

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRÍA



TESIS DOCTORAL

Efectos de distintos patrones de uso de alcohol sobre el sistema endocannabinoide en tejidos periféricos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Mariam Vázquez Berrios

DIRECTORES

**Fernando Antonio Rodríguez de Fonseca
Antonia Serrano Criado**

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE

MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRIA

Programa de Doctorado de Neurociencia

***EFFECTOS DE DISTINTOS PATRONES DE
USO DE ALCOHOL SOBRE
EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
EN TEJIDOS PERIFÉRICOS***

Realizado por:

MARIAM VÁZQUEZ BERRIOS

DIRECTORES

Dr. FERNANDO ANTONIO RODRÍGUEZ DE FONSECA

(Departamento de Psicobiología. UCM)

Dra. ANTONIA SERRANO CRIADO

(Hospital Regional Universitario de Málaga-IBIMA)



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE

MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRIA

Programa de Doctorado de Neurociencia

***EFFECTOS DE DISTINTOS PATRONES DE
USO DE ALCOHOL SOBRE
EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
EN TEJIDOS PERIFÉRICOS***

Realizado por:

MARIAM VÁZQUEZ BERRIOS

DIRECTORES

Dr. FERNANDO ANTONIO RODRÍGUEZ DE FONSECA

(Departamento de Psicobiología. UCM)

Dra. ANTONIA SERRANO CRIADO

(Hospital Regional Universitario de Málaga-IBIMA)

ABREVIATURAS

ADH: alcohol deshidrogenasa	MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno
ADN: ácido desoxirribonucleico	MCP-1: proteína quemo-atrayente de monocitos
ADNc: ADN complementario	MOPS: ácido 3(-N-morfolino) propanesulfónico
AEA: araquidonoleitanolamida o anandamida	MyD88: factor 88 de diferenciación mieloide
2-AG: 2-araquidonil glicerol	NAc: núcleo accumbens
ANOVA: análisis de la varianza	NAEs: N-aciletanolaminas/ aciletanolamidas
ARN: ácido ribonucleico	NAPE-PLD: fosfolipasa D específica de N-acilfosfatidiletanolamina
ARNm: ARN mensajero	OEA: oleiletanolamida
ATV: área tegmental ventral	PAMPs: moléculas asociadas a patógenos
BHT: butilhidroxituloeno	PEA: palmitoiletanolamida
CB₁: receptor cannabinoide tipo 1	PPAR: receptor activado por proliferadores de peroxisomas
CB₂: receptor cannabinoide tipo 2	(q)RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
CD6: transportador de ácidos grasos	SEC: sistema endocannabinoide
DAG: diacilglicerol	SEM/EEM: error estándar de la media
DAGL: diacilglicerol lipasa	SNC: sistema nervioso central
DAGL-α: diacilglicerol lipasa subtipo α	sP: ratas <i>Sardinian</i> con preferencia al alcohol
DAGL-β: diacilglicerol lipasa subtipo β	TAB 1: proteína ligadora de TAK 1
DID: <i>Drinking in the Dark</i>	TAK 1: quinasa activada de TGF- β
ECL: quimioluminescencia	TFs: factores de transcripción
FAAH: hidrolasa de amida de ácidos grasos	TGF-β: factor de crecimiento transformante beta
GABA: ácido γ -aminobutírico	THC: tetrahidrocannabinol
GMP: guanosina monofosfato cíclico	TNF: factor necrosis tumoral
GOT: transaminasa glutámico oxalacética	TRAF6: factor 6 asociado a receptor de TNF
GPT: transaminasa glutámico pirúvica	
GGT: gamma glutamil transpeptidasa	
HDL-C: colesterol de alta densidad	
5-HTT: transportador de serotonina	
IL: interleuquina	
IRAK: kinasa asociada a IL-1R	
LPA₁: receptor 1 del ácido lisofosfatídico	
LPS: lipopolisacárido	
MGL: monoacilglicerol lipasa	

TLR: receptores Toll-like

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-
diol

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....5

ÍNDICE

1. RESÚMENES.....10
1.1 RESÚMEN EN ESPAÑOL.....11
1.2 RESÚMEN EN INGLÉS.....15

2. INTRODUCCIÓN.....19

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....38
3.1 HIPÓTESIS.....39
3.2. OBJETIVOS.....40

4. MATERIAL Y MÉTODOS.....41

5. RESULTADOS.....56

6. DISCUSIÓN.....104

7. CONCLUSIONES.....118

8. BIBLIOGRAFÍA.....121

RESÚMENES

1.1. RESÚMEN EN ESPAÑOL

Actualmente, el alcohol es una de las sustancias de mayor consumo a nivel mundial. El consumo intensivo en atracón o “*binge drinking*” es un patrón de comportamiento caracterizado por la ingesta repetitiva de alcohol hasta alcanzar la intoxicación. Este comportamiento se puede observar hoy en día, especialmente entre los adolescentes. Este comportamiento, definido como el consumo de 5 bebidas o más entre hombres y 4 bebidas o más entre mujeres en un período de 2 horas que resulta en una concentración de alcohol en sangre de 0.08%, se puede considerar la raíz del problema de adicción al alcohol ya que, además de las consecuencias a corto plazo que afectan a estas personas, es más probable que individuos abusen o dependan del alcohol a largo plazo. El consumo continuo y excesivo de alcohol conduce a neuroadaptaciones en el cerebro que promueven el desarrollo de la dependencia al alcohol al crear, por ejemplo, tolerancia a través de alteraciones en el metabolismo del alcohol o cambios en la percepción del efecto de recompensa en el sistema nervioso central.

Uno de los sistemas neurotransmisores modulado por alcohol es el sistema endocannabinoide. La modulación de los transmisores lipídicos en el cerebro puede estar asociado al desarrollo de dependencia a alcohol al adquirir ciertas características relacionadas a la adicción como tolerancia, “*craving*” y abstinencia. Aunque se ha establecido una relación entre el sistema endocannabinoide y el alcoholismo, el sistema periférico ha sido menos estudiado. En la presente Tesis Doctoral se abordaron varias hipótesis para estudiar el alcoholismo y el papel que juega el sistema endocannabinoide en los tejidos periféricos (hígado, bazo, yeyuno) en el fenómeno del alcoholismo:

HIPÓTESIS 1. La expresión de los genes y/o proteínas relacionadas con el sistema de transmisión endocannabinoide se altera por la auto-administración prolongada de alcohol en el hígado y el intestino de los animales expuestos a esta droga. Los cambios observados dependerán de la intensidad del consumo.

HIPÓTESIS 2. La expresión de los genes y/o proteínas relacionadas con el sistema de transmisión endocannabinoide en el hígado y el intestino de los animales se altera por la exposición intensiva a alcohol en un modelo de atracón (“*binge*”). Los cambios observados dependerán del número de episodios de consumo intensivo y se observarán de modo diferencial en ambos tejidos.

HIPOTESIS 3. La exposición moderada durante la adolescencia a alcohol en un modelo de consumo episódico producirá cambios a largo plazo en la expresión de los genes y/o proteínas relacionadas con el sistema de transmisión endocannabinoide (SEC) en el bazo

de los animales expuestos. Los cambios observados dependerán del sexo del animal expuesto a alcohol durante la adolescencia.

HIPOTESIS 4. Aunque el alcohol puede producir efectos diferenciales sobre la expresión de los genes y/o proteínas relacionadas con el sistema de transmisión endocannabinoide, que serían dependientes del tejido y el modelo de administración del alcohol, se pueden encontrar patrones comunes de acción de esta droga sobre estos sistemas de transmisión. Para verificar las hipótesis se realizaron tres estudios diferentes con tres modelos diferentes de alcoholismo (autoadministración, “*binge drinking*”, y “*Drinking in the Dark*”). Se estudió la expresión génica y la expresión protéica en los tejidos periféricos, incluyendo el hígado, el intestino y el bazo, para analizar su participación en la conducta adictiva.

En el primer estudio se analizaron los efectos del alcohol en el hígado e intestino de ratas después de tres meses de autoadministración. Un grupo de los animales consumió una tasa baja de alcohol y otro grupo una tasa alta. El grupo control bebió una solución de sacarina. En el caso de los receptores CB₁ y LPAR1, no se afectaron los niveles de ARNm. En el receptor CB₂ y PPAR- α no hubo un efecto de auto-administración pero hubo diferencias entre grupos donde disminuyeron los niveles de los receptores en el grupo de tasa alta de auto-administración. En las enzimas de biosíntesis (NAPE-PLD y DAGL- α/β) y en las enzimas de degradación (FAAH y MGL) tampoco se vio un efecto de auto-administración en los niveles de ARNm pero sí disminuyeron los niveles de enzimas en el grupo de la tasa alta de alcohol comparado con el de tasa baja. En el caso del intestino, no se vieron efectos en los niveles de los receptores. Se vio un efecto en la tasa alta de alcohol en el receptor LPAR1. Igualmente este efecto se mostró en DAGL- β y en las enzimas de degradación (FAAH y MGL). Contrario al hígado, en el intestino se vio un incremento de los niveles de receptores y enzimas en el grupo de tasa alta de alcohol.

En el segundo estudio se analizó la expresión de los genes relacionados con la señalización del sistema endocannabinoide en el hígado e intestino de ratas Wistar expuestas a un modelo de atracón forzado mediante la administración oral de 3 g/kg de una solución de etanol al 25% en agua por 1, 2, 4 y 8 episodios de consumo intensivo de alcohol (una administración única intensiva). Se midió la concentración de etanol en sangre donde se vio un efecto del tiempo de exposición y tiempo de toma de muestra en los niveles de alcohol en sangre. En el hígado se vio un efecto por el consumo de alcohol en atracón en los receptores (CB₁, CB₂, PPAR- α y LPAR1), enzimas de biosíntesis (NAPE-PLD y DAGL- α/β), enzimas de degradación (FAAH y MGL) del sistema endocannabinoide y translocasa de ácidos grasos (CD36) con una disminución en los niveles de estos. En el intestino se vio un

efecto por el consumo de alcohol en atracón en el receptor PPAR- α y sólo cuando se repitieron los atracones (binge 4, binge 8). En cuanto a la expresión proteica, sólo se vio un efecto en el aumento de los niveles de MGL en el hígado.

En el tercer estudio se analizó la expresión de los genes relacionados con la señalización del sistema endocannabinoide en el bazo de ratas Wistar adultas expuestas a cuatro semanas de consumo moderado de alcohol durante la adolescencia. El análisis de concentración de alcohol en sangre demostró un efecto significativo de tiempo de exposición y factor sexo. En cambio, no hubo un efecto en el metabolismo energético ni en la toxicidad de los animales. Se vio un efecto de exposición de alcohol en la expresión génica de los receptores CB₁ y PPAR- α . También se vio un efecto por factor sexo en CB₁. En cuanto a la expresión proteica se vio un efecto de exposición a alcohol y factor sexo en NAPE-PLD. También se estudió la repercusión funcional en el sistema inmune en la edad adulta de la exposición de ratas Wistar a cuatro semanas de consumo moderado de alcohol durante la adolescencia. Se estudiaron los niveles de citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) y quemoquinas circulantes (CCL2/MCP-1, CX₃CL1/fractalquina). Se vio un efecto por factor sexo con una disminución en concentración de CX₃CL1 en ratas macho. En las citoquinas se vio un efecto de exposición de alcohol y factor sexo en TNF- α e IL-6 con una concentración más baja de ambas en hembras.

Los datos recogidos de estos estudios nos permiten concluir que la exposición a alcohol afecta la expresión génica y/o proteica del sistema endocannabinoide en el hígado, yeyuno e intestino. La exposición a alcohol en los tres modelos experimentales afectan la expresión de los genes y/o proteínas relacionadas con el sistema endocannabinoide en el hígado, el intestino y el bazo. Los efectos fueron más visibles en los niveles de ARNm. Estos efectos fueron especialmente intensos en el modelo de consumo de alcohol por atracón. Se vio una relación entre la intensidad y la dosis de alcohol administrada con los cambios producidos en los tejidos periféricos. Mientras más alta era la dosis y el número de atracones, más cambios se vieron. En el modelo de auto-administración los cambios en hígado e intestino dependían de la intensidad de la auto-administración aunque tuvieron efectos opuestos en ambos tejidos. En el hígado se produjeron efectos inhibitorios mientras que en el intestino se produjeron efectos activadores. En el modelo de exposición adolescente a cantidades moderadas de alcohol se observaron efectos en el sistema endocannabinoide, especialmente entre sexos. Por lo que hay diferencia de género luego de exposición a alcohol. Además, se vio un cambio en el sistema inmunológico y en los niveles de citoquinas, también con diferencias en género.

Por lo tanto, estos estudios nos indican que el alcohol también modula el sistema endocannabinoide y el sistema inmune en los tejidos periféricos. La exposición al alcohol, sea en el modelo de ingesta crónica o aguda, produce una desregulación en el sistema característico de una condición patológica. La determinación de los factores (e.g, dosis, intensidad) que conducen a ese estado de adicción, la importancia de la localización donde ocurren estos cambios (hígado o intestino) nos aclara los mecanismos envueltos en la transición del uso agudo al uso crónico de alcohol. Las adaptaciones o deficiencias del sistema endocannabinoide en los tejidos periféricos pueden ser un punto de partida para encontrar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de alcoholismo.

1.2. RESÚMEN EN INGLÉS

Currently, alcohol is one of the most frequently used substances worldwide. The term “binge drinking” refers to a behavioral pattern characterized by repeatedly drinking to intoxication. This behavior is usually seen among adolescents. “*Binge drinking*” has been defined as a drinking pattern that brings blood alcohol concentration to 0.08%, where men consume 5 or more drinks and women consume 4 or more drinks in a 2-hour period. Alcohol addiction may stem from binge drinking since, besides suffering several short-term consequences, it is more probable that this type of behavior will lead to alcohol abuse or dependence in the long run. Brain neuroadaptations occur after excessive and continuous consumption of alcohol, which could lead to the development of alcohol dependence due to alterations in alcohol metabolism or changes in the perception of the rewarding effect in the central nervous system.

One of the neurotransmission systems modulated by alcohol is the endocannabinoid system. The modulation of lipid transmitters in the brain could be associated to the development of alcohol dependence after acquiring certain characteristics that are distinctive of addiction like tolerance, craving or withdrawal. Even though a link has been established between the endocannabinoid system and alcoholism, the peripheral system has barely been studied. Our present work will address the following hypotheses concerning the link between alcoholism and the role of the endocannabinoid system in alcoholism at the peripheral level (liver, spleen, jejunum):

HYPOTHESIS 1. Gene and/or protein expression related to the endocannabinoid system transmission is altered by the prolonged exposure to alcohol during self-administration in the liver and jejunum of animals exposed to this drug. The observed changes will depend on consumption intensity.

HYPOTHESIS 2. The gene and/or protein expression related to the endocannabinoid system transmission in the animals’ liver and jejunum is altered by intensive exposure to alcohol in a binge drinking model. The changes observed will depend on the number of episodes of intensive consumption and will be differentially observed in both tissues.

HYPOTHESIS 3. Moderate exposure to alcohol during adolescence in a model of episodic drinking will produce long-term changes in the expression of genes and/or proteins related to the ECS transmission in the animals’ spleen. The observed changes will depend on the animal sex when exposed to alcohol during adolescence.

HYPOTHESIS 4. Although alcohol can induce differential effects on gene and/or protein expression related to ECS transmission, which would depend on the tissue and the type of

alcohol administration experimental model, common patterns of alcohol action can be seen in these transmitter systems.

Three different studies were performed to verify these hypotheses. Three different alcohol models (self-administration, "*binge drinking*" and "*Drinking in the Dark*"). Gene and protein expression was analyzed in peripheral tissues, including liver, intestine and the spleen to study their role in addictive behavior.

In the first study, alcohol effects were analyzed in the animals' liver and intestine after three months of alcohol self-administration. One group of animals had a low ethanol intake, and another group has a high ethanol intake. The control group drank a saccharine solution. CB₁ and LPAR1 mRNA levels did not significantly change. The same occurred in CB₂ and PPAR- α receptors, although a difference between groups was observed, where there was a decrease in receptors' levels in the high ethanol intake group. The biosynthetic enzymes (NAPE-PLD and DAGL- α/β) and degradation enzymes (FAAH and MGL) didn't show an effect on mRNA expression levels, but the enzymes' levels decreased in the high ethanol intake group compared to the low ethanol intake group. Receptor levels did not change significantly in the intestine, although an effect was observed in LPAR1 levels in the high intake ethanol group. Likewise, an effect was seen in DAGL- β and the degradation enzymes (FAAH and MGL). Contrary to what was observed in the liver, there was an increase of receptor and enzyme levels in the high ethanol intake group.

In the second study, gene expression related to the endocannabinoid signaling system in the liver and intestine of Wistar rats exposed to a binge drinking model through the oral administration of 3 g/kg of 25% ethanol solution in water. This occurred in 1, 2, 4, and 8 episodes of intensive alcohol consumption (one sole intensive administration). Blood ethanol concentration was measured. A time exposure effect and an effect of the time when the sample collection was taken was observed. In the liver, an effect due to binge drinking was seen in the cannabinoid receptors (CB₁, CB₂, PPAR- α y LPAR1), biosynthetic enzymes (NAPE-PLD y DAGL- α/β), degradation enzymes (FAAH y MGL) and fatty acid translocase (CD36) since there was a decrease of these levels. An effect due to binge drinking on the PPAR- α receptor in the intestine when there was a repeated intake of alcohol during the binge 4 and the binge 8 episodes. Regarding protein expression, MGL levels increased in the liver.

In the third study, gene expression related to the endocannabinoid signaling system in the spleen of adult Wistar rats exposed to 4 weeks of moderate alcohol consumption during adolescence was analyzed. Blood ethanol concentration levels showed an effect due to time

exposure and the sex factor. On the other hand, no significant change was seen in the energy metabolism or toxicity levels of the animals. An effect on gene expression due to alcohol exposure in CB₁ and PPAR- α receptors could be observed. In the CB₁ receptor, a sex factor effect could also be seen. Protein expression was affected by alcohol exposure and the sex factor in NAPE-PLD. Functional repercussions on the immune system of adult Wistar rats after alcohol exposure during 4 weeks of moderate alcohol consumption during the adolescence stage were studied. Cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) and circulating chemokine levels (CCL2/MCP-1, CX₃CL1/fractalkine) were analyzed. An effect due to the sex factor was observed in a decrease of CX₃CL1 levels in male rats. Cytokines (TNF- α and IL-6) were affected by alcohol exposure and animal sex factors. Female rats had a lower concentration of both cytokines compared to male rats.

The data collected throughout these experiments allow us to reach several conclusions. Alcohol exposure affects endocannabinoid gene and/or protein expression in the liver, jejunum and spleen. Exposure to alcohol in the three experimental models influenced endocannabinoid gene and/or protein expression in these three tissues. The changes were more apparent in mRNA expression level. They were especially intense in the binge drinking model. A link between the intensity of alcohol consumption and the alcohol dose administered could be seen in the changes that occurred at the peripheral level. More changes occurred when the dose administered and the number of episodes was higher. In the self-administration model, the changes that occurred in the liver and intestine depended on consumption intensity. The liver showed inhibitory effects while the intestine showed excitatory effects.

In the “*Drinking in the dark*” model, where adolescent rats consumed moderate amounts of alcohol, changes in the endocannabinoid system were observed, especially between male and female rats. Thus sex difference influences alcohol consumption. There were also changes observed in the immune system and cytokine levels due to sex difference.

These experiments indicate that alcohol also modulates the endocannabinoid system and the immune system in the peripheral tissues. Exposure to alcohol, regardless of the type of experimental model, leads to a dysregulation of the endocannabinoid system that's characteristic of a pathological condition. Determining the factors (e.g., dose, intensity) that lead to addiction and the localization of the neurotransmitter system where these changes occur (liver or jejunum) may help elucidate the mechanisms involved during the transition from acute use to chronic use of alcohol. The adaptations or deficiencies in the

endocannabinoid system at the peripheral level could be a starting point to find new therapeutic targets that will help treat alcoholism.

INTRODUCCIÓN

2.1. EL ALCOHOLISMO COMO PROBLEMA DE SALUD

El alcohol es una de las sustancias de abuso más peligrosas por su elevada aceptación social y cuyo uso continuado puede progresar a trastornos por uso de alcohol y otras complicaciones asociadas propias de cualquier estado adictivo. De hecho, alcohol es la droga más consumida a nivel mundial y su uso está permitido en la mayoría de los países (Keller y Vaillant, 2011). Por lo tanto, esta situación de aceptación generalizada del consumo alcohol podría subestimar muchos de sus efectos perjudiciales sobre la salud y sus consecuencias sociales y económicas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2011), la mayoría de las personas beben con moderación, pero aproximadamente 76,3 millones de personas sufren de trastornos por consumo de alcohol que incluyen el abuso y dependencia al alcohol.

Las consecuencias de este consumo generalizado se han convertido en un verdadero problema económico y sanitario a nivel global. Estados Unidos ha invertido unos 185000 millones de dólares anuales en tratar problemas relacionados con el alcohol (NIAAA, 2013). En Europa, el costo de problemas asociados al alcohol se estima en 125000 millones de euros aproximadamente (European Commission, 2006). La dependencia al alcohol se ha asociado con más de 60 condiciones médicas que incluyen enfermedades gastrointestinales y del hígado, enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades psiquiátricas (Room et al., 2005). El consumo excesivo de alcohol también está asociado, a corto plazo, con una alta siniestralidad por accidentes de tráfico (que llevan a muertes prematuras e incapacidad), además de una disminución en la productividad laboral, mayores tasas de criminalidad y violencia, etc. (Cook y Moore, 2000).

El impacto social, económico y sanitario del alcohol se relaciona con su potencial adictivo. La adicción es un trastorno crónico y recurrente que está vinculado al sistema nervioso central (SNC) y que se caracteriza por una serie de cambios neurobiológicos y comportamentales que conllevan a una búsqueda compulsiva de drogas para su consumo (Cami y Farre, 2003). En el caso del alcohol, el abuso se define como el consumo de cantidades crecientes de alcohol que son dañinas y tienen efectos negativos en la salud física y mental del individuo. En cuanto a la dependencia al alcohol, su identificación se produce por la presencia en el individuo de los mismos síntomas de abuso al alcohol, pero incluye la presencia de las siguientes características: tolerancia, abstinencia y el uso continuo o persistente de alcohol a pesar de las consecuencias negativas (Saitz, 2005). La tolerancia ocurre cuando un individuo es cada vez menos sensible a cierta cantidad de alcohol e ingiere dosis más altas, mientras que la abstinencia se refiere a los síntomas

negativos que se producen cuando se interrumpe el consumo de alcohol abruptamente. Estos síntomas en la abstinencia pueden llevar a sujetos alcohólicos a consumir cantidades mayores de alcohol para evitar los efectos negativos (Finn y Crabbe, 1997). Otra característica propia durante la dependencia al alcohol es el “*craving*” (concepto derivado del inglés referido a ansia/deseo) que consiste en un fuerte deseo de beber alcohol, principalmente durante y después del período de abstinencia (Miller et al., 2012).

2.2. FORMAS DE CONSUMO DE ALCOHOL

Tomando en consideración las definiciones de los trastornos por uso de alcohol y los efectos y consecuencias que traen consigo, se puede pensar que el consumo de grandes cantidades de alcohol en cortos períodos de tiempo podría ser un buen predictor de un futuro desarrollo de alcoholismo (Bouchery et al., 2011). Este tipo de consumo de alcohol en atracón, conocido también como “*binge drinking*” (término inglés usado habitualmente en el campo de la adicción), se define como el consumo de al menos 5 bebidas alcohólicas en hombres o al menos 4 bebidas alcohólicas en mujeres durante un período de 2 horas que resulta en una concentración mínima de alcohol en sangre de 0.08% (NIAAA, 2004). Los niveles de alcohol en la sangre podrán predecir tanto el patrón de consumo de alcohol como las consecuencias en la salud que pueden provocar. Por ejemplo, una persona que consuma una bebida de alcohol diaria va a consumir lo mismo que una persona que se abstiene durante la semana pero decide consumir 7 bebidas un día de fin de semana. Sin embargo, esta última tiene mayor probabilidad de sufrir consecuencias causadas por intoxicación por los niveles más altos de concentración de alcohol en sangre. Las consecuencias incluyen: comportamientos antisociales como vandalismo y problemas con la autoridad, disputas, agresiones y accidentes de tráfico (Wechsler et al., 1994 y 2002). El consumo en atracón de alcohol también promueve la toma de decisiones inadecuadas (George et al., 2005) como conductas sexuales más arriesgadas (Stappenbeck et al., 2013). Todas estas consecuencias negativas pueden producir una incapacidad y daño permanentes en el sujeto por el elevado riesgo que supone un “*binge drinking*” frecuente o continuo.

A todo ello hay que añadir que el consumo crónico del alcohol es la causa de un elevado número de trastornos y enfermedades, tal y como ya se ha mencionado. Por otro lado, hay que recordar que el consumo de alcohol en atracón podrá provocar a medio y largo plazo una serie de cambios neurobiológicos, sobre todo si se produce en una etapa adolescente,

que promoverán una mayor vulnerabilidad al desarrollo de trastornos de abuso y dependencia al alcohol durante la edad adulta (Rehm, 2011).

2.3. MODELOS ANIMALES DE CONSUMO DE ALCOHOL

2.3.1. AUTO-ADMINISTRACIÓN

Uno de los modelos preclínicos de adicción más utilizado es el de auto-administración ya que emula varios aspectos de la condición humana durante el consumo de droga. Varios modelos animales se han establecido para analizar los aspectos de la adicción desde el comienzo de uso de la sustancia hasta alcanzar el estado de dependencia. Estos modelos permiten estudiar más a fondo el comportamiento y los mecanismos neurobiológicos asociados a la adicción.

Existen varios modelos de auto-administración que estudian el comportamiento de búsqueda y consumo de alcohol además de los aspectos de recompensa. El paradigma de consumo voluntario, como el “*two-bottle choice*” (acceso a dos botellas), permite estudiar la afinidad de los animales hacia el alcohol. Aunque este modelo mide el consumo de alcohol de los animales, no toma en consideración otros aspectos de la adicción (Tabakoff y Hoffman, 2000).

El condicionamiento operante originalmente estudiaba las propiedades reforzantes de alcohol, por ejemplo, cuando el animal tiene que *trabajar* ya que debe presionar una palanca para auto-administrarse alcohol (Files et al., 2008). Este tipo de modelo permite evaluar la motivación, además de los aspectos de consumo de alcohol durante la auto-administración. El consumo está correlacionado con el mantenimiento y terminación de consumo de droga. La motivación es parte del inicio de consumo de droga. Ésta controla el comportamiento de búsqueda de la droga y lo dirige hacia donde puede encontrar la droga (Tabakoff y Hoffman, 2000).

Por lo tanto, durante el procedimiento operante, los estímulos ambientales y temporales pueden variar al de acuerdo a las sesiones de los animales en cajas especiales. Por ejemplo, se puede variar cuán duro tiene que trabajar el animal por la droga, la frecuencia de presentación de droga y la dosis por cada refuerzo. Como consecuencia, se diferencia el comportamiento de búsqueda y adquisición de droga y el de consumo (Heilig y Koob, 2007). La mayoría de estos experimentos usan un programa de refuerzo de ratio fijo para estudiar los patrones en la tasa de consumo de droga. Un programa de refuerzo de ratio fijo concede una recompensa luego de un número específico de respuestas. El más común es el ratio fijo

1 que requiere una respuesta para obtener una recompensa. Con este tipo de programa se pueden estudiar las propiedades de refuerzo del alcohol. El refuerzo mide el efecto de que un comportamiento se fortalezca o se aprenda como consecuencia de un estímulo (en este caso la recompensa de alcohol). Las propiedades reforzantes son indicativas del potencial de abuso de varias sustancias (O Connor et al., 2011). En cuanto a la adicción, el programa de refuerzo de ratio fijo se ha utilizado para estudiar la transición del uso controlado al uso compulsivo de drogas.

2.3.2. CONSUMO EN ATRACÓN O *BINGE*

Aunque el estudio voluntario de consumo de alcohol ha permitido evaluar aspectos importantes de la adicción y los mecanismos neurobiológicos correspondientes, los modelos de alcohol de consumo de atracón de alcohol no han recibido mucha atención. Este patrón de comportamiento prevalece especialmente entre adolescentes. Además de las consecuencias negativas que hemos discutido anteriormente, el “*binge drinking*” aumenta el riesgo de desarrollar dependencia al alcohol mientras más temprano se comience este tipo de consumo (Miller et al., 2007). Es importante entonces estudiar los mecanismos envueltos y los sistemas que modulan este tipo de ingesta.

El uso del término “*binge*” se ha utilizado para diferenciar los consumidores crónicos de alcohol y los que consumen alcohol en grandes cantidades pero en episodios (Tomsovic, 1974). Como hemos mencionado anteriormente la NIAAA (2004) definió el “*binge drinking*” donde un episodio eleva la concentración de alcohol en sangre a 0,08%. Para distinguir la ingesta excesiva vs. la ingesta leve o moderada de alcohol, Samson (2000) indicó que el control del consumo oral de alcohol se debe a la cantidad de alcohol consumida durante los episodios y la cantidad de tiempo que transcurre entre esos episodios. Por lo tanto, nuevos modelos que emulen el comportamiento humano han surgido para analizar los patrones de consumo excesivo de alcohol donde se consuman grandes cantidades en un período de tiempo o ingesta rápida de la bebida con períodos intermitentes breves entre una ingesta y otra. Uno de los modelos de “*binge*” que se ha comenzado a utilizar con más frecuencia es el de “*drinking in the dark*” (DID). Este modelo promueve un alto consumo de alcohol donde los animales alcanzan niveles de concentración de alcohol en la sangre relevantes. Los factores más importantes al estudiar el “*binge drinking*” son cantidad de alcohol, frecuencia y rapidez para replicar lo mejor posible el comportamiento humano (Crabbe et al., 2009).

Los mecanismos neurobiológicos asociados al “*binge drinking*” no se han estudiado ampliamente. Estos modelos podrían explicar cómo se inicia y se mantiene este

comportamiento, además de que podrían aclarar el proceso de transición entre abuso y dependencia al alcohol. En este trabajo comparamos tres modelos de consumo de alcohol y estudiamos cómo el alcohol modula el sistema endocannabinoide a nivel periférico y las señales inmunológicas y las diferencias en estos sistemas según el tratamiento agudo o crónico de alcohol administrado. Esto podría contribuir a entender las diferencias a nivel molecular, celular y de comportamiento entre el abuso y la dependencia al alcohol y los cambios que tienen que ocurrir para pasar de un estado a otro.

2.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE ALCOHOL: LAS NUEVAS DIANAS

El alcohol o alcohol etílico es una molécula simple de dos carbonos. Es soluble en agua y grasa y cruza las membranas biológicas con facilidad. Cuando se consume, el tracto intestinal absorbe rápidamente el alcohol, principalmente el intestino delgado (Norberg et al., 2003), pero la mayor parte del metabolismo ocurre en el hígado, donde la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) metaboliza el acetaldehído (Lieber, 1991).

El alcohol trabaja como un depresor del SNC ya que aumenta la inhibición de la transmisión nerviosa cerebral y disminuye su excitación. En un cerebro normal, existe un balance entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria, pero el uso de alcohol interrumpe este equilibrio. Incluso un consumo agudo de alcohol es capaz de afectar dicho estado de equilibrio al promover la neurotransmisión inhibitoria y atenuar la excitatoria. Se ha sugerido que el cerebro compensa de este modo los efectos depresores del alcohol después de un consumo crónico de alcohol para mantener la homeostasis (Valenzuela, 1997). Estos cambios de compensación juegan un papel importante en la transición del uso controlado al uso compulsivo de alcohol.

2.4.1. ALCOHOL Y SISTEMAS DE TRANSMISIÓN CLÁSICOS

La motivación para consumir alcohol y otras drogas de abuso puede producirse debido a los efectos de refuerzo (Wise, 1998). Se ha sugerido que las sustancias de abuso se pueden auto-administrar debido a los efectos de los refuerzos positivos, que son un efecto directo de recompensa de la droga. Por otra parte, se pueden auto-administrar por los efectos de los refuerzos negativos para evitar los síntomas de abstinencia (Kandel, 2002). El progreso de consumo de droga de impulsivo (recompensa) hasta compulsivo conlleva una serie de neuroadaptaciones que conducen a la adicción.

Estudios recientes concurren en que la desregulación neural que resulta luego del consumo de droga envuelve vías neuroquímicas y neuroanatómicas similares (Hyman y Malenka

2001), en especial las drogas de abuso activan la vía mesocorticolímbica-dopaminérgica, también conocida como la vía de recompensa (Di Chiara and Imperato, 1988). Esta vía juega un papel importante en el sistema de motivación ya que regula las respuestas a los procesos de recompensa naturales como comer o beber. El núcleo accumbens (NAc) y el área ventral tegmental (VTA) son clave para mediar los efectos de las drogas (Koob y Volkow, 2010). Las vías dopaminérgicas y opioide se consideran los sistemas principales que median estos efectos (Solinas et al., 2008). Como consecuencia, la activación del sistema mesocorticolímbico-dopaminérgico lleva a un aumento en la transmisión de dopamina en el VTA (Gessa et al., 1985) y en el NAcc (Di Chiara e Imperato, 1988).

El consumo de alcohol induce a una variedad de cambios en los sistemas neurotransmisores, proteínas neuronales y las membranas de las neuronas (Chin y Goldstein, 1981), entre ellos los sistemas neurotransmisores que regulan el sistema de recompensa.

2.4.1.1. GABA

El neurotransmisor principal envuelto en la inhibición del SNC es ácido gama-aminobutírico (GABA) (Pitzele y Tolia, 2010). El GABA actúa sobre tres tipos de receptores: GABA_a, GABA_b y GABA_c. Los receptores GABA_a se encuentran en la mayoría de las neuronas en el cerebro y la médula espinal y es mediador de la mayoría de los efectos depresores del SNC (Johnston, 1996). La activación del receptor GABA_a permite la entrada de iones de cloro (Cl⁻) a la célula post-sináptica causando la hiperpolarización de la membrana post-sináptica y disminuyendo la excitabilidad de la membrana. El etanol aumenta la actividad de GABA lo que resulta en una acción inhibitoria que causa sedación, ausencia de coordinación motora y disfunción cognitiva (Mihic y Harris, 1997).

El alcohol modula el receptor GABA_a y potencia los canales activados por voltaje cuando aumenta la hiperpolarización. Los cambios en el comportamiento inducidos por el alcohol aumentan cuando se administran agonistas GABA y disminuyen con los antagonistas GABA (Liljequist y Engel, 1982). La exposición continua al alcohol conduce a cambios en el ARNm y los niveles de proteína de los receptores GABA_a debido al mecanismo de adaptación compensatorio. Hay una disminución en la densidad del receptor GABA_a y cambios en la expresión de genes en regiones específicas para la regulación positiva o negativa de las subunidades α y β . La exposición crónica al alcohol disminuye la densidad de receptores GABA_a α 1 en el área tegmental ventral (ATV) lo que resulta en un aumento en liberación de dopamina. Como consecuencia, se cree que los sistemas GABAérgicos median la auto-

administración de alcohol en animales al estimular la vía de recompensa a través del sistema mesolímbico-dopaminérgico (Chester y Cunningham, 2001).

2.4.1.2. DOPAMINA

La dopamina es un neurotransmisor importante para varios procesos como aprendizaje, motivación y recompensa provocada por estímulos naturales y drogas de abuso, incluyendo el alcohol (Gonzales et al., 2004). La dopamina es sintetizada por tirosina hidroxilasa a partir del amino ácido tirosina a DOPA (dihidroxifenilalanina). Ésta luego se convierte en dopamina via DOPA decarboxilasa. La dopamina tiene 5 tipos de receptores (D1-D5) (Verheij and Cools, 2008). Hay cuatro vías dopaminérgicas importantes que incluyen la vía mesolímbica y la mesocortical. Ambas se originan en el ATV donde la vía mesocortical se proyecta a la corteza prefrontal y el sistema mesolímbico se proyecta a regiones límbicas como el Nac, la corteza prefrontal y la amígdala Ambos sistemas son claves que juegan un papel en la recompensa, la memoria y respuestas emocionales y moticvacionales (Swanson, 1982).

La auto-administración de alcohol aumenta los niveles de dopamina en el Nac y la corteza prefrontal medial (Weiss et al., 1993) debido a la activación de las neuronas dopaminérgicas en el ATV. Mientras, el consumo crónico de alcohol no tiene un efecto tan relevante en los niveles de dopamina ya que estas neuronas desarrollan tolerancia (McBride et al., 1990). El bloqueo de receptores de dopamina en el NAC reduce la ingesta de alcohol (Cunningham et al., 2000). La privación de alcohol conduce a disminución en función del sistema mesolímbico-dopaminérgico lo que se cree que motiva al individuo a continuar consumiendo alcohol para recuperar la línea base del sistema (Ahmed y Koob, 2005). En un estudio clínico, individuos alcohólicos en abstinencia que tenían menor cantidad de receptores en el estrato ventral demostraban tener un mayor “*craving*” de alcohol. Los cambios neuroadaptativos en el sistema mesolímbico-dopaminérgico pueden estar asociados a los efectos de refuerzo negativos característicos del alcoholismo.

2.4.1.3. OPIOIDES

La vía opioide es uno de los sistemas principales que median los efectos de drogas en el sistema de recompensa a través de la modulación del sistema mesolímbico-dopaminérgico (Spanagel et al., 1990). Hay tres tipos de receptores opioides: μ , δ y κ , que son los responsables de mediar las acciones de péptidos endógenos opioides como la β -endorfina, las encefalinas y las dinofirnas. El alcohol interfiere con los mecanismos opioides al nivel de

los péptidos opioides endógenos ya que afecta la síntesis, liberación o procesamiento de estos. Al nivel de los receptores opioides, altera la afinidad por los péptidos opioides. La exposición aguda al alcohol aumenta los niveles de las encefalinas y los niveles de β -endorfinas altos se han correlacionado con el alcoholismo (Gianoulakis et al., 2001). Tanto los antagonistas opioides selectivos para los receptores μ - y δ - como los antagonistas no-selectivos, disminuyen la ingesta de alcohol. En estudios de lesiones de los terminales dopaminérgicos en el NAc, el antagonista naltrexona disminuye el consumo de alcohol aunque las lesiones no alteran la ingesta de alcohol (Koistinen et al., 2001). Los efectos de los antagonistas opioides no se atribuyen solamente a las acciones de la transmisión dopaminérgica. Mientras la ingesta de alcohol aumenta las endorfinas extracelulares en el NAc, los antagonistas opioides inhiben las acciones de las endorfinas endógenas.

2.4.1.4. SEROTONINA

Los receptores serotoninérgicos han sido implicados en el consumo de alcohol, intoxicación y los efectos de abstinencia. La actividad del receptor 5-HT1 reduce la actividad basal de la liberación de dopamina en el prosencéfalo. Cuando se ingiere alcohol, hay una liberación más intensa de dopamina y, como consecuencia, un aumento en las propiedades de recompensa de alcohol. Se ha demostrado que el consumo de alcohol disminuye el número y la sensibilidad de los receptores 5-HT2 a largo plazo (Pandey et al., 1992). Los receptores 5-HT3 se encuentran en el NAc y facilitan la liberación de dopamina. Los antagonistas de estos otros receptores inhiben la liberación de dopamina inducida por alcohol en el sistema mesolímbico (Tomkins y Sellers, 1995). El consumo agudo de alcohol aumenta los niveles extracelulares de serotonina mientras que el consumo crónico causa un aumento en la recaptación por el transportador de serotonina (5-HTT) o disminuye la liberación en los núcleos del rafe. Exposición al alcohol aumenta la expresión de ARNm de serotonina en las regiones asociadas con la vía de recompensa en el cerebro (Heinz et al., 2003). El uso de inhibidores selectivos de recaptación serotoninérgicos son beneficiosos para evitar la ansiedad y depresión en alcohólicos asociada a la abstinencia (Lejoyeux, 1996).

2.4.1.5. GLUTAMATO

El glutamato actúa sobre dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos son canales iónicos acoplados a ligando y se clasifican como NMDA, AMPA y *Kainate* basado en su sensibilidad a ciertos agonistas (Nakanishi, S, 1992).

Los receptores metabotrópicos son receptores acoplados a la proteína G y se dividen en 8 subtipos mGluR (Pin, 1995).

El alcohol inhibe la entrada de calcio mediado por NMDA en la corteza, NAc, amígdala, el hipocampo y el ATV (Gass y Olive, 2008). También inhibe el aumento de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) inducido por NMDA (Hoffman et al., 1989). La administración crónica de alcohol conduce a una regulación positiva de los receptores NMDA y su actividad debido a su inhibición constante de la transmisión de glutamato. Por lo tanto, la abstinencia al alcohol se asocia con un aumento en la transmisión excitatoria de aminoácido y manifiesta síntomas como convulsiones. El alcohol también inhibe los receptores AMPA y *Kainate* pero las concentraciones que se requieren para producir este efecto son mucho más altas que para inhibir los receptores NMDA (Hoffman et al., 1989).

La actividad glutamatérgica en mGluR5, que es un receptor metabotrópico post-sináptico de glutamato, es abundante en regiones asociadas con recompensa y regula la motivación para auto-administrarse en modelos alcohólicos de ratas (Besheer et al., 2008). Los antagonistas de mGluR5 han demostrado ser beneficiosos en prevenir la recaída en estudios animales (Schroeder et al., 2005).

2.4.2. ALCOHOL Y SEÑALES INMUNOLÓGICAS

El sistema inmune es el que combate los patógenos exógenos, toxinas y lesiones. Cuando ocurre una infección, el sistema inmune activa una cascada de señales que inducen inflamación, inmunidad y reparación. El sistema natural inmune y el papel que juega en enfermedades es importante ya que existen evidencias que indican que una inflamación continua a causa de un sistema inmune natural desequilibrado resulta en el desarrollo de patología y producción de agentes neurotóxicos. Estudiar estos mecanismos es imprescindible para prevenir enfermedades crónicas degenerativas.

2.4.2.1. RECEPTORES DE TIPO *TOLL*

Estudios recientes han sugerido un rol importante para los receptores de tipo *Toll* (TLRs, de sus siglas en inglés *Toll-like receptors*) en daño cerebral inducido por alcohol. Estos son una familia de glucoproteínas que reconocen moléculas asociadas a patógenos (PAMPs). Los TLRs forman un complejo con una superfamilia de proteínas conocidas como los receptores interleuquina-1 (IL-1R). Este complejo se activa cuando se une a diferentes ligandos incluyendo el polisacárido bacteriano (LPS) y lipopéptidos. Algunas de las moléculas necesarias para iniciar la señalización inmune incluye el factor de diferenciación mieloide 88

(MyD88, de sus siglas en inglés *myeloid primary-response protein 88*), la quinasa 1 asociada al receptor de interleuquina (IRAK, de sus siglas en inglés *IL-1R-associated kinase*), factor de crecimiento transformante β (TGF- β , de sus siglas en inglés *transforming growth factor- β*), quinasa activada de TGF- β (TAK1, de sus siglas en inglés *TGF- β activated kinase*), proteína de unión a TAK-1 (TAB1, de sus siglas en inglés *TAK1-binding protein 1*), TAB2 y Factor-6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6, de sus siglas en inglés *tumour-necrosis factor receptor-associated factor 6*). La señalización de vías descendentes puede activar las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK, de sus siglas en inglés *mitogen-activated protein kinase*). Estimular esta vía resulta en activación de factores de transcripción S (TFs) AP-1 y NF- κ B. La estimulación de AP-1 y NF- κ B aumenta la expresión de genes que codifican para mediadores pro-inflamatorios como las citoquinas (Li et al., 2002; Akira y Takeda, 2004).

2.4.2.2. LIPOPOLISACÁRIDO

El lipopolisacárido (LPS) es una endotoxina que activa una cascada de señalización que resulta en una respuesta inmune. Los estudios han demostrado que la administración sistémica o central de LPS induce la expresión de los ARNm y proteínas de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α en el cerebro (Van Dam et al., 1992). Estudios recientes demostraron que la administración sistémica de LPS y alcohol induce aumentos en la producción de TNF- α (Qin et al., 2008). Este estudio sugiere una relación entre administración sistémica de LPS y neuroinflamación mediada por citoquinas. Qin et al. (2008) también encontró que LPS genera aumentos en los niveles de ARNm y proteínas de TNF- α , MCP-1, y IL-1 β en el cerebro e hígado de ratones. Blednov et al. (2011) describieron el efecto de la administración de LPS sobre la ingesta de alcohol. Se analizaron diferentes cepas de ratones por preferencia a alcohol, motivación y consumo seguido de administración de LPS. Encontraron que dos inyecciones de LPS producen aumentos persistentes en el consumo de alcohol y este efecto depende de factores genéticos y del sexo (Blednov et al., 2011). Estos resultados concuerdan con resultados previos que prueban que ratones que no tienen citoquinas, quemoquinas funcionales o TLR4 muestran una reducción en ingesta de alcohol. Esto sugiere una regulación neuroinmune del consumo de alcohol y que la señalización de la inmunidad natural puede promover indirectamente consumo de alcohol en ratones.

2.4.2.3. NF- κ B

NF- κ B es una familia de factores de transcripción que se conocen por su regulación de genes implicados en la respuesta inmune, plasticidad sináptica muerte/supervivencia celular e inflamación (Zou y Crews, 2006, 2010). NF- κ B se puede activar por una variedad de estímulos extracelulares como factores de crecimiento, mediadores de inflamación y excitotoxicidad glutamatérgica (Yakovleva et al., 2011). Se ha demostrado que un tratamiento agudo o crónico de alcohol activa NF- κ B en el SNC lo que resulta en la activación de TNF- α y citoquinas pro-inflamatorias (Crews et al., 2006). En otro estudio donde se hizo un tratamiento agudo o crónico de alcohol, encontraron que el etanol regula la vía de NF- κ B dependiendo de la dosis. El tratamiento agudo resultó en un aumento en la expresión de proteína mientras que el tratamiento crónico condujo a una inhibición significativa de la transcripción de NF- κ B (Rulten et al., 2006). A nivel de transcripción, el etanol puede actuar a través de la vía NF- κ B.

2.4.2.4. CITOQUINAS Y QUEMOQUINAS

Se ha descubierto recientemente que hay una comunicación recíproca entre el cerebro y el sistema inmune a través de moléculas de señalización conocidas como citoquinas. Éstas se expresan ampliamente en la glia (astrocitos y microglia) y sus receptores están presentes en todos los tipos de células del SNC. En condiciones fisiológicas, las citoquinas regulan la inflamación cuando producen respuestas pro- o anti-inflamatorias. El aumento en la producción de citoquinas se ha asociado con varias patologías como Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple o trastornos de ánimo (Glass et al., 2010). El efecto del alcohol en la producción de citoquinas y la inmunidad natural es complejo. Se ha demostrado que el consumo de alcohol causa niveles elevados de citoquinas en el cerebro. Especialmente, la ingesta crónica de alcohol en humanos se asocia a niveles elevados de TNF- α , IL-1 e IL-6 (McClain et al., 2004). Por otro lado, el consumo moderado de alcohol reduce el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Hendriks y Van Tol, 2005). El alcohol puede proteger de varias enfermedades cuando induce señales anti-inflamatorias a través de las citoquinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10. La ingesta de alcohol moderada en macrófagos inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias a través de la vía NF- κ B (Mandrekar et al., 2001). Por lo tanto, esto sugiere que el consumo moderado de alcohol tiene efectos anti-inflamatorios al suprimir las señales pro-inflamatorias y aumentar la producción de citoquinas anti-inflamatorias. Esta evidencia sugiere que el etanol induce efectos diferentes en la producción de citoquinas y la respuesta inmune dependiendo de la dosis (aguda o crónica).

Finalmente, otra citoquina relevante implicada en la neuroinflamación inducida por alcohol es la proteína quemo-atrayente MCP-1 (Blednov et al., 2005). Un estudio en humanos encontró una concentración elevada del ATV, sustancia negra, el hipocampo y la amígdala en alcohólicos (He et al., 2008). Esto sugiere otro componente importante en la participación neuroinmune en el daño cerebral causado por alcohol.

2.4.3. ALCOHOL Y SISTEMAS DE TRANSMISIÓN LIPÍDICA

Además de los sistemas de neurotransmisión clásicos, que como hemos visto están modulados por el alcohol, existen en el organismo una serie de sistemas de señalización basados en lípidos bioactivos, y cuya importancia en las adaptaciones al consumo crónico y al abuso de alcohol empiezan a ser conocidas. Estos sistemas son señales que se generan a partir de lípidos estructurales de la membrana, generalmente fosfolípidos, y que por acción enzimática son fragmentadas, liberando la señal bioactiva. Entre las numerosas familias de lípidos bioactivos que se conocen, hay varias que están estrechamente relacionadas entre sí, destacando los endocannabinoides (anandamida y 2-araquidonilglicerol), las aciletanolamidas no cannabinoides (como la oleoiletanolamida), los derivados de ácido araquidónico (prostaglandinas y endoperóxidos) y la familia del ácido lisofosfatídico (Ver Figura 1). Todas ellas han sido implicadas en las acciones del alcohol.

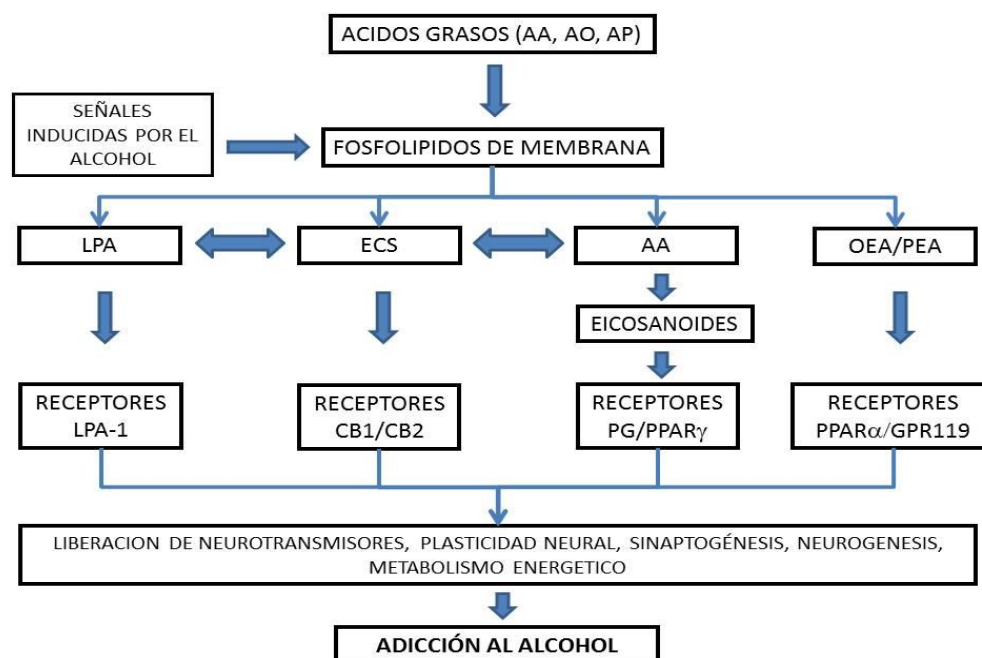


Figura 1. Sistemas de transmisión lipídica y alcoholismo. LPA, ácido lisofosfatídico; ECS, sistema endocannabinoide; AA, ácido araquidónico; OEA, oleoiletanolamida; PEA, Palmitoiletanolamida; PPAR, receptores para proliferadores de peroxisomas.

2.4.3.1. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Numerosas evidencias apuntan a un papel del sistema cannabinoide endógeno (SEC) en los efectos comportamentales del alcohol, jugando un papel principal en el desarrollo de tolerancia y dependencia (Basavarajappa y Hungund, 2002). El SEC es un sistema de señalización lipídica constituido por los receptores cannabinoides, los ligandos endógenos (endocannabinoides) y la maquinaria enzimática implicada en su síntesis e inactivación. Hasta la fecha, se han caracterizado y clonado dos principales tipos de receptores, CB₁ y CB₂, ambos pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Herkenham et al., 1990). El receptor CB₁ se expresa principalmente a nivel central, aunque también se ha encontrado en tejidos periféricos (ej., músculo, tracto gastrointestinal, páncreas, hígado y tejido adiposo). El receptor CB₂ es más abundante en el sistema periférico (Van Sickle et al., 2005), localizándose principalmente en células inmunes (Fride y Mechoulam, 2003), aunque hay evidencias que también sugieren su expresión a nivel central (Onaivi et al., 2006). A nivel del SNC, las densidades más altas de receptores cannabinoides se encuentran en el cerebelo, los ganglios basales y el hipocampo (Piomelli et al., 2000), aunque también se pueden encontrar en el NAc y la corteza cerebral. Sin embargo, las densidades más bajas se encuentran a nivel del tronco cerebral y el hipotálamo (Tanda y Goldberg, 2003).

El descubrimiento de los receptores cannabinoides promovió la búsqueda de ligandos endógenos. Los endocannabinoides son derivados de ácidos grasos poli-insaturados. Los mejor caracterizados son la anandamida o araquidoniletanolamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), ambos derivados del ácido araquidónico conjugado con etanolamina o glicerol, respectivamente (Devane et al., 1992). Estos ligando se distribuyen por todo el SNC aunque las concentraciones de 2-AG son más altas que las de AEA (Stella et al., 1997). A diferencia de los neurotransmisores clásicos, los endocannabinoides no se almacenan en vesículas, sino que son sintetizados y liberados *a demanda* en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos (Fride, 2005).

Las rutas de biosíntesis y degradación de los endocannabinoides incluyen cascadas enzimáticas muy complejas que son cruciales en la regulación de sus niveles endógenos. Ambos endocannabinoides, AEA y 2-AG, presentan vías diferentes de síntesis y degradación (**Figura 2**).

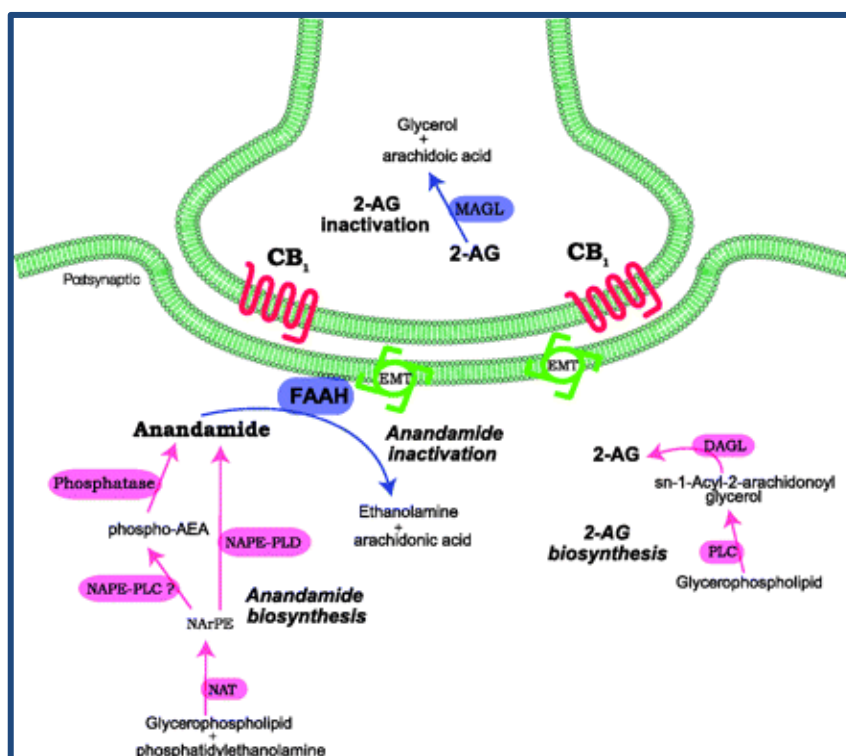


Figura 2. Rutas bioquímicas de la síntesis y degradación de AEA y 2-AG. Imagen tomada de Pacher et al., 2006.

La AEA se sintetiza a partir de un precursor fosfolípido, N-araquidonil fosfatidil etanolamina (NAPE), a través de diferentes rutas biosintéticas, siendo la vía principal a través de una fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD). Esta enzima se distribuye en el cerebro, principalmente en el giro dentado y el hipocampo. También hay densidades más bajas en la corteza, el tálamo, el hipotálamo y el cerebelo (Egertova et al., 2008). El 2-AG se sintetiza a partir del 1,2-diacilglicerol por acción de diacilglicerol lipasas (DAGL- α/β). La inactivación de la señal endocannabinoide es mediada por recaptación celular, seguida de hidrólisis intracelular. La hidrolasa de amida de ácido graso (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MGL) son las principales enzimas responsables de la degradación de AEA y 2-AG, respectivamente (Rodríguez de Fonseca et al., 2005). La expresión de MGL abunda en el cerebro, concretamente se localiza en los terminales pre-sinápticos que corresponden a la expresión del receptor CB_1 y a la liberación de 2-AG (Dinh et al., 2002).

La síntesis de los endocannabinoides es única ya que ocurre en la post-sinapsis. AEA y 2-AG actúan como mensajeros retrógrados. Esto significa que se sintetizan y se liberan en la post-sinapsis a demanda e interactúan con receptores pre-sinápticos como los receptores CB_1 localizados en las aferencias excitatorias e inhibitorias. Cuando los endocannabinoides se unen a un receptor CB_1 , se produce una inhibición de la actividad neuronal y disminuye

la liberación de neurotransmisores (Harkany et al., 2008). Como los endocannabinoides actúan como mensajeros retrógrados en los receptores CB₁ y regulan la liberación de neurotransmisores excitatorios e inhibitorios (Pacher et al., 2006), estudios recientes han mostrado la importancia de la localización de los receptores en el ATV, estriado y la corteza frontal (Ameri, 1999). Su interacción con dopamina en la transmisión post-sináptica y su participación en las transmisiones GABAérgicas y glutamatérgicas (Rodríguez de Fonseca et al., 1998) sugieren que el SEC está envuelto en la cognición, aprendizaje y memoria, recompensa, alivio al dolor (Kogan y Mechoulam, 2007) y adicción a las drogas (Maldonado et al., 2006).

El SEC ha estado implicado en comportamientos relacionados al consumo de alcohol y el desarrollo de dependencia al alcohol (Hungund y Yaragudri, 2009). Las adaptaciones o deficiencias del SEC pueden ser cruciales en el desarrollo de alcoholismo. Por lo tanto, el papel establecido de este sistema en la adicción al alcohol ha proporcionado un mejor conocimiento de los mecanismos que contribuyen a esta patología.

Varias líneas de evidencia han demostrado la participación del SEC en el consumo de alcohol y las acciones farmacológicas de alcohol. Hungund et al. (1994) demostraron que la exposición crónica al alcohol incrementaba en ratones la actividad de la fosfolipasa 2 (PLA₂), una enzima que participa en la formación de endocannabinoides en el cerebro. Posteriormente, Basavarajappa et al. (1998) mostró una disminución en la densidad del receptor CB₁ a nivel central y daños en la función dicho receptor en ratones expuestos crónicamente a vapores de etanol. Por otro lado, estudios *in vitro* demostraron un aumento de AEA y 2-AG en células SK-N-SH y una reducción de la actividad de la enzima NAPE-PLD tras la exposición crónica a alcohol. Esto se pudo deber a la activación de la enzima PLA₂ (Basavarajappa y Hungund, 1999).

Al mismo tiempo, otros estudios investigaron los efectos de agonistas y antagonistas CB₁ en el consumo de alcohol y comportamientos relacionados al alcohol como ingesta voluntaria, tolerancia y refuerzo. En el estudio de Gallate et al. (1999), hecho en ratas Wistar a las que se proporciono cerveza *ad libitum*, la administración aguda de CP55-940, un agonista de receptor cannabinoide, aumentó el consumo de alcohol de un modo dosis-dependiente. Esto indica que existe una motivación para beber alcohol, aunque dicho efecto pudo ser prevenido con el pre-tratamiento del antagonista cannabinoide SR-141716A. Éste antagonista redujo el consumo de alcohol en ratones C57Bl/6 (Arnone et al., 1997) y ratas sP (*Sardinian alcohol-preferring*) (Serra et al., 2001). Esto sugiere que el SEC provoca un efecto sobre las propiedades apetitivas del etanol. El consumo voluntario de alcohol también

se redujo cuando se administró un antagonista del receptor CB₁ en animales alcohol-dependientes (Rodríguez de Fonseca et al., 1999) y ratas sP (Colombo et al., 1998). Finalmente, SR141716A disminuyó el consumo de alcohol en ratas y la motivación a consumir alcohol también disminuyeron en ratas sP (Gallate y McGregor, 1999).

El papel del SEC en la preferencia alcohólica también se ve influido por la genética. Así, en las ratas AA con preferencia por el consumo de alcohol, se ha podido demostrar que existe un déficit de funcionamiento de la enzima que regula la degradación de anandamida FAAH, en la corteza prefrontal (Hansson et al., 2007). Estos autores pudieron comprobar que se puede modificar la preferencia por alcohol mediante inyecciones inhibidores de la FAAH en la corteza prefrontal, lo que indica un papel relevante de este sistema en la regulación de la motivación innata por esta droga. De hecho, estudios en humanos han demostrado este importante papel de la FAAH como gen de predisposición al alcoholismo (Hoenick et al., 2007).

2.4.3.2. ACILETANOLAMIDAS NO CANNABINOIDES

Estructuralmente, la AEA también pertenece a otra familia de compuestos lipídicos denominada aciletanolamidas o N-aciletanolaminas (NAEs), que incluye a la palmitoiletanolamida (PEA) y la oleoiletanolamida (OEA). Esta familia representa también una clase importante de moléculas de señalización. Las NAEs se han aislado del cerebro y otros tejidos (Hill et al., 2009) y se han asociado con procesos importantes como el control de apetito, regulación de energía metabólica y la respuesta anti-inflamatoria (Simon y Cravatt, 2007).

PEA es un agente anti-inflamatorio muy conocido que tiene propiedades analgésicas, mientras que la OEA es un factor de saciedad que inhibe la ingesta de comida, en ambos casos a través de la unión a los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisoma subtipo α (PPAR- α). De esta manera, la OEA actúa en oposición a AEA caracterizada por sus propiedades estimulantes del apetito. La mayoría de NAEs de cadena larga se cree que modulan los efectos de AEA al actuar como compuestos “*entourage*” (Smart et al., 2002), esto es porque todas estas moléculas son degradadas por la misma enzima FAAH y compiten con AEA para unirse a FAAH. Esto reduce la tasa de degradación y alarga los efectos en el cuerpo. Las NAEs también tienen una acción neuroprotectora, ya que sus niveles aumentan cuando hay neuronas lesionadas (Hansen et al., 2002). En

órganos como el corazón se ha encontrado un aumento en los niveles de NAEs tras producirse lesiones y fenómenos de estrés sobre células cardíacas.

La administración aguda de alcohol resulta en reducciones de AEA y PEA en el cerebro, mientras que incrementan en el intestino e hígado (Ferrer et al.2007). La Oleoiletanolamida (OEA) sigue un patrón diferente, incrementándose en todos los tejidos estudiados, de modo directamente relacionado con la concentración de alcohol tisular (Bilbao et al., 2015). Estos datos sugieren que el alcohol administrado de forma aguda puede tener un efecto en los mecanismos que regulan las NAEs en los tejidos. Estos efectos parecen ser independientes de los cambios en la actividad de FAAH y NAPE-PLD aún en presencia de alcohol, aunque pueden estar relacionados con la liberación de transmisores capaces de activar las enzimas de síntesis de los endocannabinoides, como son el glutamato, la acetilcolina o las catecolaminas. (Ferrer et al., 2007).

2.4.3.3. ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO

El SEC está relacionado con el sistema de transmisión del ácido lisofosfatídico (LPA). De hecho, ambos sistemas son producto de rutas metabólicas que afectan al metabolismo de acilgliceroles y convergen en varias encrucijadas metabólicas. El ácido lisofosfatídico (LPA, 1- ó 2- acil-*sn*-glicerol-3-fosfato) es un lisofosfolípido endógeno biológicamente activo que ejerce funciones de señalización extracelular a través de seis receptores de membrana acoplados a proteína G (LPA₁₋₆) que se expresan en abundantes tejidos y tipos celulares incluyendo el sistema nervioso (Choi y Chun, 2013). El LPA participa en la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular, siendo relevante para múltiples procesos biológicos como la neurogénesis, la mielinización, la formación de vasos sanguíneos, la reproducción, la inducción de dolor neuropático y la progresión tumoral (Choi et al., 2010). El LPA también regula la función del sistema nervioso con implicaciones para el comportamiento. Aunque hasta hace poco se desconocía si el LPA y su receptor LPA₁ estaban implicados en los comportamientos asociados al consumo y a la adicción al alcohol, un estudio llevado a cabo en ratones ha demostrado que el alcohol modifica los niveles de LPA en suero y tejidos periféricos (Zhao et al., 2011). Además, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio (Castilla-Ortega et al., en revisión) han confirmado que la señalización mediada por LPA modula el consumo de alcohol en animales experimentales. Ratones carentes del receptor LPA₁ presentan un significativo incremento del consumo voluntario de alcohol en comparación con ratones normales (ratones *wild-type*).

2.5. ALCOHOL Y SISTEMAS DE TRANSMISIÓN LIPÍDICA PERIFÉRICOS

Las señales periféricas pueden participar en las acciones del alcohol. Recientemente, el número de estudios sobre el sistema periférico y su papel en la patogénesis de enfermedades ha aumentado significativamente. Aunque se creía que la localización de los receptores CB₁ se limitaba al cerebro, se ha descubierto que están distribuidos más ampliamente. Estos receptores se encuentran en concentraciones bajas en el hígado (Osei-Hyiaman et al., 2005), en el tracto gastrointestinal y en el tejido adiposo (Izzo et al., 2001). Los receptores CB₂ también se han encontrado en el SNC y la periferia, donde se expresan en mayor cantidad en las células inmunes (Van Sickle et al., 2005). A nivel tisular, los cambios en la expresión de estos receptores están asociados a la presencia de estímulos fisiológicos, pero también patológicos (Pacher et al., 2006). De hecho, en condiciones patológicas, el SEC responde a estímulos agudos a través de cambios en su actividad y expresión que posteriormente regresan a su estado homeostático original en un marco de tiempo específico. Cuando el estímulo es continuo hay una alteración de todo el sistema de señalización, produciéndose cambios dinámicos en los niveles basales de endocannabinoides y sus receptores, así como alteraciones en la actividad (sensibilidad, tolerancia, resistencia...) y expresión enzimática, etc. (Di Marzo, 2008; Di Carlo y Izzo, 2003).

A nivel periférico, los endocannabinoides tienen una función relevante para la salud tanto en el tracto gastrointestinal (Izzo y Sharkey, 2010) como en el hígado (Mallat et al., 2011). En el caso de alcoholismo, mientras que la AEA se ha relacionado con la esteatohepatitis y la fibrosis que conduce a la cirrosis, la OEA reduce el consumo de alcohol al unirse al receptor nuclear PPAR- α . Se ha demostrado un papel homeostático de la señalización de OEA en el comportamiento cuando las ratas se exponen al alcohol (Bilbao et al., 2015). Aún así, los efectos farmacológicos y de comportamiento del alcohol en el SEC a nivel periférico apenas se han estudiado. El SEC en el sistema periférico podría ser otra clave en el desarrollo del alcoholismo, por lo que su estudio podría ayudar a un mejor conocimiento de los procesos implicados en el abuso y dependencia al alcohol. Esto podría ayudar a encontrar dianas terapéuticas para el tratamiento de alcoholismo y de sus complicaciones periféricas. Este es el principal motivo de los estudios presentados en esta tesis doctoral.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Como hemos visto en la introducción, el alcohol puede modular la dinámica de funcionamiento de los transmisores lipídicos en el cerebro. Estas modificaciones pueden estar relacionadas con la adquisición del fenotipo adicto al incidir en los fenómenos de recompensa, de tolerancia, y en las neuroadaptaciones que se asocian al síndrome de abstinencia. Sin embargo, los efectos derivados del consumo del alcohol sobre estos transmisores lipídicos en los órganos periféricos no son bien conocidos. En la presente Tesis Doctoral se pretende abordar este problema planteando las siguientes hipótesis experimentales:

HIPOTESIS 1. La expresión de los genes y/o proteínas relacionadas con el sistema de transmisión endocannabinoide se altera por la auto-administración prolongada de alcohol en el hígado y el intestino de los animales expuestos a esta droga. Los cambios observados dependerán de la intensidad del consumo.

HIPOTESIS 2. La expresión de los genes y/o proteínas relacionadas con el sistema de transmisión endocannabinoide en el hígado y el intestino de los animales se altera por la exposición intensiva a alcohol en un modelo de atracón ("*binge*"). Los cambios observados dependerán del número de episodios de consumo intensivo y se observarán de modo diferencial en ambos tejidos.

HIPOTESIS 3. La exposición moderada durante la adolescencia a alcohol en un modelo de consumo episódico producirá cambios a largo plazo en la expresión de los genes y/o proteínas relacionadas con el sistema de transmisión endocannabinoide en el bazo de los animales expuestos. Los cambios observados dependerán del sexo del animal expuesto a alcohol durante la adolescencia.

HIPOTESIS 4. Aunque el alcohol puede producir efectos diferenciales sobre la expresión de los genes y/o proteínas relacionadas con el sistema de transmisión endocannabinoide, que serían dependientes del tejido y el modelo de administración del alcohol, se pueden encontrar patrones comunes de acción de esta droga sobre estos sistemas de transmisión.

3.2. OBJETIVOS

Las cuatro hipótesis experimentales se comprobarán mediante el desarrollo de los siguientes objetivos:

OBJETIVO 1. Análisis de la expresión de los genes relacionados con la señalización del sistema endocannabinoide en el hígado de ratas Wistar expuestas a tres meses de auto-administración operante de alcohol. Los genes a estudiar serían los receptores cannabinoides (CB₁, CB₂), los receptores para aciletanolamidas no cannabinoides (PPAR- α), el receptor para ácido lisofosfatídico (LPA₁), las enzimas de síntesis y degradación de aciletanolamidas (NAPE-PLD, FAAH), las enzimas de síntesis y degradación de acil gliceroles (DAGL- α , DAGL- β , MGL) y el transportador de ácidos grasos (CD36).

OBJETIVO 2. Análisis de la expresión de los genes relacionados con la señalización del sistema endocannabinoide en el intestino (yeyuno) de ratas Wistar expuestas a tres meses de auto-administración operante de alcohol. Los genes a estudiar serían los citados en el objetivo 1.

OBJETIVO 3. Análisis de la expresión de los genes relacionados con la señalización del sistema endocannabinoide en el hígado de ratas Wistar expuestas a 1, 2, 4 y 8 episodios de consumo intensivo de alcohol (Una administración única intensiva). Los genes a estudiar serían los citados en el objetivo 1.

OBJETIVO 4. Análisis de la expresión de los genes relacionados con la señalización del sistema endocannabinoide en el intestino (yeyuno) de ratas Wistar expuestas a 1, 2, 4 y 8 episodios de consumo intensivo de alcohol (Una administración única intensiva). Los genes a estudiar serían los citados en el objetivo 1.

OBJETIVO 5. Análisis en la edad adulta de la expresión de los genes relacionados con la señalización del sistema endocannabinoide en el bazo de ratas Wistar expuestas a cuatro semanas de consumo moderado de alcohol durante la adolescencia. Los genes a estudiar serían los citados en el objetivo 1.

OBJETIVO 6. Repercusión funcional en el sistema inmune y metabólico en la edad adulta de la exposición de ratas Wistar a cuatro semanas de consumo moderado de alcohol durante la adolescencia. Se estudiarán parámetros metabólicos en plasma, así como los niveles de citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) y quemoquinas circulantes (CCL2/MCP-1, CX₃CL1/fractalquina).

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MODELOS ANIMALES DE ALCOHOLISMO

En los experimentos realizados durante este estudio se utilizaron ratas Wistar macho adultas (Estudios I y II) o adolescentes (Estudio III). Todos los procedimientos se llevaron a cabo según la Directiva Europea 2010/63/EU y el Real Decreto 53/2013 que regula la investigación animal, y regulaciones éticas internacionales. Además, todos los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Psicología de la Universidad Complutense de Madrid.

En el presente estudio se llevaron a cabo 3 procedimientos diferentes de administración de alcohol:

Auto-administración

Administración en atracón (*binge*)

Drinking in the dark (DID)

4.1.1. PROCEDIMIENTO DE AUTO-ADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL (ESTUDIO I)

4.1.1.1. CÁMARAS DE AUTO-ADMINISTRACIÓN

Los entrenamientos y ensayos fueron realizados en cámaras operantes estandarizadas situadas en instalaciones convenientemente ventiladas y con sonido atenuado. Cada cámara estaba equipada con un reservorio de agua (capacidad de volumen: 10 mL) colocado a 4 cm por encima de la base y en el centro del panel frontal de la cámara, y dos palancas retráctiles situadas a derecha e izquierda a 3 cm del reservorio de bebida.

Un ordenador controló la liberación de fluidos por presión de las palancas, la presentación de estímulos si fuere necesario y la grabación de datos comportamentales. Para obtener los datos se utilizó el programa MED-PC (MED Associates Inc., Georgia, VT).

4.1.1.2. ENTRENAMIENTO OPERANTE

El *condicionamiento operante* es un proceso por el cual se aprende gradualmente una respuesta mediante un refuerzo o un castigo que también se denomina reforzamiento instrumental. En este ensayo las ratas *Wistar* fueron entrenadas para auto-administrarse etanol al 10% mediante pulsación de palancas en sesiones diarias de 30 minutos siguiendo un patrón de reforzamiento fijo, donde cada respuesta resultó en la liberación de 0,1 mL, a partir de una solución apetecible para el animal (Cippitelli et al., 2005):

En un principio durante los primeros 3 días de entrenamiento, se restringió la disponibilidad de agua en la jaula a 2 horas diarias para facilitar la adquisición de respuestas operantes

para un líquido reforzador. Durante este tiempo, se reforzó la presión de palanca a través de una solución de sacarina al 0,2% (p/v). Llegado a este punto, de nuevo el agua fue de libre disposición, y el entrenamiento de auto-administración de sacarina continuó durante otros 3 días hasta que los animales alcanzaron una respuesta basal estable.

Las ratas fueron entrenadas entonces para auto-administrarse etanol mediante una modificación del procedimiento de retirada gradual de sacarosa usado por *Samson, 1986*, en el que se utilizó sacarina en lugar de sacarosa (Weiss, F et al., 1993). La fase de iniciación a etanol comenzó el día 6, cuando las ratas disponían en esta ocasión de una solución de partida con etanol al 5% (p/v) y un 0,2% de sacarina (p/v). A partir del día 7, la concentración de etanol se incrementó gradualmente de un 5% a un 8% y finalmente a un 10% (p/v), mientras que por el contrario la concentración de sacarina disminuyó hasta un 0%.

Desde el inicio de este procedimiento de retirada de sacarina, se introdujo una segunda palanca aunque inactiva. En todas las fases de entrenamiento y ensayo, las respuestas en esta palanca (que no tenían consecuencias programadas) se consideraron una medida de activación comportamental no específica.

4.1.1.3. AUTO-ADMINISTRACIÓN DE ETANOL

Tras completar la fase de retirada de sacarina, las ratas se entrenaron en sesiones diarias de 30 minutos para presionar la palanca que suministraba etanol al 10% (0,1 mL/respuesta) hasta alcanzar un nivel de respuesta basal y estable.

4.1.1.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados 60 minutos tras la última sesión de auto-administración de alcohol. Las muestras de hígado e intestino delgado (yeyuno) fueron extraídas y congeladas inmediatamente con nieve carbónica. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

4.1.2. PROCEDIMIENTO DE CONSUMO EN ATRACÓN DE ALCOHOL (BINGE) (ESTUDIO II)

4.1.2.1. ANIMALES

Para este estudio se utilizarán 48 ratas *Wistar* macho (Harlan Laboratories Barcelona, España) de 275-325 g de peso al inicio de los experimentos. Los animales fueron

estabulados en grupos de 4 ratas por jaula bajo unas condiciones controladas de humedad y temperatura, y siguiendo un ciclo luz/oscuridad reverso de 12/12 h (las luces se apagaban a las 8:00 AM). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a la comida y agua a lo largo de todo el estudio, salvo en las horas previas a la administración de alcohol.

4.1.2.2. CONSUMO EN ATRACÓN

Este procedimiento se llevó a cabo a los 60 minutos del inicio de la fase oscura del ciclo. En primer lugar, para habituar a los animales al protocolo de administración intragástrico y reducir respuestas no-específicas al estrés, todas las ratas recibieron 2 administraciones intragástricas diarias de agua durante 2 semanas. A continuación, los animales se distribuyeron en 4 grupos experimentales: grupo control (recibió agua), grupo *binge 1* (recibió una dosis de alcohol en atracón), grupo *binge 4* (recibió una dosis semanal de alcohol en atracón durante 4 semanas) y grupo *binge 8* (recibió una dosis semanal de alcohol en atracón durante 8 semanas). La administración de alcohol en atracón a los grupos *binge 1, 4 y 8* se hizo vía intragástrica por *gavage*, administrando una dosis de alcohol de 3 g/kg al 25% en un volumen de 15 mL/kg. En el caso del grupo control, los animales recibieron el mismo volumen de agua. Los animales se privaron de comida 12 horas previas al tratamiento para normalizar la absorción del alcohol y evitar la presencia/ausencia de comida en el estómago (López-Moreno et al., 2015).

4.1.2.3. TOMA DE MUESTRAS PARA LA VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALCOHOL EN SANGRE

El análisis de la concentración de alcohol en sangre únicamente se llevó a cabo en el grupo que había recibido mayor número de administraciones de alcohol en atracón (grupo *binge 8*). Para ello, se tomaron muestras de sangre de la cola (250 µL) usando un tubo Microvette CB300 que contenía EDTA (Fisher Scientific SL, Madrid, España). Las muestras se tomaron a 1, 2, 3 y 4 horas post-administración de alcohol durante las 8 semanas. La última semana de tratamiento sólo se tomaron muestras de sangre de la cola a las 2 horas, ya que los animales se sacrificaron en ese momento. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500 xg durante 15 minutos utilizando una centrífuga refrigerada. Se extrajo el plasma y se guardó a -20°C para su posterior análisis.

4.1.2.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados 2 horas tras la última administración intra-gástrica de alcohol. Las muestras de hígado e intestino delgado (yeyuno) fueron extraídas y congeladas inmediatamente con nieve carbónica. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

4.1.3. PROCEDIMIENTO PARA EL “*DRINKING IN THE DARK*” (ESTUDIO III)

4.1.3.1. ANIMALES

Para este estudio se utilizaron las crías de ratas *Wistar* (Harlan Laboratories, Rossdorf, Alemania). Se utilizaron un total de 32 ratas de ambos sexos seleccionadas de cuatro camadas. El día del parto, día postnatal (DPN) 0, las camadas se ajustaron y equilibraron según el sexo a 8 crías por cada rata madre (4 machos y 4 hembras). Los animales se dejaron tranquilos hasta el destete en el DPN 22. A partir de ese momento, los animales se colocaron en parejas del mismo sexo bajo unas condiciones controladas de humedad y temperatura, y siguiendo un ciclo luz/oscuridad reverso de 12/12 h (las luces se apagaban a las 8:00 AM). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a la comida y agua a lo largo de todo el estudio, excepto durante las sesiones de exposición al alcohol. Los animales fueron controlados diariamente.

4.1.3.2. “*DRINKING IN THE DARK*”

El procedimiento de DID se aplicó 4 días a la semana como un modelo intermitente de administración forzada de alcohol. El estudio se inició en ratas adolescentes (DPN 28) de ambos sexos que se asignaron arbitrariamente al grupo control o al grupo de alcohol (8 hembras y 8 machos por grupo) en jaulas individuales y alternando la colocación de las jaulas en cada grupo experimental. Los animales del grupo alcohol fueron expuestos a una solución de alcohol al 20% (v/v) en lugar de agua a los 60 minutos de iniciarse la fase oscura del ciclo. La botella con alcohol se dejó durante 2 horas por 3 días consecutivos. Finalmente, el cuarto día la sesión se extendió a 4 horas. Este procedimiento fue seguido por 3 días de abstinencia en los que los animales sólo tenían acceso a agua. En el caso del grupo control, los animales recibieron una botella con agua. Este procedimiento semanal se repitió durante 4 semanas consecutivas. Todos los días, los biberones se pesaron antes y después de cada sesión.

4.1.3.3. TOMA DE MUESTRAS PARA LA VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALCOHOL EN SANGRE

Para el análisis de la concentración de alcohol en sangre se tomaron muestras de sangre de la cola (250 μ L) usando un tubo tubo Microvette CB300 que contenía EDTA (Fisher Scientific SL, Madrid, España). Las muestras se tomaron a los 90 minutos de la sesión de 4 horas de la primera y cuarta semana de exposición. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500 xg durante 15 minutos utilizando una centrifuga refrigerada. Se extrajo el plasma y se guardó a -20°C para su posterior análisis.

4.1.3.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Los animales de los grupos control y alcohol fueron sacrificados 2 semanas después de la última sesión de exposición de DID (DPN 68). Las ratas se sacrificaron en una habitación con ruido mínimo por decapitación y se recogieron muestras de sangre, bazo e hígado. La sangre se centrifugó a 2000 xg durante 15 minutos y el plasma. Las muestras de hígado y bazo fueron extraídas y congeladas inmediatamente con nieve carbónica. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

4.2. VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALCOHOL EN SANGRE

Para valorar la concentración de alcohol en sangre se utilizó el plasma obtenido a partir de las muestras de sangre de la cola de las ratas expuestas a los diferentes procedimientos de alcohol. La concentración de etanol se midió utilizando un kit comercial "*Enzychrom Ethanol Assay Kit*" siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Bioassay Systems, Hayward, CA, EE.UU). Todas las medidas se llevaron a cabo por duplicado.

4.3. ENSAYOS BIOQUÍMICOS EN PLASMA

Se midieron los siguientes metabolitos en plasma: glucosa, triglicéridos, colesterol, colesterol de alta densidad (HDL-C, del inglés *High-density lipoprotein cholesterol*), ácido úrico, urea, creatinina, transaminasa glutámico oxalacética (GOT, del inglés *Glutamate-oxaloacetate transaminase*), transaminasa glutámico pirúvica (GPT, del inglés *Glutamate-pyruvate transaminase*) y gamma glutamil transpeptidasa (GGt, del inglés *Gamma glutamyl transpeptidase*). Todos estos metabolitos se analizaron utilizando kits comerciales de acuerdo a las instrucciones del fabricante en un Hitachi 737 Automatic Analyzer (Hitachi, Tokyo, Japón).

4.4. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA GRASA HEPÁTICA

Para poder extraer todo el contenido lipídico de un tejido, la técnica comúnmente utilizada es la descrita por Folch, que propuso el uso de una mezcla de disolventes polar y apolar (Folch et al., 1957), método que posteriormente fue modificado por Bligh y Dyer (Bligh y Dye 1959). Siguiendo este método, los lípidos totales se extrajeron de las muestras de hígado congeladas utilizando una mezcla extractiva compuesta por cloroformo: metanol en una proporción 2:1 (v/v); además, como la mayoría de los lípidos contienen dobles enlaces sensibles a la oxidación, se añadió un 0,025% del antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EE.UU). Se trabajó con una cantidad de tejido entre 200-400 mg. Las muestras de hígado se trataron con un homogeneizador Ultra Turrax (IKA, T18Basic) en 1 mL de suero fisiológico, y cuando quedaron totalmente homogeneizadas, se añadió a cada muestra 5 mL de la mezcla extractiva, 100 μ L de HCl 0,1 N y 100 μ L de $MgCl_2$ seguido de dos sesiones de agitación en vórtex de 30 segundos cada una. Para separar las fases se centrifugó (en una centrifuga Megafuge 1.0R, Heraeus) a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los lípidos quedaron concentrados en la fase orgánica inferior, que se pasaron a un tubo limpio (previamente pesado) y al resto se les volvió a añadir mezcla extractiva (3 mL) y se repitió todo el proceso, asegurándonos así de haber extraído toda la grasa de la muestra. Las muestras se desecaron en corriente de nitrógeno y se pesaron nuevamente los tubos. El contenido de grasa total se expresó como un porcentaje respecto al peso inicial del tejido (Serrano et al., 2006).

El contenido de triglicéridos de la muestra se cuantificó usando un kit comercial y siguiendo las instrucciones del fabricante (Randox Laboratories Ltd., Ardmore, Reino Unido).

4.5. INMUNOENSAYO MÚLTIPLE PARA LA VALORACIÓN DE QUEMOQUINAS Y CITOQUINAS EN PLASMA

Para cuantificar los niveles de quemoquinas y citoquinas en plasma se realizó una suspensión múltiple de proteínas utilizando un kit de inmunoensayo (Procarta Inc., Toronto, Canadá) (Araos et al., 2015).

Este método de análisis se basa en el uso de la tecnología *Luminex* para la medida simultánea de las quemoquinas (CCL2 y CX₃CL1) y citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) (Araos et al, 2015). Brevemente, se añadieron 50 μ L de microesferas conjugadas con anticuerpos anti-quemoquinas o anti-citoquinas a cada uno de los 96 pocillos de una placa y se adhirieron mediante filtración por vacío. Tras el lavado, se añadieron 25 μ L de los estándares pre-diluidos (rango desde 40600 pg/mL a 0,62 pg/mL) o de las muestras de plasma, y se dejó la placa en agitación a 500 rpm durante 1 hora (temperatura ambiente).

Posteriormente, se realizó un segundo lavado, se añadió 25 μL de los anticuerpos de detección múltiple y se volvió a dejar en agitación durante 30 minutos. Tras el siguiente lavado, se añadió 50 μL de ficoeritrina conjugada con estreptavidina durante 30 minutos, se lavó y se añadió 120 μL de tampón de lectura a cada pocillo. Se analizó un mínimo de 75 microesferas/parámetros utilizando el Sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España). Los datos generados (la media de la intensidad de la fluorescencia) se analizó usando el software Bio-Plex Manager 4.1 (Bio-Rad Laboratories). Los resultados se expresaron como pg de proteína /mL de plasma.

4.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa de tipo cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR, del inglés *quantitative real-time polymerase chain reaction*) se llevó a cabo la cuantificación relativa de los ARN mensajeros (ARNm) de diferentes receptores y enzimas relacionados con los endocannabinoides y otros mediadores lipídicos en las muestras de hígado, intestino y bazo de ratas. En todo momento, las soluciones y materiales utilizados permanecían totalmente libres de RNasas por la aplicación de protocolos específicos de manipulación y limpieza de las muestras y el área de trabajo.

4.6.1. Extracción del ARN total

Para el aislamiento del ARN total de los diferentes tejidos se utilizó el método del TRIzol® (Gibco BRL Life Technologies, Baltimore, MD, EE.UU). Las muestras se colocaron en hielo antes de comenzar la extracción. Se añadió 1 mL de TRIzol® a los tubos además de unas bolas de acero para homogeneizar. Los tubos se transfirieron al “*TissueLyser Adaptor Set 2x24*”, donde se homogeneizaron durante 3 minutos a 30 Hz. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se reservó el sobrenadante y para separar las fases se añadió 200 μL de cloroformo por cada mL de TRIzol®, agitando manualmente 15-20 segundos. Posteriormente, se incubó durante 2-3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Tras la centrifugación, la muestra se separó en una fase inferior (fenol-cloroformo), que contiene las proteínas, una interfase (ADN) y una fase superior acuosa, donde se encontraba exclusivamente el ARN. Transferimos esta fase a un eppendorf limpio y libre de RNasas, cuidando de no contaminar con el ADN de la interfase.

Para precipitar el ARN, se añadió a la fase acuosa ya transferida, 500 μL de isopropanol. Los tubos se agitaron manualmente y se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura

ambiente. Luego se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el ARN precipitado con 500 µL de etanol al 75%. Los tubos se centrifugaron a 11000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El lavado con etanol se repitió, seguido por el paso de centrifugación. El “*pellet*” de ARN se dejó secar bien hasta que todo el etanol se evaporó y se disolvió en 50 µL de agua libre de RNAsas (Qiagen, Alemania) durante 10 minutos a 60°C.

4.6.2. PURIFICACIÓN

Con objeto de tener una preparación pura de ARN para la qPCR se realizó una limpieza del ARN utilizando el RNeasy Mini Kit de Qiagen (Hilden, Alemania), que contiene unas columnas con una membrana de sílica-gel que permite purificar hasta 100 µg de ARN (elimina selectivamente la mayoría de las moléculas menores de 200 nucleótidos, como el 5.8S ARNr, 5S ARNr y ARNt, que suponen entre un 15-20% del ARN total). Con esta técnica se eliminó también la mayor parte del ADN, pero para asegurarnos de su total eliminación se incluyó un paso de digestión en columna con ADNasa I (RNase-free DNase Set, Qiagen).

4.6.3. CUANTIFICACIÓN

Para determinar la concentración de ARN y su pureza utilizamos un espectrofotómetro de alta sensibilidad Nanodrop TM ND-1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, EE.UU). La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm para cada muestra utilizando 1 µL de ARN eluido. La pureza se midió calculando el ratio A_{260}/A_{280} . El agua ultrapura se utilizó como blanco.

4.6.4. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó en un termociclador (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, EE.UU). Este paso de ARN a ADNc se hizo en dos fases:

A. Para cada muestra se tomó:

- un volumen de ARN que contenía 1 µg ajustando el volumen a 13 µL con agua libre de RNAsas.
- 2 µL de oligodT (“*random primer*”) (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania)

Esta mezcla se puso en el termociclador con el siguiente programa de temperaturas:

1. 70°C 10 minutos
2. 4°C 5 minutos

3. Hold 4°C

B. Para la transcripción reversa se usó la enzima “*Transcriptor Reverse Transcriptase kit*” (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania). Se preparó una mezcla (Master Mix) en la que se añadió por cada muestra:

Componente	Volumen
Tampón de RT 5x	4 µL
dNTPs	2 µL
Inhibidor RNAsín	0.5 µL
RT enzima	0.5 µL

Se añadieron 7 µL de Master Mix a cada muestra. Luego se incubaron durante 30 minutos en el termociclador. El ADNc producido se diluyó en la cantidad indicada de agua libre de ARNasas para alcanzar una dilución 1:100. El producto final se guardó a -20°C, listo ya para realizar las qRT-PCR.

4.6.5. TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para las qRT-PCRs se utilizó el sistema de detección para PCR en tiempo real CFX96TM (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU) y el formato de marcador colorante FAM para los ensayos de expresión génica de TaqMan® Gene Expression (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Las muestras (9 µL de ADNc diluido 1/100) se cargaron en una placa de 96 pocillos (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU). La placa se selló con un film transparente y luego se llevó a cabo la qRT-PCR. Cada reacción se corrió en duplicado. Los parámetros de los ciclos fueron: 50°C durante 2 minutos para desactivar ADN mono y bicatenario que contenía dUTP, 95°C durante 10 minutos para activar la ADN Taq polimerasa seguido por 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos para la fusión del ADNc y 60°C durante 1 minuto para permitir la hibridación y extensión de los cebadores en los que se adquirió la fluorescencia. Se realizaron análisis de curvas de fusión para asegurar que solo se amplificó un único producto. Se analizaron varios genes constitutivos, seleccionando el más adecuado según su homogeneidad. Los valores absolutos de cada muestra se normalizaron con relación al gen constitutivo β-actina. La cuantificación relativa se obtuvo usando el método ΔΔCt y se normalizó respecto al grupo control. Los cebadores para la reacción de PCR se obtuvieron basándose en la base de datos del genoma de Applied

Biosystems de referencias de ARNm de rata (<http://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/gene-expression.html>) (**Tabla 1**).

Gen	ID del ensayo	Nº GenBank	Longitud del amplicón
β-actina (<i>Actb</i>)	Rn00667869_m1	NM_031144.2	91
CB₁ (<i>Cnr1</i>)	Rn02758689_s1	NM_012784.4	92
CB₂ (<i>Cnr2</i>)	Rn03993699_s1	NM_001164142.1	102
DAGL-α (<i>Dagla</i>)	Rn01454304_m1	NM_001005886.1	67
DAGL-β (<i>Daglb</i>)	Rn01453770_m1	NM_001107120.1	57
FAAH (<i>Faah</i>)	Rn00577086_m1	NM_024132.3	63
MGL (<i>Magl</i>)	Rn00593297_m1	NM_138502.2	78
NAPE-PLD (<i>Napepld</i>)	Rn01786262_m1	NM_199381.1	71
PPAR-α (<i>Ppara</i>)	Rn00566193_m1	NM_013196.1	98
LPA₁ (<i>Lpar1</i>)	Rn00588435_m1	NM_053936.3	67
FAT (<i>Cd36</i>)	Rn00580728_m1	NM_031561.2	101

Tabla 1. Cebadores (*primers*) utilizados para las qPCRs.

4.7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTÉICA (WESTERN-BLOT)

Esta técnica se utilizó para identificar y localizar determinadas proteínas en base a su capacidad para unirse a anticuerpos específicos.

4.7.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Las proteínas se extrajeron de los tejidos de hígado y yeyuno utilizando un tampón de lisis (0,2% SDS, 1 mM EDTA, 1% NaDOC, 150 mM NaCl, 1% Triton y 50 mM Tris-HCl pH 7,6) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche, Mannheim, Alemania). Las muestras se colocaron en hielo, se añadió 1 mL del tampón de lisis a cada una y se homogeneizaron en un homogeneizador Ultra-Turrax (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EE.UU). Una vez homogeneizadas, se pusieron en agitación durante 2 horas a 4°C y se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (fase soluble) y se transfirió a un tubo limpio.

4.7.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La concentración de proteína de cada muestra se determinó mediante el método de Bradford. Para ello se prepararon distintas diluciones de la proteína utilizada como estándar, albúmina de suero bovino, entre 25 y 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con ellas obtuvimos una curva patrón. Se añadieron 5 μL de las diluciones apropiadas de los estándares y de las muestras directamente sobre la microplaca de 96 pocillos. Como blanco se utilizó el tampón donde se encontraba diluida la muestra. A continuación se añadió 250 μL del reactivo azul de Coomassie (PIERCE, Biotechnology, INC, IL, EE.UU). Se agitó durante 30 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y seguido, se midió la densidad óptica a 595 nm en un espectrofotómetro (VERSAmax, *microplate reader*, MDS Inc, Toronto, Canadá), restando la absorbancia medida para el blanco. Se representó la densidad óptica (DO595) frente a la concentración de los estándares, para obtener la curva patrón. Extrapolando los valores de DO595 de la muestra problema en la recta patrón, se obtuvo la concentración de proteínas.

4.7.3. INMUNODETECCIÓN (*WESTERN-BLOT*)

Llevamos a cabo el análisis de western blot para algunos componentes del SEC (CB₂, FAAH, MGL, NAPE-PLD, PPAR- α) y adaptina, como constitutivo. Utilizamos entre 25 y 50 μg de proteína.

Las proteínas de interés se separaron en función del peso molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (el porcentaje de acrilamida depende del tamaño de la proteína que se quiere estudiar) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Tras la electroforesis se procedió a la transferencia de las proteínas. La transferencia de proteínas o *blotting* supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, en este caso de nitrocelulosa.

El procedimiento se inicia apilando sucesivamente una esponja plana, papel de filtro empapado en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20% v/v, pH 8,3), el gel, la membrana en contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente una esponja plana. Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en un tanque en el que se encuentra el tampón de transferencia y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Se dispone de forma que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+). La carga neta de las proteínas en el caso de los geles de SDS-PAGE es positiva debida a la carga del SDS. La electroforesis se realiza a 100-150 voltios durante 2-3 horas. La velocidad de transferencia es inversamente proporcional al tamaño de la proteína. El proceso provoca un

fuerte calentamiento de la solución por lo que se refrigera el sistema. Una vez realizada la transferencia la membrana se puede analizar inmediatamente o bien conservarla en frío (2 a 8°C) durante meses. Para localizar las bandas de proteína, las membranas se tiñeron con rojo *Ponceau* y se cortaron las membranas al nivel del marcador de peso molecular según la proteína de interés.

Una etapa común a todos los procedimientos de inmunodetección es el bloqueo, para prevenir la unión no específica del sistema de detección a la membrana, con el riesgo asociado de tener un elevado *background* o falsos positivos. En este caso, las membranas se bloquearon durante 1 hora con PBST (50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 200 mM NaCl y 0,1% Tween-20) con un 2% de BSA. A continuación se procedió a la detección de las proteínas de interés incubando durante 2 horas con el primer anticuerpo específico contra las proteínas que se querían estudiar (ver **Tabla 2**) diluidos en PBST con un 2% de BSA. Después de 3 lavados de 5 minutos en PBST, se incubó 1 hora a 25°C con el segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa (Promega, Madison, MI, EE.UU) en PBS. Finalmente, se volvió a lavar tal como se ha descrito previamente y se revelaron las bandas que contenían las proteínas de interés usando la técnica de detección de quimioluminiscencia (ECL) con los reactivos (A y B) de Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, EE.UU). El reactivo A se mezcló con el reactivo B en un ratio de 1:1. Luego se incubó la membrana en esta mezcla por 1 minuto antes de colocarlo entre film y se reveló con el Autochemi-UVP Bioimaging System (LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg/Bodensee, Alemania). Las membranas se reutilizaron y se separaron con tampón de “*stripping*” (14,2 mL tampón de “*stacking*” 0,5 M Tris pH 6,8, 10 mL 20% SDS, 100 mM mercaptoetanol) durante 30 minutos a 50°C y en agitación. Se cuantificaron las distintas bandas por densitometría utilizando el programa informático ImageJ (Rasband W.S., ImageJ, U.S., NIH, Bethesda, MA, EE.UU) <http://imagen.nih.gov/ij>, 1997-2012.

Anticuerpo	Peso molecular (kD)	Dilución
γ -adaptina	100	1:1000
PPAR- α	55	1:200
CB ₂	45	1:200
NAPE-PLD	46	1:100
FAAH	67	1:1000
MGL	35	1:100

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la cuantificación de proteínas relacionadas con el SEC en hígado e intestino

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron mediante medias y errores estándar de la media (EEM ó SEM). Las pruebas estadísticas aplicadas fueron seleccionadas en función del tipo de variable y su distribución, así como del número de grupos experimentales a comparar.

4.8.1. PRUEBA DE NORMALIDAD DE VARIABLES

La distribución de cada variable permitió seleccionar el método estadístico de análisis paramétrico o no paramétrico adecuado para variables normales o no normales respectivamente. Para determinar esta distribución de variables, se utilizó el test de normalidad general de *D Agostino y Pearson*.

4.8.2. ANÁLISIS DE MEDIAS

Para las comparaciones estadísticas entre medias de dos grupos se utilizó la prueba estadística t de *Student* para variables continuas normales y el test de *Mann-Whitney* para variables discretas o no normales.

Para las comparaciones de tres o más grupos:

1) Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías, en función del número de factores a considerar, para variables normales a través del estadístico F con sus correspondientes grados de libertad. Como prueba *post-hoc* para comparaciones pareadas múltiples se aplicó la prueba de *Tukey*.

2) Como prueba no paramétrica para variables no normales, se utilizó *Kruskal-Wallis* y la complementaria prueba *post-hoc* de *Dunn*.

4.8.3. ANÁLISIS DE CORRELACIONES

Los análisis múltiples de correlaciones entre variables se realizaron a través de los correspondientes coeficientes de correlación:

- 1) Pearson (r) para variables continuas y normales.
- 2) Spearman (ρ) para variables continuas no normales o variables discretas/categorías.

4.8.4. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS Y VALOR p

Partiendo de la asunción de hipótesis nula ó H_0 (ausencia de diferencias entre medias y de asociación entre variables), la probabilidad de rechazo de esta quedó determinada por el valor p . De este modo, un valor p menor a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo para rechazar H_0 .

Para los análisis estadísticos se utilizó la versión 5.04 del paquete estadístico Graph-Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

5.1. EFECTOS DE LA AUTO-ADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL SOBRE EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (SEC) PERIFÉRICO

En este estudio se muestran los efectos de la auto-administración de alcohol sobre el SEC en el hígado e intestino de ratas adultas. Con este fin, se abordó el efecto de la auto-administración durante 107 días de alcohol o sacarina. Se utilizaron 42 animales que se auto-administraban sacarina y 67 que se auto-administraban alcohol. Los estudios se abordaron en dos fases, en una primera se analizó la expresión de los genes relacionados con el SEC en el hígado y el intestino de todos los animales, y posteriormente se seleccionaron 20 animales con fenotipos extremos en auto-administración de alcohol (baja y alta auto-administración) y se compararon con los fenotipos medios de sacarina (20 animales mas cercanos a la media).

5.1.1. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA AUTO-ADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL Y LOS NIVELES DE ARNm DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SEC EN EL HÍGADO E INTESTINO DELGADO

A continuación, se llevaron a cabo análisis múltiple de correlaciones para ver si existía algún tipo de asociación entre el consumo de sacarina o alcohol y la expresión del ARNm de proteínas relacionadas con el SEC en los órganos estudiados (intestino delgado e hígado).

La **Tabla 1** muestra los resultados del análisis múltiple de correlaciones, donde se observan en negrita las correlaciones significativas.

ARNm	Control (Sacarina)		Alcohol	
	Yeyuno	Hígado	Yeyuno	Hígado
CB ₁	rho -0.005 <i>p</i> = 0.976	rho -0.174 <i>p</i> = 0.302	rho +0.147 <i>p</i> = 0.263	rho -0.154 <i>p</i> = 0.233
CB ₂	rho= -0.484 <i>p</i>= 0.006	rho= -0.392 <i>p</i>= 0.016	rho -0.082 <i>p</i> = 0.551	rho= -0.321 <i>p</i>= 0.011
PPAR- α	rho +0.310 <i>p</i> = 0.058	rho -0.273 <i>p</i> = 0.092	rho +0.055 <i>p</i> = 0.667	rho= -0.274 <i>p</i>= 0.027
LPA ₁	rho -0.003 <i>p</i> = 0.988	rho -0.143 <i>p</i> = 0.406	rho= +0.397 <i>p</i>= 0.001	rho= -0.313 <i>p</i>= 0.012
NAPE-PLD	rho -0.163 <i>p</i> = 0.348	rho -0.263 <i>p</i> = 0.116	rho +0.002 <i>p</i> = 0.987	rho= -0.162 <i>p</i> = 0.197
DAGL- α	rho +0.108 <i>p</i> = 0.550	rho= -0.357 <i>p</i>= 0.035	rho +0.037 <i>p</i> = 0.782	rho= -0.288 <i>p</i>= 0.022
DAGL- β	rho -0.196 <i>p</i> = 0.244	rho -0.150 <i>p</i> = 0.383	rho -0.105 <i>p</i> = 0.416	rho -0.174 <i>p</i> = 0.180
FAAH	rho +0.197 <i>p</i> = 0.244	rho -0.073 <i>p</i> = 0.678	rho= +0.256 <i>p</i>= 0.043	rho= -0.366 <i>p</i>= 0.003
MGL	rho -0.005 <i>p</i> = 0.976	rho= -0.464 <i>p</i>= 0.006	rho -0.176 <i>p</i> = 0.171	rho= -0.327 <i>p</i>= 0.011
FAT/CD36	rho +0.031 <i>p</i> = 0.854	rho +0.047 <i>p</i> = 0.777	rho= +0.304 <i>p</i>= 0.017	rho +0.109 <i>p</i> = 0.394

Tabla 1. Análisis múltiple de correlaciones entre el consumo de sacarina o alcohol y la expresión del ARNm de proteínas relacionadas con el SEC en el intestino delgado (yeyuno) e hígado de ratas expuestas a auto-administración. Abreviaturas: rho: Coeficiente de correlación de Spearman; *p*: Valor inferior al nivel de significación establecido en 0.05 (implica la existencia de correlación). Los nombres de las proteínas se definen en el texto.

5.1.1.2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA AUTO-ADMINISTRACIÓN DE SACARINA Y LOS NIVELES DE ARNm EN EL HÍGADO E INTESTINO DELGADO

En el hígado, observamos una correlación negativa entre el consumo de sacarina y los niveles de ARNm del receptor CB₂ (**Figura 1A**) o de las enzimas de síntesis y degradación de 2-AG, DAGL- α (**Figura 1B**) y MGL (**Figura 1C**), respectivamente.

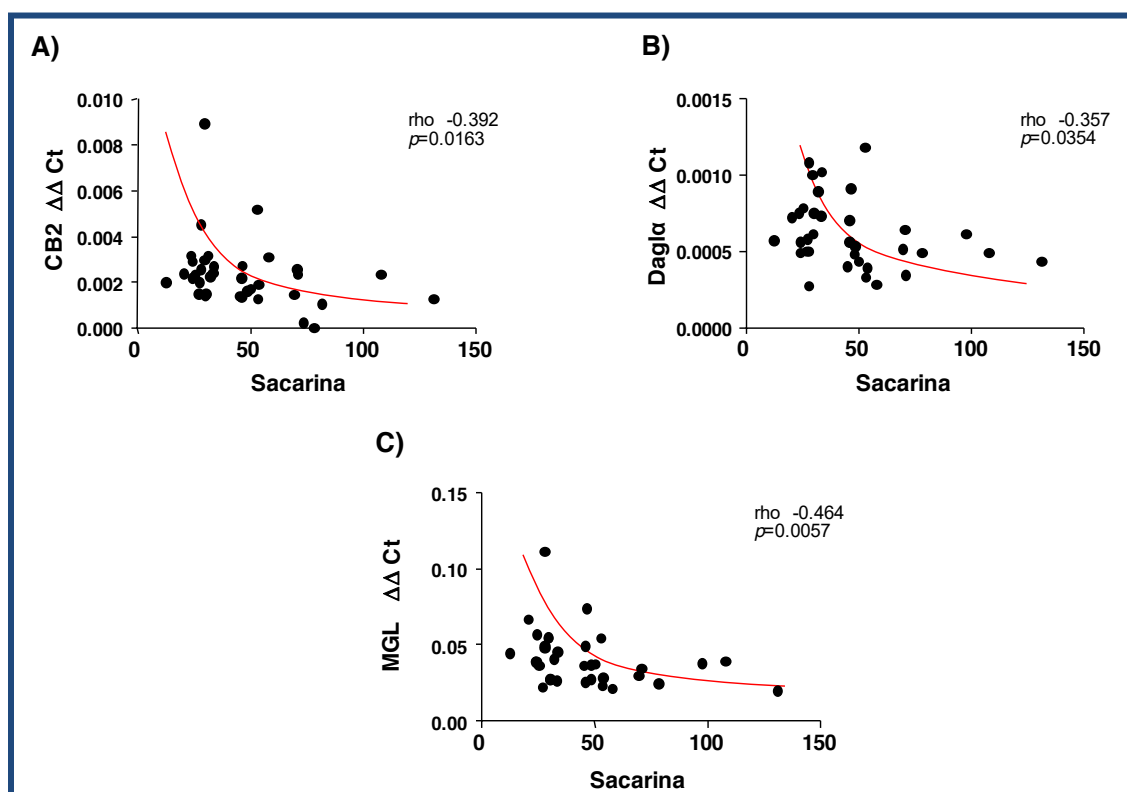


Figura 1. Análisis múltiple de correlaciones entre la auto-administración de sacarina y la expresión del ARNm del receptor CB₂ (A), la enzima DAGL α (B) y la enzima MGL (C) en el hígado de ratas. Rho: Coeficiente de correlación de Spearman; p : Valor inferior al nivel de significación establecido en 0.05 (implica la existencia de correlación).

Sin embargo, en el caso del intestino sólo observamos una correlación negativa entre el consumo de sacarina y los niveles de ARNm del receptor CB₂ (**Figura 2**).

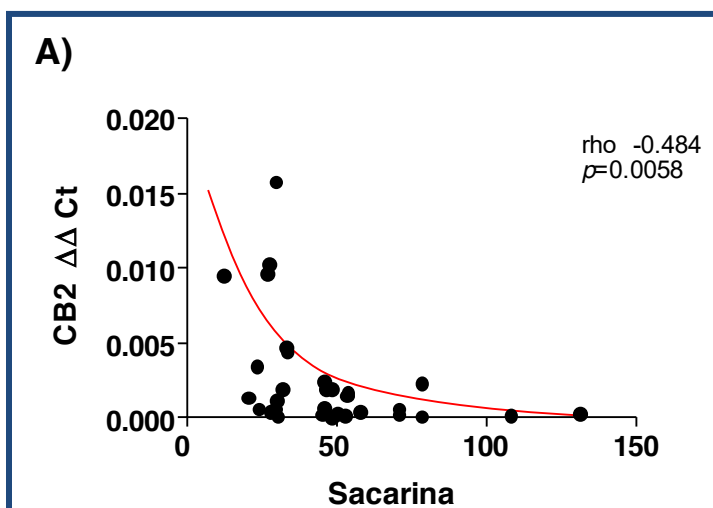


Figura 2. Análisis múltiple de correlaciones entre la auto-administración de sacarina y la expresión del ARNm del receptor CB₂ en el intestino de ratas. Rho: Coeficiente de correlación de Spearman; *p*: Valor inferior al nivel de significación establecido en 0.05 (implica la existencia de correlación).

5.1.1.3. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA AUTO-ADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL Y LOS NIVELES DE ARNm EN EL HÍGADO E INTESTINO DELGADO

Cuando analizamos las correlaciones con la auto-administración de alcohol, observamos que existía una asociación negativa entre la auto-administración con la mayoría de los ARNm de receptores y enzimas evaluados en el hígado (**Figura 3**).

Por el contrario, en el intestino observamos correlaciones positivas entre la auto-administración de alcohol y los niveles de ARNm de LPA₁ (**Figura 4A**), FAAH (**Figura 4B**) y FAT/CD36 (**Figura 4C**).

En base a estos resultados, y para hacer una comparación entre fenotipos extremos, en los que se harán mediciones de expresión de proteínas, hemos dividido los animales del grupo alcohol en 2 subgrupos: animales con una baja tasa de auto-administración (menor EtOH) y animales con una alta tasa de auto-administración (mayor EtOH). Estos, a su vez, se han comparado con animales con una tasa de auto-administración media de sacarina. Los valores de auto-administración fueron: *ingesta baja* de alcohol ($34,7 \pm 7$ palancadas en las cajas operantes), *ingesta elevada* ($79,2 \pm 8$ palancadas), y *consumo promedio* de sacarina ($65,8 \pm 6$ palancadas).

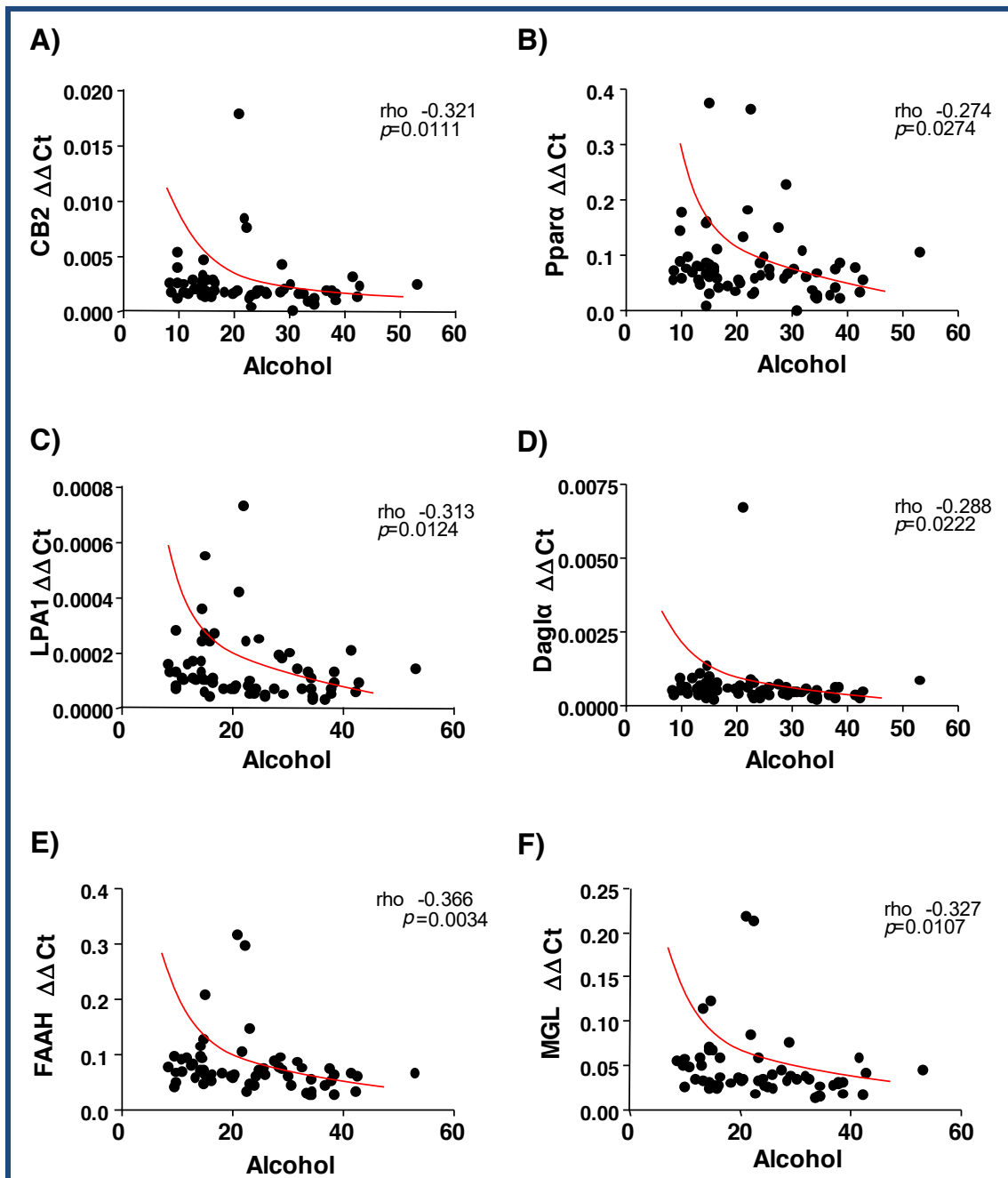


Figura 3. Análisis múltiple de correlaciones entre la auto-administración de alcohol y la expresión del ARNm de los receptores CB₂ (A), PPAR- α (B) y LPA₁ (C), de la enzima de biosíntesis DAGL- α (D), y de las enzimas de degradación FAAH (E) y MGL (F) en el hígado de ratas. Rho: Coeficiente de correlación de Spearman; p: Valor inferior al nivel de significación establecido en 0.05 (implica la existencia de correlación).

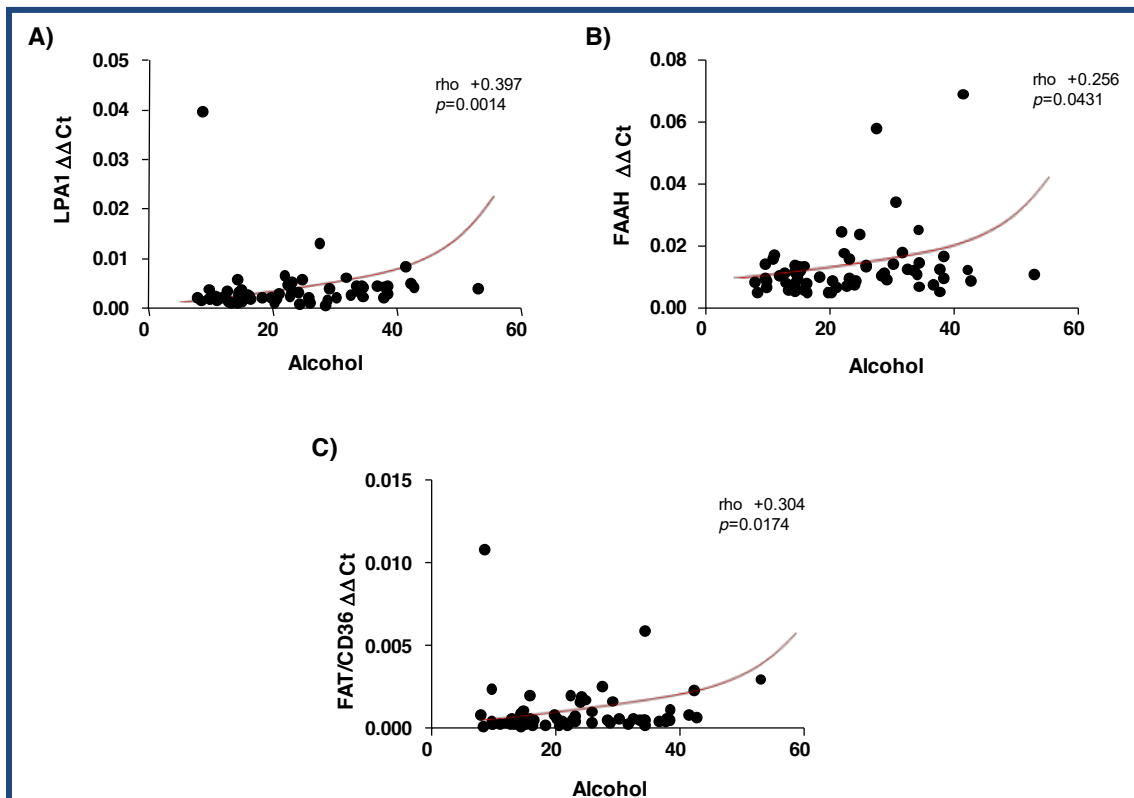


Figura 4. Análisis múltiple de correlaciones entre la auto-administración de alcohol y la expresión del ARNm del receptor LPA_1 (A), de la enzima de degradación FAAH (B) y la translocasa FAT/CD36 (C) en el intestino de ratas. Rho: Coeficiente de correlación de Spearman; p : Valor inferior al nivel de significación establecido en 0.05 (implica la existencia de correlación).

5.1.2. EFECTOS DE LA AUTO-ADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SEC EN EL HÍGADO

Para esta evaluación se seleccionaron los receptores cannabinoides (CB_1 y CB_2), el receptor nuclear PPAR- α , el receptor del ácido lisofosfatídico LPA_1 , las enzimas implicadas en la biosíntesis de endocannabinoides y otros derivados lipídicos [N-acil-fosfatidiletanolamina/fosfolipasa D (NAPE-PLD) y diacilglicerol lipasa subtipos α y β (DAGL- α y DAGL- β)], enzimas de degradación [amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MGL)] y, finalmente, la translocasa de ácidos grasos FAT/CD36.

5.1.2.1. RECEPTORES CANNABINOIDES CB_1 Y CB_2

La **Figura 5** muestra los niveles de ARNm de los receptores cannabinoides. EN el caso del receptor CB_1 , la auto-administración no afectó a los niveles de ARNm (**Figura 5A**) ni tampoco se observaron diferencias entre los subgrupos con baja y alta auto-administración (**Figura 5B**).

Respecto a los niveles de ARNm del receptor CB₂, aunque tampoco se observó un efecto de la auto-administración (**Figura 5C**), el ANOVA mostró un efecto de *la tasa de auto-administración* de alcohol ($F_{2,54} 6.32, p=0.0034$) (**Figura 5D**). En este caso, la expresión relativa de CB₂ disminuyó de forma significativa en el grupo con una alta tasa de auto-administración en comparación al grupo con baja tasa ($^{++}p<0.01$).

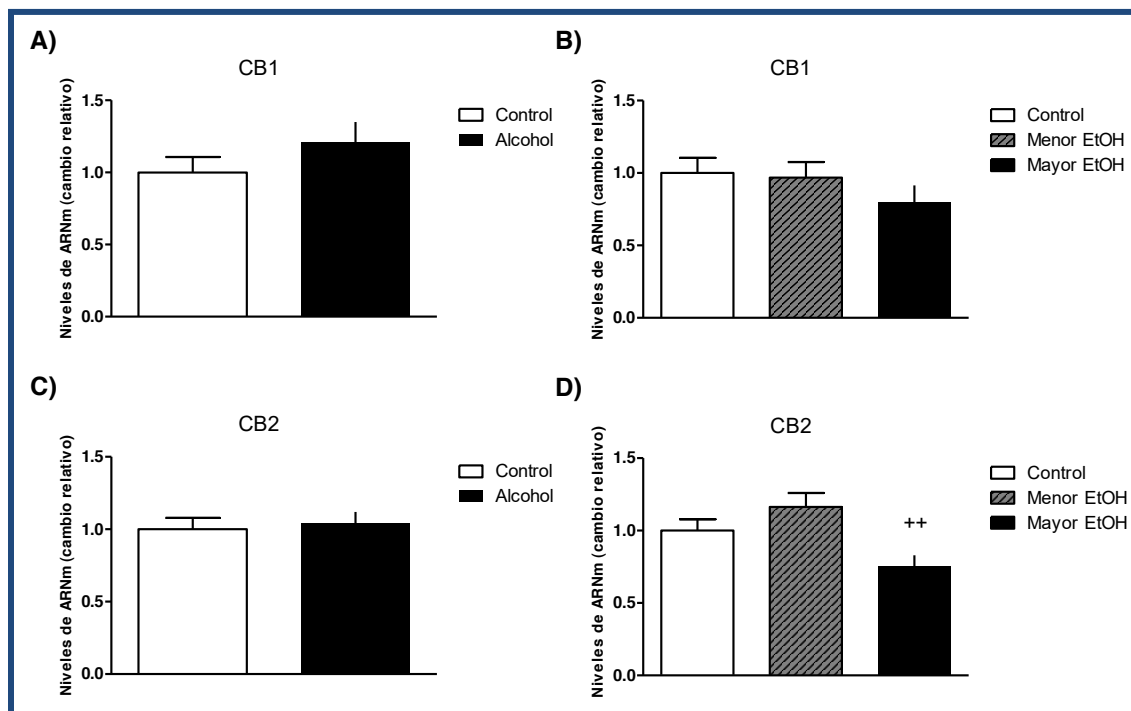


Figura 5. Niveles de ARNm de los receptores CB₁ (A, B) y CB₂ (C, D) en el hígado de ratas auto-administrándose alcohol. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Los datos se analizaron mediante pruebas *t* de Student o ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (++) $p<0.01$ indica diferencias significativas frente al grupo menor EtOH.

5.1.2.2. RECEPTORES NUCLEARES PPAR- α

Los niveles de ARNm del receptor nuclear PPAR- α en el hígado no fueron significativamente afectados por la auto-administración (**Figura 6A**), aunque el ANOVA mostró un efecto de *la tasa de auto-administración* de alcohol ($F_{2,54} 4.59, p=0.0145$) (**Figura 6B**). Así, el análisis *post-hoc* reveló cambios significativos sólo en las ratas con una mayor tasa de auto-administración, con una disminución significativa en comparación al grupo con baja tasa de auto-administración ($^{+}p<0.05$).

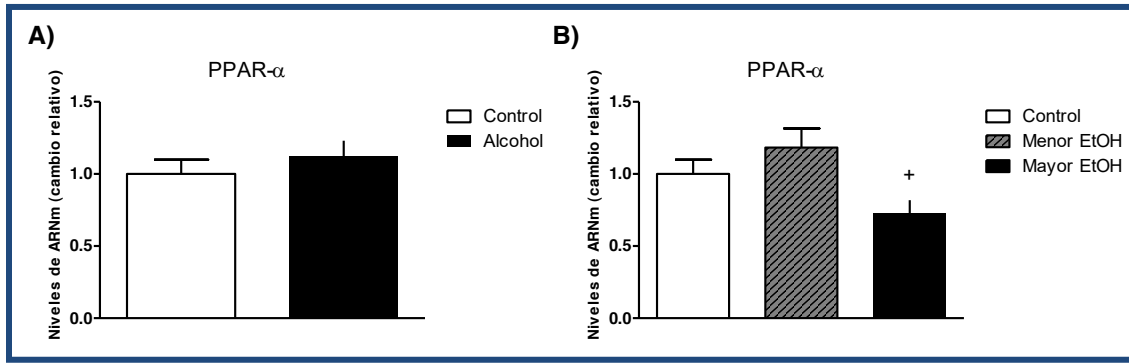


Figura 6. Niveles de ARNm del receptor nuclear PPAR- α en el hígado de ratas expuestas a auto-administración de alcohol (A) o divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración (B). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Los datos se analizaron mediante pruebas *t* de *Student* o ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (+) $p < 0.05$ indica diferencias significativas frente al grupo menor EtOH.

5.1.2.3. RECEPTOR DEL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO LPA₁

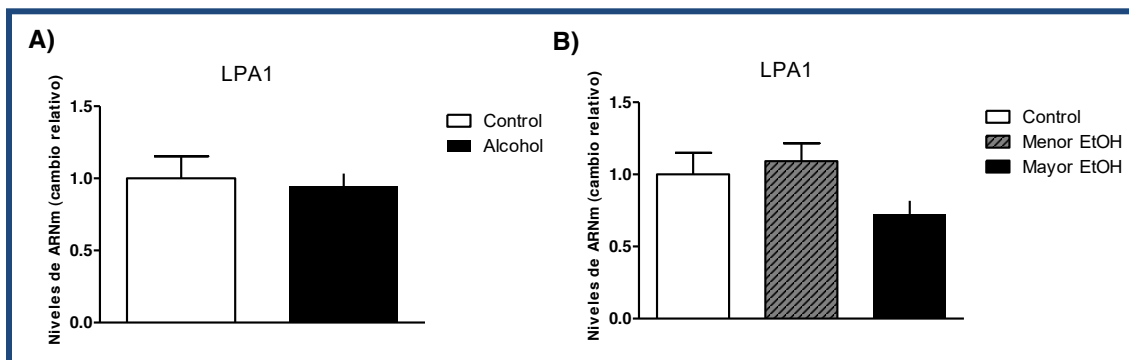


Figura 7. Niveles de ARNm del receptor LPA₁ en el hígado de ratas expuestas a auto-administración de alcohol (A) o divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración (B). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Los datos se analizaron mediante las pruebas no paramétricas *U* de *Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis* y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

La auto-administración no afectó a los niveles de ARNm del receptor LPA₁ (**Figura 7A**) ni tampoco se observaron diferencias entre los subgrupos con baja y alta auto-administración (**Figura 7B**).

5.1.2.4. ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS NAPE-PLD Y DAGL- α/β

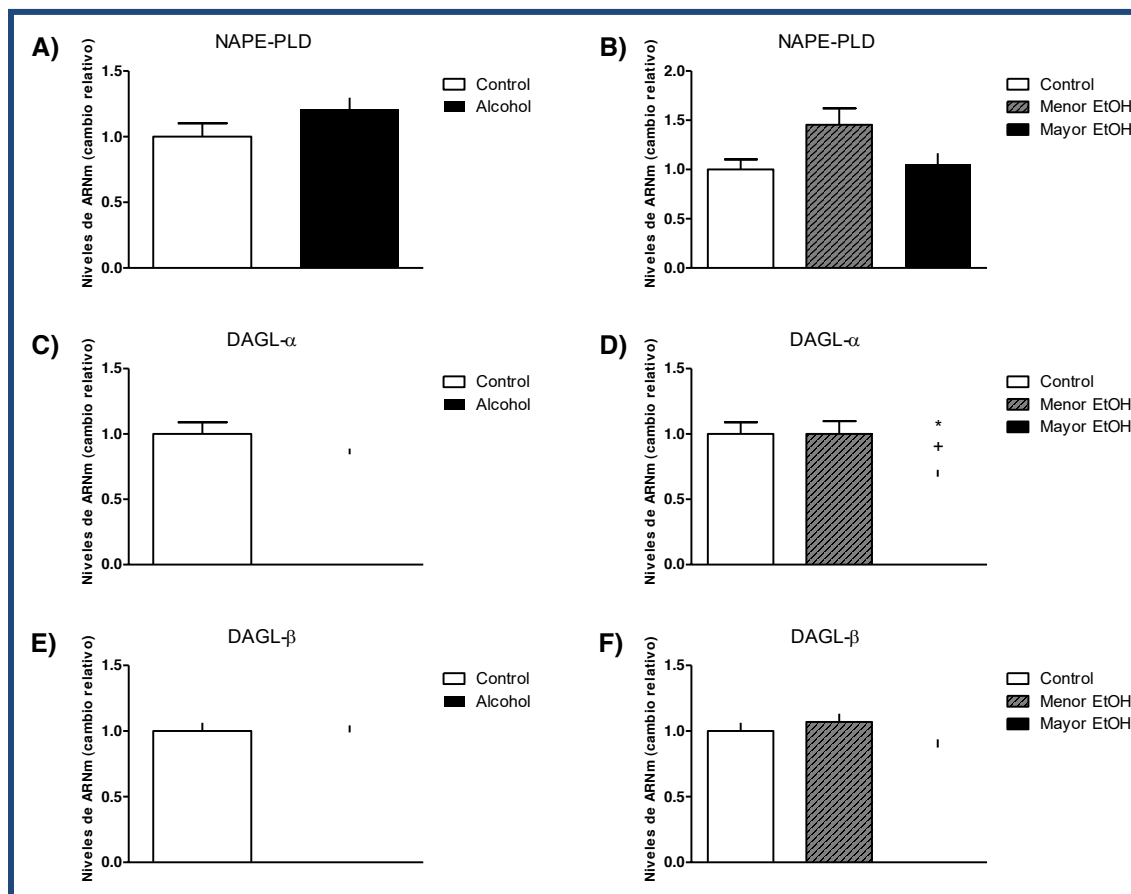


Figura 8. Niveles de ARNm de las enzimas NAPE-PLD (A, B), DAGL- α (C, D) y DAGL- β (E, F) en el hígado de ratas auto-administrándose alcohol. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Según la normalidad, los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas (*U de Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis*) o paramétricas (*t de Student* o *ANOVA* de una vía), seguido de la correspondiente prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$ indica diferencias significativas frente al grupo control. (+) $p < 0.05$ indica diferencias significativas frente al grupo menor EtOH.

Aunque no se observó ninguna diferencia en los niveles hepáticos de ARNm de las enzimas de biosíntesis del grupo control y el grupo de ratas auto-administrándose alcohol (**Figuras 8A, 8C y 8D**), si hubo cambios en la expresión de NAPE-PLD y DAGL- α cuando se subdividieron en función de la tasa de auto-administración.

El ANOVA mostró un efecto significativo de *la tasa de auto-administración* de alcohol sobre la expresión relativa de NAPE-PLD ($F_{2,53} = 3.49$, $p = 0.0375$) (**Figura 8B**). Sin embargo, no se observó cambios significativos en las comparaciones múltiples.

En cuanto a DAGL- α , el análisis estadístico mostró un efecto significativo de *la tasa de auto-administración* de alcohol ($F_{2,53} = 5.28$, $p = 0.0081$) (**Figura 8D**). En este caso, se observó una disminución significativa en la expresión relativa de esta enzimas en los animales con una

mayor tasa de auto-administración en comparación a los otros grupos (* $p < 0.05$ en comparación al grupo control; $^+p < 0.05$ en comparación al grupo con baja tasa de auto-administración). Finalmente, los niveles de ARNm de DAGL- β no se vieron afectados (**Figura 8F**).

5.1.2.5. ENZIMAS DE DEGRADACIÓN FAAH Y MGL

Al igual que lo observado con las enzimas de biosíntesis, tampoco hubo diferencias en los niveles de ARNm de las enzimas de degradación entre el grupo control y el grupo de ratas auto-administrándose alcohol en el hígado (**Figuras 9A y 9C**), pero si se observaron cambios en la expresión de ambas enzimas cuando se subdividieron en función de la tasa de auto-administración.

La **Figura 9B** muestra la expresión del ARNm de FAAH en los diferentes subgrupos experimentales. El ANOVA mostró un efecto significativo de *la tasa de auto-administración* de alcohol ($F_{2,54} = 8.25, p = 0.0007$). Así, la expresión relativa de esta enzima disminuyó de forma significativa en los animales con una mayor tasa de auto-administración en comparación a los otros grupos (* $p < 0.05$ en comparación al grupo control; $^{+++}p < 0.001$ en comparación al grupo con baja tasa de auto-administración).

La **Figura 9D** muestra la expresión del ARNm de MGL en los diferentes subgrupos experimentales. El ANOVA mostró un efecto significativo de *la tasa de auto-administración* de alcohol ($F_{2,52} = 7.32, p = 0.0016$). Así, el análisis *post-hoc* reveló cambios significativos sólo en las ratas con una mayor tasa de auto-administración, con una disminución significativa en comparación al grupo con baja tasa de auto-administración ($^{++}p < 0.01$).

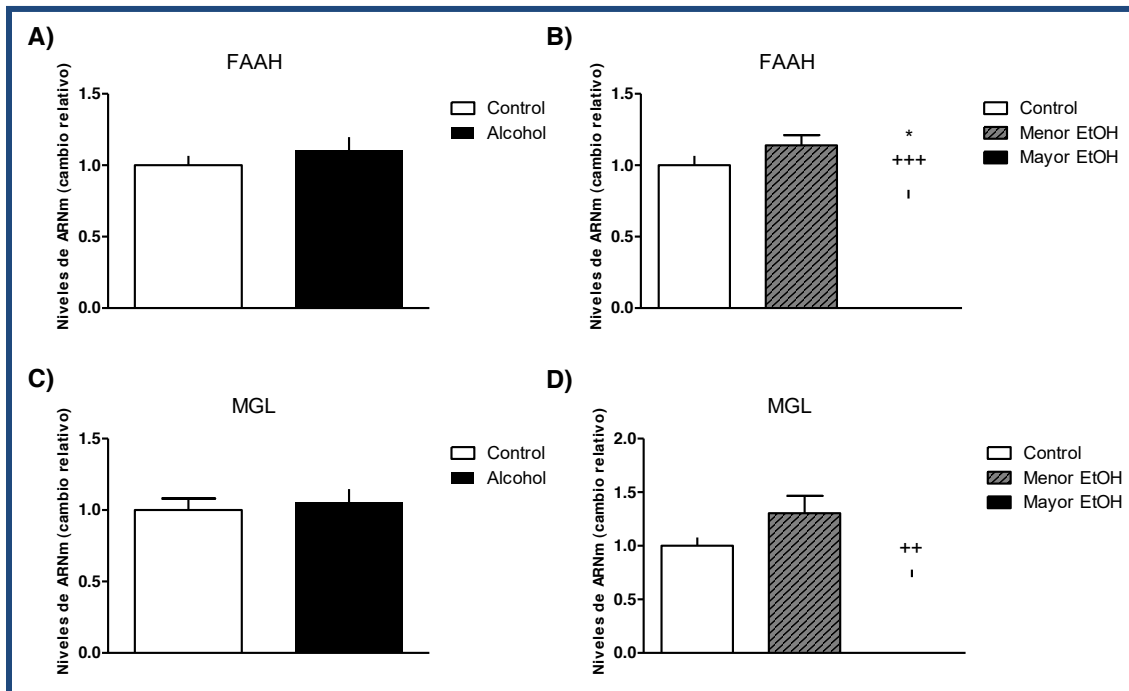


Figura 9. Niveles de ARNm de las enzimas FAAH (A, B) y MGL (C, D) en el hígado de ratas auto-administrándose alcohol. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Los datos se analizaron mediante pruebas *t* de *Studento* ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$ indica diferencias significativas frente al grupo control. (++) $p < 0.01$ y (+++) $p < 0.001$ indica diferencias significativas frente al grupo menor EtOH.

5.1.2.6. TRANSLOCASA DE ÁCIDOS GRASOS FAT/CD36

El nivel de ARNm de la translocasa FAT/CD36 está representado en la **Figura 10**. La auto-administración no afectó a los niveles de ARNm (**Figura 10A**) ni tampoco se observaron diferencias entre los subgrupos con baja y alta auto-administración (**Figura 6B**).

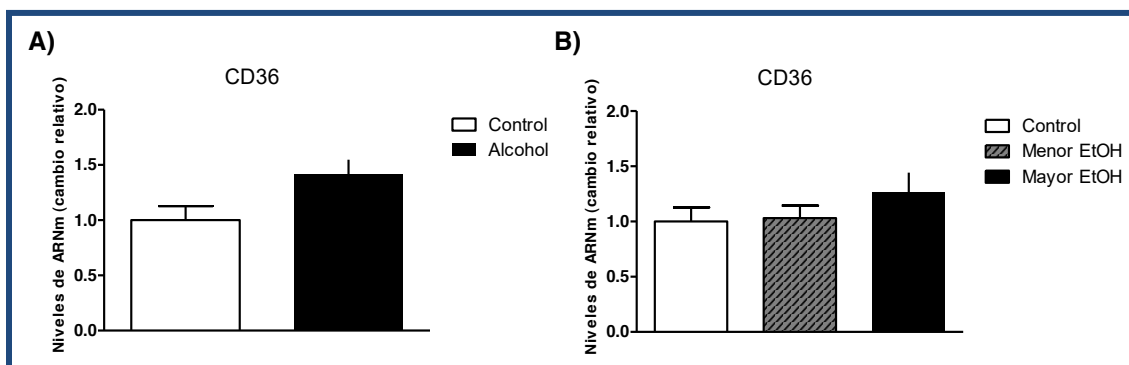


Figura 10. Niveles de ARNm de FAT/CD36 en el hígado de ratas expuestas a auto-administración de alcohol (A) o divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración (B). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Los datos se analizaron mediante pruebas *t* de *Studento* ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.1.3. EFECTOS DE LA AUTO-ADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SEC EN EL INTESTINO DELGADO

Para evaluar si este patrón de consumo de alcohol afectaba a otros órganos periféricos, se llevó a cabo en yeyuno el mismo estudio realizado en hígado. Al igual que en el apartado anterior de resultados, en este caso se analizó la expresión de ARNm de los receptores CB₁, CB₂, PPAR- α y LPA₁; de las enzimas de biosíntesis NAPE-PLD, DAGL- α y DAGL- β , de las enzimas de degradación FAAH y MGL; y de la translocasa FAT/CD36.

5.1.3.1. RECEPTORES CANNABINOIDES CB₁ Y CB₂

En el intestino, los niveles de ARNm de los receptores cannabinoides no se vieron afectados por la auto-administración de alcohol (**Figura 11**).

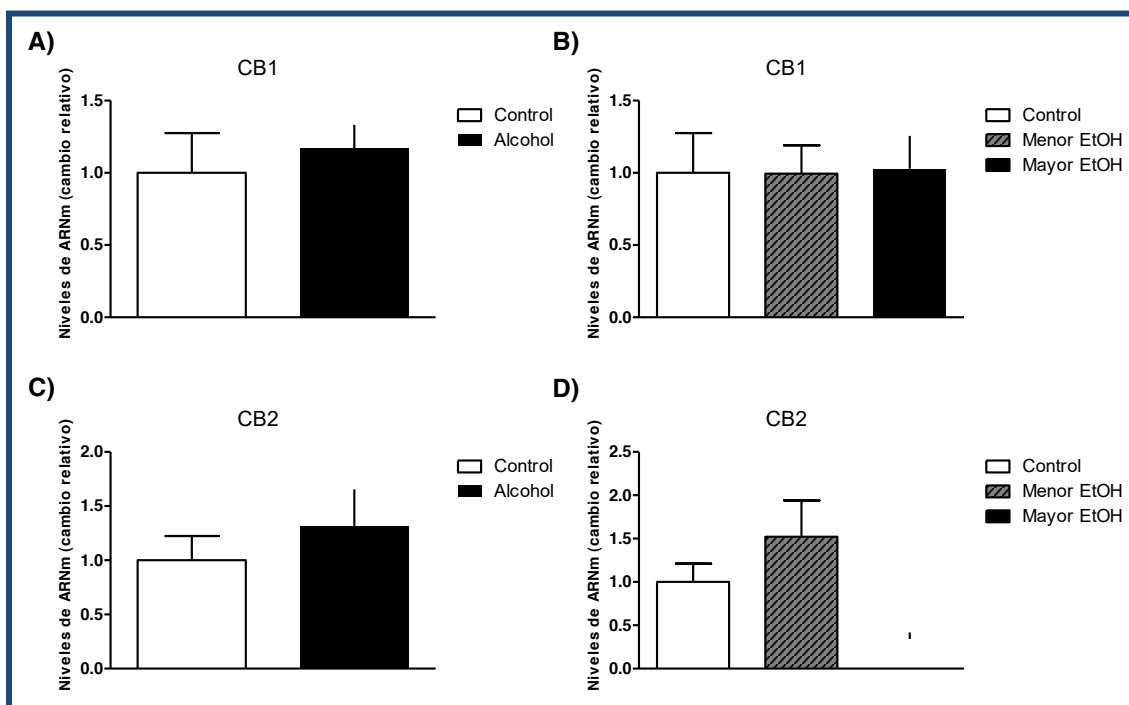


Figura 11. Niveles de ARNm de los receptores CB₁ (A, B) y CB₂ (C, D) en el intestino de ratas auto-administrándose alcohol. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas *U de Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis* y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.1.3.2. RECEPTORES NUCLEARES PPAR- α

Tampoco se observó ningún efecto sobre los niveles de ARNm del receptor nuclear PPAR- α en el intestino de las ratas auto-administrándose alcohol (**Figura 12**).

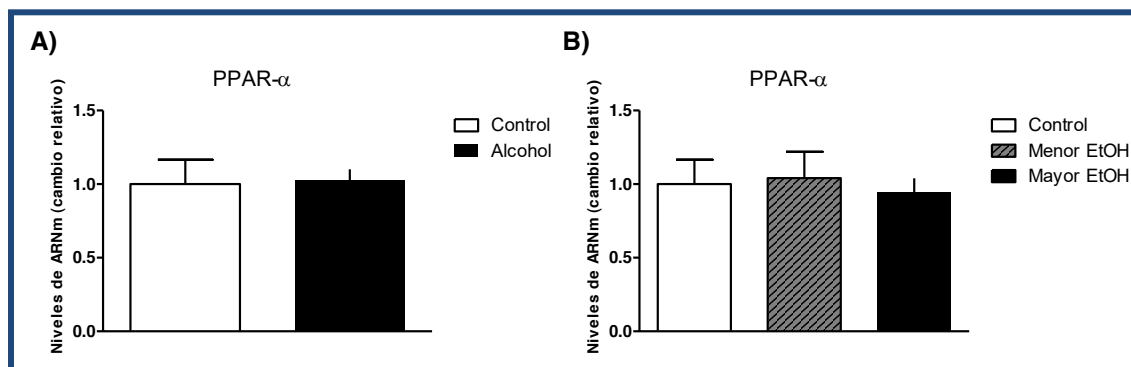


Figura 12. Niveles de ARNm del receptor nuclear PPAR- α en el intestino de ratas expuestas a auto-administración de alcohol (A) o divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración (B). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas *U de Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis* y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.1.3.3. RECEPTOR DEL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO LPA₁

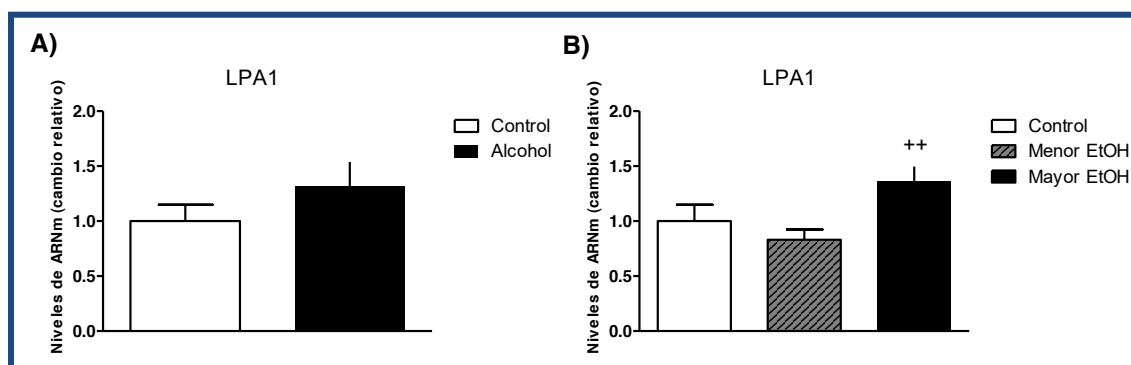


Figura 13. Niveles de ARNm del receptor LPA₁ en el intestino de ratas expuestas a auto-administración de alcohol (A) o divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración (B). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Los datos se analizaron mediante las pruebas no paramétricas *U de Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis* y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (++) $p < 0.01$ indica diferencias significativas frente al grupo menor EtOH.

El nivel de ARNm del receptor LPA₁ está representado en la **Figura 13**. Aunque no se observó un efecto significativo de la auto-administración (**Figura 13A**), el análisis no paramétrico reveló un efecto significativo de la *tasa de auto-administración* de alcohol (KW 10.54, $p = 0.0054$) (**Figura 13B**). En este caso, la expresión relativa de este receptor

aumentó de forma significativa en el grupo con una alta tasa de auto-administración en comparación al grupo con baja tasa (** $p < 0.01$).

5.1.3.4. ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS NAPE-PLD Y DAGL- α/β

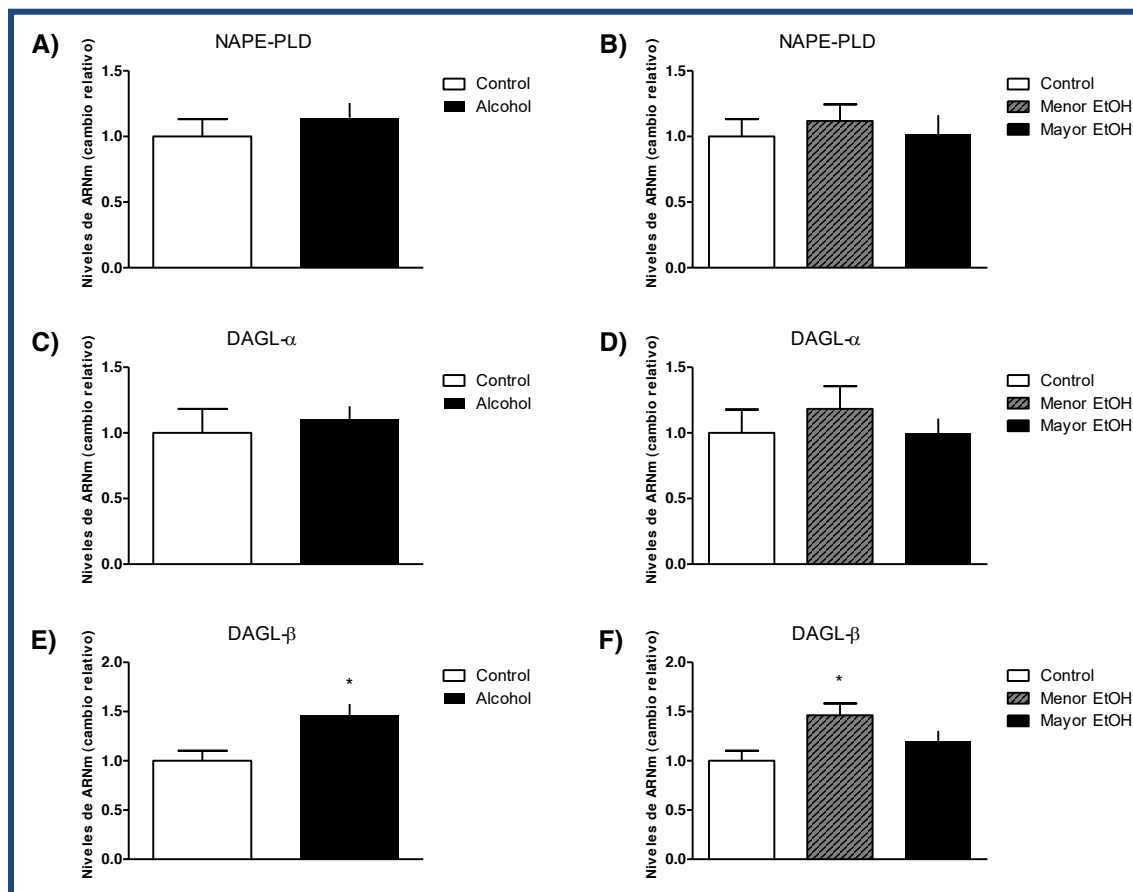


Figura 14. Niveles de ARNm de las enzimas NAPE-PLD (A, B), DAGL- α (C, D) y DAGL- β (E, F) en el intestino de ratas auto-administrándose alcohol. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Los datos se analizaron mediante pruebas *t* de *Studento* ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

En el intestino, no observamos cambios en los niveles de ARNm de las enzimas NAPE-PLD (Figuras 14A y 14B) ni DAGL- α (Figuras 14C y 14D).

En cuanto a la expresión de DAGL- β , observamos un incremento significativo en el grupo de ratas de auto-administración de alcohol en comparación al grupo control (* $p < 0.05$) (Figura 14E). Cuando subdividimos los animales en función de la tasa de auto-administración, el análisis estadístico mostró un efecto significativo ($F_{2,56} 4.50$, $p = 0.0154$) (Figura 14F). En este caso, se observó un aumento significativo en la expresión relativa de

esta enzima en los animales con una menor tasa de auto-administración en comparación al grupo control ($*p<0.05$).

5.1.3.5. ENZIMAS DE DEGRADACIÓN FAAH Y MGL

La **Figura 15** muestra la expresión del ARNm de las enzimas de degradación FAAH y MGL en el intestino de ratas auto-administrándose alcohol

La expresión del ARNm de FAAH estaba incrementado significativamente en el grupo de ratas de auto-administración de alcohol en comparación al grupo control ($*p<0.05$) (**Figura 15A**). Cuando subdividimos los animales en función de *la tasa de auto-administración*, el análisis no paramétrico reveló un efecto significativo de *la tasa de auto-administración* de alcohol (KW 9.30, $p=0.0096$) (**Figura 15B**). En este caso, se observó un aumento significativo en la expresión relativa de esta enzima en los animales con una mayor tasa de auto-administración en comparación al grupo control ($**p<0.01$).

En cuanto a la expresión de la enzima MGL, aunque no se observó un efecto significativo de la auto-administración (**Figura 15C**), el análisis no paramétrico reveló un efecto significativo de *la tasa de auto-administración* de alcohol (KW 6.91, $p=0.0316$) (**Figura 15D**). Así, el análisis *post-hoc* reveló una disminución significativa en las ratas con una alta tasa de auto-administración en comparación al grupo control ($*p<0.05$).

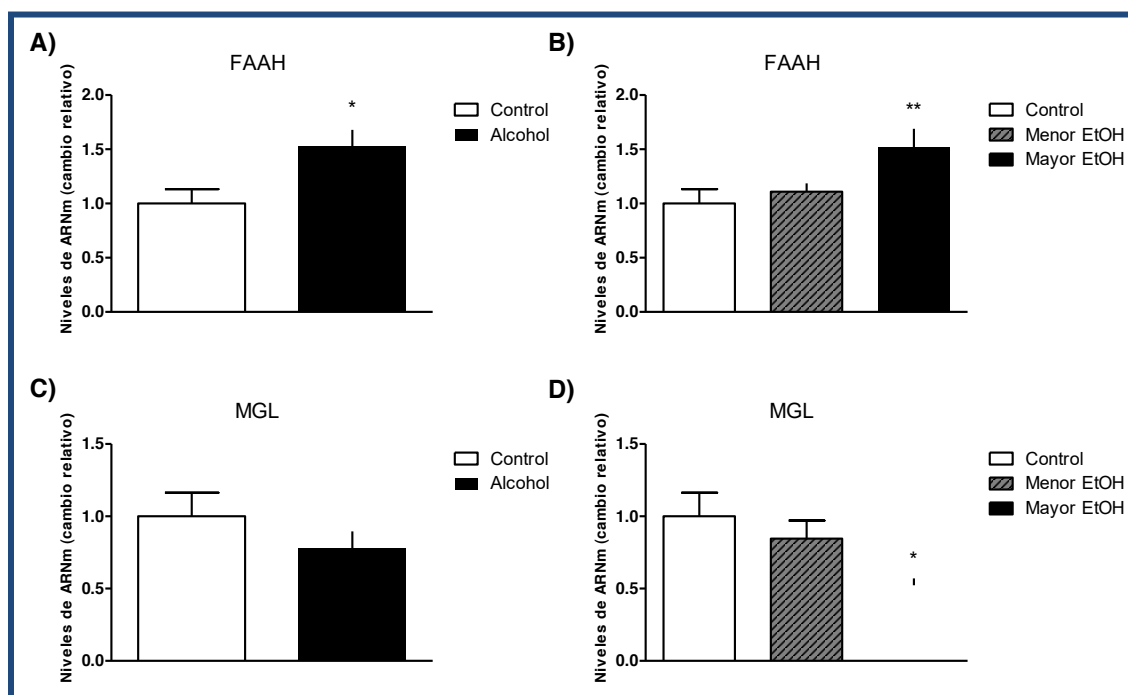


Figura 15. Niveles de ARNm de las enzimas FAAH (A, B) y MGL (C, D) en el intestino de ratas auto-administrándose alcohol. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, $n=18-20$). Los datos se analizaron mediante las pruebas no paramétricas *U de Mann-Whitney* o

Kruskal-Wallis y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

5.1.3.6. TRANSLOCASA DE ÁCIDOS GRASOS FAT/CD36

El nivel de ARNm de la translocasa FAT/CD36 está representado en la **Figura 16**. La auto-administración no afectó a los niveles de ARNm (**Figura 16A**) ni tampoco se observaron diferencias entre los subgrupos con baja y alta auto-administración (**Figura 16B**).

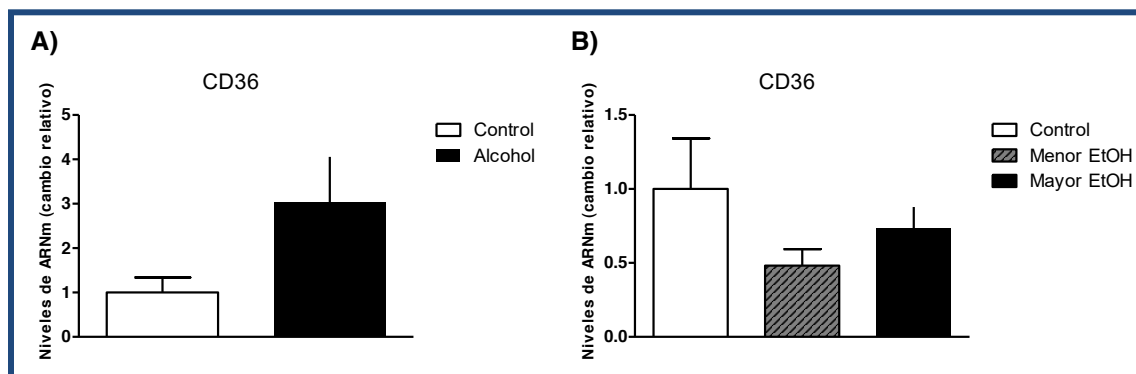


Figura 16. Niveles de ARNm de FAT/CD36 en el intestino de ratas expuestas a auto-administración de alcohol (A) o divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración (B). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=18-20). Los datos se analizaron mediante las pruebas no paramétricas *U de Mann-Whitney* o Kruskal-Wallis y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

Finalmente, la **Tabla 2** muestra un resumen de los efectos de la auto-administración de alcohol sobre los niveles de ARNm tanto en hígado como en intestino:

ARNm	Alcohol		Baja auto-administración		Alta auto-administración	
	Intestino	Hígado	Intestino	Hígado	Intestino	Hígado
CB ₁	-	-	-	-	-	-
CB ₂	-	-	-	-	-	↓
PPAR- α	-	-	-	-	-	↓
LPA ₁	-	-	-	-	↑	-
NAPE-PLD	-	-	-	-	-	-
DAGL α	-	-	-	-	-	↓ ↓
DAGL β	↑	-	↑	-	-	-
FAAH	↑	-	-	-	↑	↓ ↓

MGL	-	-	-	-	↓	↓
FAT/CD36	-	-	-	-	-	-

Tabla 2. Representación relativa de la expresión del ARNm de proteínas relacionadas con el SEC en el intestino e hígado de ratas expuestas a auto-administración de alcohol frente a un grupo control de sacarina. Abreviaturas/Símbolos: Flechas: Indican un incremento (hacia arriba) o un descenso (hacia abajo) en la expresión del ARNm correspondiente en comparación con los valores del grupo control de sacarina (en rojo) o entre los grupos de alta o baja tasa de auto-administración de alcohol (en negro). Los nombres de las proteínas se definen en el texto.

5.1.4. EFECTOS DE LA AUTO-ADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SEC EN EL HÍGADO

Puesto que observamos cambios en la expresión del ARNm de algunos receptores y enzimas metabólicas relacionadas con el SEC, a continuación evaluamos si la expresión de proteína también estaba alterada en el hígado de los animales que se auto-administraban alcohol.

5.1.4.1. RECEPTOR PPAR- α

En el hígado, la expresión de proteína de los receptores PPAR- α (**Figura 17**) no se vio afectada por la auto-administración de alcohol.

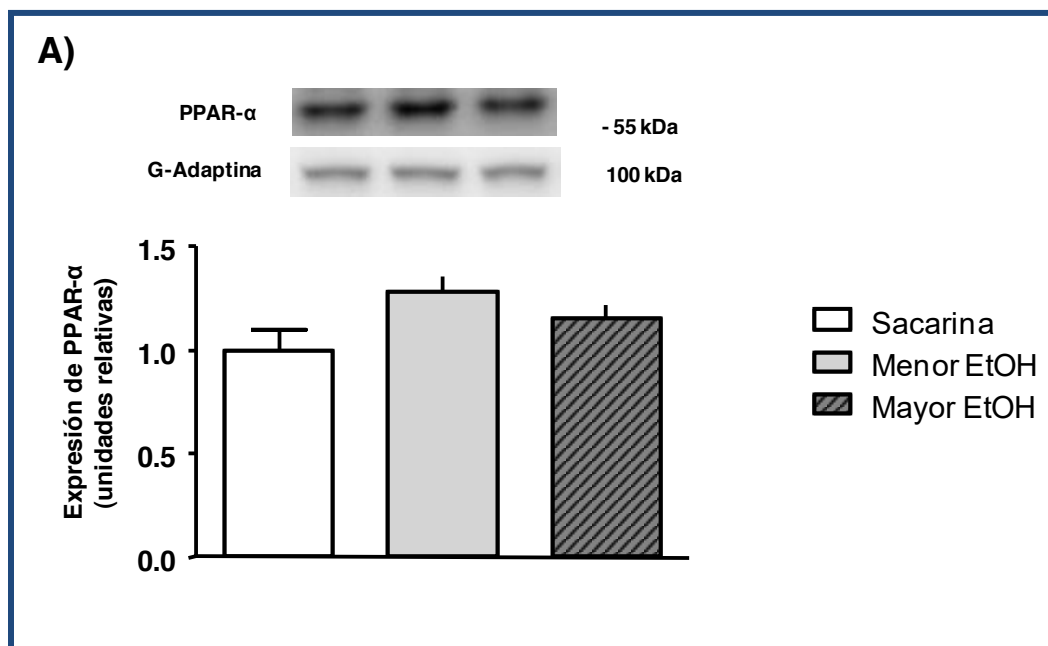


Figura 17. Nivel de proteína de los receptores PPAR- α en el hígado de ratas expuestas a auto-administración de alcohol divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración. Los resultados se expresan como datos

relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, n=8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.1.4.2. ENZIMA DE BIOSÍNTESIS: NAPE-PLD

La **Figura 18** muestra el nivel de proteína de la enzima de biosíntesis NAPE-PLD en el hígado. El análisis no paramétrico reveló un efecto significativo de *la tasa de auto-administración* de alcohol (KW 7.36, $p=0.0253$), con una disminución significativa en las ratas con una alta tasa de auto-administración en comparación al grupo control ($*p<0.05$).

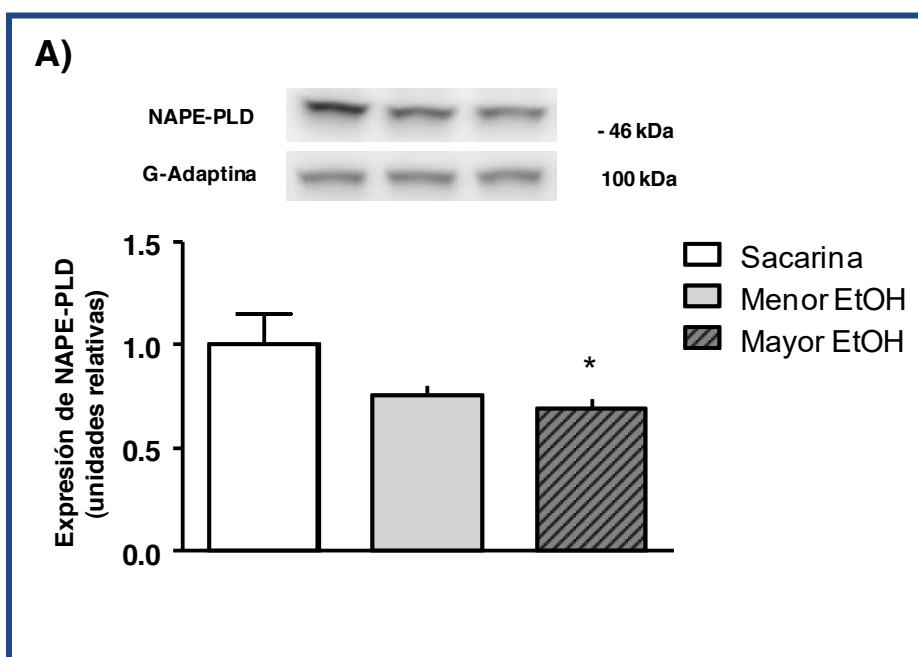


Figura 18. Nivel de proteína de la enzima NAPE-PLD en el hígado de ratas expuestas a auto-administración de alcohol divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, n=8). Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p<0.05$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

5.1.4.3. ENZIMAS DE DEGRADACIÓN: FAAH Y MGL

En el hígado, la expresión de proteína de las enzimas de degradación FAAH (**Figura 19A**) y MGL (**Figura 19B**) no se vio afectada por la auto-administración de alcohol.

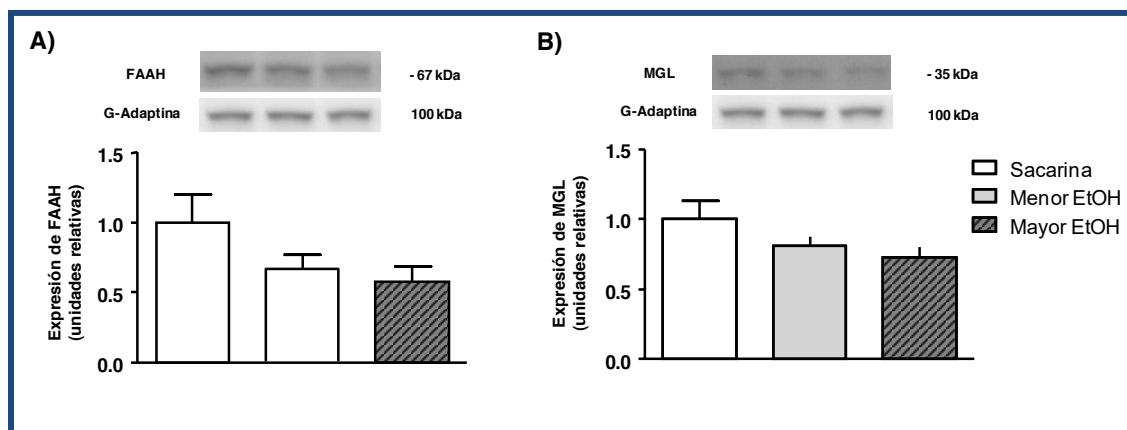


Figura 19. Nivel de proteína de la enzima FAAH (A) y MGL (B) en el hígado de ratas expuestas a auto-administración de alcohol divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, n=8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.1.5. EFECTOS DE LA AUTO-ADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SEC EN EL INTESTINO

Al igual que hicimos en las muestras de hígado, también evaluamos los cambios en la expresión de proteína de algunos receptores y enzimas cuya expresión del ARNm de estaba alterada en el intestino de los animales que se auto-administraban alcohol.

5.1.5.1. RECEPTOR PPAR- α

En el intestino, la expresión de proteína de los receptores PPAR- α (**Figura 20**) se vio afectada significativamente por *la tasa de auto-administración* ($F_{2,20}$ 6.47, $p=0.0068$). En este caso, se observó una disminución significativa en las ratas con una alta tasa de auto-administración en comparación al grupo con baja tasa ($^{**}p<0.01$).

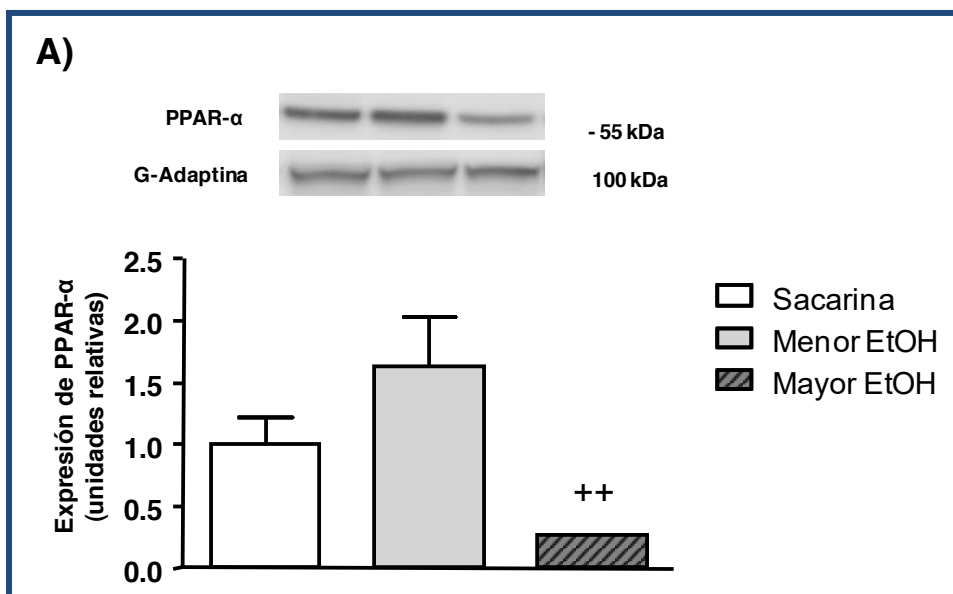


Figura 20. Nivel de proteína de los receptores PPAR- α en el intestino de ratas expuestas a auto-administración de alcohol divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, n=7-8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.(++) $p < 0.01$ indica diferencias significativas frente al grupo menor EtOH.

5.1.5.2. ENZIMA DE BIOSÍNTESIS: NAPE-PLD

En el intestino, la expresión de proteína de la enzima NAPE-PLD (**Figura 21**) no se vio afectada por la auto-administración de alcohol.

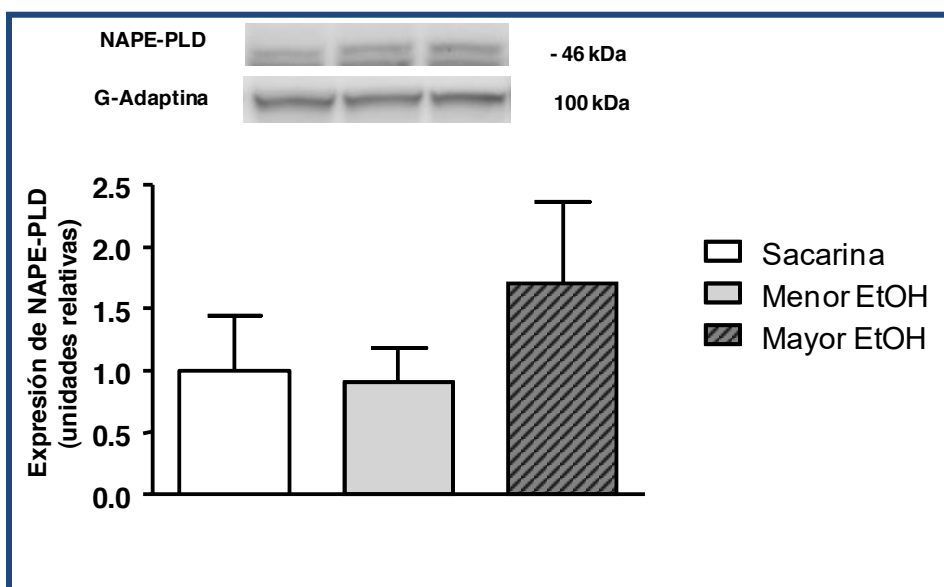


Figura 21. Nivel de proteína de la enzima NAPE-PLD en el intestino de ratas expuestas a auto-administración de alcohol divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración. Los resultados se expresan como datos

relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, n=7-8). Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.1.5.3. ENZIMA DE DEGRADACIÓN: FAAH

Como se observa en la **Figura 22**, el ANOVA mostró un efecto significativo *la tasa de auto-administración* ($F_{2,21}$ 6.51, $p=0.0063$) sobre los niveles de proteína de la enzima FAAH. Así, el análisis *post-hoc* reveló cambios significativos sólo en las ratas con una mayor tasa de auto-administración, con una disminución significativa en comparación al grupo con baja tasa de auto-administración (** $p<0.01$).

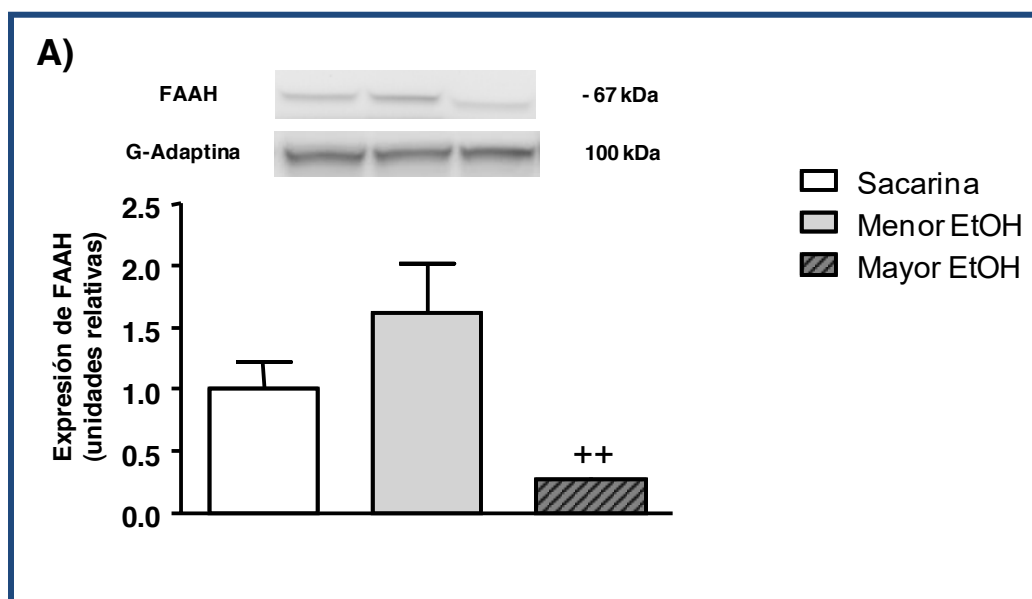


Figura 22. Nivel de proteína de la enzima FAAH en el intestino de ratas expuestas a auto-administración de alcohol divididas en subgrupos según la tasa de auto-administración. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, n=7-8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (++) $p<0.01$ indica diferencias significativas frente al grupo menor EtOH.

5.2. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL EN ATRACÓN O *BINGE* SOBRE EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (SEC) PERIFÉRICO

En este estudio se muestran los efectos de un consumo en atracón ("*binge drinking*") agudo o repetido sobre el SEC en el hígado e intestino de ratas adultas. Para ello, hemos utilizado un modelo de atracón forzado mediante la administración oral de 3 g/kg de una solución de etanol al 25% en agua 1, 4 u 8 veces (**Figura 1**).

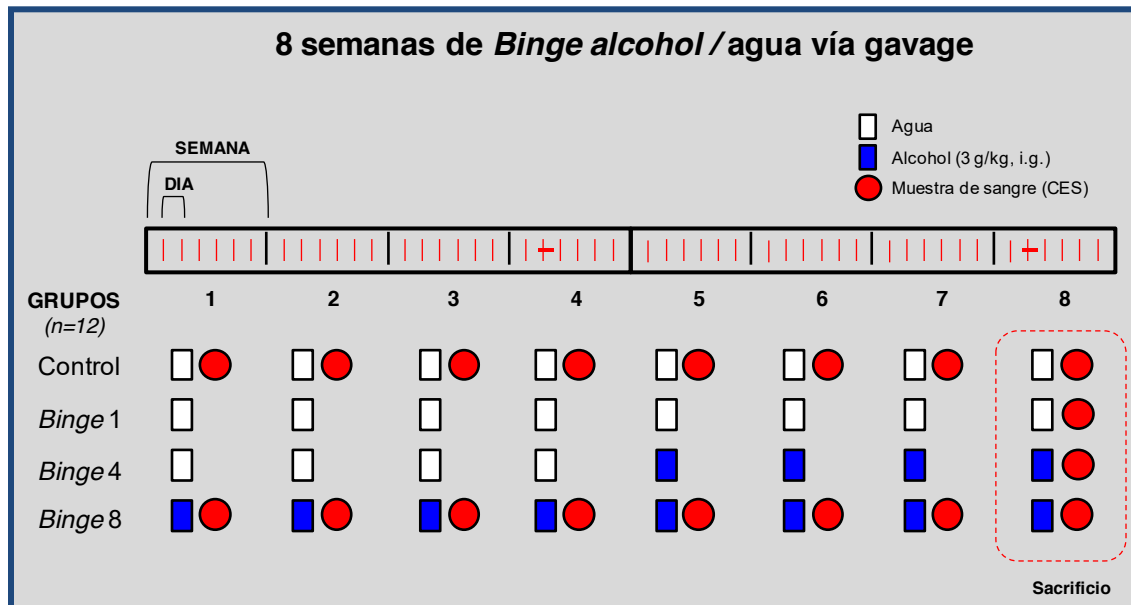


Figura 1. Esquema del procedimiento de consumo en atracón mediante administración de 3 g/kg de etanol vía intragástrica. Finalmente, los animales quedaron distribuidos en 4 grupos experimentales, en función del número de atracones de alcohol recibidos: grupo control (sólo recibió agua), grupo *binge 1* (recibió una única dosis de etanol), grupo *binge 4* (recibió una dosis de etanol por semana durante 4 semanas) y grupo *binge 8* (recibió una dosis de etanol por semana durante 8 semanas).

5.2.1. CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN SANGRE: CONSUMO EN ATRACÓN DE ALCOHOL CRÓNICO

Tras como indica la Figura 1, al grupo *binge 8* se le tomaron muestras de sangre semanalmente a diferentes tiempos (1, 2, 3 y 4 horas) tras la administración de alcohol. Este protocolo se llevó a cabo todas las semanas, excepto la última, ya que los animales fueron sacrificados a las 2 horas de la administración de alcohol.

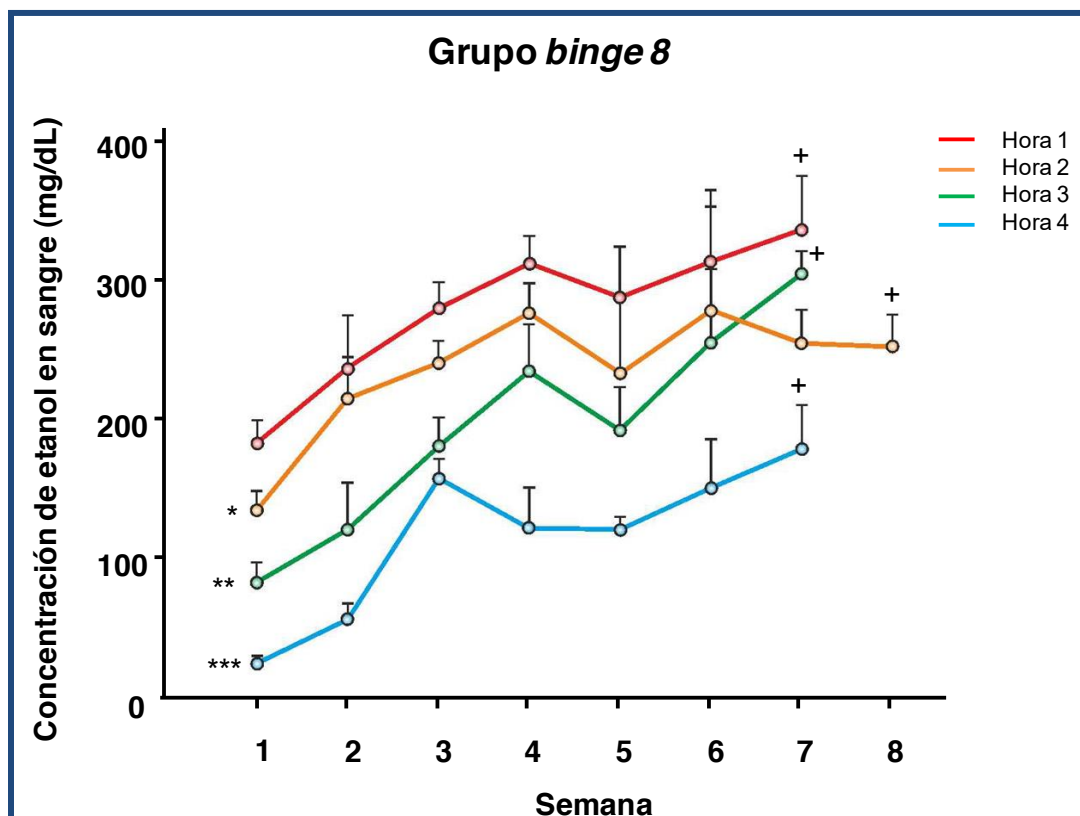


Figura 2. Concentración de etanol en sangre durante las 4h post-administración de alcohol (3 g/kg) una vez a la semana durante 8 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM (n=6 animales por grupo). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$ indica diferencias significativas frente a la hora 1. (+) $p < 0.05$ indica diferencias significativas frente a la primera semana.

Como se muestra en la **Figura 2**, el análisis estadístico reveló un efecto significativo del factor *tiempo de exposición* (semanas de consumo en atracón) ($F_{6,108}=13.27$, $p < 0.001$) y del factor *tiempo de toma de muestra* (1, 2, 3 ó 4 horas) ($F_{3,18}=15.46$, $p < 0.001$). De hecho, la concentración de etanol en sangre alcanzó el máximo durante la primera hora tras el atracón, disminuyendo progresivamente y de forma significativa en las siguientes horas (2h: * $p < 0.05$; 3h: ** $p < 0.01$; 4h: *** $p < 0.001$). Además, el atracón crónico durante 8 semanas produjo un incremento significativo de la concentración de etanol en sangre, independientemente de la hora de la toma de la muestra (# $p < 0.05$).

5.2.2. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL EN ATRACÓN SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SEC EN EL HÍGADO

El patrón de consumo de alcohol en atracón afectó la expresión génica de ciertos componentes del SEC en el hígado de rata. Para esta evaluación se seleccionaron los

receptores cannabinoides (CB₁ y CB₂), el receptor nuclear PPAR- α , el receptor del ácido lisofosfatídico LPA₁, las enzimas implicadas en la biosíntesis de endocannabinoides y otros derivados lipídicos [N-acil-fosfatidiletanolamina/fosfolipasa D (NAPE-PLD) y diacilglicerol lipasa subtipos α y β (DAGL- α y DAGL- β)], enzimas de degradación [amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MGL)] y, finalmente, la translocasa de ácidos grasos FAT/CD36.

5.2.2.1. RECEPTORES CANNABINOIDES CB₁ Y CB₂

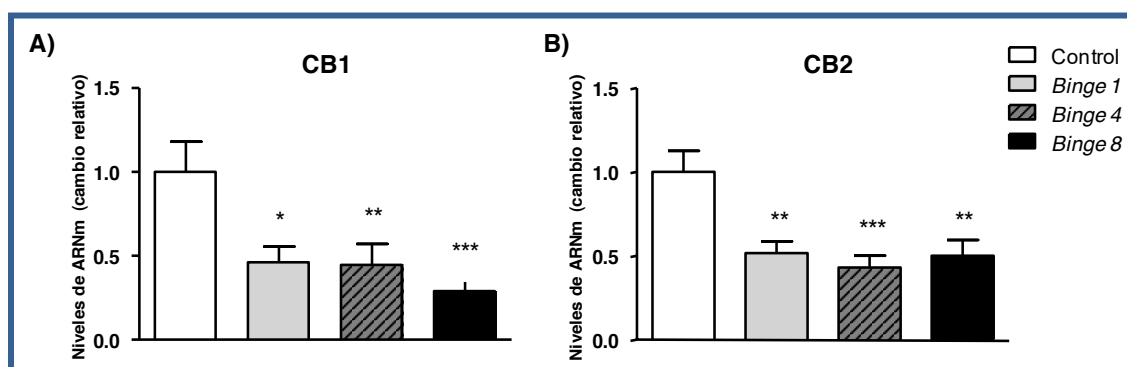


Figura 3. Niveles de ARNm de los receptores CB₁ (A) y CB₂ (B) en el hígado de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracción agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=11-12). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

Como se observa en la **Figura 3A**, el ANOVA mostró un efecto significativo del *consumo de alcohol en atracción* ($F_{3,41}=6.28$, $p = 0.001$) sobre los niveles de ARNm del receptor CB₁. Así, la expresión relativa de CB₁ disminuyó de forma significativa en comparación al grupo control en función del número de veces que los animales habían recibido una dosis de alcohol (*binge 1*: * $p < 0.05$; *binge 4*: ** $p < 0.01$; *binge 8*: *** $p < 0.001$).

Respecto a los niveles de ARNm del receptor CB₂ (**Figura 3B**), el ANOVA mostró un efecto significativo del *consumo de alcohol en atracción* ($F_{3,41}=7.92$, $p = 0.0003$). En este caso, la expresión relativa de CB₂ disminuyó de forma significativa en todos los grupos expuestos a alcohol en comparación al grupo control (*binge 1* y *8*: ** $p < 0.01$; *binge 4*: *** $p < 0.001$).

5.2.2.2. RECEPTORES NUCLEARES PPAR- α

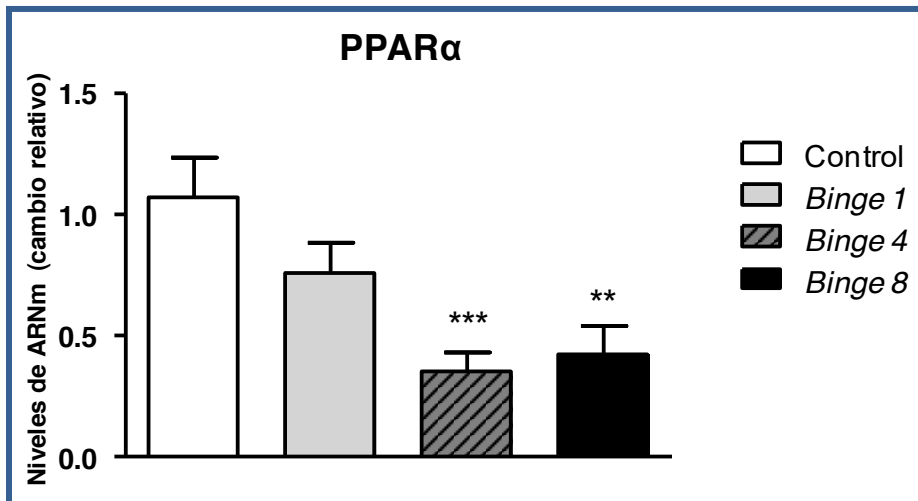


Figura 4. Niveles de ARNm del receptor nuclear PPAR- α en el hígado de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=11-12). Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

Los niveles de ARNm del receptor nuclear PPAR- α fueron significativamente afectados por el consumo de alcohol en atracón (KW 20.07, p 0.0002) (**Figura 4**). Así, el análisis *post-hoc* reveló cambios significativos sólo en las ratas expuestas a repetidos atracones, con una disminución significativa en comparación al grupo control (*binge 4*: *** $p < 0.001$; *binge 8*: ** $p < 0.01$).

5.2.2.3. RECEPTOR DEL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO LPA₁

Como se observa en la **Figura 5**, el ANOVA mostró un efecto significativo del consumo de alcohol en atracón ($F_{3,43} = 3.62$, p 0.020) sobre los niveles de ARNm del receptor LPA₁. Así, aunque se observó una disminución en la expresión relativa de este receptor en los animales expuestos a un consumo en atracón repetido en comparación al grupo control, esta disminución sólo fue significativa en el grupo *binge 4* (* $p < 0.05$).

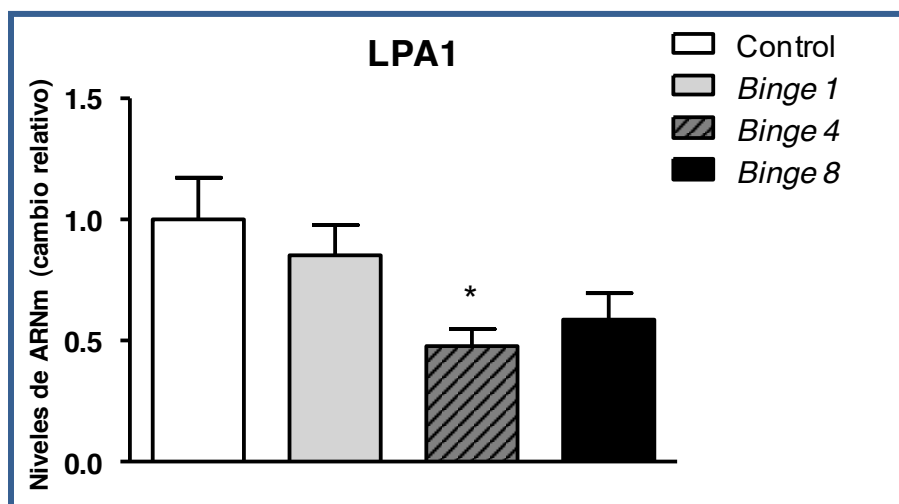


Figura 5. Niveles de ARNm del receptor LPA₁ en el hígado de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=11-12). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

5.2.2.4. ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS NAPE-PLD Y DAGL- α/β

La **Figura 6A** muestra la expresión del ARNm de NAPE-PLD, enzima implicada en la biosíntesis de las aciletanolamidas. El análisis no paramétrico reveló un efecto significativo por el *consumo de alcohol en atracón* (KW 14.27, p 0.0026). Así, el análisis *post-hoc* reveló cambios significativos sólo en las ratas expuestas a repetidos atracones, con una disminución significativa en comparación al grupo control (*binge 4*: *** $p < 0.001$; *binge 8*: * $p < 0.05$).

Las enzimas DAGL- α y DAGL- β participan en la síntesis de 2-AG y sus niveles de ARNm están representados en las **Figuras 6B** y **6C**, respectivamente. El análisis estadístico mostró un efecto significativo por el *consumo de alcohol en atracón*, tanto sobre la expresión de ARNm de DAGL- α ($F_{3,43}=3.50$, $p=0.0234$) como de DAGL- β (KW 11.88, p 0.0078). En ambos casos, se observó una disminución significativa en la expresión relativa de estas enzimas en los animales expuestos a un consumo en atracón repetido en comparación al grupo control (* $p < 0.05$).

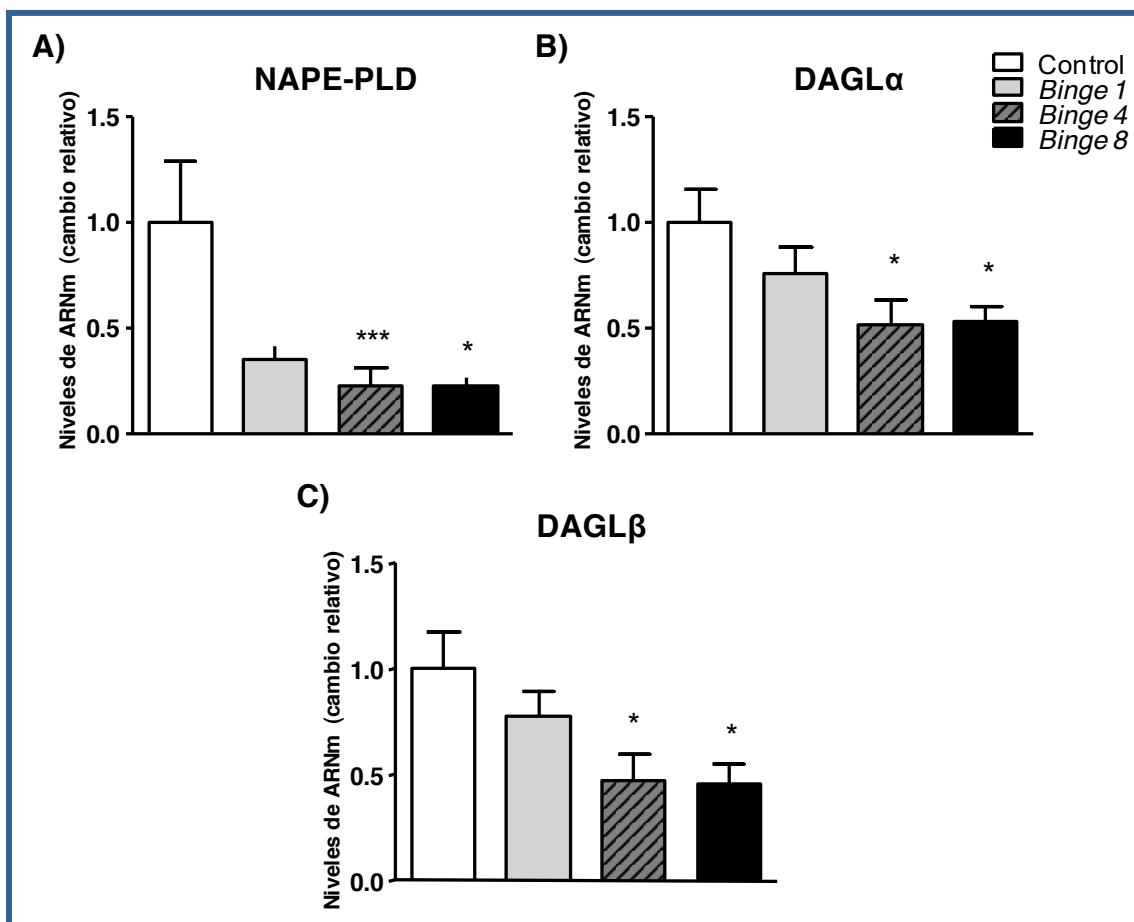


Figura 6. Niveles de ARNm de las enzimas NAPE-PLD (A), DAGL- α (B) y DAGL- β (C) en el hígado de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=11-12). Según la normalidad, los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía o mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, seguido de la correspondiente prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$ y (***) $p < 0.001$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

5.2.2.5. ENZIMAS DE DEGRADACIÓN FAAH Y MGL

La **Figura 7A** muestra la expresión del ARNm de FAAH, enzima implicada en la degradación de las aciletanolamidas. El ANOVA mostró un efecto significativo del *consumo de alcohol en atracón* ($F_{3,42}=5.64$, p 0.0024). Así, la expresión relativa de esta enzima disminuyó de forma significativa en los grupos expuestos a repetidos atracones de alcohol en comparación al grupo control (** $p < 0.01$).

La **Figura 7B** muestra la expresión del ARNm de MGL, enzima que participa en la degradación del 2-AG. El ANOVA mostró un efecto significativo del *consumo de alcohol en atracón* ($F_{3,43}=4.69$, p 0.0064). En cuanto a las comparaciones múltiples, la prueba *post-hoc*

señaló una disminución significativa de los niveles de ARNm en todos los grupos expuestos a alcohol en comparación al grupo control (*binge 1 y 8: * $p < 0.05$; binge 4: ** $p < 0.01$*).

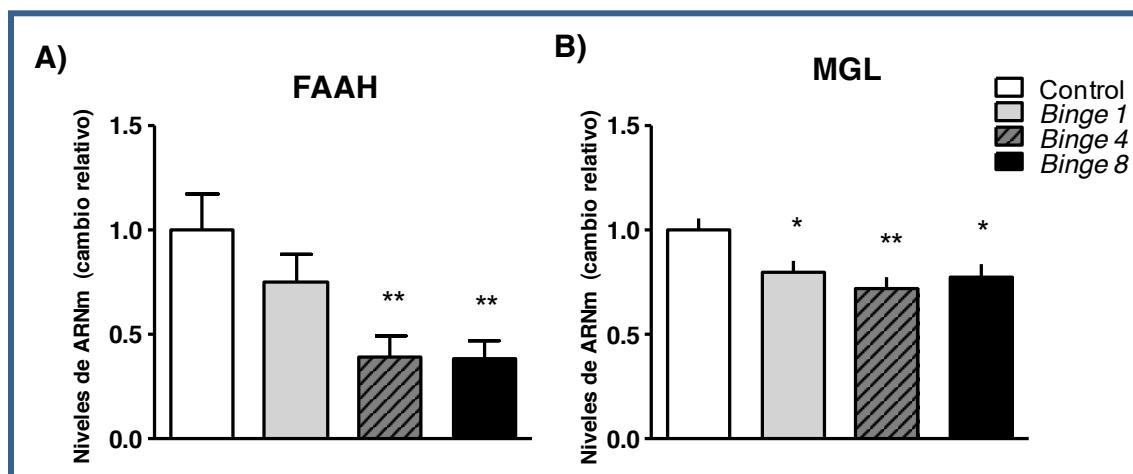


Figura 7. Niveles de ARNm de las enzimas FAAH (A) y MGL (B) en el hígado de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracción aguda (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=11-12). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

5.2.2.6. TRANSLOCASA DE ÁCIDOS GRASOS FAT/CD36

El nivel de ARNm de la translocasa FAT/CD36 está representado en la **Figura 8**. El análisis no paramétrico reveló un efecto significativo por el *consumo de alcohol en atracción* (KW 11.88, p 0.0078). Así, el análisis *post-hoc* reveló cambios significativos sólo en las ratas expuestas a repetidos atracones, con una disminución significativa en comparación al grupo control (* $p < 0.05$).

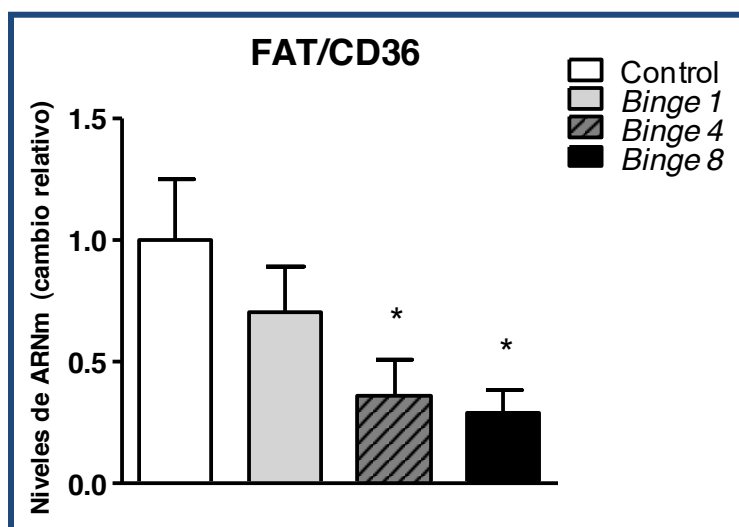


Figura 8. Niveles de ARNm de FAT/CD36 en el hígado de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=11-12). Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

5.2.3. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL EN ATRACÓN SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SEC EN EL INTESTINO

Para evaluar si el patrón de consumo de alcohol en atracón afectaba a otros órganos periféricos, se llevó a cabo en intestino el mismo estudio realizado en hígado. Al igual que en el apartado anterior de resultados, en este caso se analizó la expresión de ARNm de los receptores CB₁, CB₂, PPAR- α y LPA₁; de las enzimas de biosíntesis NAPE-PLD, DAGL- α y DAGL- β , de las enzimas de degradación FAAH y MGL; y de la translocasa FAT/CD36.

5.2.3.1. RECEPTORES CANNABINOIDES CB₁ Y CB₂

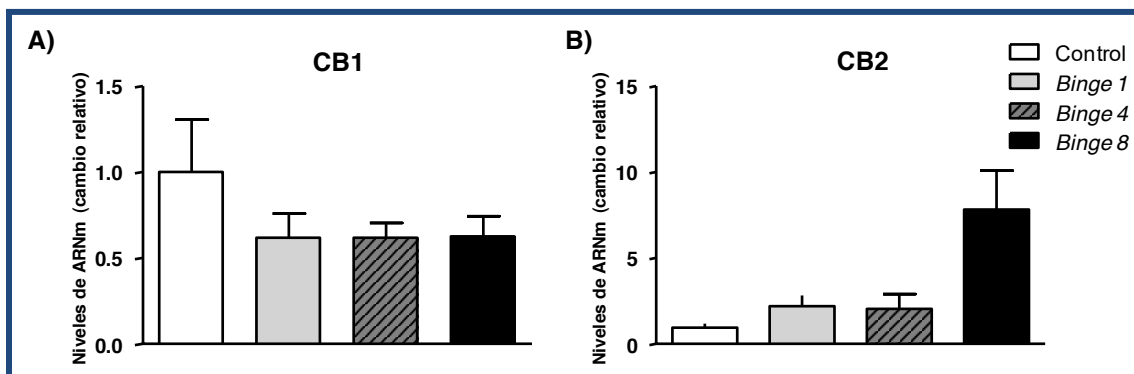


Figura 9. Niveles de ARNm de los receptores CB₁ (A) y CB₂ (B) en el intestino de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=11-12). Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

A diferencia de lo que observamos en el hígado, los niveles de ARNm de los receptores cannabinoides no se vieron afectados en el intestino por el *consumo de alcohol en atracón* (Figura 9).

5.2.3.2. RECEPTORES NUCLEARES PPAR- α

Como se observa en la Figura 10, el ANOVA mostró un efecto significativo del *consumo de alcohol en atracón* ($F_{3,42}=6.98$, $p = 0.0007$) sobre los niveles de ARNm del receptor PPAR- α .

Así, el análisis *post-hoc* reveló cambios significativos sólo en las ratas expuestas a repetidos atracones, con una disminución significativa en comparación al grupo control (*binge 4*: *** $p<0.001$; *binge 8*: ** $p<0.01$).

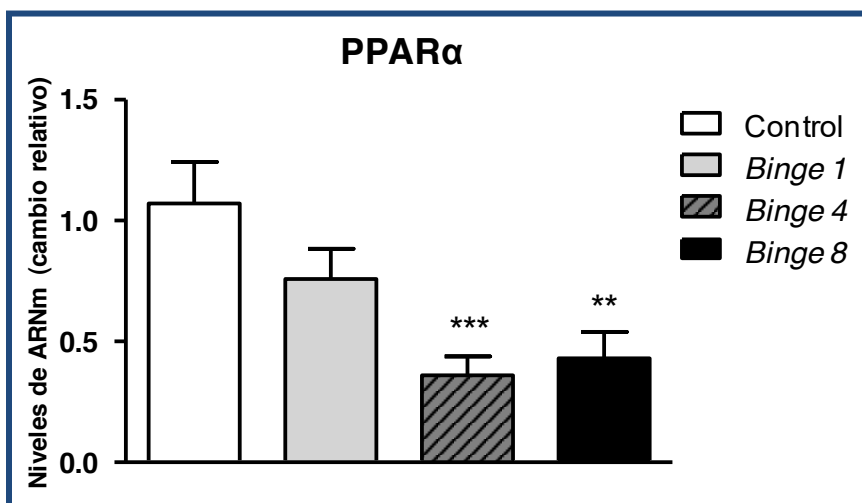


Figura 10. Niveles de ARNm del receptor nuclear PPAR- α en el intestino de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, $n=11-12$). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (**) $p<0.01$ y (***) $p<0.001$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

5.2.3.3. RECEPTOR DEL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO LPA₁

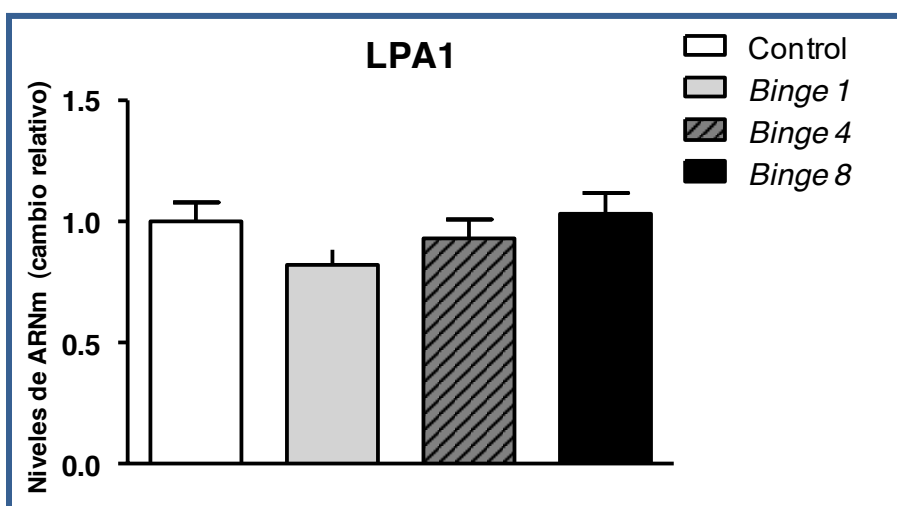


Figura 11. Niveles de ARNm del receptor LPA₁ en el intestino de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, $n=11-12$). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

Como se observa en la **Figura 11**, los niveles de ARNm del receptor LPA₁ no se vieron afectados en el intestino por el *consumo de alcohol en atracón*.

5.2.3.4. ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS NAPE-PLD Y DAGL- α/β

Los niveles de ARNm de las enzimas de biosíntesis no se vieron afectados por el *consumo de alcohol en atracón* (**Figura 12**).

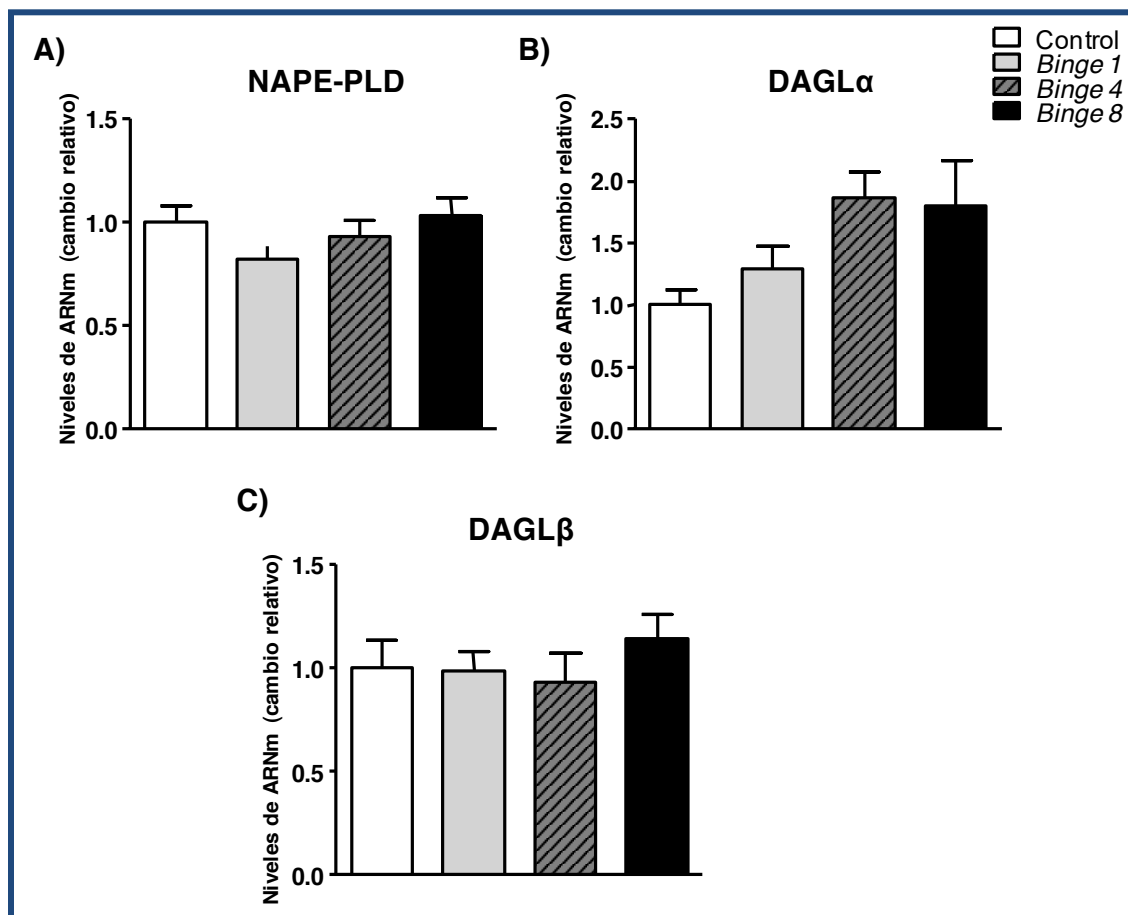


Figura 12. Niveles de ARNm de las enzimas NAPE-PLD (A), DAGL α (B) y DAGL β (C) en el intestino de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=11-12). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.2.3.5. ENZIMAS DE DEGRADACIÓN FAAH Y MGL

Igualmente, los niveles de ARNm de las enzimas de degradación no se vieron afectados por el *consumo de alcohol en atracón* (**Figura 13**).

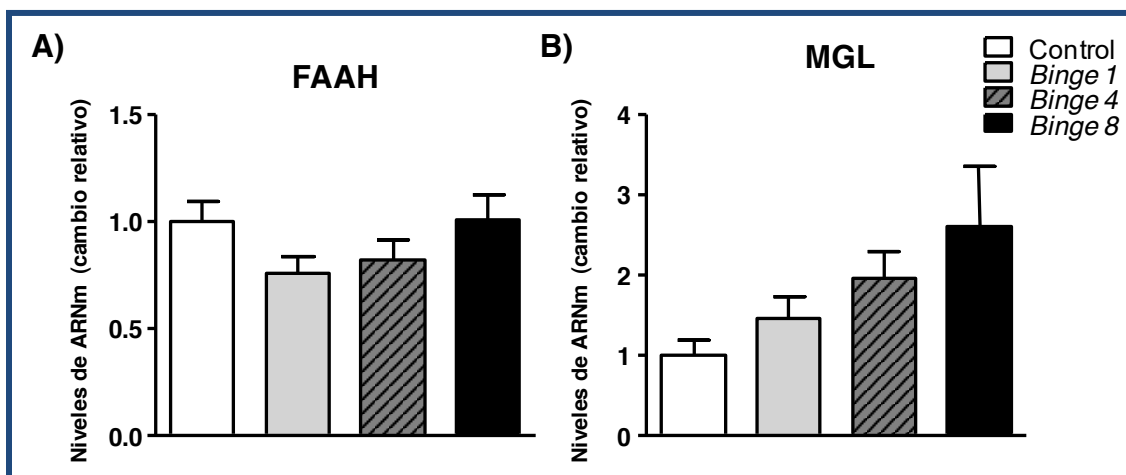


Figura 13. Niveles de ARNm de las enzimas FAAH (A) y MGL (B) en el intestino de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=11-12). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.2.3.6. TRANSLOCASA DE ÁCIDOS GRASOS FAT/CD36

El nivel de ARNm de la translocasa FAT/CD36 está representado en la **Figura 14**. El ANOVA mostró un efecto significativo del *consumo de alcohol en atracón* ($F_{3,43}=3.30$, p 0.0292) sobre los niveles de ARNm de FAT/CD36 en intestino. A diferencia de los diferentes ARNm evaluados en hígado e intestino, éste fue el único que aumentó en los animales expuestos al alcohol, siendo este aumento significativo en el caso del grupo que recibió alcohol en atracón de forma aguda (** $p<0.01$).

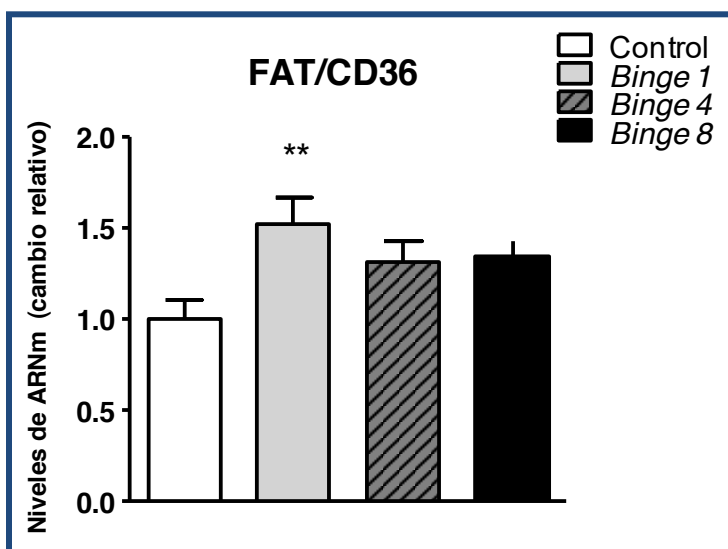


Figura 14. Niveles de ARNm de FAT/CD36 en el intestino de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a

la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=11-12). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (**) $p < 0.01$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

5.2.4. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL EN ATRACÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SEC EN EL HÍGADO E INTESTINO

Puesto que observamos cambios en la expresión del ARNm de algunos receptores y enzimas metabólicas relacionadas con el SEC, a continuación evaluamos si la expresión de proteína también estaba alterada en el hígado e intestino de los animales que recibieron alcohol en forma de atracón.

5.2.4.1. RECEPTORES: CB₂ Y PPAR- α

En el hígado, la expresión de proteína de los receptores CB₂ y PPAR- α (**Figura 15**) no se vio afectada por el *consumo de alcohol en atracón*.

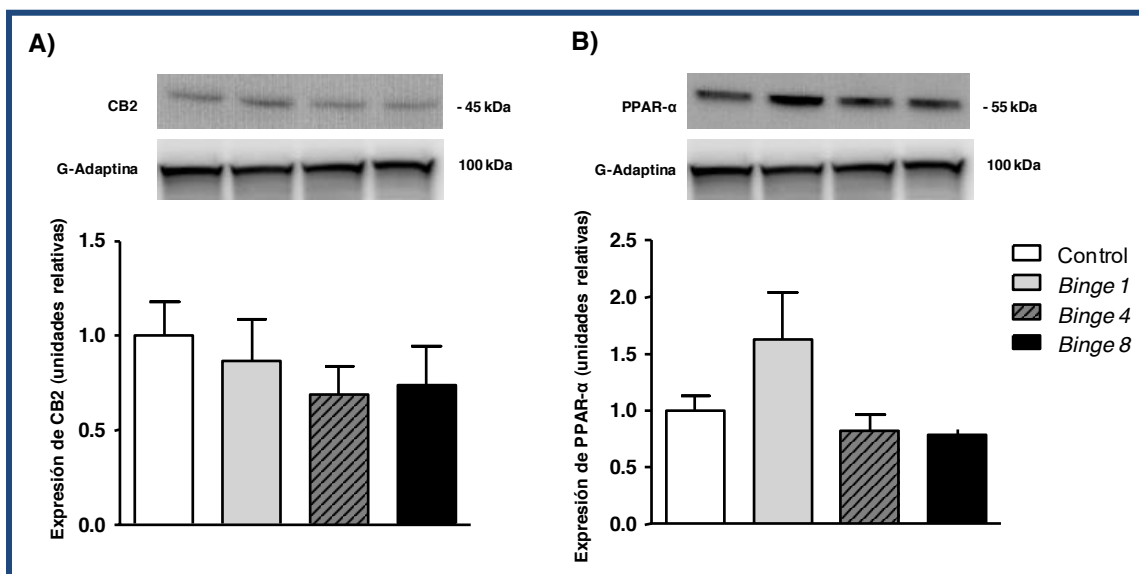


Figura 15. Nivel de proteína de los receptores CB₂ (A) y PPAR- α (B) en el hígado de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, n=8). Según la normalidad, los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía o mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, seguido de la correspondiente prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

Por el contrario, la expresión de proteína de estos receptores si estaba alterada en el intestino de las ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón (**Figura 16**). Como se observa en la **Figura 16A**, el ANOVA mostró un efecto significativo del *consumo de alcohol*

en atracción ($F_{3,17}=4.31$, p 0.0196) sobre los niveles de proteína del receptor CB_2 . No obstante, el análisis *post-hoc* reveló cambios significativos sólo en las ratas del grupo *binge* 4, con un incremento significativo en comparación a los controles ($*p<0.05$). Respecto a la expresión de la proteína del receptor nuclear PPAR- α (Figura 16B), el ANOVA indicó que no existía un efecto principal del consumo de alcohol en atracción.

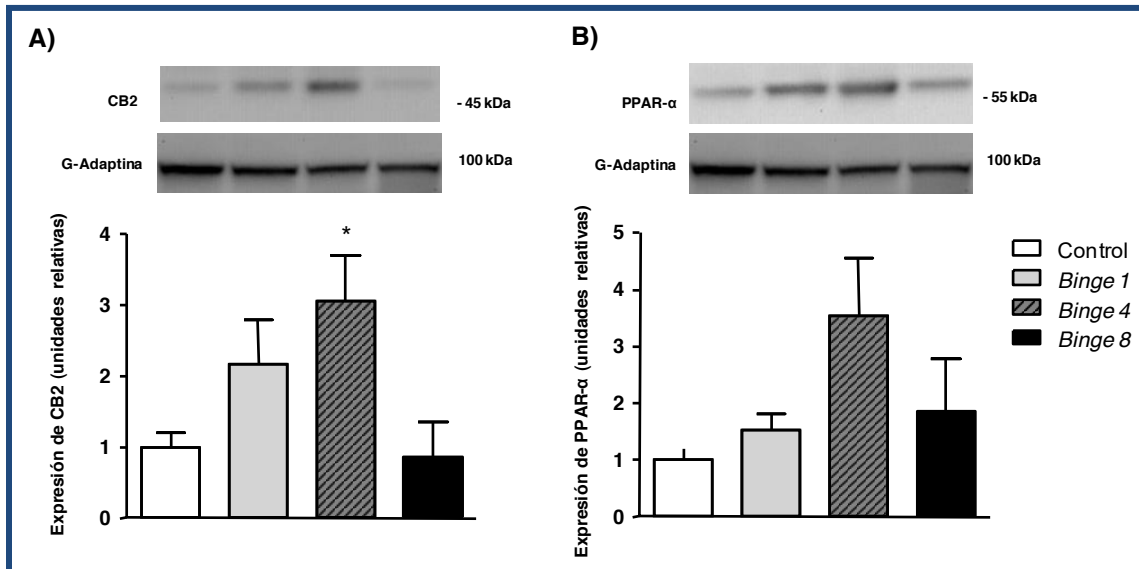


Figura 16. Nivel de proteína de los receptores CB_2 (A) y PPAR- α (B) en el intestino de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracción agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, $n=5-6$). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p<0.05$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

5.2.4.2. ENZIMA DE BIOSÍNTESIS: NAPE-PLD

El nivel de proteína de la enzima de biosíntesis NAPE-PLD no se vio afectado ni en hígado (Figura 17A) ni en intestino (Figura 17B).

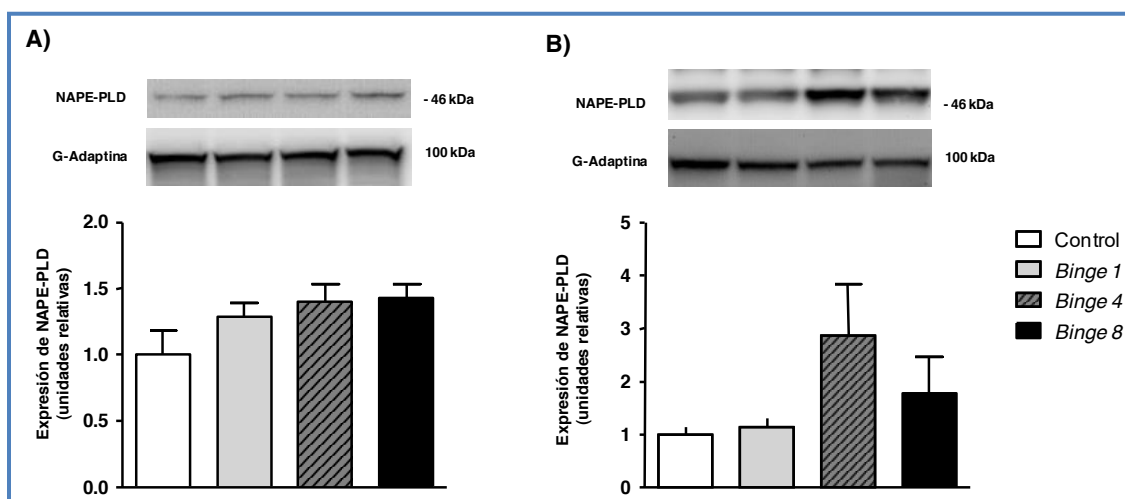


Figura 17. Nivel de proteína de la enzima NAPE-PLD en hígado (A) e intestino (B) de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, n=5-6). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.2.4.3. ENZIMAS DE DEGRADACIÓN: FAAH Y MGL

En hígado, la expresión de proteína de las enzimas FAAH y MGL están representados en las **Figuras 18A** y **18B**, respectivamente. Mientras que el análisis estadístico no mostró ningún efecto sobre el nivel de FAAH, sí que observamos un efecto significativo del *consumo de alcohol en atracón* sobre la expresión proteica de MGL ($F_{3,28}=4.55$, p 0.0101). Atendiendo al análisis *post-hoc*, el nivel de proteína de MGL en las ratas del grupo que había recibido un mayor número de atracones de alcohol fue significativamente más alto respecto al grupo control (** $p<0.01$).

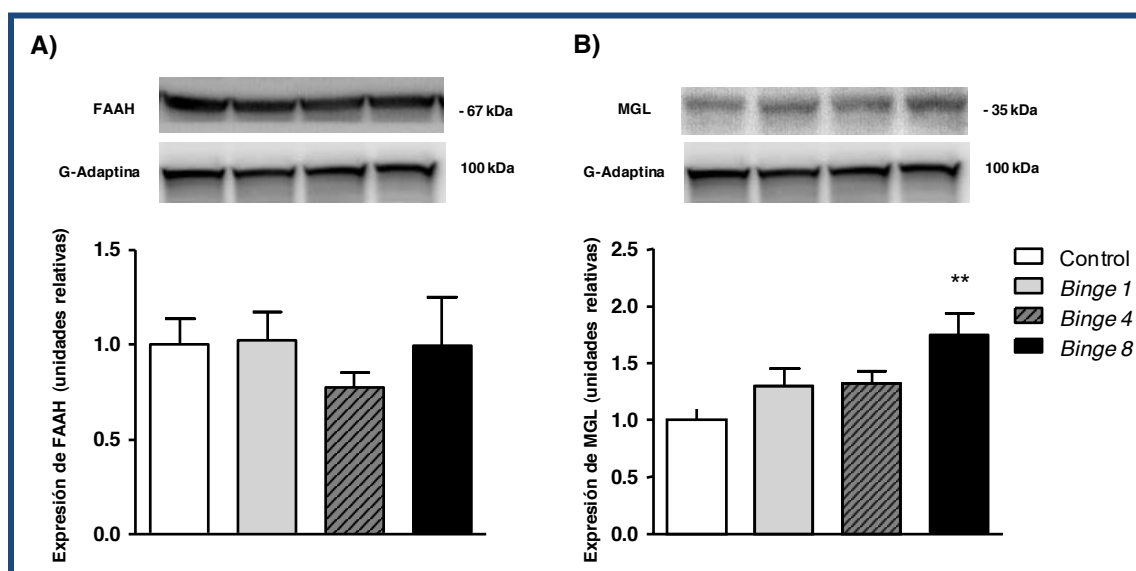


Figura 18. Nivel de proteína de la enzima FAAH (A) y MGL (B) en el hígado de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, n=8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (**) $p<0.01$ indica diferencias significativas frente al grupo control.

Por el contrario, la expresión de proteína de estas enzimas no estaba alterada en el intestino de las ratas expuestas al *consumo de alcohol en atracón* (**Figura 19**).

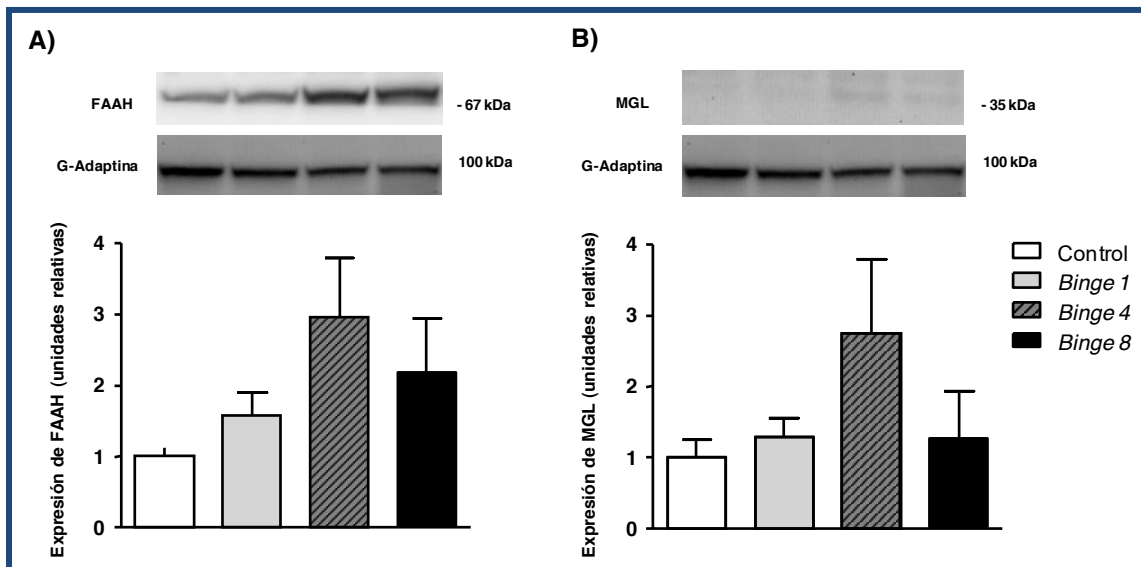


Figura 19. Nivel de proteína de la enzima FAAH (A) y MGL (B) en el intestino de ratas expuestas al consumo de alcohol en atracón agudo (1 administración) o repetido (4 u 8 administraciones). Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión de la proteína constitutiva (media \pm EEM, n=5-6). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.3. EFECTOS DEL CONSUMO MODERADO DE ALCOHOL DURANTE LA ADOLESCENCIA SOBRE EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (SEC) PERIFÉRICO

En este estudio se muestran los efectos de un consumo moderado de alcohol durante la adolescencia sobre el SEC en el bazo de ratas adultas de ambos sexos, así como sobre mediadores inflamatorios circulantes. Para ello, hemos utilizado un procedimiento experimental de “*drinking in the dark*” (DID) de 4 semanas como modelo de exposición forzada e intermitente a alcohol durante el período de adolescencia (**Figura 1**).

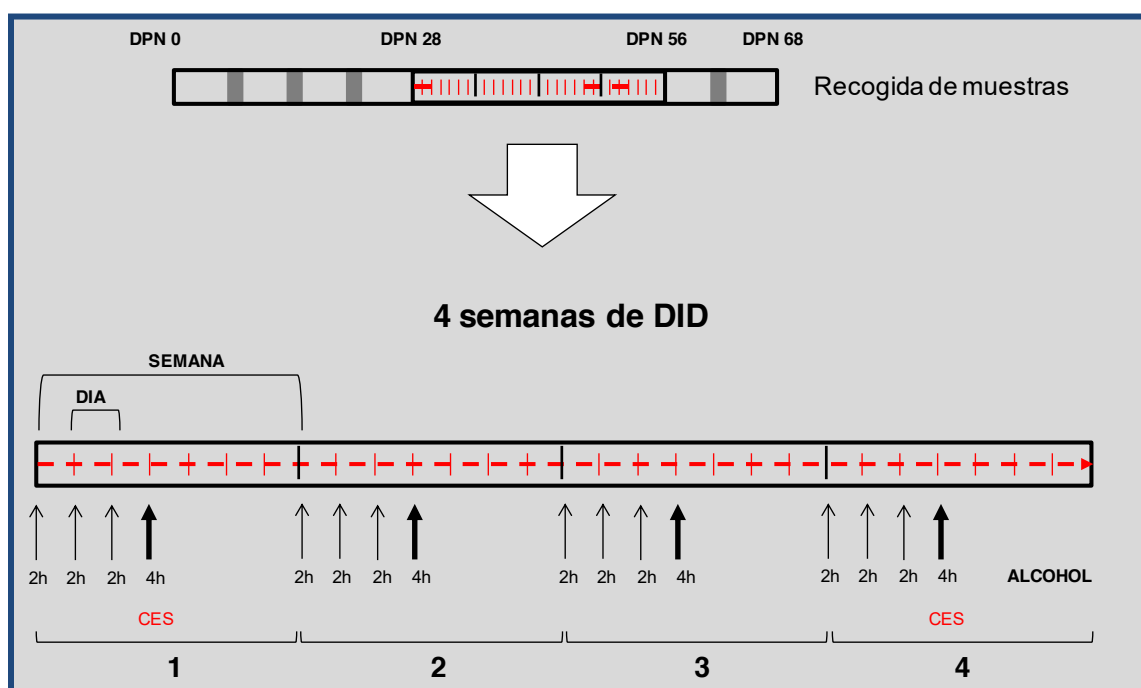


Figura 1. Esquema del procedimiento de DID utilizado en ratas adolescentes [inicio en el día postnatal (DPN) 28]. Durante 4 semanas, los animales fueron expuestos a una única botella con etanol (20%, v/v) (grupo alcohol) o con agua (grupo control) durante 4 días consecutivos 1h después del inicio del ciclo oscuro. Durante los tres primeros días de cada semana, el acceso al alcohol estuvo limitado a 2h, mientras que el cuarto día el tiempo de exposición fue de 4h. Abreviaturas: CES: concentración de etanol en sangre; DID: *drinking in the dark*.

5.3.1. CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN SANGRE: CONSUMO MODERADO DE ALCOHOL

Siguiendo el diseño experimental de DID descrito en la **Figura 1**, encontramos concentraciones de etanol en sangre crecientes a lo largo de las semanas. Durante la primera semana de exposición, la concentración de etanol en las ratas hembras tras la última sesión de DID (DPN 31) fue 11.97 ± 4.28 mg/dL, mientras que en los machos alcanzó

un valor de 10.99 ± 1.18 mg/dL. Estas concentraciones aumentaron al finalizar la última sesión de DID en la cuarta semana de exposición a alcohol (DPN 52), de modo que las ratas hembras alcanzaron concentraciones de etanol en sangre de 29.34 ± 3.92 mg/dL y los machos 28.26 ± 2.20 mg/dL.

El análisis estadístico reveló un efecto significativo del factor *tiempo de exposición* (número total de sesiones de DID) ($F_{1,28}=30.06$, $p<0.001$), pero no se observó un efecto del factor *sexo* (hembras y machos). De hecho, se observó un incremento significativo de la concentración de etanol en sangre, tanto en ratas hembras como en machos, en el DPN 52 en comparación a los niveles obtenidos en el DPN 31 (** $p<0.01$).

Estos datos indicaron un grado de consumo moderado de alcohol al finalizar el procedimiento de DID.

5.3.2. EFECTOS DEL CONSUMO MODERADO DE ALCOHOL DURANTE LA ADOLESCENCIA SOBRE PARÁMETROS BIOLÓGICOS EN PLASMA E HÍGADO

En primer lugar, se caracterizó el estado metabólico de estos animales mediante una valoración en plasma de la concentración de diferentes parámetros relacionados con el metabolismo energético y la toxicidad. Los parámetros evaluados fueron:

- Glucosa
- Triglicéridos
- Colesterol y colesterol de alta densidad (HDL-C, del inglés *High-density lipoprotein cholesterol*)
- Urea y ácido úrico
- Creatinina
- Transaminasa glutámico oxalacética (GOT, del inglés *Glutamate-oxaloacetate transaminase*)
- Transaminasa glutámico pirúvica (GPT, del inglés *Glutamate-pyruvate transaminase*)
- Gamma glutamil transpeptidasa (GGT, del inglés *Gamma glutamyl transpeptidase*)

Complementariamente a este análisis plasmático, se cuantificó el contenido de grasa hepática para evaluar el grado de daño hepático inducido por el patrón de consumo.

Como se muestra en la **Tabla 1**, las exposiciones repetidas de DID durante la adolescencia no afectaron a ninguno de los parámetros bioquímicos analizados respecto a ratas control expuestas a agua. Tampoco se observó cambios en el contenido de grasa hepática entre los diferentes grupos.

Parámetro	Hembras		Machos	
	Control	Alcohol	Control	Alcohol
Glucosa (mg/dL)	165.13±8.64	159.88±7.88	174.88±6.00	167.28±3.82
Triglicéridos (mg/dL)	208.63±26.50	246.00±31.65	246.00±31.65	255.50±28.45
Colesterol (mg/dL)	88.63±6.78	85.13±4.64	97.50±6.93	95.75±4.73
HDL-C (mg/dL)	38.93±2.18	38.48±2.46	45.33±3.73	41.99±2.91
Urea (mg/dL)	54.61±2.41	52.16±3.46	54.74±2.53	58.10±7.12
Ácido úrico (mg/dL)	2.54±0.19	2.56±0.16	2.38±0.20	2.22±0.16
Creatinina (mg/dL)	0.48±0.03	0.48±0.05	0.49±0.05	0.53±0.05
GOT (U/L)	339.88±34.46	285.64±19.88	262.18±22.93	287.38±12.63
GPT (U/L)	83.95±4.67	84.29±6.49	93.34±7.83	88.07±2.64
GGt (U/L)	6.10±0.69	4.81±0.51	6.05±1.09	6.48±0.45
Grasa total hepática (%)	4.07±0.12	3.94±0.14	4.05±0.13	3.77±0.14
Triglicéridos hepáticos (%)	0.94±0.08	0.91±0.07	0.89±0.07	0.87±0.06

Tabla 1. Parámetros biológicos en plasma e hígado de ratas expuestas a repetidas sesiones de DID durante la adolescencia. Los valores están expresados como media ± EEM (n=8 animales por grupo). Los nombres de los parámetros se definen en el texto.

5.3.3. EFECTOS DEL CONSUMO MODERADO DE ALCOHOL DURANTE LA ADOLESCENCIA SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE PROTEÍNAS RELACIONADAS SON EL SEC EN EL BAZO

El patrón de consumo moderado de alcohol durante la adolescencia afectó la expresión génica de ciertos receptores de señales lipídicas derivadas de ácidos grasos en el bazo de ratas de ambos sexos. Para esta determinación se seleccionaron los receptores cannabinoides (CB₁ y CB₂), el receptor nuclear PPAR- α y el receptor del ácido lisofosfatídico LPA₁ como principales dianas de transmisores lipídicos.

5.3.3.1. RECEPTORES CANNABINOIDES CB₁ Y CB₂

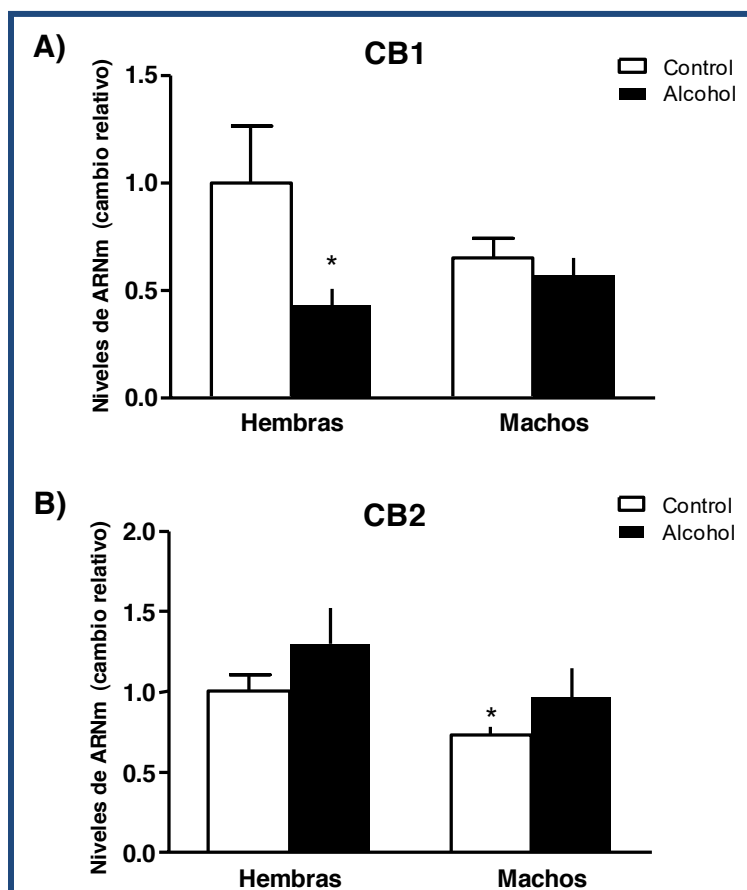


Figura 2. Niveles de ARNm del los receptores CB₁ (A) y CB₂ (B) en el bazo de ratas expuestas a alcohol durante la adolescencia y ratas controles agrupadas por sexo. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media ± EEM, n=8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (*) $p < 0.05$ indica diferencias significativas frente a ratas hembras del grupo control.

Como se observa en la **Figura 2A**, el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del factor *exposición a alcohol* ($F_{1,27}=4.459$, p 0.044) sobre los niveles de ARNm del receptor CB₁. Así, mientras se observó una disminución significativa (* $p < 0.05$) en la expresión relativa de CB₁ en las hembras del grupo alcohol en comparación a su grupo control, no hubo cambios en las ratas machos.

Respecto a los niveles de ARNm del receptor CB₂ (**Figura 2B**), el ANOVA no mostró ningún efecto significativo del factor *exposición a alcohol* o del factor *sexo*. Sin embargo, cabe destacar que análisis pareados por simples pruebas *t* de *Student* previas a la ANOVA mostraron que las ratas machos del grupo control presentaban unos niveles de ARNm más bajos que las ratas hembras controles (* $p < 0.05$).

5.3.3.2. RECEPTORES NUCLEARES PPAR- α

Los niveles de ARNm del receptor nuclear PPAR- α fueron significativamente afectados por el factor *exposición a alcohol* ($F_{1,28}=9.354$, p 0.005), que produjo una disminución general en ambos sexos (**Figura 3**). No obstante, el análisis *post-hoc* reveló cambios significativos sólo en las ratas machos del grupo alcohol, con una disminución significativa en comparación a machos controles (** $p<0.01$) y en comparación al grupo de hembras del grupo alcohol (+ $p<0.05$).

No se observaron efectos por el factor *sexo*, ni interacción *exposición a alcohol* \times *sexo*.

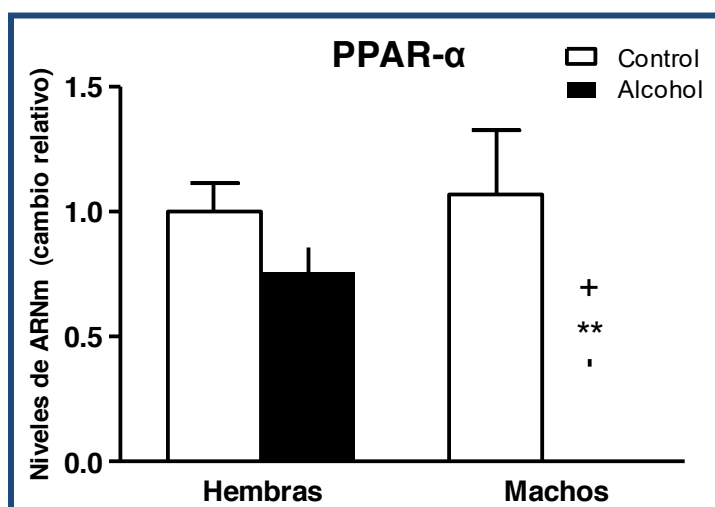


Figura 3. Niveles de ARNm del receptor nuclear PPAR- α en el bazo de ratas expuestas a alcohol durante la adolescencia y ratas controles agrupadas por sexo. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, $n=8$). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (**) $p<0.01$ indica diferencias significativas frente a ratas machos del grupo control. (+) $p<0.05$ indica diferencias significativas frente a ratas hembras del grupo alcohol.

5.3.3.3. RECEPTOR DEL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO LPA₁

A pesar de que el nivel del mensajero de este receptor parecía estar incrementado en las ratas expuestas a alcohol, el ANOVA no mostró ningún efecto significativo o interacción entre los factores de análisis *exposición a alcohol* y *sexo* (**Figura 4**).

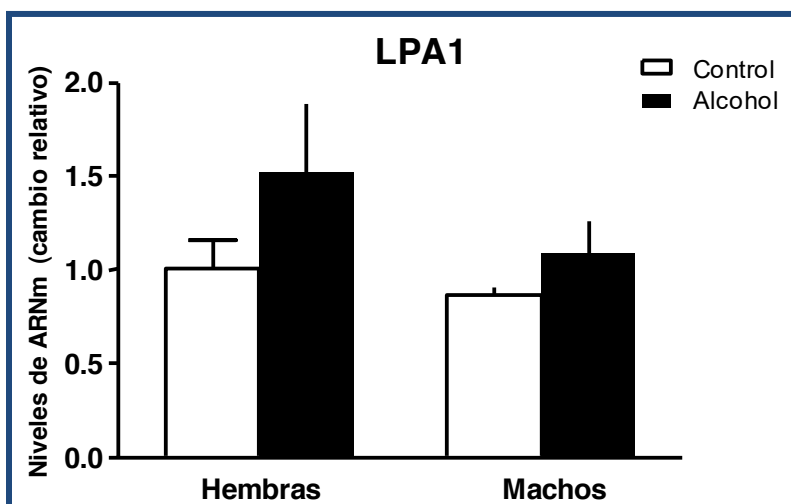


Figura 4. Niveles de ARNm del receptor LPA₁ en el bazo de ratas expuestas a alcohol durante la adolescencia y ratas controles agrupadas por sexo. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.3.4. EFECTOS DEL CONSUMO MODERADO DE ALCOHOL DURANTE LA ADOLESCENCIA SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SEC EN EL BAZO

El patrón de consumo intermitente y moderado de alcohol durante la adolescencia también alteró la expresión génica de algunas enzimas metabólicas relacionadas con el SEC en el bazo de ratas de ambos sexos. Para esta evaluación se seleccionaron las enzimas implicadas en la biosíntesis de endocannabinoides y otros derivados lipídicos [N-acil-fosfatidiletanolamina/fosfolipasa D (NAPE-PLD) y diacilglicerol lipasa subtipos α y β (DAGL- α y DAGL- β)], enzimas de degradación [amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MGL)] y, finalmente, la translocasa de ácidos grasos FAT/CD36.

5.3.4.1. ENZIMAS DE BIOSÍNTESIS NAPE-PLD Y DAGL- α/β

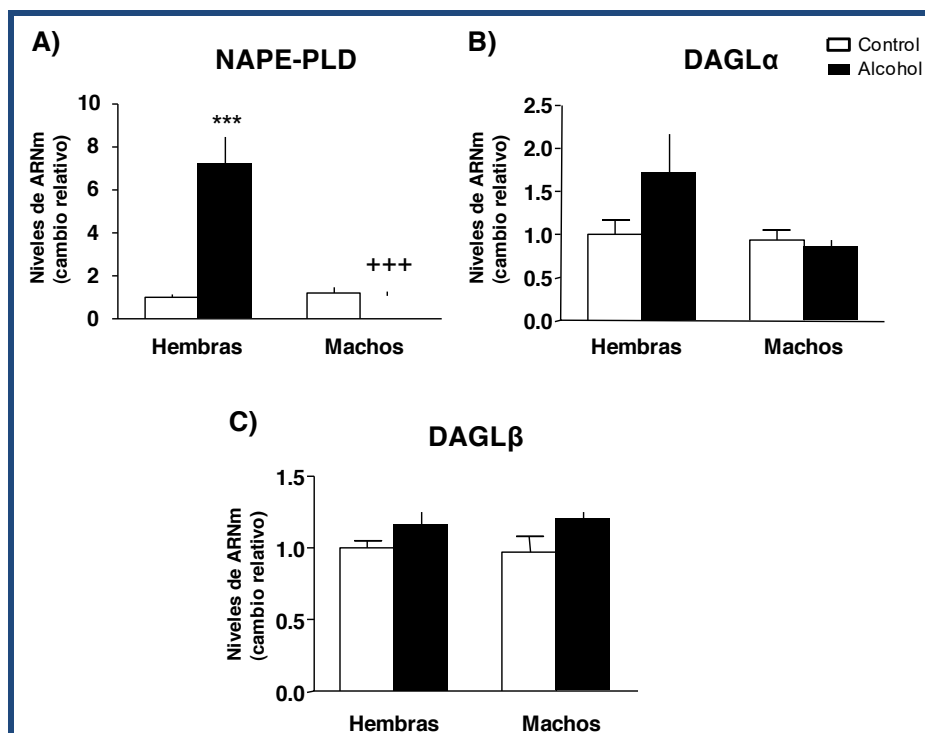


Figura 5. Niveles de ARNm de las enzimas NAPE-PLD (A), DAGL- α (B) y DAGL- β (C) en el bazo de ratas expuestas a alcohol durante la adolescencia y ratas controles agrupadas por sexo. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (***) $p < 0.001$ indica diferencias significativas frente a ratas hembras del grupo control. (+++) $p < 0.001$ indica diferencias significativas frente a ratas hembras del grupo alcohol.

La **Figura 5A** muestra la expresión del ARNm de NAPE-PLD, enzima implicada en la biosíntesis de las aciletanolamidas (por ejemplo, el endocannabinoide anandamida). El ANOVA de los niveles esplénicos de ARNm de NAPE-PLD reveló un efecto significativo por la *exposición a alcohol* ($F_{1,28}=20.13$, $p < 0.001$) y por el *sexo* ($F_{1,28}=19.10$, $p < 0.001$), además de una interacción significativa entre ambos factores ($F_{1,28}=22.34$, $p < 0.001$). En cuanto a las comparaciones múltiples, estas pruebas *post-hoc* señalaron un aumento significativo de los niveles de ARNm en ratas hembras del grupo alcohol en comparación a ratas hembras del grupo control (***) $p < 0.001$). Sin embargo, las ratas machos del grupo alcohol tenían niveles de ARNm similares a las ratas controles, y consecuentemente, inferiores a ratas hembras del grupo alcohol (+++) $p < 0.001$).

Las enzimas DAGL- α y DAGL- β participan en la síntesis del monoglicérido 2-AG y sus niveles de ARNm están representados en las **Figuras 5B** y **5C**, respectivamente. Mientras que el análisis estadístico no mostró ningún efecto de los factores evaluados sobre el nivel

de ARNm de DGL- α , sí que observamos un efecto significativo de la *exposición a alcohol* ($F_{1,28}=5.656$, p 0.024) sobre la expresión de ARNm de DGL- β , aunque el incremento observado en los niveles del mensajero en ratas del grupo alcohol no fue estadísticamente significativo en comparaciones pareadas *post-hoc* con sus respectivas ratas hembras y machos controles.

5.3.4.2. ENZIMAS DE DEGRADACIÓN FAAH Y MGL

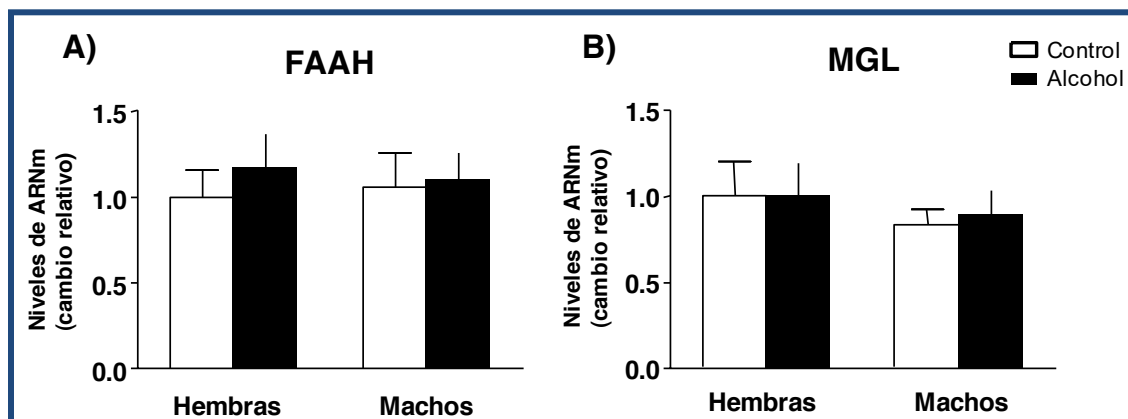


Figura 6. Niveles de ARNm de las enzimas FAAH (A) y MGL (B) en el bazo de ratas expuestas a alcohol durante la adolescencia y ratas controles agrupadas por sexo. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, $n=8$). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

Los niveles de ARNm de las enzimas de degradación no se vieron afectados por ninguno de los factores (*exposición a alcohol* o *sexo*) (**Figura 6**).

5.3.4.3. TRANSLOCASA DE ÁCIDOS GRASOS FAT/CD36

Similar a los resultados obtenidos para FAAH y MGL, el ANOVA de los niveles de ARNm de la translocasa FAT/CD36 no mostró ningún efecto significativo de la *exposición a alcohol* o *sexo*. Tampoco hubo interacción. (**Figura 7**).

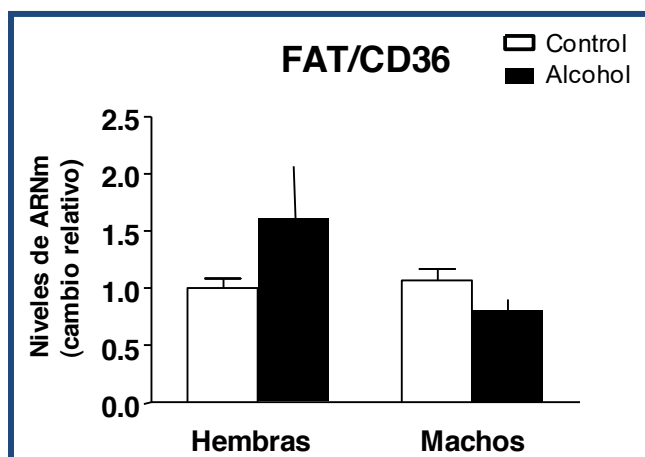


Figura 7. Niveles de ARNm de FAT/CD36 en el bazo de ratas expuestas a alcohol durante la adolescencia y ratas controles agrupadas por sexo. Los resultados se expresan como datos relativos a la expresión del gen constitutivo (media \pm EEM, n=8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones.

5.3.5. EFECTOS DEL CONSUMO MODERADO DE ALCOHOL DURANTE LA ADOLESCENCIA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE QUEMOQUINAS Y CITOQUINAS EN PLASMA

Complementario a la expresión de ARNm de proteínas relacionadas con el SEC y otros sistemas de señalización lipídicos, en este estudio se evaluó las concentraciones circulantes de quemoquinas (CCL2 y CX₃CL1) y citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) por su vinculación con procesos inflamatorios.

5.3.5.1 QUEMOQUINAS CCL2 Y CX₃CL1

Como muestra la **Figura 8A**, el ANOVA de dos vías indicó que no existía un efecto principal de la *exposición a alcohol* o el *sexo* sobre la concentración plasmática de CCL2. Por el contrario, la concentración de CX₃CL1 (**Figura 8B**) se vio significativamente afectada por el factor *sexo* ($F_{1,28}=14.19$, $p<0.001$), resultando significativamente más baja en las ratas machos en comparación a las hembras en sus respectivos grupos alcohol y control ($+p<0.05$).

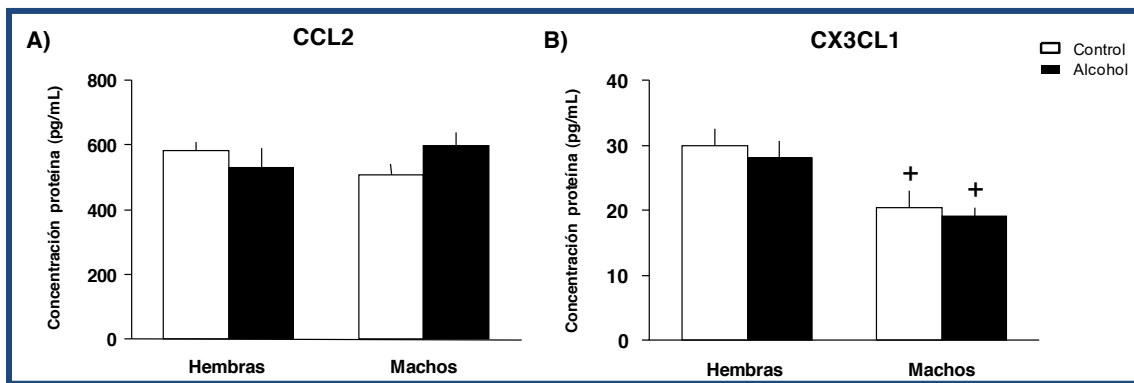


Figura 8. Niveles circulantes de las quemoquinas CCL2 (A) y CX₃CL1 (B) en ratas expuestas a alcohol durante la adolescencia y ratas controles agrupadas por sexo. Los resultados se expresan en pg/ml (media ± EEM, n=8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (+) $p < 0.05$ indica diferencias significativas frente a ratas hembras en sus respectivos grupos alcohol y control.

5.3.5.2 CITOQUINAS TNF- α , IL-1 β , IL-6 Y IL-10

La **Figura 9** muestra el efecto sobre las concentraciones de citoquinas pro y anti-inflamatorias en el plasma.

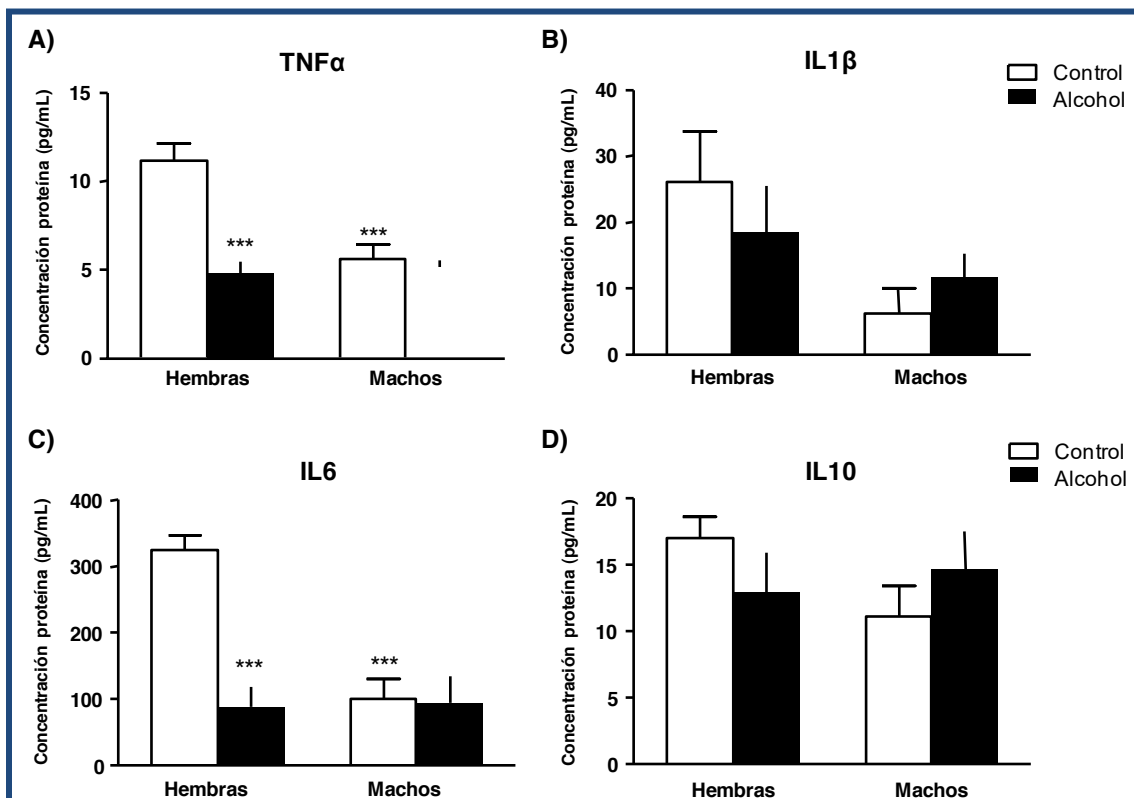


Figura 9. Concentración en plasma de las citoquinas TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) en ratas expuestas a alcohol durante la adolescencia y ratas controles agrupadas por sexo. Los resultados se expresan en pg/ml (media ± EEM, n=8). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y una prueba *post-hoc* de múltiples comparaciones. (***) $p < 0.001$ indica diferencias significativas frente a ratas hembras del grupo control.

Las concentraciones plasmáticas de TNF- α aparecen en la **Figura 9A**. El análisis estadístico reveló un efecto significativo de la *exposición a alcohol* ($F_{1,28}=19.99$, $p<0.001$) y *sexo* ($F_{1,28}=11.83$, $p=0.002$) sobre TNF- α ; además, también hubo una interacción entre ambos factores ($F_{1,28}=15.22$, $p<0.001$). Atendiendo al análisis *post-hoc*, la concentración de TNF α en las ratas hembras del grupo alcohol fue significativamente más baja respecto a su grupo control ($***p<0.001$), pero no se observó diferencias entre los machos de los grupos control y alcohol. No obstante, las ratas machos del grupo control presentaron concentraciones de TNF- α más bajas que las hembras del grupo control ($***p<0.001$).

Las concentraciones de IL-1 β no se vieron afectadas por la *exposición a alcohol* o por el *sexo* (**Figura 9B**) según el correspondiente ANOVA. De hecho, aunque estas concentraciones eran más elevadas en hembras, estas diferencias no llegaron a ser significativas, incluso tras evaluarlas mediante análisis pareados por pruebas *t* de Student.

En el caso de IL6 (**Figura 9C**), observamos un efecto significativo de la *exposición a alcohol* ($F_{1,20}=14.32$, $p=0.002$) y del *sexo* ($F_{1,20}=11.90$, $p=0.004$) sobre las concentraciones de IL-6. También se detectó una interacción entre ambos factores ($F_{1,20}=13.15$, $p=0.003$). Similar a TNF- α , la concentración de IL6 se encontró disminuida en las ratas hembras del grupo alcohol en comparación con su grupo control ($***p<0.001$), pero no se observó diferencias entre los machos de los grupos control y alcohol. No obstante, las ratas machos del grupo control mostraron concentraciones de IL-6 menores a las determinadas en hembras del grupo control ($***p<0.001$).

Finalmente, las concentraciones plasmáticas de la citoquina antiinflamatoria IL-10 no se vieron afectadas por los factores *exposición a alcohol* o por el *sexo* (**Figura 9D**).

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente Tesis Doctoral indican claramente que el SEC endógeno periférico, así como los sistemas de transmisión lipídica de NAEs y ácido lisofosfatídico, se ven alterados por la exposición a alcohol. Los cambios observados son dependientes claramente del órgano estudiado y de la dosis/patrón de uso. Tanto en los modelos de auto-administración como en los de consumo en atracón o "*binge*", los efectos observados fueron mayores cuanto mayor fue la cantidad total de alcohol administrada, siendo mucho más intensos en los modelos en los que se alcanzan mayores concentraciones de alcohol en sangre (caso de la exposición a 8 sesiones de consumo en atracón). Sin embargo, y como demuestra el modelo de exposición adolescente a cantidades moderadas de alcohol, si la exposición ocurre en un periodo crítico del desarrollo como es la adolescencia, cantidades menores de alcohol pueden producir efectos de larga duración. Este hecho es importante dado que aunque se es consciente de los daños que la exposición al alcohol ejerce durante el desarrollo fetal del SNC, aun a bajas dosis (Síndrome del espectro del alcohol fetal, [Murawski et al., 2015]) no se ha dado suficiente importancia al hecho de que otros sistemas, como el sistema inmunológico, fueran también sensible a cantidades moderadas de alcohol administradas durante la adolescencia. Es importante destacar este hecho para establecer futuros estudios que aborden el problema de la exposición adolescente, desde edades tempranas, al alcohol, un fenómeno muy frecuente según las encuestas escolares publicadas en nuestro país (Estudio ESTUDES, 2012), y que no es sólo privativo del alcohol, sino de otras drogas ilegales asociadas al mismo como el cannabis (Viveros et al., 2012).

Aunque en esta tesis no se ha estudiado el impacto funcional de esta modulación sobre el organismo, es de esperar que su alteración repercuta en el normal funcionamiento de los órganos en los que estos sistemas de lípidos transmisores actúan. Los cambios en el SEC del bazo, así como en las citoquinas circulantes tras la exposición adolescente al alcohol pueden ser un ejemplo de ello, habida cuenta de las relaciones existentes entre estos sistemas y que se han puesto de manifiesto en estudios en humanos (Pedraz et al., 2015).

Los tres modelos utilizados nos proporcionan una información muy valiosa sobre cómo estos sistemas de transmisión lipídica se ven afectados. Es de destacar que son modelos muy diferentes y que abordan problemas muy diversos. Mientras el primer modelo estudia las diferencias individuales derivadas del proceso de auto-administración voluntaria de alcohol, el segundo aborda el efecto de intoxicaciones forzadas repetidas a dosis que producen embriaguez y claros efectos tóxicos. Ambos modelos sirven para abordar el hecho diferencial de los patrones de uso observados en humanos, los de consumo crónico diario y

el de atracones en fin de semana. El tercer modelo se incorporó para estudiar las consecuencias a largo plazo de la exposición adolescente, abordando el análisis mucho tiempo después de la última administración. Se han elegido estos tres modelos precisamente para mostrar cómo las acciones del alcohol sobre estos sistemas de transmisión lipídica se ven influidos por el alcohol utilizado en tiempos y patrones muy diversos.

6.1. ESTUDIO I: EFECTOS DE LA AUTO-ADMINISTRACIÓN OPERANTE DE ALCOHOL

En este estudio se abordó el efecto de la auto-administración durante 107 días de alcohol o sacarina. Se utilizaron 42 animales que se auto-administraban sacarina y 67 que se auto-administraban alcohol. Los estudios se abordaron en dos fases, en una primera se analizó la expresión de los genes relacionados con el SEC en el hígado y el intestino de todos los animales, y posteriormente se seleccionaron los 20 con fenotipos extremos en auto-administración de alcohol (baja y alta autoadministración) y se compararon con los fenotipos medios de sacarina (20 animales mas cercanos a la media).

6.1.1. CORRELACIÓN ENTRE INGESTA DE ALCOHOL Y EXPRESIÓN DE GENES DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Esta aproximación nos ha permitido identificar la existencia de correlaciones entre la conducta de auto-administración y los niveles de expresión de estos genes. Estas correlaciones marcan claramente los genes cuyos efectos en relación con el alcohol son dosis dependientes. Los resultados muestran un patrón sorprendente, en el que la auto-administración induce claramente una inhibición dosis dependiente de la expresión del ARNm de los receptores CB₂, LPA₁ y PPAR- α en el hígado, así como de las enzimas de síntesis DGAL- α y de degradación MGL y especialmente FAAH, que es la que presenta efectos mas llamativos. Este patrón es opuesto al que se observa en intestino, donde todos los efectos son activadores, destacando la aparición de nuevo de los genes FAAH y LPA₁, pero con un sentido activador de la expresión del ARNm. Es muy llamativo el hecho de que la FAAH aparezca como gen cannabinoide principal, dado que es el que más se ha vinculado al alcoholismo en humanos, modelos de exposición/abuso en roedores o modelos de preferencia genética (Hoenicka et al., 2007; Hansson et al., 2007; Cippitelli et al., 2008). El receptor LPA₁ se ha vinculado recientemente en nuestro laboratorio a un fenotipo de preferencia alcohólica (Serrano et al., en revisión editorial). Así, un bloqueante del receptor LPA₁ administrado a ratas o ratones normales incrementa el consumo voluntario de alcohol en un test de preferencia de dos botellas ("*two bottle-choice*") (Ver **Figura 1**).

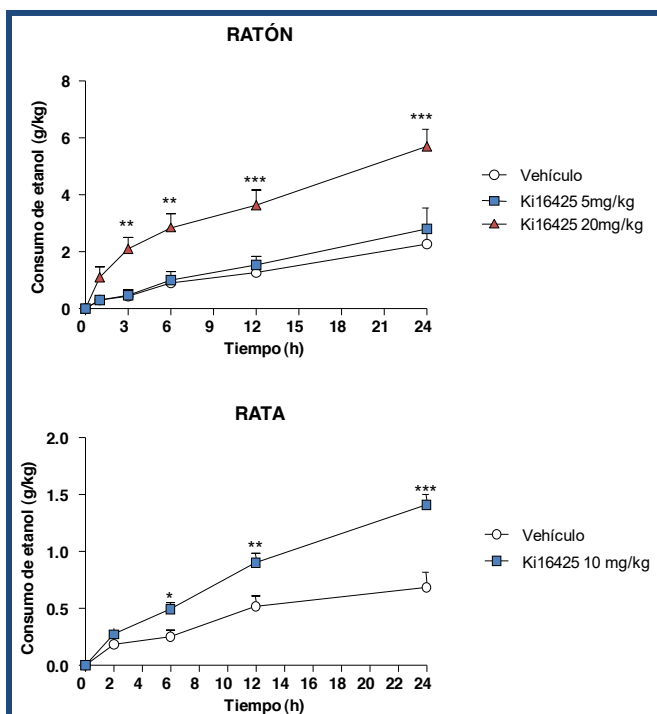


Figura 1. Consumo de alcohol de ratones (A) y ratas (B) tratados con diferentes dosis del inhibidor de LPA₁ Ki16425.

Este mismo fenotipo aparece en los animales con una delección selectiva del gen codificante para este receptor. No existen datos sobre el papel de los lisofosfolípidos en el alcoholismo en humanos, pero sí en roedores, en los que la dieta alcohólica modificó la composición de lisofosfolípidos en el suero e hígado de ratones expuestos a esta droga (Zhao et al., 2011). Los presentes resultados indican que estos compuestos y el receptor LPA₁ juegan algún papel en la ingesta de alcohol cuyo estudio debería ser acometido.

Llama mucho la atención que la cantidad de auto-administración de sacarina esté relacionada con la expresión de algunos genes en hígado e intestino, fundamentalmente el receptor CB₂, lo que podría indicar un papel de este receptor en el control de la ingesta de dulce. De hecho, en el intestino existe una expresión importante de receptores de dulce que está involucrada en la regulación metabólica (Meyer-Gerspach et al., 2011) y recientemente se ha demostrado que los endocannabinoides pueden promover un incremento en la percepción del sabor dulce a través de la modulación de la función de estos receptores de dulce (Yoshida et al., 2010).

Una vez establecida la existencia de estas correlaciones, se procedió al análisis de los fenotipos extremos. Para ello se seleccionaron 20 animales por grupo, que presentaban una *ingesta baja* de alcohol ($34,7 \pm 7$ palancadas en las cajas operantes), o una *ingesta elevada*

(79,2 ± 8 palancadas), y se compararon con animales con *consumo promedio* de sacarina (65,8 ± 6 palancadas). Esto permite seleccionar fenotipos extremos y reducir el número de *Western blots* a realizar.

6.1.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm Y PROTEÍNAS EN EL HÍGADO DE ANIMALES CON FENOTIPOS EXTREMOS DE AUTO-ADMINISTRACIÓN

Cuando se compara la expresión en el hígado de los genes relacionados con el SEC en los animales de baja tasa de auto-administración con respecto a los de alta tasa llama la atención que los efectos observados son en su mayoría inhibitorios y aparecen en el grupo de alta tasa de auto-administración. Los efectos más llamativos aparecen en los receptores CB₂ y PPAR-α, en la enzima de síntesis DAGL-α y en las de degradación FAAH y MGL. Cuando se compara la expresión de la proteína con la expresión génica, solo se observó una disminución de la NAPE-PLD. No se pudo medir la expresión del CB₂ por razones técnicas derivadas de la dificultad de encontrar anticuerpos con un marcaje selectivo para CB₂. En general los efectos observados son moderados en el hígado y aunque los estudios de fenotipos extremos de auto-administración confirman las tendencias encontradas en los estudios de correlación, la repercusión sobre las proteínas no es tan intensa. Esto puede deberse a varios factores. El primero es que pese al largo periodo de más de 100 días de sesiones de acceso al alcohol, estas fueron muy limitadas en el tiempo (generalmente un animal bebe toda la cantidad de alcohol de la sesión en los primeros 20 minutos), y nunca se alcanzan los niveles que se logran en una intoxicación forzada o en un consumo continuo mediante acceso a una dieta líquida o al acceso a dos botellas. En segundo lugar, el largo tiempo entre sesiones, además, permite un metabolismo total del alcohol y una recuperación funcional del organismo.

Los datos más llamativos, sin embargo, son los efectos sobre los receptores CB₂ y PPAR-α de carácter inhibitorio, y que están en sintonía con los que se describen en los otros modelos, e incluso en el intestino para el PPAR-α. En el caso del receptor CB₂ este receptor que está presente fundamentalmente en macrófagos residentes en el hígado y en las células estrelladas se ha vinculado a la fibrosis y a la angiogénesis por su capacidad para producir una modulación de la proliferación de estas células (Muñoz-Luque et al., 2008; Siegmund et al., 2007; Mahmoud et al., 2014). Su inhibición podría significar un primer estadio de enfermedad hepática ya que la fibrosis que acompaña a la esteatosis son dos de las características de la enfermedad alcohólica hepática. Esto se asociaría a la inhibición del receptor PPAR-α, un factor nuclear que regula las vías oxidativas y de lipogénesis hepática, facilitando la exportación de la grasa hepática en forma de

lipoproteínas VLDL y promoviendo la oxidación de ácidos grasos en peroxisomas (Nan et al., 2014). Su inhibición supondría un bloqueo de la oxidación y de la exportación de grasas favoreciendo la esteatosis. Aunque los resultados atañen sólo a la expresión de genes, sin embargo cuadran con los primeros estadios de las acciones tóxicas del alcohol descritas en el hígado. Por otro lado, el hallazgo de que la enzima NAPE-PLD esta reducida en su expresión proteica apoyaría estos datos, dado que tanto la AEA como la OEA, productos de su actividad, son activadores del receptor CB₂ y la OEA el ligando natural del receptor PPAR- α , lo que llevaría a un escenario en el que el hígado sería deficitario de señal endocannabinoide protectora facilitando el desarrollo de esteatosis y fibrosis. Esta hipótesis tiene que confirmarse mediante el análisis de producción de endocannabinoides hepáticos en el hígado de estos animales que se auto-administran alcohol. No tenemos datos plasmáticos de endocannabinoides en la sangre portal de animales que se auto-administran durante largos periodos de tiempo, pero estudios previos demuestran que el efecto agudo del alcohol es una inducción en el intestino y el hígado de las tres NAEs (AEA, OEA y PEA, Ferrer et al., 2007), por lo que sería plausible encontrar una disminución de la producción de las mismas y una desensibilización de sus receptores con la administración crónica prolongada.

6.1.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RNAm Y PROTEÍNAS EN EL INTESTINO DE ANIMALES CON FENOTIPOS EXTREMOS DE AUTO-ADMINISTRACIÓN

En el caso del intestino, como hemos dicho, los efectos sobre expresión génica fueron opuestos, salvo en el caso de la enzima de degradación de 2-AG, la MGL. En ausencia de datos sobre las acciones del alcohol autoadministrado sobre la producción de lípidos bioactivos sólo podemos especular con lo que puede estar pasando en el intestino. Se ha descrito que el alcohol incremental los niveles de OEA en intestino, un lípido bioactivo que regula el consumo de comida y de alcohol (Rodríguez de Fonseca et al., 2001; Bilbao et al., 2015). La exposición aguda a cantidades intoxicantes de alcohol induce la producción de AEA y PEA también, aunque no hay sobre los niveles en sangre portal, sino sistémica (Ferrer et al., 2007). (Ver **Figura 2**).

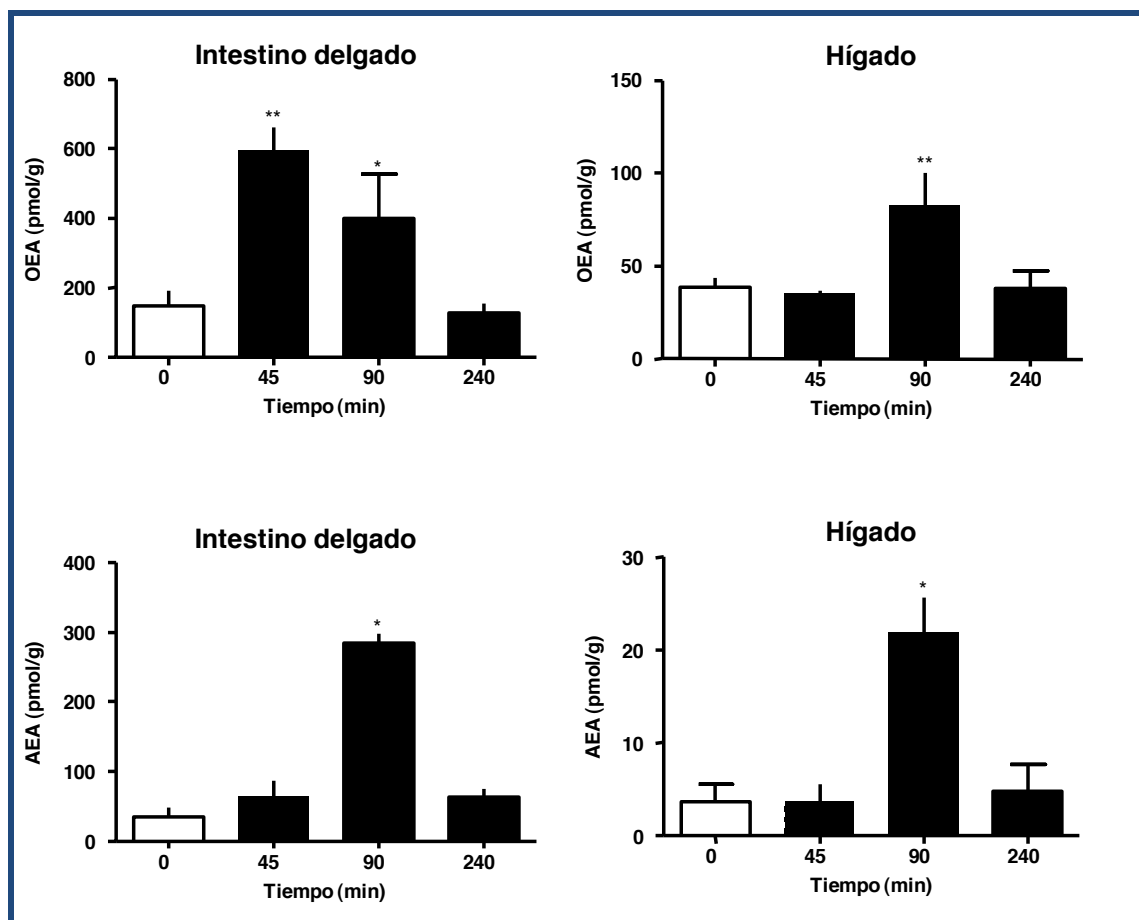


Figura 2. Niveles de OEA y AEA en el intestino delgado e hígado en ratas tras la administración aguda de 4 g/kg de etanol (i.p.).

Dado que las NAEs intestinales pueden activar los terminales libres que inervan la mucosa intestinal, regulando los procesos de hambre, saciedad, y apetitos selectivos por alimentos calóricos incluyendo la grasa, es muy posible que los cambios observados, de correlación directa positiva entre los niveles de expresión y de auto-administración de alcohol reflejen la existencia de cambios adaptativos en estos mecanismos de control de consumo, en este caso de alcohol (Gomez et al., 2002; Schwartz et al., 2008). Especulando sobre el sentido de estos cambios podría ser que las asociaciones observadas estén relacionadas directamente con la tasa de consumo y sean secundarias al fenotipo preferente por alcohol, o que los cambios endógenos pre-existentes en el SEC de los animales que se auto-administran determinen la alta tasa de auto-administración. Los estudios de expresión proteica que se han podido realizar sólo indican una marcada reducción del receptor PPAR- α , que podría determinar un mayor consumo al ser la diana de la OEA que reduce el consumo del alcohol, y de la FAAH, que permitiría un incremento de la biodisponibilidad de

anadamida y de OEA. Dado que el balance entre ambas determinaría el consumo, se puede especular que la reducción de PPAR- α y la no afectación de los receptores CB₁ que estimulan ingesta, indicaría un balance favorable hacia una mayor ingesta de alcohol. Esta hipótesis necesita ser demostrada, dado que desconocemos que niveles de endocannabinoides intestinales se pueden medir en animales que se auto-administran alcohol durante tanto tiempo. Es muy llamativa la emergencia del receptor de lisofosfolípidos LPA₁, que se observa sólo en los animales con alta tasa de auto-administración. La vinculación del receptor LPA₁ con el consumo de alcohol ha sido demostrada por nuestro equipo de investigación, y la reducción del receptor LPA₁ en los animales que se auto-administran más alcohol está de acuerdo con el fenotipo de aceptación del alcohol observado en animales carentes de este receptor (Castilla-Ortega et al., estudio remitido para su publicación, 2015), ver **Figura 1**.

6.2. ESTUDIO II: EFECTOS DEL CONSUMO EN ATRACÓN DEL ALCOHOL SOBRE EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE PERIFÉRICO

En este estudio se analizaron los efectos de exposiciones intensivas (1, 4 u 8 exposiciones) a alcohol en un modelo que remeda los atracones del patrón intermitente abusivo de esta droga, frecuente en nuestro medio, en especial en los adolescentes. En general los efectos son en su mayoría inhibitorios y se observan en el hígado, mientras que en el intestino los efectos son sorprendentemente mucho menores, con la única excepción del receptor PPAR- α , que se ve inhibido. Las acciones en el hígado son claramente dosis dependientes (mayor cuanto mayor es el número de exposiciones en atracón). En general, podemos decir que el alcohol afecta profundamente a la expresión de los ARNm del SEC que se ve inhibido en todos sus componentes.

6.2.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm Y PROTEÍNAS EN EL HÍGADO DE ANIMALES EXPUESTOS INTENSIVAMENTE A ALCOHOL EN UN MODELO DE ATRACÓN O BINGE

Las acciones observadas del alcohol, como hemos dicho, son profundamente inhibitorias en lo que atañe a la expresión de estos genes, siendo la dosis mas efectiva la de cuatro exposiciones, lo que puede indicar el desarrollo de cierta tolerancia (el grupo de 8 exposiciones en atracón muestra la recuperación en la expresión de algunos genes, lo que apoyaría esta hipótesis). No creemos que las acciones observadas sean inespecíficas, dado que en otro órgano, el intestino, el alcohol no afectó a su expresión, por lo cual no se puede argumentar un efecto indiscriminado de reducción de los procesos transcripcionales

inducidos por las altas concentraciones de alcohol. Como hemos dicho antes la caída de la expresión de los genes del SEC puede ser un indicador de comienzo de los cambios metabólicos e inflamatorios que se producen con el consumo abusivo del alcohol, y que van en sentido opuesto a la activación que se observa tras una única exposición (Ferrer et al., 2007; Bilbao et al., 2015). En ausencia de datos sobre endocannabinoides circulantes tras 4 y ocho exposiciones sólo podemos especular. Pero si como es de esperar, la inducción aguda de endocannabinoides por la exposición aguda al alcohol se sigue de una dramática reducción en la formación de AEA y de PEA, sería posible especular con un escenario en el que la caída de estos mediadores facilitase la puesta en marcha de los procesos inflamatorios, pro-fibrosis y de desajuste metabólico que caracterizan a la hepatopatía alcohólica. El estudio de la histología de estos hígados, así como los de la expresión de las rutas inflamatorias, de fibrosis, y de lipogénesis nos dará la información necesaria para confirmar esta hipótesis. Estos estudios están en marcha en la actualidad y no se han incluido en esta Tesis Doctoral que se ha centrado básicamente en la expresión de los genes cannabinoides. En la expresión proteica, el único dato es la inducción de una mayor cantidad de la proteína MGL, la principal degradadora de 2-AG. Sin embargo, pese a no haber cambios en la proteína hay que ser cautos dado que al no tener datos de la actividad enzimática podemos tener inmunoreactividad en proteína inactivada, cuyo ciclo de vida y degradación es más largo que el de los ARNm. Esto es especialmente relevante si consideramos que las proteínas del SEC, al ser este un sistema de transmisión lipídica, son proteínas integrales de la membrana y por tanto puede haber inmunoreactividad en un contexto de no funcionalidad (secuestro en vesículas, distribución hacia lisosomas, etc.).

6.2.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm Y PROTEÍNAS EN EL INTESTINO DE ANIMALES EXPUESTOS INTENSIVAMENTE A ALCOHOL EN UN MODELO DE ATRACÓN

Sorprendentemente los cambios observados en la expresión de los ARNm son mínimos y sólo se observan como tendencias en los receptores CB₂ y en la MGL. Este hecho es sorprendente, dada la intensidad de los cambios observados en el hígado, e indica una selectividad de las acciones del alcohol sobre el SEC que depende del órgano estudiado. En la expresión proteica sólo se observa un notable incremento de la expresión de CB₂, que podría estar relacionado con fenómenos inflamatorios intestinales o la activación del compartimento inmunológico ubicado en los folículos linfoides distribuidos por todo el intestino, dado que los linfocitos expresan este receptor en el que fue identificado por primera vez en 1993 (Munro et al., 1993). De hecho, en humanos y en modelos de

enfermedad inflamatoria intestinal, el receptor CB₂ suele encontrarse incrementado cuando se instaura el proceso inflamatorio (Battista et al., 2013; Di Sabatino et al., 2011; Márquez et al., 2009; Suárez et al., 2012). El significado de este incremento de CB₂ en el intestino de ratas alcohólicas fuera del contexto inflamatorio es difícil de intuir dado que no se han descrito otras acciones para este receptor intestinal fuera de los procesos de inflamación en contexto de enfermedad, con la excepción de un papel modulador en peristalsis (Grider et al., 2009).

6.3. ESTUDIO III: EFECTOS DEL CONSUMO MODERADO DE ALCOHOL EN LA ADOLESCENCIA SOBRE EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE PERIFÉRICO

Varios hallazgos destacan en este estudio en el que utilizó un procedimiento de exposición intermitente al alcohol durante la adolescencia (DID). En primer lugar, este modelo no induce cambios metabólicos en el hígado, ni produce hígado graso, como se refleja en los parámetros bioquímicos medidos en el plasma de los animales. Hay que recordar que estos cambios sí se observan en modelos de exposición intensiva, como los del estudio II, en los que los niveles de alcohol en sangre pueden llegar a ser 3-4 veces superiores a la media observada en estos animales de experimentación durante la fase de consumo. De hecho, el protocolo usado de exposición intermitente (Crabbe et al., 2009) durante cuatro días por semana a lo largo de 4 semanas aunque indujo valores crecientes de alcohol circulante nunca supero los 80 mg/dL que se alcanzan en los consumos intensivos en atracón, y que se utiliza para marcar el límite entre el consumo moderado y problemático (NIAA, 2004) En segundo lugar, este patrón de exposición moderada al alcohol induce efectos a largo plazo en la expresión de los ARNm de los genes relacionados con el SEC en el bazo, tanto en sus receptores como en las enzimas involucradas en su producción y degradación. Además, estos cambios, que son dimórficos sexuales con una mayor afectación en las hembras, se asocian a alteraciones en los niveles circulantes de de quemoquinas (CX₃CL1) y de las citoquinas TNF- α and IL-6. Este hecho indica que el alcohol induce cambios con repercusión funcional a largo plazo y en los que el factor sexo influye de manera decisiva, algo que no se suele tener en cuenta en los estudios sobre alcoholismo, fuertemente sesgados hacia los estudios en varones.

6.3.1. REPERCUSIÓN METABÓLICA EN EL HÍGADO DE LA EXPOSICIÓN INTERMITENTE A ALCOHOL DURANTE LA ADOLESCENCIA

Uno de los principales problemas del alcoholismo es la inducción de hepatopatía grasa alcohólica, el primer paso hacia la aparición de esteatohepatitis y cirrosis, la principal

complicación sistémica del alcoholismo. No existen apenas estudios en los que se aborde si el protocolo de DID induce esteatosis (D'Souza et al., 2010). Nuestros resultados indican claramente que el protocolo de administración no produjo incrementos en la cantidad de grasa hepática, ni en el contenido de triglicéridos, ni en los valores de transaminasas circulantes, lo que indica que no se ha producido daño hepático que permanezca dos semanas después de la última exposición al alcohol. Una vez descartados el daño hepático y su repercusión sistémica, nos centramos en el estudio del bazo, un órgano periférico del sistema inmunológico, con rica presencia en elementos del SEC. Descartar la enfermedad hepática era esencial para poder relacionar los cambios en este SEC con los parámetros inmunológicos afectados por la exposición al alcohol.

6.3.2. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA CANNABINOIDE ESPLÉNICO DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN INTERMITENTE AL ALCOHOL EN MACHOS Y HEMBRAS ADOLESCENTES

El SEC se ha estudiado ampliamente en el cerebro de animales expuestos al alcohol, en especial en cepas que presentan preferencia alcohólica y en animales con deleciones selectivas de genes relacionados con el SEC (Serrano y Parsons, 2011). Existen también varios estudios que abordan las acciones del alcohol sobre el SEC hepático, en los que se ha descrito como el alcohol altera la función de este sistema, participando en la aparición de hígado graso posiblemente a través de la inducción de su actividad a través de incrementos tanto en la producción de endocannabinoides como en la actividad del receptor cannabinoide CB₁ (Jeong et al., 2008; Tam et al., 2011). Sin embargo, como hemos visto, faltan estudios en los que se aborden las acciones del alcohol en otros órganos con una fuerte presencia de este sistema, como el intestino y el bazo. En este estudio nos hemos centrado en este órgano inmunológico. Los resultados indican que la exposición adolescente al alcohol produce cambios a largo plazo en la expresión del ARNm de los receptores CB₁ y PPAR- α , que en términos generales se reduce, incrementando la expresión de las enzimas productoras de amidas de ácidos grasos NAPE-PLD y de acilglicerol DGL- β en el bazo. Estos efectos fueron presentados un claro dimorfismo sexual. Así, mientras los cambios en el ARNm del CB₁ y la NAPE-PLD, de sentidos opuestos, se observaron sólo en hembras, los cambios en el ARNm del receptor PPAR- α se observaron sólo en machos. Los cambios observados sugieren que el alcohol induce un tono cannabinoide elevado en las hembras (incremento en la enzima de producción y una posible desensibilización del receptor CB₁). Esta hipótesis casa con lo publicado en la literatura sobre el incremento de actividad cannabinoide tras la administración crónica de

alcohol en cerebro (Caille et al., 2007; Alvarez-Jaimes et al., 2009). Sin embargo, la posibilidad de que se hayan reducido el número de receptores y su funcionalidad no puede confirmarse sólo con la reducción de la expresión del ARNm del receptor, por lo que habría que abordar estudios de actividad y número de estos receptores. En este sentido, un estudio previo en rata demostró que la expresión en el hipocampo del ARNm del receptor CB₁ dos días después de la exposición intermitente al alcohol indujo se había reducido, revirtiéndose 40 días después de la última administración (Mitrirattanakul et al., 2007). Adicionalmente, nuestro grupo de investigación encontró que la exposición continua durante dos semanas a una dieta líquida suplementada con un 10% de alcohol en la edad adulta produjo un incremento en la expresión de la NAPE-PLD, lo que coincide con los hallazgos del estudio en adolescentes. Además, la exposición intermitente al alcohol durante 5 días por semana, a lo largo de tres semanas, también redujo la expresión del receptor CB₁ en la amígdala a las 6 horas después de la última administración de alcohol (Serrano et al., 2011).

No existen, sin embargo, otros estudios similares en bazo, pese a tener una marcada expresión de receptores cannabinoides (Munro et al., 1993). Los únicos estudios adicionales se han hecho en líneas celulares, fundamentalmente neuroblastoma humanos, en los que el cultivo con alcohol demuestra un incremento claro de la actividad de la NAPE-PLD a raíz de la exposición a alcohol (100 mM) durante 72 horas (Basavarajappa y Hungund, 1999).

Aunque los cambios que hemos observado, por tanto, coinciden con los descritos para otros modelos de exposición a alcohol (en particular los de CB₁ y NAPE-PLD), hay que destacar que todos los estudios a los que nos hemos referido se han realizado en machos, y no hay apenas datos en hembras en lo que atañe al SEC periférico. Varias líneas experimentales sí han identificado la existencia de dimorfismos sexuales en el SEC en el cerebro (Craft et al., 2013; Rubino et al., 2011; Viveros et al., 2012). Estudios realizados mediante gonadectomía y reemplazo hormonal demostraron hace ya veinte años que los receptores cannabinoides CB₁ estaban sujetos al control de las hormonas sexuales esteroideas (Rodríguez de Fonseca et al., 1993). Hasta que punto el alcohol interfiere con esta señalización hormonal se desconoce, pero la presencia de efectos dimórficos sexuales indica que es un factor muy importante en la comprensión de la fisiopatología del alcoholismo.

6.3.3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN INTERMITENTE AL ALCOHOL EN LA ADOLESCENCIA EN LOS MEDIADORES INMUNOLÓGICOS PLASMÁTICOS CIRCULANTES

En el presente estudio se abordó la medición de las concentraciones plasmáticas de mediadores inflamatorios de las familias de las citoquinas y las quemoquinas pro-inflamatorias, cuyo papel en el alcoholismo y la adicción a drogas ha sido propuesto recientemente (Araos et al., 2015; Pascual et al., 2015). Los principales hallazgos indican que las hembras exhiben mayores concentraciones que los machos en citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias. Las concentraciones encontradas de CX₃CL1 y TNF- α fueron más bajas en los machos que en las hembras. Existen evidencias crecientes de que las citoquinas y quemoquinas presentan un fuerte dimorfismo sexual en sus concentraciones y que pueden verse afectadas por las fluctuaciones hormonales (Kovacs et al., 2002). De hecho, un estudio reciente en nuestro laboratorio demostró la existencia de estas diferencias sexuales en el perfil de citoquinas y quemoquinas en pacientes adictos a cocaína (Pedraz et al., 2015), estudios que se habían realizado previamente en el líquido cefalorraquídeo de pacientes adictos (Coller et al., 2012). En general, lo que observamos es que la exposición adolescente al alcohol reduce las diferencias sexuales, disminuyendo los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6 lo que sugiere que durante la adolescencia, la presencia de alcohol ejerce un efecto inhibitorio sobre las diferencias sexuales normales en estos mediadores cuyas consecuencias no se han estudiado pero que deberían considerarse para entender los efectos diferenciales del alcohol en hombres y mujeres. Respecto al mecanismo inhibitorio, de nuevo todos los estudios en los que se ha descrito un efecto reductor de la expresión de los niveles de ARNm de las citoquinas pro-inflamatorias y de las quemoquinas en el bazo han sido realizados en machos, sin ningún dato en hembras. Así, Liu et al. (2011) describieron que en ratas macho expuestas a consumo en atracón de alcohol mostraron una reducción en la expresión esplénica de los ARNm de citoquinas y quemoquinas, incluyendo IL-1 β , IL-6 y CCL2.

6.3.4. RELACIÓN ENTRE LOS MEDIADORES INMUNOLÓGICOS CIRCULANTES Y SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN EL BAZO

Los endocannabinoides son moléculas con importantes propiedades anti-inflamatorias e inmunosupresoras. La activación de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ inhibe la producción de citoquinas/quemoquinas pro-inflamatorias e incrementa la de citoquinas anti-inflamatorias (Correa et al., 2010; Pandey et al., 2009). En nuestro estudio, la disminución de los niveles del ARNm del receptor CB₁ y el incremento en los niveles del ARNm de la NAPE-PLD observados en el bazo de las hembras expuestas al alcohol serían compatibles con una respuesta anti-inflamatoria puesta en marcha para contrarrestar las acciones pro-inflamatorias del alcohol. El potencial incremento en AEA, OEA y PEA conducirían a una

inhibición de las concentraciones plasmáticas de TNF- α e IL-6. Esta hipótesis estaría de acuerdo con estudios previos realizados *in vitro* en astrocitos en los que el incremento en el tono endocannabinoide reduce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Facchinetti et al., 2003; Ortega-Gutierrez et al., 2005).

En resumen, la exposición intermitente al alcohol durante la adolescencia es suficiente para inducir cambios a largo plazo en la expresión del SEC en el bazo, así como para afectar a la secreción de citoquinas y quemoquinas de manera dimórfica sexual. Estos resultados realzan la importancia de considerar los efectos a largo plazo del alcohol, en especial en lo que atañe al sistema inmunológico periférico, y a su modulación por el SEC.

CONCLUSIONES

1. La exposición a alcohol afecta a la expresión de los genes y/o proteínas relacionadas con el sistema endocannabinoide en el hígado, el intestino y el bazo. Los efectos fueron mucho más intensos en la expresión del ARNm que en el de las proteínas.
2. Las modificaciones observadas dependen del modelo utilizado y de la intensidad de la exposición al alcohol. En este sentido, la exposición en atracón produce cambios mucho más intensos y dependientes de la dosis, siendo tanto más intensos cuanto más alta sea la dosis total administrada.
3. Si el alcohol se administra en un periodo crítico del desarrollo, como la adolescencia los efectos pueden ser duraderos a largo plazo. Así, la exposición adolescente a cantidades moderadas de alcohol produce cambios permanentes en el sistema endocannabinoide esplénico, asociados a cambios en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias.
4. En el modelo de auto-administración operante de alcohol puede demostrarse que los cambios observados en hígado e intestino se correlacionan con la intensidad de la auto-administración.
5. En el hígado tanto la auto-administración de alcohol como la administración en atracón produjo efectos inhibitorios en la expresión del ARNm de los genes relacionados con el sistema endocannabinoide. Los efectos inhibitorios observados fueron más intensos cuanto más alta fue la administración de alcohol.
6. En el intestino, la auto-administración de alcohol produjo efectos activadores en la expresión del ARNm de los genes relacionados con el sistema endocannabinoide. Los efectos mostraron una correlación positiva con la tasa de auto-administración, en un patrón opuesto al observado en hígado.
7. En el intestino se observa una llamativa correlación de la auto-administración del alcohol con la expresión del receptor LPA₁ para ácido lisofosfatídico. Este receptor está emergiendo como una nueva diana de interés en el control de la ingesta excesiva de alcohol.
8. En el modelo de exposición adolescente a cantidades moderadas de alcohol se observaron efectos dimórficos sexuales sobre la expresión de los genes relacionados con el sistema endocannabinoide, destacando la inducción de la enzima NAPE-PLD en las hembras expuestas. Este hallazgo refuerza la necesidad de hacer estudios sobre las acciones del alcohol desde la perspectiva del género.
9. La exposición adolescente a alcohol no sólo afecta al sistema endocannabinoide en tejidos inmunológicos, sino también a los niveles de citoquinas circulantes. Las acciones del

alcohol sobre estas citoquinas fueron dependientes del sexo del animal y se observó una inhibición de los niveles de TNF- α e IL-6 sólo en las hembras expuestas a alcohol.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, S.H., and Koob, G.F. (2005). Transition to Drug Addiction: A Negative Reinforcement Model Based on an Allostatic Decrease in Reward Function. *Psychopharmacology*, 180.3, 473-490.

Akira, S. and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499 - 511.

Alvarez-Jaimes, L., Stouffer, D.G. and Parsons, L.H. (2009). Chronic ethanol treatment potentiates ethanol-induced increases in interstitial nucleus accumbens endocannabinoid levels in rats. *J Neurochem.*, 111, 37-48.

Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, 58, 315-348.

Arnone, M., Maruani, J., Chaperon, F., et al. (1997). Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, 132, 104–106.

Araos, P., Pedraz, M., Serrano, A., Lucena, M., Barrios, V., García-Marchena, N., Campos-Cloute, R., Ruiz, J.J., Romero, P., Suárez, J., Baixeras, E., de la Torre, R., Montesinos, J., Guerri, C., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., Martínez-Riera, R., Torrens, M., Chowen, J.A., Argente, J., Mason, B.J., Pavón, F.J. and Rodríguez de Fonseca, F. (2015). Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addict Biol.*, 20, 756-72. doi: 10.1111/adb.12156.

Basavarajappa, B. S., Saito, M., Cooper, T. B. and Hungund, B. L. (1997). Activation of arachidonic acid-specific phospholipase A2 in human neuroblastoma cells after chronic alcohol exposure: prevention by GM1 ganglioside. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21, 1199-1203.

Basavarajappa, B. S., Cooper, T. B. and Hungund, B. L. (1998). Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane. *Brain Research*, 793, 212–218.

Basavarajappa, B. S. and Hungund, B. L. (1999). Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist, anandamide and its precursor N arachidonyl phosphatidyl ethanolamine in SK-N-SH Cells. *Journal of Neurochemistry*, 72, 522–528.

Basavarajappa, B.S. and Hungund, B.L. (2002). Neuromodulatory role of the endocannabinoid signaling system in alcoholism: an overview. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66, 287-299.

Battista, N., Di Sabatino, A., Di Tommaso, M., Biancheri, P., Rapino, C., Giuffrida, P., Papadia, C., Montana, C., Pasini, A., Vanoli, A., Lanzarotto, F., Villanacci, V., Corazza, G.R. and Maccarrone, M. (2013) Altered expression of type-1 and type-2 cannabinoid receptors in celiac disease. *PLoS One*, 19, 8. e62078.

Besheer, J., Faccidomo, S., Grondin, J.J.M. and Hodge, C.W. (2008). Regulation of Motivation to Self-Administer Ethanol by mGluR5 in Alcohol-Preferring (P) Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32.2, 209-221.

Bilbao, A., Serrano, A., Cippitelli, A., Pavón, F.J., Giuffrida, A., Suárez, J., García-Marchena, N., Baixeras, E., Gómez de Heras, R., Orio, L., Alén, F., Ciccocioppo, R., Cravatt, B.F., Parsons, L.H., Piomelli, D. and Rodríguez de Fonseca, F. (2015) Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addict Biol.* doi: 10.1111/adb.12276.

Blednov, Y.A., Bergeson, S.E., Walker, D., Ferreira, V.M., Kuziel, W.A., and Harris, R.A. (2005). Perturbation of chemokine networks by gene deletion alters the reinforcing actions of ethanol. *Behav. Brain Res.*, 165, 110–125.

Blednov, Y.A., Benavidez, J.M., Geil, C., Perra, S., Morikawa, H. and Harris, R.A. (2011). Activation of inflammatory signaling by lipopolysaccharide produces a prolonged increase of voluntary alcohol intake in mice. *Brain Behav. Immun.*, 25, S92–S105.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol.*, 37, 911-917.

Bouchery, E.E., Harwood, H.J., Sacks, J.J., Simon, C.J. and Brewer, R.D. (2011). Economic costs of excessive alcohol consumption in the U.S., 2006. *Am J Prev Med*, 41, 516-524.

Caillé, S., Alvarez-Jaimes, L., Polis, I., Stouffer, D.G. and Parsons L.H. (2007). Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *J Neurosci.*, 27, 3695-3702.

Cami, J. and Farre, M., (2003). Mechanisms of disease: drug addiction. *The New England Journal of Medicine*, 349, 975 – 986.

Castilla-Ortega, E., Pavón, F.J., Sánchez-Marín, L., Estivill-Torrús, G., Pedraza, C., Blanco, E., Suárez, J., Santín, L., Rodríguez de Fonseca, F., Serrano, A. Both genetic deletion and pharmacological blockade of lysophosphatidic acid LPA1 receptor results in increased alcohol consumption. *Neuropharmacology*. Segunda Revision.

Chester, J.A., and Cunningham, C.L. (2002). GABAA Receptor Modulation of the Rewarding and Aversive Effects of Ethanol. *Alcohol*, 26.3, 131-143.

Chin, J.H. and Goldstein, D.B.. (1981). Membrane-Disordering Action of Ethanol Variation with Membrane Cholesterol Content and Depth of the Spin Label Probe. *Molecular Pharmacology*, 19.3, 425-431.

Choi, J.W., Herr, D.R., Noguchi, K., Yung, Y.C., Lee, C.W., Mutoh, T., Lin, M.E., Teo, S.T., Park, K.E., Mosley, A.N. and Chun, J. (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 50, 57-86. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753. Review.

Choi, J.W., Chun, J. (2013). Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta.*, 1831, 20-32. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.07.015.

Cippitelli, A., Cannella, N., Braconi, S., Duranti, A., Tontini, A., Bilbao, A., De Fonseca F.R., Piomelli, D., Ciccocioppo, R. (2008) Increase of brain endocannabinoid anandamide levels by FAAH inhibition and alcohol abuse behaviours in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 198, 449-460.

Coller, J.K. and Hutchinson, M.R. Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacol Ther.*, 134, 219-245.

Colombo, G., Agabio, R., Fa, M. et al. (1998). Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR141716. *Alcohol*, 33, 126–130.

Cook, P.J. and Moore, M.J. (2000). "Alcohol," Handbook of Health Economics, in: J. Culyer & J. P. Newhouse (ed.), Handbook of Health Economics, edition 1, volume 1, chapter 30, p. 1629-1673: Elsevier.

Correa, F., Hernangomez, M., Mestre, L., Loria, F., Spagnolo, A., Docagne, F. et al. (2010). Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. *Glia*, 58, 135-147.

Crabbe, J.C., Metten, P., Rhodes, J.S., Yu, C.H., Brown, L.L., Phillips, T.J. et al. (2009). A line of mice selected for high blood ethanol concentrations shows drinking in the dark to intoxication. *Biol Psychiatry*, 65, 662–670.

Craft, R.M., Marusich, J.A., Wiley, J.L. (2013) Sex differences in cannabinoid pharmacology: a reflection of differences in the endocannabinoid system? *Life Sci.*, 92, 476-81.

Cravatt, B.F., Simon, G.M. and Yates, J.R. (2007). The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature*, 450, 991-1000.

Crews F.T., Nixon, K., Kim, D., Joseph, J., Shukitt-Hale, B., Qin, L., and Zou, J. (2006). BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcohol Clin Exp Res*, 30, 1938-1949.

Cunningham, C. L., Howard, M.A., Gill, S.J., Rubinstein, M., Low, M.J. and Grandy, D.K. (2000). Ethanol-conditioned Place Preference Is Reduced in Dopamine D2 Receptor-deficient Mice. *Pharmacolog Biochemistry and Behavior*, 67.4, 693-99.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. and Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946–1949.

Di Carlo, G. and Izzo, A.A. (2003). Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic application. *Expert Opin Investig Drugs*, 3, 771–784.

Di Chiara, G. and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85, 5274–5278.

Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., et al. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10819-10824.

Di Sabatino, A., Battista, N., Biancheri, P., Rapino, C., Rovedatti, L., Astarita, G., Vanoli, A., Dainese, E., Guerci, M., Piomelli, D., Pender, S.L., MacDonald, T.T., Maccarrone, M. and Corazza, G.R. (2011) The endogenous cannabinoid system in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.*, 4, 574-583.

D Souza El-Guindy, N.B., Kovacs, E.J., De Witte, P., Spies, C., Littleton, J.M., de Villiers, W.J. et al. (2010) Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. *Alcohol Clin Exp Res.*, 34, 1489-1511.

Estudio

ESTUDES.

http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/pdf/8_ESTUDES_2012_Informe.pdf

European Commission. (2006). Alcohol in Europe: A Public Health Perspective. http://ec.europa.eu/health/archive/ph_determinants/life_style/alcohol/documents/alcohol_europe_en.pdf

Facchinetti, F., Del Giudice, E., Furegato, S., Passarotto, M., Leon, A. (2003) Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia*, 41, 61-68.

Ferrer, B., Bermúdez-Silva, F.J., Bilbao, A., Alvarez-Jaimes, L., Sanchez-Vera, I., Giuffrida, A., Serrano, A., Baixeras, E., Khaturia, S., Navarro, M., Parsons, L.H., Piomelli, D. and Rodríguez de Fonseca, F. (2007). Regulation of brain anandamide by acute administration of ethanol. *Biochem J.*, 404, 97-104.

Files, F.J., Samson, H.H., Denning, C.E. and Marvin, S. (1998). Comparison of alcohol-preferring and nonpreferring selectively bred rat lines. II. Operant self-administration in a continuous-access situation. *Alcohol Clin Exp Res.*, 1247–1258.

Fride, E. and Mechoulam, R. (2003). New advances in the identification and physiological role of the different components of the endogenous cannabinoid system. In Maldonado R, ed. *Molecular biology of drug addiction. Humana Press*, 173–198.

Fride, E. (2005). Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4, 633–642.

Finn, D.A. and Crabbe, J.C. (1997). Exploring alcohol withdrawal syndrome. *Alcohol Health & Research World*, 21, 149–156.

Folch, J., Lees, M. and Stanley S.G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.*, 226, 497-509.

Gallate, J.E., Saharov, T., Mallet, P.E., et al. (1999). Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist. *Eur J Pharmacol*, 370, 233–240.

Gallate, J.E. and McGregor, I.S. (1999). The motivation for beer in rats: effects of ritanserin, naloxone and SR141716. *Psychopharmacology*, 142, 302–308.

Gass, J. and Olive, M. (2008). Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochemical Pharmacology*, 75.1, 218-65.

George, S., Rogers, R.D. and Duka, T. (2005). The acute effect of alcohol on decision making in social drinkers. *Psychopharmacology*, 182, 160-169.

Gessa, G.L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L., Mereu, G. (1985). Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *Brain Res*, 248, 210–214.

Gianoulakis, C. (2001). Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *J Psychiatry Neurosci*, 26, 304-318.

Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., and Gage, F.H. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, 140, 918–934.

Gómez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J.M., Bilbao, A., Del Arco, I., Cippitelli, A., Nava, F., Piomelli, D. and Rodríguez de Fonseca, F. (2002). A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci.*, 22, 9612-9617.

Gonzales, R.A., Job, M.O. and Doyon, W.M. (2004) The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacology & Therapeutics*, 103, 121-146.

Grider, J.R., Mahavadi, S., Li, Y., Qiao, L.Y., Kuemmerle, J.F., Murthy, K.S. and Martin, B.R. (2009) Modulation of motor and sensory pathways of the peristaltic reflex by cannabinoids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 297, G539-G549.

Hansson, A.C., Bermúdez-Silva, F.J., Malinen, H., Hyytiä, P., Sanchez-Vera, I., Rimondini, R., Rodríguez de Fonseca, F., Kunos, G., Sommer, W.H. and Heilig M. (2007). Genetic impairment of frontocortical endocannabinoid degradation and high alcohol preference. *Neuropsychopharmacology*, 32, 117-126.

Harkany, T., Mackie, K., Doherty, P. (2008). Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. *Curr Opin Neurobiol*, 18, 338-345.

He, J. and Crews, F.T. (2008). Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp. Neurol.*, 210, 349-358.

Heilig, M. and Koob, G.F. (2007) A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends Neurosci.*, 30, 399–406.

Heinz, A., Jones, D.W., Gorey, J.G., Benne, A., Suomi, S.J., Weinberger, D.R. and Higley, J.D. (2003). Serotonin Transporter Availability Correlates with Alcohol Intake in Nonhuman Primates. *Molecular Psychiatry*, 8, 231-234.

Hendriks, H.F. and van Tol, A. (2005). *Alcohol. Handb. Exp. Pharmacol.*, 170, 339-61.

Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., et al. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1932–1936.

Hill, M.N., Miller, G.E., Carrier, E.J., Gorzalka, B.B. and Hillard, C.J. (2009) Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 1257–1262.

Hoenicke, J., Ponce, G., Jiménez-Arriero, M.A., Ampuero, I., Rodríguez-Jiménez, R., Rubio, G., Aragüés, M., Ramos, J.A. and Palomo, T. (2007) Association in alcoholic patients between psychopathic traits and the additive effect of allelic forms of the CNR1 and FAAH endocannabinoid genes, and the 3' region of the DRD2 gene. *Neurotox Res.*, 11, 51-60.

Hoffman, P.L., Rabe, C.S., Moses, F., and Tabakoff, B. (1989). N Methyl-D-Aspartate Receptors and Ethanol: Inhibition of Calcium Flux and Cyclic GMP Production. *Journal of Neurochemistry*, 52.6, 1937-1940.

Hyman, S.E. and Malenka, R.C. (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci*, 2, 695–703.

Hungund, B. L., Zheng, Z. and Barkai, A. L. (1994). Ganglioside GM1 reduces ethanol induced phospholipase A2 activity in synaptosomal preparations from mice. *Neurochemistry International*, 25, 321–325.

Hungund, B.L. and Vinod, K.Y. (2009). Role of the endocannabinoid signaling system in alcohol-related behaviors. *Open Neuropsychopharmacol J.*, 2, 31-39.

Izzo, A.A. and Sharkey, K.A. (2010). Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther*, 126, 21–38.

Jeong, W.I., Osei-Hyiaman, D., Park, O., Liu, J., Batkai, S., Mukhopadhyay, P. et al. (2008) Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab.*, 7, 227-233.

Kandel, D.B. (2002) Stages and Pathways of Drug Involvement: Examining the Gateway Hypothesis. Cambridge, UK: Cambridge UP.

Keller, M. and Vaillant, G. E. (2011). Alcohol consumption. Encyclopedia Britannica Online. Retrieved from: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/13398/alcohol-consumption>

Kogan, N.M. and Mechoulam, R. (2007). Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin Neurosci*, 9, 413–430.

- Koistinen, M., Tuomainen, P., Hyytiä, P. and Kiianmaa, K. (2001) Naltrexone suppresses ethanol intake in 6-hydroxydopamine-treated rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25.11, 1605-1612.
- Koob, G.F. and Volkow, N.D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35, 217-238.
- Kovacs, E.J. and Messingham, K.A. (2002) Influence of alcohol and gender on immune response. *Alcohol Res Health*, 26, 257-263.
- Lejoyeux, M. (1996) Use of Serotonin (5-hydroxytryptamine) Reuptake inhibitors in the treatment of alcoholism. *Alcohol and Alcoholism*, 31.1, 69-75.
- Li, S., Strelow, A., Fontana, E. J., and Wesche, H. (2002). IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 99, 5567–5572.
- Lieber, C.S. (1991). Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 15, 573-592.
- Liljequist, S., and Engel, J. (1982). Effects of GABAergic agonists and antagonists on various ethanol-induced behavioral changes. *Psychopharmacology*, 78.1, 71-75.
- Liu, X., Mao, X. and Chang, S.L. (2011) Altered gene expression in the spleen of adolescent rats following high ethanol concentration binge drinking. *Int J Clin Exp Med.*, 4, 252-257.
- López-Moreno, J.A., Marcos, M., Calleja-Conde, J., Echeverry-Alzate, V., Bühler, K.M., Costa-Alba, P., Bernardo, E., Laso, F.J., Rodríguez de Fonseca, F., Nadal, R., Viveros, M.P., Maldonado, R. and Giné, E. (2015). Histone Deacetylase Gene Expression Following Binge Alcohol Consumption in Rats and Humans. *Alcohol Clin Exp Res.*, 39, 1939-1950.
- Mahmoud, M.F., Swefy, S.E., Hasan, R.A. and Ibrahim, A. (2014) Role of cannabinoid receptors in hepatic fibrosis and apoptosis associated with bile duct ligation in rats. *Eur J Pharmacol.*, 742, 118-124.
- Maldonado, R., Valverde, O. and Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci*, 29, 225–232.

Mallat, A., Teixeira-Clerc, F., Deveaux, V., Manin, S. and Lotersztajn, S. (2011). The endocannabinoid system as a key mediator during liver diseases: new insights and therapeutic openings. *Br J Pharmacol*, 163, 1432–1440.

Mandrekar, P., Dolganiuc, A., Catalano, D., and Kodys, K. (2001). Reduced alloreactive Tcell activation after alcohol intake is due to impaired monocyte accessory cell function and correlates with elevated IL-10, IL-13, and decreased IFN γ levels. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 25, 1766–1772.

Marqu ez, L., Suárez, J., Iglesias, M., Bermudez-Silva, F.J., Rodríguez de Fonseca, F. and Andreu, M. (2009) Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PLoS One*, 4, e6893.

McBride, W.J., Murphy, J.M., Lumeng, L. and Li, T.K. (1990). Serotonin, dopamine and GABA involvement in alcohol drinking of selectively bred rats. *Alcohol*, 7, 199-205.

McClain, C.J., Song, Z., Barve, S.S., Hill, D.B., and Deaciuc, I. (2004). Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 287, G497-502.

Meyer-Gerspach, A.C., W olnerhanssen, B., and Beglinger, C. (2014) Gut sweet taste receptors and their role in metabolism. *Front Horm Res.*, 42, 123-133.

Mihic, S. J., and Harris, R. A. (1997). GABA and the GABAA receptor. *Alcohol Health and Research World*, 21, 127-131.

Miller, J.W., Naimi, T.S., Brewer, R.D. and Jones, S.E. (2007) Binge drinking and associated health risk behaviors among high school students. *Pediatrics*, 119, 76–85.

Miller, M.A., Hays, L.R. and Fillmore, M.T. (2012). Lack of tolerance to the disinhibiting effects of alcohol in heavy drinkers. *Psychopharmacology*, 224, 511-518.

Mitirattanakul, S., Lopez-Valdes, H.E., Liang, J., Matsuka, Y., Mackie, K., Faull, K.F. et al. (2007) Bidirectional alterations of hippocampal cannabinoid 1 receptors and their endogenous ligands in a rat model of alcohol withdrawal and dependence. *Alcohol Clin Exp Res.*, 31, 855-867.

Munro, S., Thomas, K.L. and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-65.

Muñoz-Luque, J., Ros, J., Fernández-Varo, G., Tugues, S., Morales-Ruiz, M., Alvarez, C.E., Friedman, S.L., Arroyo, V. and Jiménez, W. (2008) Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, 324, 475-483.

Murawski, N.J., Moore, E.M., Thomas, J.D. and Riley, E.P. (2015) Advances in diagnosis and treatment of Fetal Alcohol Spectrum Disorders: from animal models to human studies. *Alcohol Res.*, 37, 97-108.

Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, 258.5082, 597-603.

Nan, Y.M., Wang, R.Q. and Fu, N. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor α , a potential therapeutic target for alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.*, 20, 8055-8060.

Norberg, A., Jones, A.W., Hahn, R. G. and Gabrielsson, J. L. (2003). Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clinical Pharmacokinetics*, 42, 1-31.

NIAAA. (2004). NIAAA Council approves definition of binge drinking. National Institutes of Health NIAAA Newsletter ed. Bethesda.

NIAAA. (2013). Alcohol Facts and Statistics. Retrieved from: <http://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/alcohol-facts-and-statistics>

Onaivi, E.S. (2006). Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology*. 54, 231-46.

Ortega-Gutierrez, S., Molina-Holgado, E., Guaza, C. (2005). Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia*, 52, 163-168.

Pacher, P., Batkai, S. and Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58, 389–462.

Pandey, S.C., Piano, M.R., Schwertz, D.W., Davis, J.M. and Pandey, G.N. (1992). Effect of Ethanol Administration and Withdrawal on Serotonin Receptor Subtypes and Receptor-Mediated Phosphoinositide Hydrolysis in Rat Brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 16.6, 1110-1116.

Pandey, R., Mousawy, K., Nagarkatti, M. and Nagarkatti, P. (2009) Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res.*, 60, 85-92.

Pascual, M., Baliño, P., Aragón, C.M. and Guerri, C. (2015) Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology*, 89, 352-359.

Pedraz, M., Araos, P., García-Marchena, N., Serrano, A., Romero-Sanchiz, P., Suárez, J., Castilla-Ortega, E., Mayoral-Cleries, F., Ruiz, J.J., Pastor, A., Barrios, V., Chowen, J.A., Argente, J., Torrens, M., de la Torre, R., Rodríguez De Fonseca, F., Pavón, F.J. (2015) Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. *Front Psychiatry*, 16, 6-17.

Pin, J. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 34.1, 1-26.

Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A. and Rodríguez de Fonseca, F. (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci*, 21, 218-224.

Pitzele, H. Z. and Tolia, V. M. (2010). Twenty per hour: altered mental state due to ethanol abuse and withdrawal. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 28, 683-705.

Qin, L., He, J., Hanes, R.N., Pluzarev, O., Hong, J.S. and Fulton, F.T. (2008). Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J. Neuroinflammation*, 5, 10.

Rehm, J. (2011). The risks associated with alcohol use and alcoholism. *Alcohol Res Health*, 34, 135-43.

Rodríguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Ramos, J.A., Martín, M. and Fernández-Ruiz, J.J. (1994) Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. *Life Sci.*, 54, 159-170.

Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gómez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., Murillo-Rodríguez, E., Giuffrida, A., LoVerme, J., Gaetani, S., Kathuria, S., Gall, C. and Piomelli, D. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 414, 209-212.

Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Martin-Calderon, J. L., Gorriti, M. A. and Navarro, M. (1998). Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiology of Disease*, 5, 483–501.

Rodríguez de Fonseca, F., Roberts, A.J., Bilbao, A. and Koob, G.F. (1999). Cannabinoid receptor antagonist SR141716A decreases operant ethanol self administration in rats exposed to ethanol–vapor chambers. *Acta Pharmacol Sin*, 20, 1109–1114.

Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F.J., Bilbao, A., Cippitelli, A. and Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol*, 40, 2-14.

Room, R., Babor, T. and Rehm, J. (2005). Alcohol and public health. *The Lancet*, 365, 519-530.

Rubino, T. and Parolaro, D. (2011) Sexually dimorphic effects of cannabinoid compounds on emotion and cognition. *Front Behav Neurosci.*, 5, 64.

Rutlen, S.L., Ripley, T.L., Hunt, C.L., Stephens, D.N. and Mayne, L.V. (2006). Sp1 and NFkB pathways are regulated in brain in response to acute and chronic ethanol. *Genes, Brain and Behav.*, 5, 257–273.

Saitz, R. (2005). Unhealthy alcohol use. *The New England Journal of Medicine*, 352, 596-607.

Samson, H.H. (1986) Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats. *Alcohol Clin Exp Res.*, 10, 436-442.

Samson, H.H. (2000). The microstructure of ethanol drinking: Genetic and behavioral factors in the control of drinking patterns. *Addiction 95 Suppl.*, 2, S61–S72.

Schroeder, J.P., Overstreet, D.H. and Hodge, C.W. (2005) The MGLuR5 antagonist MPEP decreases operant ethanol self-administration during maintenance and after repeated alcohol deprivations in alcohol-preferring (P) rats, *Psychopharmacology*, 179.1, 262-270.

Schwartz, G.J., Fu, J., Astarita, G., Li, X., Gaetani, S., Campolongo, P., Cuomo, V. and Piomelli, D. (2008). The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab.*, 8, 281-288.

Serra, S., Carai, M.A., Brunetti, G. et al. (2001). The cannabinoid receptor antagonist SR141716 prevents acquisition of drinking behavior in alcohol-preferring rats. *Eur J Pharmacol*, 430, 369–371.

Serrano, A., Pavón, F.J., de Diego, Y., Romero-Zerbo, Y., Bermúdez-Silva, F.J., Bautista, D., Mayas, D., Rodríguez de Fonseca, F. and Macías, M. (2008). Oleoylethanolamide, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, prevents liver injury and oxidative stress induced by Tween 20. *Obesity and Metabolism-Milan*, 4, 76-84.

Serrano, A., Rivera, P., Pavon, F.J., Decara, J., Suárez, J., Rodriguez de Fonseca, F. and Parsons, L.H. (2012) Differential effects of single versus repeated alcohol withdrawal on the expression of endocannabinoid system-related genes in the rat amygdala. *Alcohol Clin Exp Res.*, 36, 984-994.

Siegmund, S.V., Qian, T., de Minicis, S., Harvey-White, J., Kunos, G., Vinod, K.Y., Hungund, B. and Schwabe, R.F. (2007) The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J.*, 21, 2798-2806.

Smart, D., Jonsson, K.O., Vandevorde, S., Lambert, D.M. and Fowler CJ. (2002). 'Entourage' effects of N-acyl ethanolamines at human vanilloid receptors. Comparison of effects upon anandamide-induced vanilloid receptor activation and upon anandamide metabolism. *Br J Pharmacol.*, 136, 452–458.

Solinas, M., Goldberg, S.R. and Piomelli, D. (2008). The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol*, 154, 369–383.

Spanagel, R., Herz, A. and Shippenberg, T.S. (1990). Identification of the opioid receptor types mediating beta-endorphin-induced alterations in dopamine release in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol*, 190, 177-184.

Stappenbeck, C.A., Norris, J., Kiekel, P.A., Morrison, D.M., George, W.H., Davis, K.C., Zawacki, T., Jacques-Tiura, A.J. and Abdallah, D.A. (2013). Patterns of alcohol use and expectancies predict sexual risk taking among non-problem drinking women. *J Stud Alcohol Drugs*, 74, 223-232.

Stella, N., Schweitzer, P. and Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 1997, 388, 773–778.

Suárez, J., Romero-Zerbo, Y., Márquez, L., Rivera, P., Iglesias, M., Bermúdez-Silva, F.J., Andreu, M. and Rodríguez de Fonseca, F. (2012). Ulcerative colitis impairs the acylethanolamide-based anti-inflammatory system reversal by 5-aminosalicylic acid and glucocorticoids. *PLoS One*, 7, e37729.

Swanson, L.W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin*, 9, 321-353.

Tabakoff, B. and Hoffman, P.L. (2000). Animal models in alcohol research. *Alcohol Res Health*, 24, 77–84.

Tam, J., Liu J., Mukhopadhyay, B., Cinar, R., Godlewski, G. and Kunos, G. (2011). Endocannabinoids in liver disease. *Hepatology*, 53, 346-355.

Tanda, G. and Goldberg, S.R. (2003). Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms--a review of recent preclinical data. *Psychopharmacology*, 169, 115-134.

Tomkins, D. M., Le A.D. and Sellers, E.M. (1995). Effect of the 5-HT₃ antagonist ondansetron on voluntary ethanol intake in rats and mice maintained on a limited access procedure. *Psychopharmacology*, 117.4, 479-485.

Tomsovic, M. (1974). "Binge" and continuous drinkers. Characteristics and treatment follow-up. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol*, 35(Pt. A), 558-564.

Valenzuela, F. (1997). Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol, Health & Research World*, 21.2,144-48.

Van Dam, A.M., Brouns, M., Louisse, S. and Berkenbosch, F. (1992). Appearance of interleukin-1 in macrophages and in ramified microglia in the brain of endotoxin-treated rats: a pathway for the induction of non-specific symptoms of sickness? *Brain Res.*, 588, 291-296.

Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D. and Sharkey, K.A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 310, 329–332.

Verheij, M.M.M. and Cools, A.R. (2008). Twenty years of dopamine research: Individual differences in the response of accumbal dopamine to environmental and pharmacological challenges. *European Journal of Pharmacology*, 585, 228–244.

Viveros, M.P., Llorente, R., Suarez, J., Llorente-Berzal, A., Lopez-Gallardo, M. and de Fonseca, F.R. (2012). The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex differences and neuropsychiatric implications. *J Psychopharmacol.*, 26, 164-176.

Wechsler, H., Davenport, A., Dowdall, G., Moeykens, B. and Castillo, S. (1994). Health and behavioral consequences of binge drinking at colleges: A national survey of students at 140 campuses. *Journal of the American Medical Association*, 272, 672-1677.

Wechsler, H., Lee, J.E., Kuo, M., Seibring, M., Nelson, T.F. and Lee, H.P. (2002). Trends in college binge drinking during a period of increased prevention efforts: Findings from four Harvard School of Public Health study surveys, 1993-2001. *Journal of American College Health*, 50, 203-217.

Weiss, F., Lorang, M.T., Bloom, F.E. and Koob, G.F. (1993). Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 267, 250-258.

WHO. (2011). Global status report on alcohol and health. Geneva.

Wise, R.A. (1998). Drug-activation of brain reward pathways. *Drug and alcohol dependence*, 51, 13-22.

Yakovleva, T., Bazov, I., Watanabe, H., Hauser, K.F. and Bakalkin, G. (2011). Transcriptional control of maladaptive and protective responses in alcoholics: a role of the NF- κ B system. *Brain Behav. Immun.*, 25, S29–S38.

Yoshida, R., Ohkuri, T., Jyotaki, M., Yasuo, T., Horio, N., Yasumatsu, K., Sanematsu, K., Shigemura, N., Yamamoto, T., Margolskee, R.F. and Ninomiya, Y. (2010). Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 935-939.

Zhao, Z., Yu, M., Crabb, D., Xu, Y. and Liangpunsakul, S. (2011). Ethanol-induced alterations in fatty acid-related lipids in serum and tissues in mice. *Alcohol Clin Exp Res.*, 35, 229-234. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01338.x.

Zou, J. and Crews, F.T. (2006). CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol. Neurobiol.*, 26, 385-405.

Zou, J. and Crews, F.T. (2010). Induction of innate immune gene expression cascades in brain slice cultures by ethanol: key role of NF-kappaB and proinflammatory cytokines. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 34, 777-789.

