from GI microbiota has been reported, for example, by GI microbiota transplantation from high-fat diet mice to depleted-microbiota mice, resulting in disrupted exploratory, cognitive and stereotypical behaviour compared with animals that received microbiota from control-diet animals (15). Although the exact mechanisms of this communication between GI microbiota and the brain have not yet been fully elucidated, several potential pathways have been described to provide a bidirectional interaction between the GI microbiota and the brain.

1.1. Intestinal Barrier Dysfunction and Peripheral Inflammation

The GI barrier is a continuous multi-layer barrier formed by the mucus, the epithelial cell layer and the lamina propria, where numerous immune cells reside. The main functions of the GI barrier are the absorption of nutrients and water from the intestinal lumen and the restriction of the passage of toxic compounds, such as microorganisms or their products, to the systemic circulation (16). There is evidence that a breakdown of the intestinal barrier allows the entry of bacteria or their products, such as the endotoxin lipopolysaccharide (LPS), a cell wall component of Gram-negative bacteria, to the systemic blood flow, creating a leaky gut.

In normal conditions, LPS could permeate through the healthy GI barrier into the portal circulation to the liver, where it is neutralised and eliminated by different mechanisms, including phagocytosis by Kupffer cells, enzymes that degrade it, and by binding it to different molecules, such as lipoproteins and apolipoproteins (17).

*Address correspondence to this author at the Department of Psychobiology and Methods in Behavioural Sciences, Faculty of Psychology, Complutense University of Madrid, Campus de Somosaguas s/n, 28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid, Spain); E-mail: lorio@psi.ucm.es

However, when a leaky gut is produced, the high levels of LPS are not efficiently cleared in the liver and enter into the bloodstream, inducing endotoxaemia (18), which in turn activates the immune system and induces a peripheral inflammatory response. When high levels of LPS enter into the systemic circulation, innate immune cells, including Kupffer cells in the liver, are activated *via* cluster of differentiation-14 (CD-14) and Toll-like receptor (TLR)4, since LPS is a potent agonist of the TLR4 innate immune receptors. Consequently, pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-8, and pro-inflammatory mediators such as reactive oxygen species (ROS), are released into the systemic circulation (19). Peripheral inflammation affects the central nervous system (CNS) functioning through multiple mechanisms that will be reviewed below. For example, this peripheral inflammatory response may cause and perpetuate chronic neuroinflammation (20), leading to *sickness behaviour*, which is characterised by the loss of social interaction, reduced cognition, depression, anxiety, loss of appetite and lethargy (21).

1.2. Immune System Activation

As mentioned above, GI microbiota is a source of pro-inflammatory molecules that activate the immune system. The immune system helps to maintain GI homeostasis and has a great impact on behaviour. In fact, immune system alterations have been well documented in several different disorders, such as depression, anxiety and addiction (22). There is evidence that LPS strongly activates the innate immune system through TLR4 activation in peripheral immune cells, inducing the synthesis of pro-inflammatory cytokines, which can ultimately reach the brain and alter its normal functioning and behaviour.

GI microbiota appears to be needed for the development of the immune system (23), since Germ-free (GF) mice have defected the structure and function of their immune system, and these effects can be partly reversed by providing them with microbiota (24). Additionally, there is evidence suggesting that GI microbiota regulates maturation and function of microglial cells; the lack of GI microbiota promotes changes in microglia properties, while GI recolonization restores microglial function (3).

1.3. Blood-brain Barrier Permeability

The BBB is a fundamental barrier that regulates the passage of molecules between the circulation to the brain parenchyma, and its integrity is essential to ensure the CNS homeostasis. It is known that bacteria and their products can disrupt BBB. For example, LPS affects the expression of tight junction (TJ) proteins forming the BBB (25) and, indeed, increased BBB permeability has been observed in cases of sepsis (26). Interestingly, it was found that low-dose penicillin modifies the BBB integrity in the hippocampus by increasing the mRNA and protein levels of the TJ proteins occludin and claudin-5 (27). Recently, it has been shown in an *in vitro* model that the short-chain fatty acid (SCFA) propionate (produced when GI microbiota ferments dietary fibre) has a beneficial effect on BBB after LPS exposure (28). A total lack of GI microbiota in mice during the foetal period increases BBB permeability that is maintained into adulthood, suggesting a role of the GI microbiota in the formation of the BBB TJ proteins. This increased permeability of the BBB can be reverted (decreased) by the transfection of beneficial bacteria (*i.e.* bacteria that produce SCFA) into these GF mice (4). These studies highlight the beneficial role of normal GI microbiota in the functioning of the BBB.

1.4. HPA Axis

The HPA axis is crucial for the adaptation of the organism to stress and therefore plays an essential role in the regulation of different homeostatic functions, such as mood and behaviour. Although evidence regarding the status of the HPA axis in GF mice is contradictory, perhaps due to different genetic backgrounds in ani-

mals and diverse methodologies, studies report that GI microbiota is important for the HPA axis development and function (29). In some studies, adult GF mice exhibit more anxiety-like behaviour (30,31) as well as higher levels of corticosterone and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) than controls, which are partially reversed after faecal transplantation from the control animals, and totally reversed after treatment with *Bifidobacterium infantis* (32,33). These studies report that earlier transplantation takes place during development, the better the results obtained, highlighting the existence of a critical window for the colonisation process to develop a normal HPA axis (33). In contrast to this, other studies have reported less anxiety-like behaviour in GF mice (34-37).

These findings support the idea that GI microbiota affects the HPA axis function. However, in the same way that bacteria can influence the HPA axis, this axis and stress can modulate GI microbiota composition. For example, stress in piglets reduces the number of *Lactobacillus* sp. in stomach, ileum and jejunum and increases the number of the pathogen *Streptococcus* in the stomach (38); maternal separation can reduce the abundance of *Lactobacillus* in baby rat faeces, with long-term effects on GI microbiota (39); and the abundance of the beneficial bacteria *Lactobacillus* in the faeces of rhesus monkeys can also be reduced (40). There is also evidence from human studies, which report that stress negatively modulates GI microbiota composition (41,42). For instance, stress during military training can decrease Bacteroidetes and increase Firmicutes (43).

1.5. Autonomic Nervous System Activation

The autonomic nervous system (ANS) connects the GI tract with brain areas such as the hypothalamus or the nucleus tractus solitarius. The longest nerve of the ANS is the vagus nerve or tenth cranial nerve, which provides afferent and efferent innervations to the organs of the abdominal cavity and controls functions, including gut motility. The vagus nerve function is crucial in gut-brain communication (1). The afferent endings of the vagus nerve have IL-1 and prostaglandin receptors, which could facilitate the sending of information on the peripheral immune status to the brain (44). Additionally, electrical stimulation of the vagus nerve induces brain expression of IL-1 β and activation of the HPA (45) and peripheral LPS induces the same effect (46). Evidence on the importance of this pathway in GI microbiota-brain communication is provided by studies in which vagotomy (surgical removal of the vagus nerve) prevents behavioural changes promoted by GI microbiota (despite treatment with probiotics) (47). However, there must exist other vagus-independent pathways since, in another study, vagotomy carried out before infection failed to prevent anxiety-like behaviour in mice (48).

1.6. Neurotransmitter Signalling and Neurogenesis

GI microbiota may regulate mood and behaviour by modifying neurotransmitter signalling. For example, some GI bacteria can synthesise different neurotransmitters such as serotonin, dopamine and the inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) (1), which are relevant regulators of the reward system and mood. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* can synthesise GABA in culture (49) and ingestion of *Lactobacillus rhamnosus* in mice modulates the levels of GABA receptor in different brain regions, which are related to the physiopathology of anxiety and depression (47). Serotonin is considered as a natural mood stabiliser and 90% of this neurotransmitter is synthesised in the GI tract. Indeed, GI microbiota can induce the production of serotonin by enterochromaffin cells through the activity of SCFAs (50). Interestingly, GF mice have more plasmatic tryptophan (the serotonin precursor), more serotonin in the hippocampus (32), higher serotonin turnover in the striatum and elevated noradrenaline and dopamine (51). Regarding other neurotransmitters such as the excitatory glutamate, GF mice have reduced mRNA levels of the subunit 2A of

the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) in the hippocampus (33).

GI microbiota can also regulate brain function and behaviour through changes in neurogenesis-related parameters. For example, GF mice show less hippocampal and cortical brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which promotes the growth, differentiation and survival of neurons (33). However, hippocampal levels of BDNF mRNA are increased in female GF mice, which suggests a gender-dependent regulation of GI microbiota on hippocampal BDNF levels (32,35). Additionally, the induction of intestinal dysbiosis in mice increases the expression of hippocampal BDNF and behavioural changes (exploratory behaviour) (48). However, in a more recent study, it was shown that the depletion of GI microbiota from early adolescence in mice significantly reduced BDNF levels (31). It is evident, then, that the role of GI microbiota on neurogenesis parameters is still not fully elucidated and requires further investigation.

1.7. Presence of Bacteria in the Brain?

Very recently, the presence of bacteria in healthy human *post-mortem* brains has been described, creating controversy among the scientific community. Abundant bacteria have been found in the human substantia nigra, hippocampus and frontal cortex, and sparse numbers in the striatum. Bacteria were predominantly located in astrocyte endfeet at the BBB, dendrites and the soma of glial cells. This presence of bacteria in the brain is still highly controversial and it is speculated that it may be tied to contamination. Studies conducted in animals also revealed the presence of bacteria in control mice brains with no presence of bacteria in GF mice, which appears to eliminate the possibility of contamination, at least in animal models (52).

Moreover, in physiological conditions, LPS was found in brain regions of healthy rats such as the frontal cortex, co-localising with TLR4 and lipoproteins (*i.e.* ApoA1), suggesting that LPS penetrates the brain *via* a lipoprotein transport mechanism and binds to its receptor, TLR4, in the BBB surrounding areas (53). In pathological conditions, 16s RNA from bacteria was found in *post-mortem* human brains of Alzheimer's diagnosed patients, supporting the hypothesis that bacteria can reach the brain, at least in pathological conditions, as observed in this case (54).

2. ALCOHOL ABUSE ALTERS MICROBIOTA-GUT-BRAIN AXIS

Alcohol consumption may disrupt the symbiotic relationship that exists between the GI microbiota and humans. Alcohol-induced microbial imbalance affects bacteria composition (*i.e.* specific bacterial overgrowth) or activity, causing the condition referred to as dysbiosis (55,56). Alcohol-dysbiosis, together with the disruption of the GI barrier and consequent induction of endotoxaemia, has been associated with the development and progression of alcohol-related liver disease and behavioural abnormalities in alcohol use disorder (AUD) diagnosed patients (10,57,58). Thus, endotoxaemia following alcohol exposure may be the result of several main factors, including ethanol-induced Gram-negative bacteria overgrowth or dysbiosis (10); increased GI permeability (59), due to the alcohol-induced impairment of the GI barrier; and a delayed endotoxin clearance due to impaired phagocytic capacity of Kupffer cells (60). In the following paragraphs, we review the main mechanisms involved in alcohol-induced dysbiosis and leaky gut.

2.1. Mechanisms Through which Alcohol Promotes GI Dysbiosis

Over the last few years, several studies have reported bacterial overgrowth in both animal and human intestines as a consequence of alcohol exposure (61,62). In laboratory animals, despite differences in the results due to differences in the species (rat, mouse) and the alcohol protocol used, alcohol promotes an increase of bac-

teria from the phylum Proteobacteria and Firmicutes, and a decrease of bacteria from the phylum Bacteroidetes. In humans, alcohol promotes an increase of Proteobacteria and a decrease of Bacteroidetes and the well-known beneficial bacteria *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Results on qualitative changes in GI microbiota induced by alcohol exposure have been reviewed in-depth elsewhere (56). These changes may have an important impact on the status of the immune system, mainly because Proteobacteria are Gram-negative bacteria, and the increase in the amount in Gram-negative-derived endotoxin in the GI tract strongly activates the innate immunity TLR4 receptors (63-65).

The exact mechanisms of alcohol-induced dysbiosis have not been fully described, although some pathways have been suggested (Fig. 1a). For example, ethanol ingestion causes a variety of pathological changes in the GI tract, including gross morphological lesions and functional changes, which may affect intestinal motility (66). Indeed, increasing intestinal motility *via* the administration of a prokinetic agent has been proven to inhibit bacterial proliferation in cirrhotic subjects (67). Another mechanism through which alcohol could promote bacterial overgrowth is by inducing changes in the gastric pH. Some AUD subjects have reduced gastric acid production (hypochlorhydria) as a consequence of the gut injuries (68), and this hypochlorhydria drives the GI microbiota overgrowth in the small intestine (69). Additionally, alcohol exposure increases faecal pH, which is associated with Gram-negative bacteria overgrowth (61).

Another plausible mechanism of dysbiosis is impaired bile production and/or flow. Bile acids exert direct and indirect antimicrobial properties (70), and, conversely, the GI microbiota composition in the absence of alcohol might regulate bile acid synthesis (71). Indeed, the conversion of primary to secondary bile acids is reduced in patients with cirrhosis (72). Since the conversion of primary into secondary bile acids is a key function of the GI microbiota, these results suggest differences in the microbiota between alcohol cirrhotic and control subjects. Furthermore, cirrhotics, compared to controls, had higher *Enterobacteriaceae* (potentially pathogenic) but lower *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* and *Blautia* abundance (72). In addition, obstruction of bile flow results in bacterial proliferation and mucosal injury in the small intestine (73), whereas oral administration of bile acid to cirrhotic rats decreases bacterial overgrowth (74). Bile acids suppress GI bacterial overgrowth directly due to their detergent properties and indirectly through the activation of the main bile acid farnesoid x receptor (FXR). FXR exerts its inhibitory effects on bacterial overgrowth through the regulation of proinflammatory-related genes' expression, such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and IL-8, whose peptide-derived products have displayed anti-microbial activity (75).

Finally, another mechanism that likely influences alcohol-related bacterial overgrowth is the direct suppression of antimicrobial molecules. Chronic alcohol consumption suppresses the antibacterial molecules Reg3Gamma (bactericidal effects against Gram-positive bacteria) and Reg3Beta (against Gram-negative bacteria) both in rodents and humans (76,77). The absence of Reg3Gamma allows the microbiota to get closer to the GI epithelium and enhances the microbiota-induced activation of the intestinal adaptive immune response (78), while the overexpression of Reg3Gamma decreases the colonisation of bacteria of the mucosal surfaces, decreasing bacterial translocation (79). Prebiotics, such as fructooligosaccharides (FOS), restore Reg3Gamma levels, limiting GI bacterial overgrowth and reversing alcohol-derived steatohepatitis (77).

Whatever the mechanisms involved in alcohol-induced dysbiosis, GI microbiota is able to, directly and indirectly, modulate the permeability of the GI barrier by different processes. Firstly, the metabolic activity of GI microbiota produces alcohol as a consequence of carbohydrate fermentation (80), which is absorbed and

metabolised when travelling to the liver through the portal vein (81). Alcohol itself promotes disruption of the GI barrier as will be detailed in the next section. Secondly, bacterial aldehyde dehydrogenase metabolises alcohol into acetaldehyde (82), which has been reported to also promote GI barrier disruption (82,83). Thirdly, GI microbiota is able to directly modulate the expression and distribution of TJ proteins that form the GI barrier. For example, enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts TJ structure and function (84), whereas the probiotic *Lactobacillus plantarum* increases the expression of TJ proteins such as ZO-1, occludin and claudins (85). Bioactive factors released from the probiotic *Bifidobacterium infantis* restore the functionality of the GI barrier by altering TJ protein expression (86).

2.2. Mechanisms Involved in the Alcohol-Induced Disruption of GI Barrier

The GI barrier restricts the passage of toxic compounds from the intestinal lumen to the inner organs and bloodstream. Regulation of its permeability is performed by two mechanisms: the paracellular and transcellular pathways (16). Lipophilic and small hydrophilic compounds cross the epithelium by passive diffusion *via* the transcellular pathway, while medium-sized molecules cross *via* the paracellular pathway. The permeability of the paracellular pathway is regulated by TJ, located in the apical part of the epithelial cells, and is formed by transmembrane proteins (occludin and claudins) and cytoplasmic proteins (*zona occludens*, ZO), which link the TJ to the cytoskeleton (87). The permeability of the paracellular pathway is also regulated by adherens junctions (AJ) formed by the transmembrane proteins cadherins and the cytoplasmic proteins catenins. The permeability of the paracellular pathway is regulated by extracellular signals, such as nutrients or inflammatory components (87), as well as by intracellular signals such as calcium, protein tyrosine kinase, protein kinase C or myosin light-chain kinase (88-90). In contrast, the passage of larger molecules through the transcellular pathway takes place mainly *via* aqueous pores, in the case of larger hydrophilic compounds; carrier-mediated mechanisms, for nutrients, and endocytosis, for proteins and bacteria (91).

There is strong evidence that alcohol exposure increases GI permeability both in laboratory animals and in humans. This alcohol-induced leaky gut has been measured by indirect approaches such as the absorption of molecular probes (*i.e.*, lactulose, mannitol or sucrose) or by measuring the circulating levels of LPS, as well as by direct measurement of the integrity of the protein complexes that form the intestinal barrier (*i.e.*, TJ). Thus, leaky gut has been clearly documented in alcohol-dependent patients assessed by levels of LPS in blood, using the ⁵¹Cr-EDTA method (92,93), as well as by the aforementioned lactulose/mannitol method (59). Whereas chronic alcohol exposure in humans leads to small intestine barrier alterations, acute alcohol exposure affects gastroduodenal permeability (94). Alcohol binge drinking also disrupts the normal permeability of the GI barrier; our laboratory has recently provided indirect evidence of this phenomenon both in animals (95,96) and in young human drinkers (97) by measuring blood LPS levels, and direct evidence by characterisation of the specific mechanisms, including alterations in the structure of colonic TJ protein complexes, inflammation and apoptosis (96).

Details on the specific paracellular and transcellular mechanisms of alcohol-induced GI barrier dysfunction are outlined below.

2.2.1. Direct Damage to the Barrier: Transepithelial Mechanisms for Leaky Gut

Several independent studies have reported that acute alcohol exposure leads to mucosal and epithelial barrier damage in animals and humans. Acute alcohol administration in rats and dogs at concentrations commonly found in alcoholic drinks (4% v/v) leads to upper small intestine mucosal damage with loss of epithelium at the tips of the villi, haemorrhagic erosions and haemorrhage in the

lamina propria (98). In rats, acute intragastric administration of 20% alcohol promotes haemorrhagic erosions and epithelial cell loss in the proximal small intestine (99). Additionally, in mice, a single dose of 6 g/kg of alcohol resulted in submucosal blebbing, ulceration of the villi and breaches in the epithelial layer of the villi (100). In humans, acute alcohol administration of a single dose of 1 g/kg promotes duodenal injuries, such as subepithelial blebbing, haemorrhagic erosions and infiltration of inflammatory cells (101). Additionally, severe injuries in the mucosa of the rectus have been reported in humans with excessive alcohol consumption, including inflammation, a lower number of goblet cells, distorted mitochondria and dilated endoplasmic reticulum (102). Acute administration of low doses of alcohol-induced apoptosis in the human intestinal cell line Caco-2, that would allow LPS and other endotoxins to cross the GI barrier (103). Furthermore, we have recently reported that alcohol binge drinking induces apoptosis in the colonic barrier (96).

Chronic alcohol exposure also results in mucosal and epithelial barrier damage, although there are controversial results because of the high rate of intestinal epithelial cell turnover and other factors such as sex, age and alcohol dosage (98). Some studies have reported that 16 weeks of alcohol exposure in rats results in enlargement of mitochondria, diminishment of rough endoplasmic reticulum and dilatation of smooth endoplasmic reticulum (104). Gavage administration of 20% alcohol to rats for 14 days leads to exfoliation, subepithelial edema of the tips of the villi and cellular infiltration (105). Other histological changes in the mucosa of the small intestine found after chronic alcohol administration are reduced villi height, villi atrophy and bacterial adhesion to the mucosa (106). Although the exact mechanisms have not been deeply elucidated, the plausible initial events suggested are: 1) a direct toxic effect of ethanol on the epithelium of mucosa, 2) impairment of the mucosal microcirculation, 3) villi contraction leading to blebbing and exfoliation of the villi, and 4) increased leukocytes influx leading to increased levels of ROS and other injurious molecules (98). In addition, caspase-3 activity seems to be higher after chronic alcohol consumption inducing intestinal apoptosis in mice (107).

These effects of alcohol consumption on the GI mucosa promote the malabsorption of nutrients and vitamins, contributing to the state of malnutrition commonly found in serious cases of AUD (108), which, in addition to the lack of a rich diet, enhances the deleterious effects of alcohol on the microbiota and the GI barrier.

2.2.2. Disruption of TJ Proteins: Paracellular Mechanisms of Leaky Gut

Disruption of TJ and AJ appears to be the main mechanism through which alcohol impairs the GI barrier. By different mechanisms, alcohol exposure affects the expression and organisation of local cytoskeleton proteins and the integrity of TJ protein complexes (Fig. 1b). The molecular mechanisms underlying these effects have been elucidated by *in vitro* studies using monolayers of the human intestinal epithelial cell line Caco-2. Actin and myosin filaments can be modulated by alcohol-induced phosphorylation of myosin light-chain (109); actin cytoskeleton reorganisation and TJ and AJ disruption could be a consequence of the activation of Rho/ROCK (110) and mitogen-activated protein kinases (MAPK) (111). Alcohol may induce TJ protein redistribution (ZO-1 and occludin) and loss of TJ integrity by microtubule hyperacetylation (112). It has been observed that the down-regulation of the TJ protein ZO-1 could be due to alcohol-induced over-expression of microRNA 212 (113).

The pro-inflammatory actions of alcohol may also account for the TJ disruption. Indeed, activation of the inflammatory nuclear factor kappa- B (NF-κB) by alcohol promotes instability of the F-actin cytoskeleton (114). Recent evidence indicates that alcohol binges strongly induce a pro-inflammatory effect in the rat intestine, activation of innate and adaptive immune systems and disrupt-

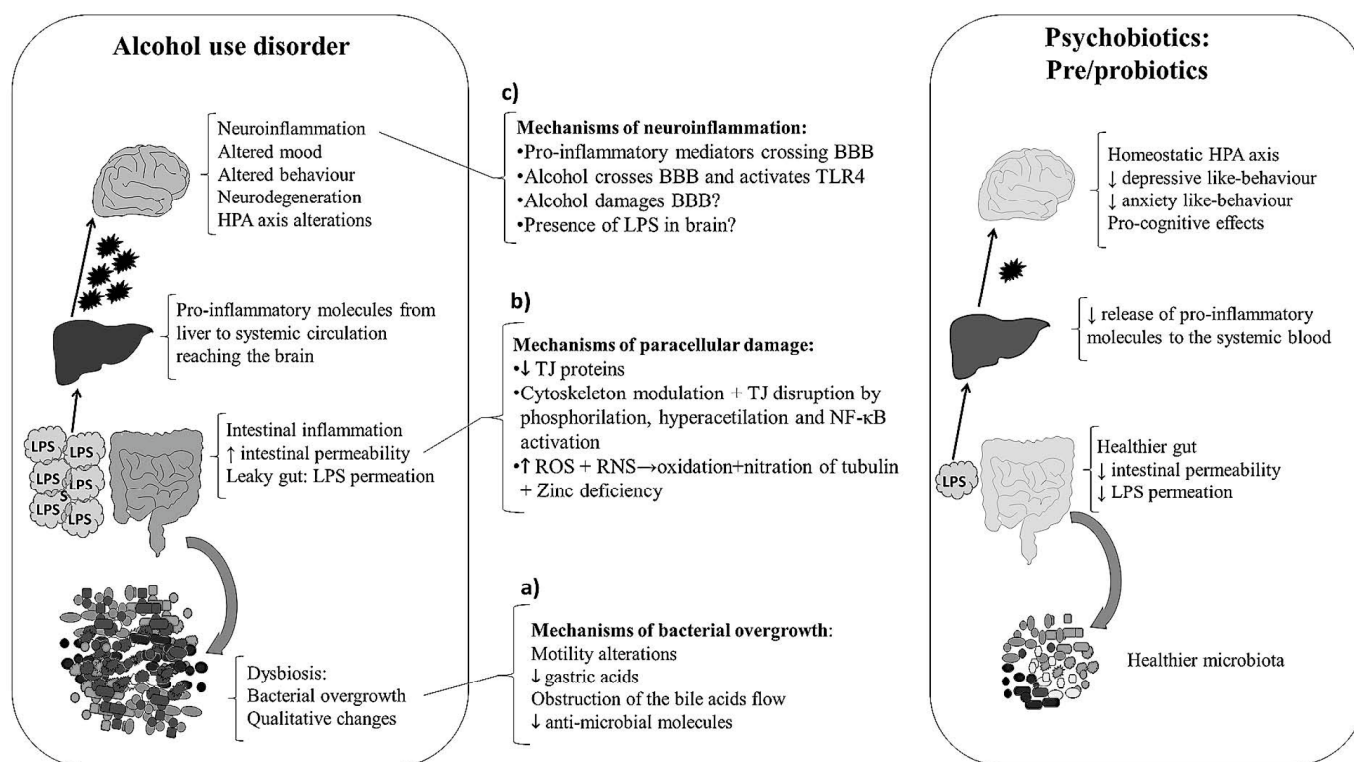


Fig. (1). Effects of alcohol consumption in the microbiota-gut-brain axis and protective effects of psychobiotics. (a) Alcohol induces microbiota dysbiosis, both bacterial overgrowth and qualitative changes. **(b)** Alcohol also promotes intestinal inflammation and an increase of the intestinal permeability producing leaky gut and, consequently, lipopolysaccharide (LPS) permeation to the liver resulting in the release of pro-inflammatory molecules to the systemic circulation. **(c)** Alcohol-induced peripheral inflammation may affect the blood-brain barrier (BBB) promoting neuroinflammation. The potential beneficial effects of psychobiotics, both pre and probiotics, include healthier microbiota and intestinal barrier, decreased LPS permeation to the liver and, consequently, decreased release of pro-inflammatory mediators to the systemic circulation reaching the brain, improving brain function. (HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal axis; TLR4, Toll-like receptor 4; TJ, tight junction; NF-κB, nuclear factor kappa- B; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

tion of TJ proteins (occludin and claudin-3) in the colon (96). Inflammation-derived oxidative stress also appears to play an important role, disrupting the GI barrier after alcohol exposure. Additionally, alcohol induces Cyp2e1 protein expression, one of the most important isoforms of CYP450 in the human intestine, which leads to ROS formation (115). Thus, elevated gut inflammation combined with high levels of nitrosative stress affects TJ proteins, contributing to gut leakiness (116). Indeed, activation of the Snail transcription factor induces oxidative and nitrosative stress by the generation of ROS and nitric oxide, which promotes oxidation and nitration of the cytoskeleton protein tubulin, disrupting the GI barrier (117,118). As a result of oxidative stress, alcohol may induce a zinc deficiency, which leads to TJ disassemble and sensitises epithelial cells to the ethanol deleterious effect (119).

It is worth noting that the expression of intestinal TJ proteins occludin and claudin-1 appears to be under the direct control of the circadian cycle (120). Interestingly, AUD subjects have a disrupted circadian cycle (increased sleep fragmentation, less total sleep time, *etc.*) assessed by low levels of plasma melatonin that correlate with gut leakiness and endotoxaemia (121). Alcohol stimulates an increase in circadian clock proteins by the above-mentioned Cyp2e1-mediated oxidative stress, leading to intestinal hyperpermeability. Melatonin could then act as an antioxidant in the GI tract (122).

Finally, the alcohol metabolite acetaldehyde, produced by the mucosal and bacterial alcohol dehydrogenase (ADH) enzyme (123), may promote GI barrier dysfunction as well. Comparable to the aforementioned direct actions of alcohol, the acetaldehyde may affect the redistribution of AJ and TJ proteins (83,124,125), induce a loss of interaction between TJ proteins (83) or promote hyperac-

tylation of microtubular proteins such as alpha-tubulin (112), leading to impaired GI barrier function.

2.3. Alcohol, BBB and Neuroinflammation

As alcohol promotes bacterial overgrowth and an increase in the permeability of the GI barrier, LPS increases in the lumen of the GI tract and permeates to the liver. Persistent LPS increments activate liver immune cells and affect the hepatocytes, leading to the release of proinflammatory cytokines and other pro-inflammatory molecules that reach the systemic circulation (19,126,127). Once in the circulatory system, cytokines and other pro-inflammatory molecules may induce neuroinflammation by various mechanisms explained previously in this paper and explored in-depth elsewhere (21), which include crossing the BBB (128).

Alcohol also directly promotes neuroinflammation by crossing the BBB and activating the innate immune system *via* TLR4 expressed in the microglia, astrocytes and neurons (20,129,130). Whether alcohol exposure disrupts the BBB, increasing its permeability to proinflammatory molecules, remains controversial. Some studies have reported that alcohol affects BBB integrity, while other studies have shown no effects of alcohol on BBB (131). Disregarding the mechanisms involved, this alcohol-induced neuroinflammation is associated with cognitive and behavioural impairments (95,132) (Fig. 1c).

2.4. Alcohol and HPA Axis

The HPA-microbiota relationship has been explored previously in this paper. Including alcohol in this equation, this section emphasises the importance of HPA in alcohol-related behaviours.

Numerous studies have found dysregulations in the HPA axis in AUD subjects, and these alterations are, in turn, a risk factor for AUD development (133). Acute alcohol exposure activates the HPA axis, increasing the levels of glucocorticoids and ACTH in animals and humans (134,135). However, chronic alcohol exposure is characterised by the following pattern of cortisol release: as an individual drinks during the day, cortisol levels are elevated; while they are sleeping, they produce normal levels of cortisol; once they awaken, they release high levels of cortisol, leading to withdrawal symptoms, which are lowered as they begin to drink during the day (136). The repeated activation of this axis causes the loss of the flexible regulation of the same (137), leading to a blunted HPA axis response to acute alcohol exposure, characterised by a lower release of ACTH (138) and a lower cortisol response to stress (137). Indeed, during abstinence, long-term alcohol drinkers exhibited lower cortisol levels than controls (non-drinkers or occasional drinkers). These alterations in the HPA axis are associated with depressed mood, craving and dysregulations in the reward system, contributing to the beginning and persistence of AUD and relapse (139,140).

3. A NEW ROLE FOR PSYCHOBIOPTICS TO TREAT AUD?

"Psychobiotics" is a novel term to define both ingested living organisms, probiotics, that confer benefits for mental health (141) and the food ingredients, prebiotics, that induce the growth or activity of beneficial microorganisms exerting positive effects on mental health (142). In recent years, clinical and preclinical studies have provided evidence that probiotics and prebiotics are able to improve HPA axis function, mood, behaviour and brain function in stress-associated diseases, such as depression, which is highly prevalent among AUDs patients (143-145), and ameliorate various alcohol consumption-associated alterations in the GI barrier and microbiota (146).

AUD is a psychiatric condition in which alteration in the stress axis is present, as well as emotional disturbances such as depression or anxiety, which are very relevant to the treatment outcome. In this section, we summarise the main findings suggesting that both probiotics and prebiotics are beneficial to treat the above-mentioned alterations and could be useful as a novel pharmaceutical approach to ameliorate AUD symptoms.

3.1. Psychoactive Effects of Probiotics

There is evidence on the bidirectional effect of probiotic agents and HPA axis activation. Different types of stress (maternal separation, social stress, etc.) are associated with changes in GI microbiota composition in infant mice, which can be reversed by healthy mice microbiota inoculation. The absence of microbiota in GF mice induces an exaggerated stress response that is attenuated by the intestinal inoculation of probiotics. For example, stressed rodents treated with *Lactobacillus farciminis* show a reduced HPA axis response (147) and the administration of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus helveticus* similarly attenuates the HPA response to stress (148).

The balance between beneficial and pathogenic bacteria in the gut is important for stress-associated behaviours, such as anxiety. Thus, the administration of the pathogenic bacteria *Campylobacter* induces anxiety-like behaviour in mice (149). Intra-gastric inoculation of *Bifidobacterium infantis* and *Blautia coccoides* reduces the anxiety-like behaviour in GF mice (150), and, similarly, *Lactobacillus reuteri* reduces anxiety-like behaviours in mice infected with *Citrobacter rodentium* (151).

Studies in humans showed similar effects of probiotic treatment in the attenuation of the HPA axis. Administration of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 decreases cortisol levels and psychological distress in healthy subjects (152,153). Oral administration of *Lactobacillus plantarum* 299v reduces the levels of salivary cortisol during examination stress (154), and treatment with *Clostridium butyricum* before laryngeal

cancer surgery decreases serum corticotropin-releasing factor levels and relieves anxiety before surgery (155). A recent study revealed, however, that administration of *Bifidobacterium longum* NCC3001 in patients with irritable bowel syndrome promotes a reduction in depression but not in anxiety scores, and it is associated with changes in the pattern of brain activation, suggesting a reduction of limbic reactivity (156).

We have previously mentioned the role of GI microbiota on leaky gut, including the expression and distribution of TJ proteins, and emotional responses. The enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts TJ structure and function (84), whereas the probiotic treatment with *Lactobacillus farciminis* reduces LPS levels and prevents GI barrier disruption, resulting in reduced HPA axis response (147). The probiotic *Lactobacillus plantarum* increases the expression of TJ proteins such as ZO-1, occludin and claudins (85) and, similarly, bioactive factors released from the probiotic *Bifidobacterium infantis* restore the functionality of the GI barrier by altering TJ protein expression (86). Indeed, a recent study showed that *Lactobacillus plantarum* reduces alcohol-induced pro-inflammatory cytokines expression and down-regulation of TJ proteins in the colon (157).

3.2. Psychoactive Effects of Prebiotics

Prebiotics are food contents (*i.e.* soluble fibres) that augment the growth and/or activity of endogenous bacteria. Prebiotics that contribute to emotional, cognitive or neural variables are also considered psychobiotics (142), and the possible mechanisms implicated in the improvement of behaviour and neurobiology after prebiotics consumption have been reviewed elsewhere (158). Soluble fibres used as prebiotics include FOS and galactooligosaccharides (GOS), which appear to be beneficial for GI microbiota, and oligosaccharides that are naturally present in human milk, such as sialyllactoses, are also prebiotics that enhances the growth of beneficial commensal microorganisms (159,160). In the following paragraphs, we describe some evidence on the impact of certain prebiotics in addiction-related behaviours, such as stress response, anxiety or depression-like behaviour.

Chronic prebiotic FOS+GOS treatment exhibits anti-inflammatory, anti-depressant and anxiolytic effects, normalises microbiota, and increases cecal acetate and propionate while reducing isobutyrate levels, which significantly correlated with behavioural changes (144). This chronic prebiotics FOS+GOS combined treatment exhibits not only anxiolytic but also antidepressant-like effects in mice, reducing stress-induced elevations in corticosterone and proinflammatory cytokines, and modifies specific gene expression in the hippocampus and hypothalamus (144). In humans, healthy volunteers supplemented with FOS and GOS show a suppression of the neuroendocrine stress response, assessed by low salivary cortisol levels, and alterations in emotional bias (161), consistent with previous findings of endocrine and anxiolytic effects of microbiota proliferation. Administration of human milk oligosaccharides 3' sialyllactose and 6' sialyllactose in mice prevents stress-induced alterations in GI microbiota composition and attenuates stressor-induced anxiety-like behaviour (159). Further, the administration of B-GOS® is associated with pro-cognitive effects and increased cortical NMDAR function (162) and the administration of FOS increases BDNF in the hippocampus (163). On the contrary, it has been recently shown that unhealthy, high-fat diets affect operant behavioural learning, behavioural flexibility, impulsivity and compulsive-like behaviour (164).

Undigested carbohydrates in food are fermented by the GI microbiota, producing SCFAs, which have multiple biological effects including changes in neural signalling and neurotransmitter production, as well as an impact on behaviour after crossing the BBB (165). In addition to undigested fibre food, SCFA can also be produced from complex carbohydrate polymers released by certain *Bifidobacterium* strains (166).

With regard to long-chain fatty acids, supplementation with docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 polyunsaturated fatty acid of long-chain, promotes beneficial changes in the GI microbiota composition as well as in the anxiety and depressive-like behaviours in a sex-dependent manner (167). The effects of omega-3 fatty acids in the microbiota-brain axis have been reviewed in detail elsewhere (168). Our laboratory has recently shown that repeated administration of oleoylethanolamide (OEA), a biolipid compound with oleic acid in its structure, reduces intestinal inflammation and apoptosis, bacterial translocation from the GI lumen to the mesenteric lymph nodes and spleen and the levels of the endotoxin LPS in systemic blood (96). Partially as a consequence of this, OEA reduces neuroinflammation in the frontal cortex and the anxiety and depressive-like behaviour after a protocol of alcohol-binge drinking in rats (95). The endogenous release of OEA has been found in young human binge drinkers and correlates with inflammatory changes, which have been related to worse neuropsychological performance in female drinkers (97,169). OEA is an endogenous factor released by the intestine (170) that could be regulating microbiota composition, since it has been shown that OEA administration in mice changes the GI microbiota profile, increasing Bacteroidetes and decreasing Firmicutes. This action on microbiota has a similar profile to that obtained in the lean-like phenotype fed with fibre-rich diet, which promotes an increased richness of microbiota species and higher microbial diversity, inducing changes in the metabolic profile (171).

3.3. Psychobiotics (Probiotics and Prebiotics) in AUD

Dysbiosis is not always present in all AUD patients, but it appears to be related to the prognosis of the disorder. Leclercq *et al.* (92) showed that only around 40% of the AUD subjects in their study presented dysbiosis. Those dysbiotic subjects also exhibited leaky gut and more severe markers of alcohol-dependence, together with the persistence of anxiety, depression and craving after 18 days of abstinence. However, it is not clear whether alcohol drinking contributed to dysbiosis or it is the consequence of previous differences in the microbiota, since the pattern of drinking between dysbiotic and non-dysbiotic AUD was not different, and the composition of GI microbiota failed to recover during alcohol withdrawal in this 40% of the AUD subjects (172).

A recent review has highlighted the role of GI microbiota in substance use disorders, in particular in AUD (173). Additionally, recent studies point to a clear influence of GI microbiota in neuroinflammation in the context of alcohol consumption. Reduction of the GI microbiota with antibiotics decreases alcohol-induced proinflammatory cytokines expression both in the brain and the small intestine and also reduces alcohol-induced microglial activation and morphologic changes in the cortex and hippocampus (174).

CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

There is increasing evidence that psychobiotics promote beneficial effects in various psychological disorders, including depression and stress. Data presented in this review highlight a new role for prebiotics and probiotics in the field of alcohol use disorder. Taking into account the beneficial role of psychobiotics in HPA axis dysregulation, anxiety and depression, recent evidences in alcohol-related behaviours, probiotic and prebiotic treatments are emerging as novel nutritional pharmacotherapies to treat gut-brain axis disorders, including AUD. More scientific studies, especially in humans, must be carried out to further investigate the role of GI microbiota in mental health, and specifically in the field of substance use disorders, including alcohol. To our best knowledge, no clinical studies have yet been carried out to elucidate the potential role of probiotics or prebiotics in abrogating the disorders and neurobiochemical changes observed in AUD. We propose that nutraceutical based-therapies, such as those using OEA, could be considered as a prebiotic to treat AUD symptoms.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGMENTS

Funding received from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades PR68/18 RETOS (ref. RTI2018-099535-B-100).

REFERENCES

- [1] Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *NatRevNeurosci* 2012; 3(10): 701-1. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3346> PMID: 22968153
- [2] Wang HX, Wang YP. Gut Microbiota-brain Axis. *Chin Med J (Engl)* 2016; 129(19): 2373-80. <http://dx.doi.org/10.4103/0366-6999.190667> PMID: 27647198
- [3] Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, *et al.* Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 2015; 18(7): 965-77. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4030> PMID: 26030851
- [4] Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Toth M, *et al.* The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice *SciTranslMed* 2014; 6(263)263ra158. <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759> PMID: 25411471
- [5] Wang S, Harvey L, Martin R, van der Beek EM, Knol J, Cryan JF, *et al.* Targeting the gut microbiota to influence brain development and function in early life. *NeurosciBiobehavRev* 2018; 95: 191-201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.09.002> PMID: 30195933
- [6] Martin-Subero M, Anderson G, Kanchanatawan B, Berk M, Maes M. Comorbidity between depression and inflammatory bowel disease explained by immune-inflammatory, oxidative, and nitrosative stress; tryptophan catabolite; and gut-brain pathways. *CNS Spectr* 2016; 21(2): 184-98. <http://dx.doi.org/10.1017/S1092852915000449> PMID: 26307347
- [7] Van Oudenhove L, Törnblom H, Störsrud S, Tack J, Simréen M. Depression and Somatization Are Associated With Increased Postprandial Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 2016; 150(4): 866-74. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.11.010> PMID: 26602216
- [8] Hayley S, Audet MC, Anisman H. Inflammation and the microbiome: implications for depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol* 2016; 29: 42-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2016.06.001> PMID: 27327647
- [9] Ding HT, Taur Y, Walkup JT. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. *J Autism Dev Disord* 2017; 47(2): 480-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-016-2960-9> PMID: 27882443
- [10] Mutlu EA, Gillevet PM, Rangwala H, Sikaroodi M, Naqvi A, Engen PA, *et al.* Colonic microbiome is altered in alcoholism. *AmJPhysiolGastrointestLiver Physiol* 2012; 02(9): G966-78. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00380.2011> PMID: 22241860
- [11] Funk C, Braune A, Grabber JH, Steinhart H, Bunzel M. Model studies of lignified fiber fermentation by human fecal microbiota and its impact on heterocyclic aromatic amine adsorption *MutatRes* 2007; 24(1-2): 41-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.010> PMID: 17475287
- [12] Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism *JPEN JPparenterEnteral Nutr* 1997; 21(6): 357-65. [http://dx.doi.org/10.1016/S0261-5614\(97\)80252-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-5614(97)80252-X) PMID: 9406136
- [13] Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, *et al.* Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae *CellHost Microbe* 2007; 2(3): 204. [http://dx.doi.org/10.1016/S1931-3128\(07\)00194-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1931-3128(07)00194-1) PMID: 18030708

- [14] Guo G, Jia KR, Shi Y, Liu XF, Liu KY, Qi W, *et al.* Psychological stress enhances the colonization of the stomach by *Helicobacter pylori* in the BALB/c mouse. *Stress* 2009; 12(6): 478-85. <http://dx.doi.org/10.3109/10253890802642188> PMID: 20102319
- [15] Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, *et al.* Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry* 2015; 77(7): 607-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.012> PMID: 25173628
- [16] Hammer AM, Morris NL, Earley ZM, Choudhry MA. The First Line of Defense: The Effects of Alcohol on Post-Burn Intestinal Barrier, Immune Cells, and Microbiome. *Alcohol Res* 2015; 37(2): 209-22. PMID: 26695746
- [17] Szabo G, Bala S. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J Gastroenterol* 2010; 16(11): 1321-9. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v16.i11.1321> PMID: 20238398
- [18] Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 50(2): 638-44. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.23009> PMID: 19575462
- [19] Montesinos J, Alfonso-Loeches S, Guerri C. Impact of the Innate Immune Response in the Actions of Ethanol on the Central Nervous System. *Alcohol Clin Exp Res* 2016; 40(11): 2260-70. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13208> PMID: 27650785
- [20] Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 10-2094-5-10. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-5-10> PMID: 18348728
- [21] Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9(1): 46-56. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2297> PMID: 18073775
- [22] Cacabelos R, Torrellas C, Fernandez-Novoa L, Aliev G. Neuroimmune Crosstalk in CNS Disorders: The Histamine Connection. *Curr Pharm Des* 2016; 22(7): 819-48. <http://dx.doi.org/CPD-EPUB-72401> PMID: 26648474
- [23] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease *Nat Rev Immunol* 2009; 9(5): 313-23. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2515> PMID: 19343057
- [24] Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 2016; 352(6285): 539-44. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad9378> PMID: 27126036
- [25] Banks WA, Gray AM, Erickson MA, Salameh TS, Damodarasamy M, Sheibani N, *et al.* Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *J Neuroinflammation* 2015; 12: 223-015-0434-1. <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1> PMID: 26608623
- [26] Danielski LG, Giustina AD, Badawy M, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F, *et al.* Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. *Mol Neurobiol* 2018; 55(2): 1045-53. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0356-7> PMID: 28092082
- [27] Leclercq S, Mian FM, Stanisiz AM, Bindels LB, Cambier E, Ben-Amram H, *et al.* Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat Commun* 2017; 8: 15062. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15062> PMID: 28375200
- [28] Hoyles L, Snelling T, Umlai UK, Nicholson JK, Carding SR, Glen RC, *et al.* Microbiome-host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood-brain barrier *Microbiome* 2018; 6(1): 55-018-0439-y. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-018-0439-y> PMID: 29562936
- [29] Farzi A, Frohlich EE, Holzer P. Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. *Neurotherapeutics* 2018; 15 (1): 5-22. <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-017-0600-5> PMID: 29380303
- [30] Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Dauge V, *et al.* Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats *Psychoneuroendocrinology* 2014; 42: 207-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.014> PMID: 24636517
- [31] Desbonnet L, Clarke G, Traplin A, O'Sullivan O, Crispie F, Moloney RD, *et al.* Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain Behav Immun* 2015; 48: 165-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.004> PMID: 25866195
- [32] Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, *et al.* The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 2013; 18(6): 666-73. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2012.77> PMID: 2688187
- [33] Sudo N, Chida Y, Aiba Y, *et al.* Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 2004; 558(Pt 1): 263-75. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388> PMID: 15133062
- [34] De Palma G, Blennerhassett P, Lu J, Deng Y, Park AJ, Green W, *et al.* Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nat Commun* 2015; 6: 7735. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms8735> PMID: 26218677
- [35] Neufeld KA, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. *Commun Integr Biol* 2011; 4(4): 492-4. <http://dx.doi.org/10.4161/cib.15702> PMID: 21966581
- [36] Huo R, Zeng B, Zeng L, Cheng K, Li B, Luo Y, *et al.* Microbiota Modulate Anxiety-Like Behavior and Endocrine Abnormalities in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Cell Infect Microbiol* 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2017.00489> PMID: 29250490
- [37] Zheng P, Zeng B, Zhou C, Liu M, Fang Z, Xu X, *et al.* Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Mol Psychiatry* 2016; 21(6): 786-96. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.44> PMID: 27067014
- [38] Su Y, Yao W, Perez-Gutierrez ON, Smidt H, Zhu WY. Changes in abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. *FEMS Microbiol Ecol* 2008; 66(3): 546-55. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00529.x> PMID: 18554303
- [39] O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, *et al.* Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry* 2009; 65(3): 263-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.026> PMID: 18723164
- [40] Bailey MT, Coe CL. Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Dev Psychobiol* 1999; 35(2): 146-55. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199909\)35:23.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199909)35:23.0.CO;2-G) PMID: 10461128
- [41] Holdeman LV, Good IJ, Moore WE. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol* 1976; 31(3): 359-75. PMID: 938032
- [42] Moore WE, Cato EP, Holdeman LV. Some current concepts in intestinal bacteriology. *Am J Clin Nutr* 1978; 31(10)(Suppl.): S33-42. <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/31.10.S33> PMID: 707392
- [43] Karl JP, Margolis LM, Madslie EH, Murphy NE, Castellani JW, Gundersen Y, *et al.* Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 2017; 312(6): G559-71. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00066.2017> PMID: 28336545
- [44] Ek M, Kurosawa M, Lundeberg T, Ericsson A. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 β : role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci* 1998; 18(22): 9471-9. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-22-09471.1998> PMID: 9801384
- [45] Hosoi T, Okuma Y, Nomura Y. Electrical stimulation of afferent vagus nerve induces IL-1 β expression in the brain and activates HPA axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279(1): R141-7. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.1.R141> PMID: 10896875
- [46] Laye S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 27(1): 157-62. [http://dx.doi.org/0169-328X\(94\)90197-X](http://dx.doi.org/0169-328X(94)90197-X) PMID: 7877446

- [47] Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, *et al.* Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse *via* the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(38): 16050-5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1102999108> PMID: 21876150
- [48] Bercik P, Park AJ, Sinclair D, Khoshdel A, Lu J, Huang X, *et al.* The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23(12): 1132-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01796.x> PMID: 21988661
- [49] Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J Appl Microbiol* 2012; 113(2): 411-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x> PMID: 22612585
- [50] Reigstad CS, Salmonson CE, Rainey JF III, *et al.* Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J* 2015; 29(4): 1395-403. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.14-259598> PMID: 25550456
- [51] Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, *et al.* Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108-3052.(7): 3047-52. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1010529108> PMID: 21282636
- [52] The human brain microbiome; there are bacteria in our brains! 2018; Available at: <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/4649/presentation/32057> Accessed Sept 4, 2019
- [53] Vargas-Caraveo A, Sayd A, Maus SR, Caso JR, Madrigal JLM, Garcia-Bueno B, *et al.* Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions *SciRep* 2017; 7(1): 13113-017-. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13302-6> PMID: 29030613
- [54] Emery DC, Shoemark DK, Batstone TE, Waterfall CM, Coghill JA, Cerajewska TL, *et al.* 16S rRNA Next Generation Sequencing Analysis Shows Bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. *Front Aging Neurosci* 2017; 9: 195. <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2017.00195> PMID: 28676754
- [55] Hartmann P, Seebauer CT, Schnabl B. Alcoholic liver disease: the gut microbiome and liver cross talk. *ClinExpRes* 2015; 39(5): 763-75. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.12704> PMID: 25872593
- [56] Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Res* 2015; 37(2): 223-36. PMID: 26695747
- [57] Sophie L, Sebastien M, Patrice DC, Audrey MN, Fran A, ois J, Peter S, *et al.* Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(42): E4493. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1415174111>
- [58] Mutlu E, Keshavarzian A, Engen P, Forsyth CB, Sikaroodi M, Gillevet P. Intestinal dysbiosis: a possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats. *Alcohol-ClinExpRes* 2009; 33(10): 1836-46. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01022.x> PMID: 19645728
- [59] Keshavarzian A, Holmes EW, Patel M, Iber F, Fields JZ, Pethkar S. Leaky gut in alcoholic cirrhosis: a possible mechanism for alcohol-induced liver damage. *AmJGastroenterol* 1999; 94(1): 200-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.00797.x> PMID: 9934756
- [60] Fukui H, Kitano H, Okamoto Y, *et al.* Interaction of Kupffer cells to splenic macrophages and hepatocytes in endotoxin clearance: effect of alcohol. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10(Suppl. 1): S31-4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.1995.tb01793.x> PMID: 8589338
- [61] Bull-Ottersen L, Feng W, Kirpich I, Wang Y, Qin X, Liu Y, *et al.* Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment. *PLoS One* 2013; 8(1): e53028.
- [62] Gabbard SL, Lacy BE, Levine GM, Crowell MD. The impact of alcohol consumption and cholecystectomy on small intestinal bacterial overgrowth. *DigDisSci* 2014; 59(3): 638-44. <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-013-2960-y> PMID: 24323179
- [63] Leclercq S, de Timary P, Delzenne NM, Starkel P. The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence. *Transl Psychiatry* 2017; 7(2): e1048. <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2017.15> PMID: 28244981
- [64] Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability *in vitro* and *in vivo* by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *AmJPathol* 2013; 182(2): 375-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.014> PMID: 28244981
- [65] Forsythe RM, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion. *Shock* 2002; 17(3): 180-4. <http://dx.doi.org/10.1097/00024382-200203000-00004> PMID: 11900335
- [66] Preedy VR, Marway JS, Siddiq T, Ansari FA, Hashim IA, Peters TJ. Gastrointestinal protein turnover and alcohol misuse. *Drug Alcohol Depend* 1993; 34(1): 1-10. [http://dx.doi.org/10.1016/0376-8716\(93\)90040-W](http://dx.doi.org/10.1016/0376-8716(93)90040-W) PMID: 8174497
- [67] Madrid AM, Hurtado C, Venegas M, Cumsille F, Defilippi C. Long-Term treatment with cisapride and antibiotics in liver cirrhosis: effect on small intestinal motility, bacterial overgrowth, and liver function. *AmJGastroenterol* 2001; 96(4): 1251-5. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03636.x> PMID: 11316178
- [68] Chari S, Teysse S, Singer MV. Alcohol and gastric acid secretion in humans. *Gut* 1993; 34(6): 843-7. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.34.6.843> PMID: 8314520
- [69] Shindo K, Machida M, Miyakawa K, Fukumura M. A syndrome of cirrhosis, achlorhydria, small intestinal bacterial overgrowth, and fat malabsorption. *Am J Gastroenterol* 1993; 88(12): 2084-91. PMID: 8249977
- [70] Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Gut microbiota, cirrhosis, and alcohol regulate bile acid metabolism in the gut. *Dig Dis* 2015; 33(3): 338-45. <http://dx.doi.org/10.1159/000371678> PMID: 26045267
- [71] Kang DJ, Hylemon PB, Gillevet PM, Sartor RB, Betrapally NS, Kakiyama G, *et al.* Gut microbial composition can differentially regulate bile acid synthesis in humanized mice *HepatolCommun* 2017; 1(1): 61-70. <http://dx.doi.org/10.1002/hep4.1020> PMID: 29404434
- [72] Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM, *et al.* Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol* 2013; 58(5): 949-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.01.003> PMID: 23333527
- [73] Inagaki T, Moschetta A, Lee YK, Peng L, Zhao G, Downes M, *et al.* Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(10): 3920-5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0509592103> PMID: 16473946
- [74] Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Planas R, Hofmann AF, Vinado B, Hagey LR, *et al.* Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology* 2003; 37(3): 551-7. <http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2003.50116> PMID: 12601352
- [75] Bjorstad A, Fu H, Karlsson A, Dahlgren C, Bylund J. Interleukin-8-derived peptide has antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(9): 3889-95. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.9.3889-3895.2005> PMID: 16127067
- [76] Hartmann P, Chen P, Wang HJ, *et al.* Deficiency of intestinal mucin-2 ameliorates experimental alcoholic liver disease in mice. *Hepatology* 2013; 58(1): 108-19. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26321> PMID: 23408358
- [77] Yan AW, Fouts DE, Brandt J, Starkel P, Torralba M, Schott E, *et al.* Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011; 53(1): 96-105. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.24018> PMID: 21254165
- [78] Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, *et al.* The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 2011; 334(6053): 255-8. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1209791> PMID: 21998396
- [79] Wang L, Fouts DE, Starkel P, Hartmann P, Chen P, Llorente C, *et al.* Intestinal REG3 Lectins Protect against Alcoholic Steatohepati-

- tis by Reducing Mucosa-Associated Microbiota and Preventing Bacterial Translocation. *CellHost Microbe* 2016; 19(2): 227-239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.003> PMID: 26867181
- [80] Blomstrand R. Observations of the formation of ethanol in the intestinal tract in man. *Life Sci* 1971; 10(10): 575-82. [http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(71\)90194-9](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(71)90194-9) PMID: 5556166
- [81] Krebs HA, Perkins JR. The physiological role of liver alcohol dehydrogenase. *Biochem J* 1970; 118(4): 635-44. PMID: 5481498
- [82] Salaspuro M. Bacteriocolonial pathway for ethanol oxidation: characteristics and implications. *Ann Med* 1996; 28(3): 195-200. <http://dx.doi.org/10.3109/07853899609033120> PMID: 8811162
- [83] Atkinson KJ, Rao RK. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280(6): G1280-8. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.6.G1280> PMID: 11352822
- [84] Shifflett DE, Clayburgh DR, Koutsouris A, Turner JR, Hecht GA. Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure *in vivo*. *LabInvest* 2005; 85(10): 1308-24. <http://dx.doi.org/3700330> PMID: 16127426
- [85] Zhou Y, Qin H, Zhang M, Shen T, Chen H, Ma Y, *et al.* Lactobacillus plantarum inhibits intestinal epithelial barrier dysfunction induced by unconjugated bilirubin. *BrJ Nutr* 2010; 104(3): 390-401. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114510000474> PMID: 20412608
- [86] Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, *et al.* Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295(5): G1025-34. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.90227.2008> PMID: 18787064
- [87] Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(4): 631-59. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x> PMID: 22782113
- [88] Samak G, Narayanan D, Jaggar JH, Rao R. CaV1.3 channels and intracellular calcium mediate osmotic stress-induced N-terminal c-Jun kinase activation and disruption of tight junctions in Caco-2 CELL MONOLAYERS. *J Biol Chem* 2011; 286(34): 30232-43. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.240358> PMID: 21737448
- [89] Jain S, Suzuki T, Seth A, Samak G, Rao R. Protein kinase C ζ phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions. *Biochem J* 2011; 437(2): 289-99. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20110587> PMID: 21545357
- [90] Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, Fioramonti J, Eutamene H, Bueno L. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *AmJ Pathol* 2005; 167(4): 1071-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61196-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61196-0) PMID: 16192642
- [91] Keita AV, Soderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22(7): 718-33. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01498.x> PMID: 20377785
- [92] Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, Neyrinck AM, Jamar F, Starkel P, *et al.* Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(42): E4485-93. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1415174111> PMID: 25288760
- [93] Leclercq S, Cani PD, Neyrinck AM, *et al.* Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain Behav Immun* 2012; 26(6): 911-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.04.001> PMID: 22521198
- [94] Keshavarzian A, Fields JZ, Vaeth J, Holmes EW. The differing effects of acute and chronic alcohol on gastric and intestinal permeability. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(12): 2205-11. PMID: 7977243
- [95] Anton M, Alen F, Gomez de Heras R, Serrano A, Pavon FJ, Leza JC, *et al.* Oleylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addict Biol* 2017; 22(3): 724-41. <http://dx.doi.org/10.1111/adb.12365> PMID: 26857094
- [96] Anton M, Rodriguez-Gonzalez A, Ballesta A, Gonzalez N, Del Pozo A, de Fonseca FR, *et al.* Alcohol binge disrupts the rat intestinal barrier: the partial protective role of oleylethanolamide. *BrJ Pharmacol* 2018; 175(24): 4464-79. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14501> PMID: 30248186
- [97] Orio L, Anton M, Rodriguez-Rojas IC, Correas A, Garcia-Bueno B, Corral M, *et al.* Young alcohol binge drinkers have elevated blood endotoxin, peripheral inflammation and low cortisol levels: neuro-psychological correlations in women. *Addict Biol* 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/adb.12543> PMID: 28840951
- [98] Bode C, Bode JC. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 7(4): 575-92. [http://dx.doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00034-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00034-9) PMID: 12828956
- [99] Tamai H, Kato S, Horie Y, Ohki E, Yokoyama H, Ishii H. Effect of acute ethanol administration on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24(3): 390-4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2000.tb04629.x> PMID: 10776683
- [100] Lambert JC, Zhou Z, Wang L, Song Z, McClain CJ, Kang YJ. Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305(3): 880-6. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.102.047852> PMID: 12626662
- [101] Gottfried EB, Korsten MA, Lieber CS. Alcohol-induced gastric and duodenal lesions in man. *Am J Gastroenterol* 1978; 70(6): 587-92. PMID: 369362
- [102] Brozinsky S, Fani K, Grosberg SJ, Wapnick S. Alcohol ingestion-induced changes in the human rectal mucosa: light and electron microscopic studies. *Dis Colon Rectum* 1978; 21(5): 329-35. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02586661> PMID: 699722
- [103] Asai K, Buurman WA, Reutelingsperger CP, Schutte B, Kaminishi M. Low concentrations of ethanol induce apoptosis in human intestinal cells. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38(11): 1154-61. <http://dx.doi.org/10.1080/00365520310006252> PMID: 14686719
- [104] Rossi MA, Zucoloto S. Effect of chronic ethanol ingestion on the small intestinal ultrastructure in rats. *Beitr Pathol* 1977; 161(1): 50-61. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-8165\(77\)80109-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-8165(77)80109-1) PMID: 562662
- [105] Napolitano LM, Koruda MJ, Zimmerman K, McCowan K, Chang J, Meyer AA. Chronic ethanol intake and burn injury: evidence for synergistic alteration in gut and immune integrity. *J Trauma* 1995; 38(2): 198-207. <http://dx.doi.org/10.1097/00005373-199502000-00008> PMID: 7869435
- [106] Persson J, Berg NO, Sjölund K, Stenling R, Magnusson PH. Morphologic changes in the small intestine after chronic alcohol consumption. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25(2): 173-84. <http://dx.doi.org/10.3109/00365529009107940> PMID: 2305214
- [107] Klingensmith NJ, Yoseph BP, Liang Z, Lyons JD, Burd EM, Margoles LM, *et al.* Epidermal Growth Factor Improves Intestinal Integrity and Survival in Murine Sepsis Following Chronic Alcohol Ingestion. *Shock* 2017; 47(2): 184-92. <http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0000000000000709> PMID: 27465753
- [108] Bujanda L. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(12): 3374-82. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.03347.x> PMID: 11151864
- [109] Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H, Hoa N. Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol* 1999; 276(4): G965-74. PMID: 10198341
- [110] Elamin E, Masclee A, Dekker J, Jonkers D. Ethanol disrupts intestinal epithelial tight junction integrity through intracellular calcium-mediated Rho/ROCK activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 306(8): G677-85. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00236.2013> PMID: 24557761
- [111] Elamin E, Masclee A, Troost F, Pieters H, Keszhelyi D, Aleksa K, *et al.* Ethanol impairs intestinal barrier function in humans through mitogen activated protein kinase signaling: a combined *in vivo* and *in vitro* approach. *PLoS One* 2014; 9(9): e107421. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107421> PMID: 25226407
- [112] Elamin E, Jonkers D, Juuti-Uusitalo K, *et al.* Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: *in vitro* study in a three dimensional intestinal epithelial cell culture model. *PLoS One* 2012; 7(4): e35008. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035008> PMID: 22563376
- [113] Tang Y, Banan A, Forsyth CB, Fields JZ, Lau CK, Zhang LJ, *et al.* Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells

- and its potential role in alcoholic liver disease. *AlcoholClinExpRes* 2008; 32(2): 355-64.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00584.x> PMID: 18162065
- [114] Banan A, Keshavarzian A, Zhang L, *et al.* NF-kappaB activation as a key mechanism in ethanol-induced disruption of the F-actin cytoskeleton and monolayer barrier integrity in intestinal epithelium. *Alcohol* 2007; 41(6): 447-60.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2007.07.003> PMID: 17869053
- [115] Forsyth CB, Voigt RM, Keshavarzian A. Intestinal CYP2E1: A mediator of alcohol-induced gut leakiness. *Redox Biol* 2014; 3: 40-6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.10.002> PMID: 25462064
- [116] Cho YE, Yu LR, Abdelmegeed MA, Yoo SH, Song BJ. Apoptosis of enterocytes and nitration of junctional complex proteins promote alcohol-induced gut leakiness and liver injury. *J Hepatol* 2018; 69(1): 142-53.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.005> PMID: 29458168
- [117] Banan A, Fields JZ, Decker H, Zhang Y, Keshavarzian A. Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294(3): 997-1008.
 PMID: 10945852
- [118] Elamin E, Masclee A, Troost F, Dekker J, Jonkers D. Activation of the epithelial-to-mesenchymal transition factor snail mediates acetaldehyde-induced intestinal epithelial barrier disruption. *Alcohol-ClinExpRes* 2014; 38(2): 344-53.
<http://dx.doi.org/10.1111/acer.12234> PMID: 24033729
- [119] Zhong W, McClain CJ, Cave M, Kang YJ, Zhou Z. The role of zinc deficiency in alcohol-induced intestinal barrier dysfunction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298(5): G625-33.
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00350.2009> PMID: 20167873
- [120] Kyoko OO, Kono H, Ishimaru K, *et al.* Expressions of tight junction proteins Occludin and Claudin-1 are under the circadian control in the mouse large intestine: implications in intestinal permeability and susceptibility to colitis. *PLoS One* 2014; 9(5): e98016
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098016> PMID: 24845399
- [121] Swanson GR, Gorenz A, Shaikh M, Desai V, Forsyth C, Fogg L, *et al.* Decreased melatonin secretion is associated with increased intestinal permeability and marker of endotoxemia in alcoholics. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 308(12): G1004-11.
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00002.2015> PMID: 25907689
- [122] Forsyth CB, Voigt RM, Burgess HJ, Swanson GR, Keshavarzian A. Circadian rhythms, alcohol and gut interactions. *Alcohol* 2015; 49(4): 389-98.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.07.021> PMID: 25499101
- [123] Visapää JP, Tillonen J, Salaspuro M. Microbes and mucosa in the regulation of intracolonic acetaldehyde concentration during ethanol challenge. *Alcohol Alcohol* 2002; 37(4): 322-6.
<http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/37.4.322> PMID: 12107032
- [124] Seth A, Basuroy S, Sheth P, Rao RK. L-Glutamine ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 87(3): G510-7.
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00058.2004> PMID: 15331350
- [125] Sheth P, Seth A, Atkinson KJ, Gheyi T, Kale G, Giorgianni F, *et al.* Acetaldehyde dissociates the PTP1B-E-cadherin-beta-catenin complex in Caco-2 cell monolayers by a phosphorylation-dependent mechanism. *Biochem J* 2007; 402(2): 291-300.
<http://dx.doi.org/10.1042/bj20060665> PMID: 17087658
- [126] Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol* 2009; 50(6): 1258-66.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.007> PMID: 19398236
- [127] Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 2011; 141(5): 1572-85.
<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.002> PMID: 21920463
- [128] Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *J Immunol* 1995; 175(10): 6893-9.
<http://dx.doi.org/10.1159/000097202> PMID: 8963753
- [129] Blanco AM, Valles SL, Pascual M, Guerri C. Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *J Immunol* 2005; 175(10): 6893-9.
<http://dx.doi.org/10.1159/000097202> PMID: 16272348
- [130] Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol* 2009; 183(7): 4733-44.
<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803590> PMID: 19752239
- [131] Szabo G, Lippai D. Converging actions of alcohol on liver and brain immune signaling. *Int Rev Neurobiol* 2014; 118: 359-80.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801284-0.00011-7> PMID: 25175869
- [132] Pascual M, Balino P, Alfonso-Loeches S, Aragon CM, Guerri C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav Immun* 2011; 25 Suppl 1: S80-91.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.012> PMID: 21352907
- [133] Rachdaoui N, Sarkar DK. Effects of alcohol on the endocrine system. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2013; 42(3): 593-615.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2013.05.008> PMID: 24011889
- [134] Frias J, Rodriguez R, Torres JM, Ruiz E, Ortega E. Effects of acute alcohol intoxication on pituitary-gonadal axis hormones, pituitary-adrenal axis hormones, beta-endorphin and prolactin in human adolescents of both sexes. *Life Sci* 2000; 67(9): 1081-6.
<http://dx.doi.org/S0024320500007025> PMID: 10954041
- [135] Richardson HN, Lee SY, O'Dell LE, Koob GF, Rivier CL. Alcohol self-administration acutely stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but alcohol dependence leads to a dampened neuroendocrine state. *Eur J Neurosci* 2008; 28(8): 1641-53.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06455.x> PMID: 18979677
- [136] Adinoff B, Iranmanesh A, Veldhuis J, Fisher L. Disturbances of the stress response: the role of the HPA axis during alcohol withdrawal and abstinence. *Alcohol Health Res World* 1998; 22(1): 67-72.
 PMID: 15706736
- [137] Koob GF, Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 2001; 24(2): 97-129.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00195-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00195-0) PMID: 11120394
- [138] Rivier C. Adult male rats exposed to an alcohol diet exhibit a blunted adrenocorticotrophic hormone response to immune or physical stress: possible role of nitric oxide. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19(6): 1474-9.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.1995.tb01010.x> PMID: 8749813
- [139] Stephens MA, Wand G. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol Res* 2012; 34(4): 468-83.
 PMID: 23584113
- [140] Blaine SK, Sinha R. Alcohol, stress, and glucocorticoids: From risk to dependence and relapse in alcohol use disorders. *Neuropharmacology* 2017; 122: 136-47.
[http://dx.doi.org/S0028-3908\(17\)30036-9](http://dx.doi.org/S0028-3908(17)30036-9) PMID: 28159647
- [141] Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry* 2013; 74(10): 720-6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001> PMID: 23759244
- [142] Sarkar A, Lehto SM, Hartly S, Dinan TG, Cryan JF, Burnet PJW. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria-Gut-Brain Signals. *Trends Neurosci* 2016; 39(11): 763-81.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.002> PMID: 27793434
- [143] Swendsen JD, Merikangas KR. The comorbidity of depression and substance use disorders. *Clin Psychol Rev* 2000; 20(2): 173-89.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0272-7358\(99\)00026-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-7358(99)00026-4) PMID: 10721496
- [144] Burokas A, Arboleya S, Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G, *et al.* Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biol Psychiatry* 2017.
[http://dx.doi.org/S0006-3223\(17\)30042-2](http://dx.doi.org/S0006-3223(17)30042-2) PMID: 28242013
- [145] Wallace CJK, Milev R. The effects of probiotics on depressive symptoms in humans: a systematic review. *Ann Gen Psychiatry* 2017; 16: 14-017-0138-2. eCollection 2017
<http://dx.doi.org/10.1186/s12991-017-0138-2> PMID: 28239408
- [146] Sung H, Kim SW, Hong M, Suk KT. Microbiota-based treatments in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2016; 22(29): 6673-82.
<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i29.6673> PMID: 27547010
- [147] Ait-Belgnaoui A, Durand H, Cartier C, Chaumaz G, Eutamene H, Ferrier L, *et al.* Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37(11): 1885-95.

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.03.024> PMID: 22541937
- [148] Ait-Belgnaoui A, Colom A, Braniste V, Ramalho L, Marrot A, Cartier C, *et al.* Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *22541937* 2014; 26(4): 510-20.
<http://dx.doi.org/10.1111/nmo.12295> PMID: 24372793
- [149] Goehler LE, Park SM, Opitz N, Lyte M, Gaykema RP. *Campylobacter jejuni* infection increases anxiety-like behavior in the hole-board: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. *Brain Behav Immun* 2008; 22(3): 354-66.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2007.08.009> PMID: 17920243
- [150] Nishino R, Mikami K, Takahashi H, Tomonaga S, Furuse M, Hiramoto T, *et al.* Commensal microbiota modulate murine behaviors in a strictly contamination-free environment confirmed by culture-based methods. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25(6): 521-8.
<http://dx.doi.org/10.1111/nmo.12110> PMID: 23480302
- [151] Mackos AR, Eubank TD, Parry NM, Bailey MT. Probiotic *Lactobacillus reuteri* attenuates the stressor-enhanced severity of *Citrobacter rodentium* infection. *Infect Immun* 2013; 81(9): 3253-63.
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00278-13> PMID: 23798531
- [152] Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejdi A, *et al.* Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr* 2011; 105(5): 755-64.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0007114510004319> PMID: 20974015
- [153] Messaoudi M, Violle N, Bisson JF, Desor D, Javelot H, Rougeot C. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes* 2011; 2(4): 256-261.
<http://dx.doi.org/10.4161/gmic.2.4.16108> PMID: 21983070
- [154] Andersson H, Tullberg C, Ahm   S, *et al.* Oral Administration of *Lactobacillus plantarum* 299v Reduces Cortisol Levels in Human Saliva during Examination Induced Stress: A Randomized, Double-Blind Controlled Trial. *Int J Microbiol* 2016; 2016:469018
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/469018> PMID: 28101105
- [155] Yang H, Zhao X, Tang S, *et al.* Probiotics reduce psychological stress in patients before laryngeal cancer surgery. *Asia Pac J Clin Oncol* 2016; 12(1): e92-6.
<http://dx.doi.org/10.1111/ajco.12120> PMID: 24571169
- [156] Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, Nardelli A, Bolino C, Lau JT, *et al.* Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 2017; 153(2): 448-459e8.
<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.003> PMID: 28483500
- [157] Shukla PK, Meena AS, Manda B, Gomes-Solecki M, Dietrich P, Dragatsis I, *et al.* *Lactobacillus plantarum* prevents and mitigates alcohol-induced disruption of colonic epithelial tight junctions, endotoxemia, and liver damage by an EGF receptor-dependent mechanism. *FASEB J* 2018.
<http://dx.doi.org/10.1096/fj.201800351R> PMID: 29912589
- [158] Kao AC, Harty S, Burnet PW. The Influence of Prebiotics on Neurobiology and Behavior. *Int Rev Neurobiol* 2016; 131: 21-48.
<http://dx.doi.org/10.1016/bs.irn.2016.08.007> PMID: 27793220
- [159] Tarr AJ, Galley JD, Fisher SE, Chichlowski M, Berg BM, Bailey MT. The prebiotics 3'Sialyllactose and 6'Sialyllactose diminish stressor-induced anxiety-like behavior and colonic microbiota alterations: Evidence for effects on the gut-brain axis. *Brain Behav Immun* 2015; 50: 166-77.
[http://dx.doi.org/S0889-1591\(15\)00234-2](http://dx.doi.org/S0889-1591(15)00234-2) PMID: 26144888
- [160] Kapiki A, Costalos C, Oikonomidou C, Triantafyllidou A, Loukatou E, Petrouhilou V. The effect of a fructo-oligosaccharide supplemented formula on gut flora of preterm infants. *Early Hum Dev* 2007; 83(5): 335-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2006.07.003> PMID: 16978805
- [161] Schmidt K, Cowen PJ, Harmer CJ, Tzortzis G, Errington S, Burnet PW. Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 2015; 232(10): 1793-801.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00213-014-3810-0> PMID: 25449699
- [162] Gronier B, Savignac HM, Di Miceli M, Idriss SM, Tzortzis G, Anthony D, *et al.* Increased cortical neuronal responses to NMDA and improved attentional set-shifting performance in rats following prebiotic (B-GOS((R))) ingestion. *Eur Neuropsychopharmacol* 2018; 28(1): 211-24.
[http://dx.doi.org/0924-977X\(17\)31992-2](http://dx.doi.org/0924-977X(17)31992-2) PMID: 29174530
- [163] Savignac HM, Corona G, Mills H, Chen L, Spencer JP, Tzortzis G, *et al.* Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-D-aspartate receptor subunits and D-serine. *Neurochem Int* 2013; 63(8): 756-64.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.10.006> PMID: 24140431
- [164] Burokas A, Martin-Garcia E, Espinosa-Carrasco J, Erb I, McDonald J, Notredame C, *et al.* Extinction and reinstatement of an operant responding maintained by food in different models of obesity. *Addict Biol* 2018; 23(2): 544-55.
<http://dx.doi.org/10.1111/adb.12597> PMID: 29282813
- [165] Yarandi SS, Peterson DA, Treisman GJ, Moran TH, Pasricha PJ. Modulatory Effects of Gut Microbiota on the Central Nervous System: How Gut Could Play a Role in Neuropsychiatric Health and Diseases. *Neurogastroenterol Motil* 2016; 22(2): 201-12.
<http://dx.doi.org/10.5056/jnm15146> PMID: 27032544
- [166] Rios-Covian D, Cuesta I, Alvarez-Buylla JR, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilan CG. *Bacteroides fragilis* metabolises exopolysaccharides produced by bifidobacteria. *BMC Microbiol* 2016; 16(1): 150-016-0773-9.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0773-9> PMID: 27418149
- [167] Davis DJ, Hecht PM, Jasarevic E, Beversdorf DQ, Will MJ, Fritsche K, *et al.* Sex-specific effects of docosahexaenoic acid (DHA) on the microbiome and behavior of socially-isolated mice. *Brain Behav Immun* 2017; 59: 38-48.
[http://dx.doi.org/S0889-1591\(16\)30412-3](http://dx.doi.org/S0889-1591(16)30412-3) PMID: 27621225
- [168] Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int J Mol Sci* 2017; 18(12)
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms18122645> PMID: 29215589
- [169] Anton M, Rodriguez-Gonzalez A, Rodriguez-Rojo I, Pastor A, Correas A, Serrano A, *et al.* Increased plasma oleoylethanolamide and palmitoleoylethanolamide levels correlate with inflammatory changes in alcohol binge drinkers: the case of HMGB1 in women. *Addict Biol* 2017.
<http://dx.doi.org/10.1111/adb.12580> PMID: 29178411
- [170] Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, *et al.* An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 2001; 414(6860): 209-12.
<http://dx.doi.org/10.1038/35102582> PMID: 11700558
- [171] Di Paola M, Bonechi E, Provensi G, Costa A, Clarke G, Ballerini C, *et al.* Oleoylethanolamide treatment affects gut microbiota composition and the expression of intestinal cytokines in Peyer's patches of mice. *Sci Rep* 2018; 8(1): 14881-018-
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-32925-x> PMID: 30291258
- [172] de Timary P, Leclercq S, Stärkel P, Delzenne N. A dysbiotic subpopulation of alcohol-dependent subjects. *Gut Microbes* 2015; 6(6): 388-91.
<http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2015.1107696> PMID: 26727422
- [173] Meckel KR, Kiraly DD. A potential role for the gut microbiome in substance use disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 2019.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00213-019-05232-0> PMID: 30982128
- [174] Lowe PP, Gyongyosi B, Satishchandran A, Iracheta-Vellve A, Cho Y, Ambade A, *et al.* Reduced gut microbiome protects from alcohol-induced neuroinflammation and alters intestinal and brain inflammasome expression. *J Neuroinflammation* 2018; 15(1): 298-018-1328-9.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12974-018-1328-9> PMID: 30368255