

ORIGINAL

Efectos de los ácidos grasos omega-3 sobre la localización del receptor cannabinoide CB1 en la región CA1 del hipocampo tras la abstinencia de alcohol en ratones machos adolescentes

Effects of omega-3 fatty acids on CB1 cannabinoid receptor localization in the hippocampal CA1 region following alcohol withdrawal in adolescent male mice

MAITANE SERRANO ^{*,**,***}; LEIRE LEKUNBERRI ^{*,**}; GARAZI OGERIN ^{*,**}; MIQUEL SAUMELL-ESNAOLA ^{****,*****}; GONTZAL GARCÍA DEL CAÑO ^{***,*****,*****}; NAGORE PUENTE ^{*,**,***}; ITZIAR BONILLA-DEL RÍO ^{*,**,***}; INMACULADA GERRIKAGOITIA ^{*,**,***}; PEDRO GRANDES ^{*,**,***}.

* Departamento de Neurociencias, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco UPV/EHU, Leioa, España.

** Achucarro Basque Center for Neuroscience, Parque Científico de la UPV/EHU, Leioa, España.

*** Red de Investigación en Atención Primaria de Adicciones (RIAPAD), ISCIII, España.

**** Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, España.

***** Bioaraba, Neurofarmacología Celular y Molecular, Vitoria-Gasteiz, España.

***** Departamento de Neurociencias, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, España.

Resumen

El consumo excesivo de alcohol durante la adolescencia compromete la plasticidad sináptica y las funciones cognitivas, en parte debido a la interferencia con el sistema endocannabinoide (SEC) y su receptor CB1. Asimismo, el alcohol impacta negativamente en los ácidos grasos omega-3, esenciales para la integridad de las membranas celulares y la función cerebral. La deficiencia de omega-3 altera la señalización del SEC y la expresión y funcionalidad del CB1, exacerbando el deterioro inducido por el alcohol. Por el contrario, la activación del SEC contribuye a restaurar las funciones sinápticas dependientes de este sistema, afectadas por la falta de omega-3. De hecho, se ha demostrado que la suplementación con omega-3 normaliza la expresión del CB1 en regiones cerebrales específicas de ratones adultos expuestos al alcohol durante la adolescencia.

A pesar de la estrecha relación entre alcohol, omega-3 y SEC, el efecto directo de los omega-3 sobre la localización subcelular del receptor CB1 tras la exposición al alcohol permanece poco explorado. Para abordar esta cuestión, analizamos la región CA1 del hipocampo en ratones machos adultos en abstinencia después de la ingesta de alcohol durante la adolescencia, utilizando inmunocitoquímica para microscopía electrónica. Nuestros resultados indican que los omega-3 ayudan a restablecer el equilibrio entre excitación e inhibición sináptica, alterado por un aumento en el número de terminales excitadoras y una reducción significativa de las inhibitorias. Sin embargo, ni la distribución ni la densidad del receptor CB1 en compartimentos neuronales y gliales se modificaron tras la exposición al alcohol ni con la suplementación con omega-3.

Estos hallazgos revelan efectos estructurales novedosos de los omega-3 en la protección frente al daño cerebral inducido por el alcohol, aportando nuevas perspectivas sobre los mecanismos neuroprotectores de estos ácidos grasos.

Palabras clave: Etanol, adolescencia, sistema endocannabinoide, neuronas, glia, ácidos grasos poliinsaturados, sistema nervioso central

Abstract

Adolescent binge drinking has detrimental effects on brain function, leading to long-lasting impairments in synaptic plasticity, cognition, and behavior. These effects are mediated, in part, by disruption of the endocannabinoid system (ECS) and its cannabinoid type-1 (CB1) receptor. Alcohol consumption also depletes omega-3 fatty acids, which are essential for maintaining cell membrane integrity and supporting brain function. This depletion impairs synaptic plasticity by disrupting endocannabinoid signaling and reducing CB1 receptor expression and function. Conversely, enhancement of the ECS can restore brain function and reverse the loss of endocannabinoid-dependent synaptic plasticity associated with omega-3 deficiency. Notably, omega-3 supplementation has been shown to restore CB1 receptor expression in specific brain regions in adult mice following adolescent alcohol exposure. However, despite the established interplay between alcohol, omega-3, and the ECS, the direct impact of omega-3 supplementation on the subcellular localization of CB1 receptors after alcohol exposure remains poorly understood.

In this study, we used immunoelectron microscopy to investigate whether omega-3 supplementation influences CB1 receptor distribution in the hippocampal CA1 region following alcohol withdrawal in adolescent male mice. Our results demonstrate that omega-3 partially restore the excitatory/inhibitory balance disrupted by alcohol, as evidenced by an increased number of excitatory terminals and a significant reduction in inhibitory terminals. However, the distribution and density of CB1 receptors within neuronal and glial compartments remain unchanged following alcohol exposure and omega-3 supplementation.

These findings highlight novel structural effects of omega-3 in mitigating alcohol-induced brain damage.

Keywords: Ethanol, adolescence, endocannabinoid system, neurons, glia, polyunsaturated fatty acids, central nervous system

■ Recibido: Abril 2025; Aceptado: Julio 2025.

■ ISSN: 0214-4840 / E-ISSN: 2604-6334

■ Enviar correspondencia a:

Pedro Grandes, Departamento de Neurociencias, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco UPV/EHU, 48940 Leioa, España.
Email: pedro.grandes@ehu.eus, tlf: +34 946012875.

Según la encuesta ESTUDES 2025, realizada por el Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, 2025), los adolescentes constituyen un grupo demográfico crítico en los patrones de consumo de alcohol, especialmente en lo referente al consumo intensivo episódico (*binge drinking* o consumo en atracón). Casi el 25% de los jóvenes de entre 14 y 18 años declaró haber participado en episodios de *binge drinking* en los 30 días previos a la encuesta. La prevalencia de este patrón es mayor en los varones (26,1%) que en las mujeres (23,3%), aunque en ambos sexos se ha observado un descenso significativo respecto a la encuesta de 2023, siendo esta disminución más pronunciada en las mujeres.

El consumo en atracón durante la adolescencia tiene repercusiones importantes para el desarrollo cerebral. Este periodo se caracteriza por una intensa remodelación neurobiológica, con cambios en la neurotransmisión, la plasticidad sináptica y la maduración estructural, particularmente en regiones cerebrales relacionadas con el aprendizaje, la memoria y la función ejecutiva. En consecuencia, la ingesta de alcohol durante esta ventana del desarrollo puede generar alteraciones duraderas y potencialmente irreversibles en la función cerebral, afectando la transmisión sináptica y la neuroplasticidad, lo que finalmente se traduce en déficits cognitivos, emocionales y motores (Abraham et al., 2017; Cservénka y Brumback, 2017; Kang et al., 2024; Keshavan et al., 2014; Lovinger y Abraham, 2018; Lovinger y Alvarez, 2017; Lovinger y Roberto, 2013; Pava y Woodward, 2012; Vetreno y Crews, 2015).

Las evidencias señalan la participación del sistema endocannabinoide (SEC) en la mediación de los efectos del alcohol sobre la función sináptica tanto en la exposición aguda como en la ingesta crónica y la abstinencia. El SEC desempeña un papel fundamental en la regulación de la motivación y el consumo de alcohol y es reconocido cada vez más como un elemento clave en la fisiopatología del trastorno por consumo de alcohol (TCA) (Gonzalez et al., 2002; Kunos, 2020; Navarrete et al., 2022; Peñasco et al., 2020; Sanchez-Marín et al., 2022; Vinod et al., 2006). Este sistema incluye receptores cannabinoides acoplados a proteínas G —principalmente CB1 y CB2—, los endocannabinoides 2-araquidonilglicerol (2-AG) y anandamida (AEA), así como la maquinaria enzimática encargada de su síntesis, degradación y transporte (Lu y Mackie, 2021).

Numerosos estudios han demostrado que la exposición crónica al alcohol reduce la expresión del ARNm y los niveles proteicos del receptor CB1, afectando a su densidad y función (Basavarajappa et al., 1998; Ortiz et al., 2004; Vinod et al., 2006). En humanos, el consumo crónico e intenso se asocia con una menor disponibilidad del receptor CB1 en varias regiones cerebrales, un efecto que a menudo persiste más allá de los periodos de abstinencia (Ceccarini et al., 2014; Hirvonen et al., 2013; Wolfé et al., 2022). Por el contrario, la eliminación genética o el antagonismo far-

macológico del receptor CB1 reduce la ingesta de alcohol, reforzando así su implicación en las conductas relacionadas con esta sustancia (Maccioni et al., 2010).

Aunque las intervenciones farmacológicas muestran un notable potencial para abordar la disfunción cognitiva inducida por el alcohol, las estrategias nutricionales, como la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFAs), están emergiendo como alternativas eficaces y accesibles. Se ha demostrado que los omega-3 pueden mejorar la pérdida de plasticidad cerebral inducida por la exposición prenatal al alcohol, lo que sugiere su utilidad en la prevención y el tratamiento de las alteraciones del neurodesarrollo asociadas al alcohol (Joffre et al., 2019; Patten et al., 2013a,b; Serrano et al., 2023). Además, estudios recientes indican que los omega-3 restauran la plasticidad sináptica y mejoran el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo tras la exposición al alcohol en periodos críticos del desarrollo (Haidary et al., 2024; Serrano et al., 2025). Así, la suplementación con omega-3 previene el deterioro del aprendizaje espacial y asociativo en ratas macho adolescentes expuestas al consumo crónico de alcohol. Esta mejora se relaciona con niveles más bajos de peroxidación lipídica e interleucina-6, lo que supone una reducción del estrés oxidativo y de la neuroinflamación hipocámpal (Haidary et al., 2024). Estos hallazgos coinciden con investigaciones previas (Faroqui, 2012; Patten et al., 2013a) y refuerzan el potencial neuroprotector de los omega-3 mediante la restauración del equilibrio redox y la modulación de las vías inflamatorias. Asimismo, los ácidos grasos omega-3, especialmente el ácido docosahexaenoico (DHA), aumentan la fluidez de la membrana, garantizando el correcto funcionamiento de los receptores asociados a ella (Bazinet y Layé, 2014; Joffre et al., 2019), lo que facilita la transmisión y la plasticidad sinápticas (Patten et al., 2013a,b). También modulan la expresión de receptores y de las cascadas de señalización implicadas en la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (Patten et al., 2013b; Serrano et al., 2024, 2025), procesos clave para el aprendizaje y la memoria (Peñasco et al., 2020; Serrano et al., 2025).

Se ha observado que la exposición al alcohol durante la adolescencia altera la plasticidad sináptica y modifica la expresión y la función del receptor CB1 en el hipocampo (Peñasco et al., 2020; Risher et al., 2015; Sabeti, 2011; Sanz-Martos et al., 2023), una región implicada en la memoria declarativa, espacial y asociativa. Nuestros estudios previos han mostrado que el *binge drinking* adolescente conduce a una reducción persistente de la expresión del ARNm de CB1 en el hipocampo adulto. Esta disminución se correlaciona con la pérdida de la LTD dependiente de endocannabinoides, lo que contribuye a los déficits de memoria (Peñasco et al., 2020; Rico-Barrio et al., 2019, 2021). Por tanto, comprender el papel del SEC en las alteraciones sinápticas inducidas por el alcohol es fundamental para identificar dianas terapéuticas destinadas a mitigar los efec-

tos a largo plazo de la exposición adolescente al alcohol y a tratar el TAC (Borgonetti et al., 2024; García-Baos et al., 2021; Kunos, 2020; Serrano et al., 2012, 2018; Stopponi et al., 2018; Wolfe et al., 2022). En particular, el *binge drinking* adolescente disminuye la expresión del receptor CB1 en la región CA1 del hipocampo adulto tras la abstinencia, afectando principalmente a su localización astrocítica y, en menor medida, a las terminales sinápticas excitadoras (Bonilla-Del Río et al., 2019). De manera similar, hemos observado una reducción de los receptores CB1 en las sinapsis excitadoras de la capa molecular del giro dentado tras la exposición al alcohol en la adolescencia (Peñasco et al., 2020). Por el contrario, la suplementación con omega-3 es capaz de aumentar la densidad del receptor CB1 tanto en las terminales sinápticas excitadoras como en las inhibitoras de dicha capa (Serrano et al., 2025). No obstante, aún se desconocen los efectos de una dieta enriquecida en omega-3 sobre la localización del receptor CB1 en la región CA1 del hipocampo tras la abstinencia de alcohol. Este aspecto es especialmente relevante debido al impacto del alcohol sobre esta región, que contribuye a la formación de memorias asociativas y desempeña un papel clave en el aprendizaje (Jeong et al., 2018; Takamiya et al., 2021).

En el presente estudio analizamos si la suplementación con omega-3 es capaz de modular, en ratones machos, las alteraciones inducidas por el alcohol en la distribución del receptor CB1 en la región CA1 del hipocampo. Mediante técnicas inmunocitoquímicas para microscopía electrónica, aportamos nuevos conocimientos sobre el potencial de los

ácidos grasos omega-3 para contrarrestar las consecuencias neurobiológicas a largo plazo de la exposición adolescente al consumo de alcohol en atracón.

Método

Declaración de ética

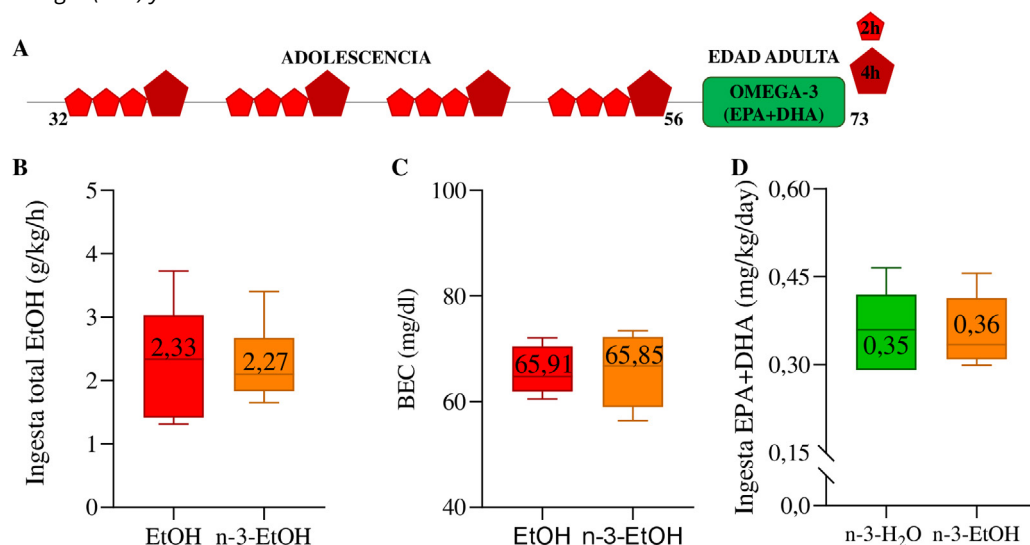
Los protocolos para el cuidado y uso de los animales fueron aprobados por el Comité de Ética para el Bienestar Animal de la Universidad del País Vasco (M20-2020-113; fecha de aprobación: 29/09/2020). Asimismo, cumplían con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas de 22 de septiembre de 2010 (2010/63/EU) y con la normativa española (Real Decreto 53/2013, BOE 08-02-2013). El número de animales y el sufrimiento fueron controlados y minimizados.

Tratamiento de los animales

Ratones machos C57BL/6J de cuatro semanas de edad (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Francia) fueron alojados por parejas y asignados aleatoriamente al grupo control (H_2O) o al grupo de alcohol (EtOH) ($n = 12$ por grupo). Los animales fueron sometidos al procedimiento drinking-in-the-dark (DID) (Rhodes et al., 2005) entre los días post-natales (PND) 32 y 56, durante un periodo de cuatro semanas (Bonilla-Del Río et al., 2019). Durante los primeros cuatro días de cada semana, los ratones fueron alojados individualmente y se les proporcionó un frasco de 10 mL que contenía agua corriente o una solución de EtOH al 20% v/v (preparada a partir de etanol al 96%; Boter S.L.,

Figura 1

Representación esquemática del modelo de consumo en la oscuridad (DID), ingesta voluntaria de etanol (EtOH), concentración de etanol en sangre (BEC) y consumo de EPA+DHA



Nota. A. Los ratones machos C57BL/6J fueron sometidos al procedimiento DID durante cuatro semanas (PND 32–56). Durante este periodo, tuvieron acceso libre a H_2O o EtOH durante 2 horas en los tres primeros días de cada semana y durante 4 horas el cuarto día. Durante el periodo de abstinencia (PND 57–73), a la mitad de los ratones se les administró una dieta enriquecida con omega-3 (2% EPA+DHA: 1,2% EPA y 0,8% DHA). **B.** Ingesta media de EtOH por hora (g/kg/h) a lo largo del DID (PND 32–56) (EtOH: $2,33 \pm 0,90$, $n=6$; n-3-EtOH: $2,27 \pm 0,62$, $n=6$). **C.** BEC (mg/dL) medida tras 4 horas de exposición a EtOH en el último día del procedimiento DID (PND 56) (EtOH: $65,91 \pm 4,59$, $n=6$; n-3-EtOH: $65,85 \pm 6,96$, $n=6$). **D.** Ingesta diaria media de EPA+DHA (mg/kg/día) durante el periodo de abstinencia (PND 57–73) (n-3- H_2O : $0,36 \pm 0,07$, $n=6$; n-3-EtOH: $0,35 \pm 0,06$, $n=6$). Todos los datos se expresan como media \pm S.E.M.

Barcelona). El acceso al frasco se mantuvo durante 2 horas en los tres primeros días y se amplió a 4 horas el cuarto día. Los tres días restantes de cada semana se destinaron al periodo de descanso, durante el cual los animales permanecieron con comida y agua *ad libitum* (Figura 1A).

La eficacia del procedimiento DID se evaluó mediante la medición de la ingesta total de EtOH (g/kg/h) (Figura 1B). Además, el último día del protocolo (PND 56), se obtuvieron muestras de sangre de la vena lateral de la cola 30 minutos después de finalizar la exposición al EtOH. La concentración de EtOH en sangre (BEC, mg/dL) se determinó posteriormente utilizando un kit comercial de cuantificación de etanol (Abcam, ab65646, España) (Figura 1C). En nuestras condiciones experimentales, las BEC se situaron por debajo del umbral asociado al *binge drinking* en adolescentes (>80 mg/dL) (Donovan, 2009). No obstante, se ha demostrado que estos niveles inducen alteraciones neurobiológicas significativas en roedores adolescentes (Bonilla-Del Río et al., 2019; Peñasco et al., 2020; Rico-Barrio et al., 2019; Serrano et al., 2025), lo que respalda la validez de este procedimiento como modelo de exposición en atracón (Rhodes et al., 2005).

Durante el periodo de abstinencia (PND 57–73), la mitad de los ratones (n = 6 por grupo) recibió una dieta enriquecida con un 2% de ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA) (1,2% EPA y 0,8% DHA) (SAFE, Augy, Francia), conformando los grupos n-3-H₂O y n-3-EtOH. Tanto los animales como el alimento se pesaron dos veces por semana con el fin de calcular la ingesta de EPA y DHA (mg/kg/día) (Figura 1D).

Procesamiento del tejido cerebral

En el PND 73, tres ratones de cada grupo fueron profundamente anestesiados con hidrato de cloral al 4% (10 mL/kg de peso corporal, i.p.) y perfundidos a través del ventrículo izquierdo con 30 mL de solución salina tamponada con fosfatos (PBS, 0,1 M, pH 7,4). Posteriormente, se realizó una perfusión con 80 mL de una solución fijadora compuesta por 4% de formaldehído, 0,2% de ácido pícrico y 0,1% de glutaraldehído, preparada en PBS y aplicada a

temperatura ambiente (TA). Los cerebros se extrajeron y se posfijaron en la misma solución fijadora a 4°C durante una semana, tras lo cual se transfirieron a un fijador diluido 1:10. A continuación, se obtuvieron secciones coronales de 50 µm de grosor utilizando un vibratomo (Leica VT 1000S, Wetzlar, Alemania) y se recogieron en tampón fosfato (PB, 0,1 M, pH 7,4) a TA.

Método de doble preinclusión con inmuno-oro e inmunoperoxidasa para microscopía electrónica

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo nuestro protocolo (Puente et al., 2015). Secciones coronales del hipocampo de 50 µm se preincubaron durante 30 minutos a TA en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 10% preparada en solución salina tamponada con Tris-HCl (TBS, pH 7,4) que contenía 0,1% de azida sódica y 0,02% de saponina. A continuación, las secciones se incubaron con anticuerpos primarios altamente específicos frente al receptor CB1 y el transportador glutamato-aspartato (GLAST) (Tabla 1), diluidos en BSA/TBS al 10% con 0,1% de azida sódica y 0,004% de saponina. Esta incubación se realizó con agitación suave durante dos días a 4°C. Tras lavados exhaustivos, las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 1) y posteriormente con una solución del complejo avidina-biotina (1:50, PK-7100, Vector Labs) durante 1,5 horas a TA. Finalmente, las secciones se lavaron durante toda la noche y se posfijaron durante 10 minutos en glutaraldehído al 1% preparado en TBS a TA.

Las partículas de oro se intensificaron posteriormente mediante plata utilizando un kit HQ Silver Enhancement (Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, EE. UU.) durante 12 minutos en la oscuridad. A continuación, las secciones se trataron con 0,05% de 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro y 0,01% de peróxido de hidrógeno en PB 0,1 M durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados, las secciones teñidas se posfijaron en tetróxido de osmio al 1% en PB 0,1 M durante 20 minutos, se deshidrataron en una serie graduada de alcoholes (50–100%) seguida de óxido de propileno, y se incluyeron en resina

Tabla 1

Anticuerpos primarios y secundarios utilizados

Anticuerpo	Concentración [µg/mL]	Especies y clonalidad	Antígeno inmunizante	Fuente, Cat.
Anti-CB1 receptor	2	Policlonal de cobaya	CB1 de ratón, 31 aa del extremo C-terminal (NM007726)	Nittobo Medical Co., CB1-GP-Af530
Anti-GLAST	0,3	Policlonal de conejo	GLAST de ratón, 41 aa del extremo C-terminal (NM148938)	Nittobo Medical Co., GLAST-Rb-Af660
Anti-cobaya conjugado con oro de 1.4 nm	0,8	Cabra (policlonal)	-	Nanoprobes, #2055
Anti-conejo biotinilado	7,5	Cabra (policlonal)	-	Vector Labs, BA-1000

Tabla 2

Número de terminales excitadoras e inhibitoras y de astrocitos positivos para GLAST en los ratones de cada grupo experimental

	H ₂ O				EtOH				n-3-EtOH				n-3-H ₂ O			
	n 1	n 2	n 3	Total	n 1	n 2	n 3	Total	n 1	n 2	n 3	Total	n 1	n 2	n 3	Total
Terminales excitadoras	458	396	283	1137	387	467	430	1284	228	375	276	879^{^^}	356	291	372	1019
Terminales inhibitoras	35	54	63	152	38	38	17	93[*]	37	33	45	115	45	75	52	172^{^^}
Astrocitos	115	279	238	632	102	214	126	442	129	135	343	607	350	382	179	911^{^^}

Nota. La significación estadística se analizó mediante ANOVA de un factor con pruebas de comparaciones múltiples paramétricas (Bonferroni) o no paramétricas (Dunn), según correspondiera. * $p < 0,05$ comparado con H₂O; ^^ $p < 0,01$ comparado con EtOH y $p < 0,05$ comparado con n-3-EtOH.

Epon 812. Posteriormente, se obtuvieron secciones ultrafinas de 50 nm con una cuchilla de diamante (Diatome, EE. UU.), las cuales se recogieron en rejillas de malla de níquel y se tiñeron con citrato de plomo al 2,5% durante 20 minutos. Estas secciones se examinaron con un microscopio electrónico (JEOL JEM 1400 Plus, Tokio, Japón), y las imágenes se adquirieron mediante una cámara digital (Mora sCMOS, Olympus, Tokio, Japón). Las micrografías se capturaron a un aumento de 8.000X, abarcando un área total aproximada de 1.100 μm^2 por ratón. El número de terminales excitadoras, inhibitoras y astrocitos marcados con GLAST fue consistente entre los grupos experimentales (Tabla 2).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 8 (GraphPad Software; RRID: SCR_002798). La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, seguida de un ANOVA de un factor y de pruebas de comparación múltiple paramétricas o no paramétricas, según correspondiera. Todos los valores se expresan como media \pm S.E.M.

Resultados

Localización del receptor CB1 en terminales sinápticas excitadoras e inhibitoras en el estrato radiado de CA1 después de la abstinencia del binge drinking en la adolescencia

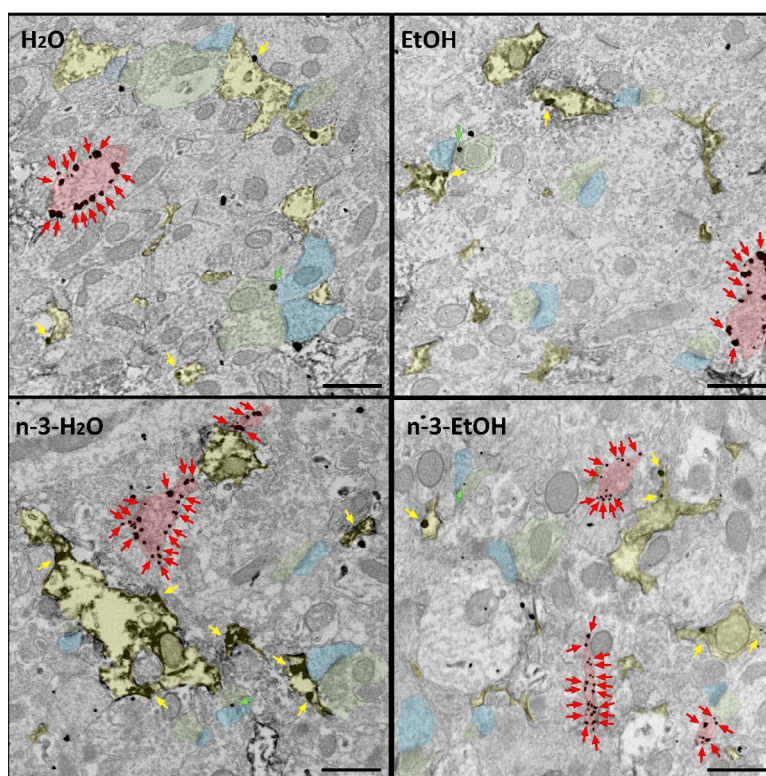
Como era de esperar, las partículas de oro se localizaron en terminales axónicas excitadoras e inhibitoras que formaban contactos sinápticos asimétricos y simétricos con espinas dendríticas y dendritas, respectivamente, en todos los grupos experimentales. Los análisis se realizaron en tres animales por grupo (Figura 2).

El número total de terminales excitadoras en el grupo EtOH ($\sim 1.100 \mu\text{m}^2$ por animal) se redujo significativamente en los ratones n-3-EtOH (EtOH: 1.284; n-3-EtOH: 879; EtOH vs. n-3-

EtOH ** $p < 0,01$) (Figura 3A; Tabla 2). Además, el número de terminales inhibitoras fue significativamente menor en los ratones EtOH en comparación con los grupos H₂O y n-3-H₂O (H₂O: 152; n-3-H₂O: 172; EtOH: 93; EtOH vs. H₂O * $p < 0,05$; EtOH vs. n-3-H₂O ** $p < 0,01$). Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos EtOH y n-3-EtOH, los ratones n-3-H₂O mostraron un número significativamente mayor de terminales inhibitoras en comparación con n-3-EtOH (n-3-EtOH: 115; n-3-H₂O: 172; n-3-EtOH vs. n-3-H₂O * $p < 0,05$) (Figura 3A; Tabla 2). En consecuencia, la proporción de terminales sinápticas excitadoras/inhedoras aumentó de manera significativa en los ratones EtOH en comparación

Figura 2

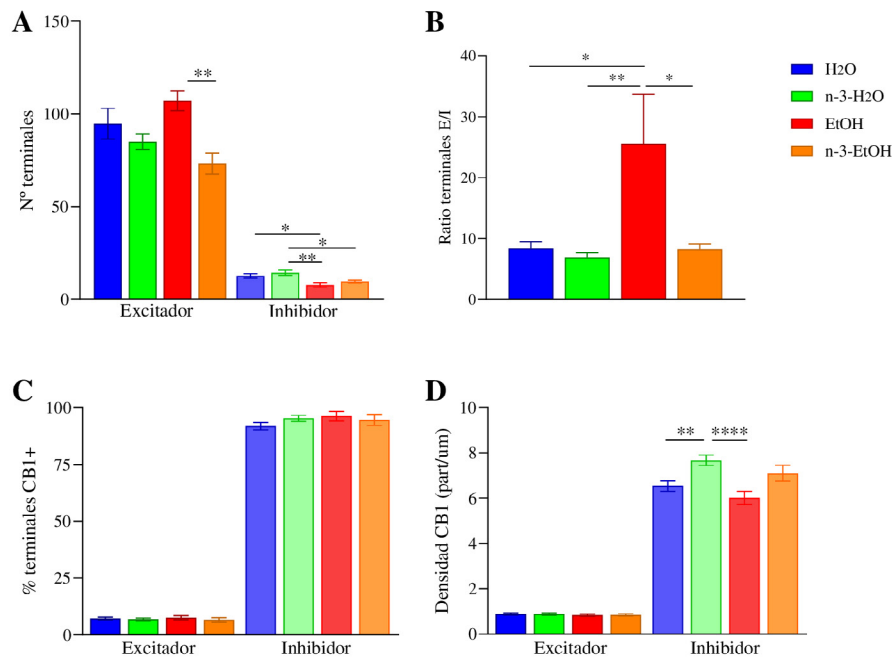
Localización ultraestructural del receptor CB1 en el estrato radiado de CA1 en ratones machos adultos de los grupos H₂O, n-3-H₂O, EtOH y n-3-EtOH



Nota. Los receptores CB1 se localizan en terminales de axones que forman sinapsis simétricas (sombreado y flechas rojas) y asimétricas (sombreado y flechas verdes), estas últimas sobre espinas dendríticas (sombreado azul), así como en membranas astrocíticas (sombreado y flechas amarillas). Barras de escala = 1 μm .

Figura 3

Distribución del receptor CB1 en compartimentos neuronales del estrato radiado de CA1 en ratones machos adultos de los grupos H₂O, n-3-H₂O, EtOH y n-3-EtOH



Nota. **A.** Número total de terminales excitadoras (H₂O: 1.137; n-3-H₂O: 1.019; EtOH: 1.284; n-3-EtOH: 879, **p<0,01 vs. EtOH) e inhibitoras (H₂O: 152; n-3-H₂O: 172; EtOH: 93, *p<0,05 vs. H₂O, *p<0,01 vs. n-3-H₂O; n-3-EtOH: 115, p<0,05 vs. n-3-H₂O) en el área analizada (~1.100 μm²) de los cuatro grupos experimentales. **B.** Ratio entre el número total de terminales excitadoras e inhibitoras (H₂O: 8,36 ± 1,12; n-3-H₂O: 6,83 ± 0,88; EtOH: 25,57 ± 8,11, *p<0,05 vs. H₂O, *p<0,01 vs. n-3-H₂O; n-3-EtOH: 8,21 ± 0,88, p<0,05 vs. EtOH). **C.** Porcentaje de terminales excitadoras (H₂O: 7,18 ± 0,58; n-3-H₂O: 6,86 ± 0,54; EtOH: 7,57 ± 0,91; n-3-EtOH: 6,59 ± 0,91) e inhibitoras CB1 positivas (H₂O: 91,89 ± 1,68; n-3-H₂O: 95,30 ± 1,29; EtOH: 96,30 ± 2,09; n-3-EtOH: 94,64 ± 2,41). **D.** Densidad del receptor CB1 (partículas/μm) en terminales excitadoras (H₂O: 0,89 ± 0,05; n-3-H₂O: 0,89 ± 0,05; EtOH: 0,84 ± 0,05; n-3-EtOH: 0,84 ± 0,05) e inhibitoras (H₂O: 6,54 ± 0,24; n-3-H₂O: 7,67 ± 0,23, **p<0,01 vs. H₂O; EtOH: 6,02 ± 0,29, **p<0,0001 vs. n-3-H₂O; n-3-EtOH: 97,11 ± 0,35). Todos los datos se expresan como media ± S.E.M. La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, seguida de un ANOVA de un factor con comparaciones múltiples paramétricas (Bonferroni) o no paramétricas (Dunn), según correspondiera.

Tabla 3

Porcentaje de terminales excitadoras, inhibitoras y astrocitos GLAST positivos que expresan el receptor CB1, y densidad de CB1 en el estrato radiado de CA1 en las cuatro condiciones experimentales (n = 3 ratones por grupo)

	H ₂ O	EtOH	n-3-EtOH	n-3-H ₂ O
Terminales excitadoras				
% CB1+	7,18 ± 0,58	7,57 ± 0,91	6,59 ± 0,91	6,86 ± 0,54
Densidad	0,89 ± 0,05	0,84 ± 0,05	0,84 ± 0,05	0,89 ± 0,05
Terminales inhibitoras				
% CB1+	91,89 ± 1,68	96,30 ± 2,09	94,64 ± 2,41	95,30 ± 1,29
Densidad	6,54 ± 0,24	6,02 ± 0,29	7,11 ± 0,35	7,67 ± 0,23****
Astrocitos				
% CB1+	26,92 ± 2,97	19,26 ± 2,67	22,48 ± 2,53	16,65 ± 1,38*
Densidad	0,64 ± 0,03	0,64 ± 0,05	0,70 ± 0,06	0,66 ± 0,04

Nota. Los valores se expresan como media ± S.E.M. La significación estadística se evaluó mediante ANOVA de un factor con pruebas de comparaciones múltiples paramétricas (Bonferroni) o no paramétricas (Dunn), según correspondiera. *p<0,05, p<0,01 en comparación con H₂O; y ****p<0,0001 en comparación con n-3-EtOH.

con los otros grupos experimentales (H₂O: 8,36 ± 1,12; n-3-H₂O: 6,83 ± 0,88; EtOH: 25,57 ± 8,11; n-3-EtOH: 8,21 ± 0,88; EtOH vs. H₂O y n-3-EtOH *p<0,05; EtOH vs. n-3-H₂O **p<0,01) (Figura 3B).

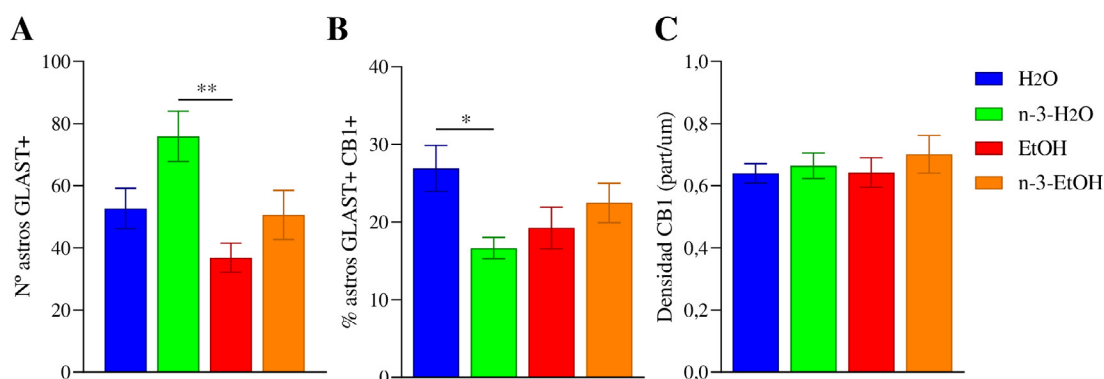
Tanto el porcentaje de terminales excitadoras positivas para CB1 como la densidad de partículas de CB1 fueron similares entre las cuatro condiciones experimentales (n-3-H₂O, EtOH, n-3-EtOH vs. H₂O; p>0,05) (Figura 3C y 3D; Tabla 3). Asimismo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de terminales inhibitoras positivas para CB1 (n-3-H₂O, EtOH, n-3-EtOH vs. H₂O; p>0,05). Sin embargo, la densidad del receptor aumentó significativamente tras la suplementación con omega-3 de los ratones control (H₂O: 6,54 ± 0,24; n-3-H₂O: 7,67 ± 0,23; n-3-H₂O vs. H₂O **p<0,01) (Figura 3C y 3D; Tabla 3).

Localización del receptor CB1 en astrocitos GLAST positivos en el estrato radiado de CA1 después de la abstinencia del binge drinking en la adolescencia

Las partículas de oro se localizaron en las membranas de los procesos astrocíticos en los cuatro grupos experimentales (Figura 2). El número total de astrocitos positivos para

Figura 4

Distribución del receptor CB1 en astrocitos del estrato radiado de CA1 en ratones machos adultos de los grupos H₂O, n-3-H₂O, EtOH y n-3-EtOH



Nota. **A.** Número total de astrocitos GLAST positivos en el área analizada (~1.100 μm^2) para los cuatro grupos experimentales (H₂O: 632; n-3-H₂O: 991; EtOH: 442, $p < 0,01$ vs. n-3-H₂O; n-3-EtOH: 607). **B.** Porcentaje de astrocitos CB1 positivos (H₂O: $26,92 \pm 2,97$; n-3-H₂O: $16,65 \pm 1,38$, $p < 0,05$ vs. H₂O; EtOH: $19,26 \pm 2,67$; n-3-EtOH: $22,48 \pm 2,53$). **C.** Densidad de CB1 (partículas/ μm) en astrocitos GLAST positivos (H₂O: $0,64 \pm 0,03$; n-3-H₂O: $0,66 \pm 0,04$; EtOH: $0,64 \pm 0,05$; n-3-EtOH: $0,70 \pm 0,06$). Todos los datos se expresan como media \pm S.E.M. La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, seguida de un ANOVA de un factor con pruebas de comparaciones múltiples paramétricas (Bonferroni) o no paramétricas (Dunn), según correspondiera.

GLAST en el área analizada (~1.100 μm^2 por animal) fue significativamente mayor en los ratones n-3-H₂O, en contraste con la disminución observada en los ratones EtOH (n-3-H₂O: 991; EtOH: 442; n-3-H₂O vs. EtOH $**p < 0,01$) (Figura 4A; Tabla 2).

En consonancia, el porcentaje de astrocitos GLAST positivos para CB1 se redujo en los ratones n-3-H₂O en comparación con los controles H₂O (H₂O: $26,92 \pm 2,97$; n-3-H₂O: $16,65 \pm 1,38$; n-3-H₂O vs. H₂O $*p < 0,05$) (Figura 3B). No obstante, la densidad del receptor CB1 fue similar entre las cuatro condiciones experimentales (n-3-H₂O, EtOH, n-3-EtOH vs. H₂O; $p > 0,05$) (Figura 3C; Tabla 3).

Discusión

Analizamos la distribución subcelular del receptor CB1 en terminales excitadoras e inhibitoras, así como en astrocitos, en el estrato radiado de la región CA1 del hipocampo. Mediante microscopía electrónica, obtuvimos una localización de alta resolución de CB1, lo que permitió recabar información detallada sobre los efectos sinápticos a largo plazo del *binge drinking* durante la adolescencia tras un periodo de abstinencia, así como sobre la influencia moduladora de una dieta suplementada con omega-3. Los ácidos grasos omega-3, en particular el DHA y el EPA, son esenciales para el mantenimiento de la salud cerebral. Como componentes fundamentales de las membranas neuronales, modulan su fluidez y, en consecuencia, la actividad de los receptores asociados a membrana y los procesos de plasticidad sináptica (Calder, 2016). El DHA, especialmente abundante en el cerebro, desempeña un papel crucial en la poda sináptica y la neuroprotección (Aguilera García

et al., 2010). Sin embargo, el consumo de alcohol reduce la absorción de DHA, disminuyendo sus niveles cerebrales y exacerbando el daño neuronal, particularmente durante la adolescencia (Akbar et al., 2006; Bondi et al., 2014). En contraste, la suplementación con omega-3 restaura los niveles de DHA, favoreciendo la sinaptogénesis, la actividad glutamatérgica y la expresión del receptor CB1 (Hashimoto et al., 2015; Kim, 2008).

Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la proporción de terminales sinápticas excitadoras respecto a las inhibitoras en ratones expuestos al alcohol. Este desequilibrio entre excitación e inhibición respalda hallazgos previos que indican que la exposición al alcohol durante la adolescencia altera la organización y la plasticidad sinápticas, particularmente en el hipocampo (Peñasco et al., 2020; Spear, 2018), y podría subyacer a los déficits cognitivos observados en la edad adulta (Serrano et al., 2025; Vetreno y Crews, 2015). De hecho, un desequilibrio persistente entre excitación e inhibición en la región CA1 tras una exposición posnatal en modalidad de atracón se ha asociado con una disregulación de la expresión génica sináptica y mitocondrial, entre la que se encuentra la expresión de *Cnr1* que codifica el receptor CB1, contribuyendo a una disfunción sináptica duradera, alteraciones en el aprendizaje y la memoria, así como a un aumento de los comportamientos ansiosos (Arzua et al., 2024). Nuestros datos muestran que la suplementación con omega-3 redujo significativamente el número de terminales excitadoras en CA1 tras la exposición al alcohol durante la adolescencia, con efectos mínimos sobre las terminales inhibitoras. Este efecto permitió restaurar el equilibrio excitador-inhibidor, poniendo de relieve el papel de los omega-3 en el mantenimiento de la integridad sináptica.

Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que demuestran los efectos neuroprotectores de los ácidos grasos omega-3 frente a la neurotoxicidad inducida por el alcohol (Patten et al., 2013b), lo que sugiere que estos lípidos pueden activar mecanismos compensatorios destinados a restablecer la plasticidad sináptica homeostática alterada por la exposición alcohólica en modalidad de atracón. Esta restauración podría implicar la modulación de la composición y la fluidez de la membrana —factores clave en la sinaptogénesis, la poda sináptica y el tráfico de receptores (Calder, 2016; Kim y Spector, 2018)—, así como la preservación de las redes sinápticas (Cao et al., 2009; Feltham et al., 2020; Lafourcade et al., 2011).

Dado el papel del receptor CB1 en la regulación de la transmisión sináptica, la recuperación funcional también podría implicar cambios en su actividad o en sus vías de señalización, incluso en ausencia de alteraciones en los niveles de expresión. En este sentido, observamos que la suplementación con omega-3 aumentó la densidad de CB1 en las terminales inhibitoras bajo condiciones control (H₂O), sin afectar a las terminales excitadoras. Estudios previos han demostrado que los omega-3 incrementan la expresión de CB1 (Kim et al., 2016), y nuestro laboratorio mostró que dicha suplementación aumenta aproximadamente en un 30 % la expresión del receptor en sinaptosomas hipocámpales en comparación con los controles (Serrano et al., 2024). Este incremento se asoció con la inducción de una LTP dependiente de endocannabinoides en las sinapsis excitadoras de la vía perforante medial en la capa molecular del giro dentado, una reducción de los comportamientos ansiosos y una mejora en la discriminación de objetos novedosos (Serrano et al., 2024). Desde un punto de vista mecanístico, la potenciación requirió la participación de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I, del endocannabinoide 2-AG y del receptor CB1 (Serrano et al., 2024).

Recientemente, demostramos que la suplementación con omega-3 durante la abstinencia alcohólica de ratones machos expuestos al alcohol mediante un modelo de *binge drinking* durante la adolescencia, aumentó la densidad del receptor CB1 en terminales presinápticas y restauró la unión de [³⁵S]GTPγS estimulada por receptor a proteínas Gαi/o. Estos efectos se asociaron con la inducción de una LTP en las sinapsis excitadoras de la vía perforante medial dependiente de AEA, del receptor de potencial transitorio tipo V1 (TRPV1) y de receptores NMDA, así como con una mejora parcial de los déficits cognitivos evaluados mediante el laberinto de Barnes (Serrano et al., 2025). Es plausible que los ácidos grasos omega-3 también modulen la transmisión y la plasticidad inhibitoras en la capa molecular del giro dentado y en el estrato radiado de CA1; sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

En este mismo estudio previo, la densidad del receptor CB1 aumentó significativamente en las terminales inhibitoras de la capa molecular del giro dentado tras el periodo de abstinencia, incrementándose aún más con la suplementación con omega-3 (Serrano et al., 2025). Este efecto no se observó en el estrato radiado de la región CA1, donde ni la exposición alcohólica ni la suplementación con omega-3 modificaron la densidad de CB1 en terminales excitadoras o inhibitoras. En conjunto, estos resultados indican que los efectos a largo plazo del alcohol y su modulación por los omega-3 dependen de la región y subregión del hipocampo, lo que subraya la necesidad de enfoques específicos por región para evaluar tanto las consecuencias fisiopatológicas como los potenciales beneficios terapéuticos.

En cuanto a los astrocitos, estudios anteriores de nuestro laboratorio demostraron que el *binge drinking* durante la adolescencia altera la morfología astrocítica y reduce en aproximadamente un 40 % la proporción de procesos astrocíticos positivos para CB1 identificados con anticuerpos frente a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), así como en un 30 % la densidad del receptor en el estrato radiado de la región CA1 de ratones machos adultos (Bonilla-Del Río et al., 2019). Por el contrario, el presente estudio no detectó cambios en la expresión de CB1 en astrocitos identificados con GLAST, lo que podría atribuirse a diferencias en los marcadores empleados. En este sentido, GFAP se localiza principalmente en las somas de los astrocitos, mientras que GLAST se expresa de forma abundante en sus procesos, cubriendo una mayor área y superficie de membrana (Achicallende et al., 2022). En definitiva, GLAST resulta ser un marcador más adecuado para estudios detallados de la localización de CB1 en astrocitos, dado que hasta un 12 % del CB1 total se encuentra en astrocitos GLAST-positivos, el doble de lo observado con GFAP (Achicallende et al., 2022).

La ausencia de alteraciones en la expresión de CB1 en astrocitos GLAST-positivos sugiere que la señalización antiinflamatoria mediada por este receptor se mantiene intacta tras el periodo de abstinencia. De manera similar, tampoco se observaron cambios en la capa molecular del giro dentado (Serrano et al., 2025). Por el contrario, la suplementación con omega-3 indujo modificaciones en la morfología astrocítica y en la distribución subcelular de CB1 dentro de los compartimentos astrocíticos, caracterizadas por un aumento en el número de compartimentos GLAST-positivos y una reducción en la proporción de astrocitos positivos para CB1, sin variaciones en la densidad total del receptor. Estos hallazgos sugieren que los omega-3 pueden modular la arquitectura de los astrocitos, incrementando la complejidad de sus procesos, y afectar indirectamente la localización de CB1 mediante mecanismos de remodelación morfológica, en vez de a través de cambios directos en los niveles de expresión del receptor (Champeil-Potokar et al., 2016; Das y Das, 2019; Joffre et al., 2019).

En conclusión, nuestros resultados refuerzan la evidencia de que las intervenciones dietéticas pueden modular el sistema endocannabinoide, ofreciendo un enfoque no farmacológico de interés de cara a mitigar los efectos adversos del consumo de alcohol en la adolescencia sobre la función cerebral. Estudios futuros deberán esclarecer los mecanismos subyacentes, en particular cómo los ácidos grasos omega-3 influyen en el equilibrio excitador-inhibidor a través del receptor CB1 en las terminales inhibitoras y regulan la función de los astrocitos. También es necesario incorporar modelos de *binge drinking* en hembras adolescentes para evaluar posibles diferencias dependientes del sexo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Cristina López-Andrés por la captura de las imágenes de ME. Esta investigación fue financiada por el Gobierno Vasco (IT1620-22 a PG); RD21/0009/0006 (a PG) y RD24/0003/0027 (a IG) financiados por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII); Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2022-138266NB-I00 apoyado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por las FEDER Una manera de hacer Europa, a GGdC). Garazi Ocerin cuenta con un contrato predoctoral financiado a través de las ayudas RD24/0003/0027 e IT1620-22.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias

- Abraham, K. P., Salinas, A. G. y Lovinger, D. M. (2017). Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses and circuits. *Neuron*, 96(6), 1223–1238. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.032>
- Achicallende, S., Bonilla-Del Río, I., Serrano, M., Mimenza, A., Lekunberri, L., Anaut-Lusar, I., Puente, N., Gerrikagoitia, I. y Grandes, P. (2022). GLAST versus GFAP as astroglial marker for the subcellular study of cannabinoid CB1 receptors in astrocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 158(6), 561–569. <https://doi.org/10.1007/s00418-022-02139-4>
- Aguilera García, C., Navarro Alarcón, M., Alonso Aperte, E., Álvarez Mercado, A. I., Carvajales, P. A. y Arredondo Olguín, M. (2010). *Tratado de Nutrición. Tomo I. Bases Fisiológicas y bioquímicas de la Nutrición* (2nd ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Akbar, M., Baick, J., Calderon, F., Wen, Z. y Kim, Y. (2006). Ethanol promotes neuronal apoptosis by inhibiting phosphatidylserine accumulation. *Journal of Neuroscience Research*, 83, 432–440. <https://doi.org/10.1002/jnr>
- Arzu, T., Yan, Y., Liu, X., Dash, R. K., Liu, Q.-S. y Bai, X. (2024). Synaptic and mitochondrial mechanisms behind alcohol-induced imbalance of excitatory/inhibitory synaptic activity and associated cognitive and behavioral abnormalities. *Translational Psychiatry*, 14, 51. <https://doi.org/10.1038/s41398-024-02748-8>
- Basavarajappa, B., Cooper, T. B. y Hungund, B. L. (1998). Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane. *Brain Research*, 793, 212–218. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00175-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00175-9)
- Bazinet, R. P. y Layé, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(12), 771–785. <https://doi.org/10.1038/nrn3820>
- Bondi, C., Taha, A., Tock, J., NK, T., Cheon, Y., Torres, G., Rapoport, R. y Moghaddam, B. (2014). Adolescent behavior and dopamine availability are uniquely sensitive to dietary omega-3 fatty acid deficiency. *Biological Psychiatry*, 75(1). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.06.007>
- Bonilla-Del Río, I., Puente, N., Peñasco, S., Rico, I., Gutiérrez-Rodríguez, A., Elezgarai, I., Ramos, A., Reguero, L., Gerrikagoitia, I., Christie, B. R., Nahirney, P. y Grandes, P. (2019). Adolescent ethanol intake alters cannabinoid type-1 receptor localization in astrocytes of the adult mouse hippocampus. *Addiction Biology*, 24(2), 182–192. <https://doi.org/10.1111/adb.12585>
- Borgonetti, V., Vozella, V., Ware, T., Cruz, B., Bullard, R., Cravatt, B. F., Galeotti, N. y Roberto, M. (2024). Excessive alcohol intake produces persistent mechanical allodynia and dysregulates the endocannabinoid system in the lumbar dorsal root ganglia of genetically-selected Marchigian Sardinian alcohol-preferring rats. *Pharmacological Research*, 209, 107462. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107462>
- Calder, P. C. (2016). Docosahexaenoic Acid. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 69(1), 8–21. <https://doi.org/10.1159/000448262>
- Cao, D., Kevala, K., Kim, J., Moon, H., Beom Jun, S., Lovinger, D. y Kim, H. (2009). Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *Journal of Neurochemistry*, 111(2), 510–521. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06335.x>
- Cecarini, J., Hompes, T., Verhaeghen, A., Casteels, C., Peuskens, H., Bormans, G., Claes, S. y Van Laere, K. (2014). Changes in cerebral CB1 receptor availability after acute and chronic alcohol abuse and monitored abstinence. *Journal of Neuroscience*, 34(8), 2822–2831. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0849-13.2014>
- Champeil-Potokar, G., Hennebelle, M., Latour, A., Vancassel, S. y Denis, I. (2016). DHA prevents corticosterone-induced changes in astrocyte morphology and function. *Journal of Neurochemistry*, 136, 1155–1167. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107462>

- Cservenka, A. y Brumback, T. (2017). The burden of binge and heavy drinking on the brain: Effects on adolescent and young adult neural structure and function. *Frontiers in Psychology*, 8, 1111. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.01111>
- Das, M. y Das, S. (2019). Docosahexaenoic acid (DHA) induced morphological differentiation of astrocytes is associated with transcriptional upregulation and endocytosis of β 2-AR. *Molecular Neurobiology*, 56, 2685–2702. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1260-0>
- Donovan, J. E. (2009). Estimated blood alcohol concentrations for child and adolescent drinking and their implications for screening instruments. *Pediatrics*, 123(6), 975–981. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-0027>
- Farooqui, A. A. (2012). *Lipid mediators and their metabolism in the brain*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9940-5>
- Feltham, B. A., Louis, X. L., Eskin, M. N. A. y Suh, M. (2020). Docosahexaenoic acid: outlining the therapeutic nutrient potential to combat the prenatal alcohol-induced insults on brain development. *Advances in Nutrition*, 11(3), 724–735. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz135>
- García-Baos, A., Alegre-Zurano, L., Cantacorps, L., Martín-Sánchez, A. y Valverde, O. (2021). Role of cannabinoids in alcohol-induced neuroinflammation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 104, 110054. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110054>
- Gonzalez, S., Cascio, M. G., Fernandez-Ruiz, J., Fezza, F., Di Marzo, V. y Ramos, J. (2002). Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Research*, 954(1), 73–81. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03344-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03344-9)
- Haidary, M., Ahmadi-Soleimani, S. M., Ghofraninejad, M., Azhdari-Zarmehri, H. y Beheshti, F. (2024). Omega-3 fatty acids supplementation prevents learning and memory impairment induced by chronic ethanol consumption in adolescent male rats through restoration of inflammatory and oxidative responses. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 84, 423–433. <https://doi.org/10.1002/jdn.10336>
- Hashimoto, M., Katakura, M., Tanabe, Y., Al Mamun, A., Inoue, T., Hossain, S., Arita, M. y Shido, O. (2015). N-3 fatty acids effectively improve the reference memory-related learning ability associated with increased brain docosahexaenoic acid-derived docosanoids in aged rats. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.bba-lip.2014.10.009>
- Hirvonen, J., Zanotti-Fregonara, P., Umhau, J. C., George, D. T., Rallis-Frutos, D., Lyoo, C. H., Li, C. T., Hines, C. S., Sun, H., Terry, G. E., Morse, C., Zoghbi, S. S., Pike, V. W., Innis, R. B. y Heilig, M. (2013). Reduced cannabinoid CB 1 receptor binding in alcohol dependence measured with positron emission tomography. *Molecular Psychiatry*, 18(8), 916–921. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.100>
- Jeong, Y., Huh, N., Lee, J., Yun, I., Lee, J., Lee, I. y Jung, M. (2018). Role of the hippocampal CA1 region in incremental value learning. *Scientific Reports*, 8(1), 9870. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28176-5>
- Joffre, C., Rey, C. y Layé, S. (2019). N-3 polyunsaturated fatty acids and the resolution of neuroinflammation. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01022>
- Kang, E., Yun, B., Cha, J., Suk, H. y Shin, E. (2024). Neurodevelopmental imprints of sociomarkers in adolescent brain connectomes. *Scientific Reports*, 14(1), 20921. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-71309-2>
- Keshavan, M., Giedd, J., Lau, J., Lewis, D. y Paus, T. (2014). Changes in the adolescent brain and the pathophysiology of psychotic disorders. *Lancet Psychiatry*, 1(7), 549–558. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(14\)00081-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(14)00081-9)
- Kim, H. Y. (2008). Biochemical and biological functions of docosahexaenoic acid in the nervous system: modulation by ethanol. *Chemistry and Physics of Lipids*, 153(1), 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.02.014>
- Kim, H. Y. y Spector, A. (2018). N-Docosahexaenoyl-ethanolamine: a neurotrophic and neuroprotective metabolite of docosahexaenoic acid. *Molecular Aspects of Medicine*, 64, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.03.004>
- Kim, J., Carlson, M. E., Kuchel, G. A., Newman, J. W. y Watkins, B. A. (2016). Dietary DHA reduces downstream endocannabinoid and inflammatory gene expression and epididymal fat mass while improving aspects of glucose use in muscle in C57BL/6J mice. *International Journal of Obesity*, 40, 129–137. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.135>
- Kunos, G. (2020). Interactions between alcohol and the endocannabinoid system. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 44(4), 790–805. <https://doi.org/10.1111/acer.14306>
- Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., De Smedt-Peyrusse, V., Labrousse, V. F., Bretillon, L., Matute, C., Rodríguez-Puertas, R., Layé, S. y Manzoni, O. J. (2011). Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nature Neuroscience*, 14(3), 345–350. <https://doi.org/10.1038/nn.2736>
- Lovinger, D. M. y Abrahao, K. P. (2018). Synaptic plasticity mechanisms common to learning and alcohol use disorder. *Learning and Memory*, 25, 425–434. <https://doi.org/10.1101/lm.046722.117>
- Lovinger, D. M. y Alvarez, V. (2017). Alcohol and basal ganglia circuitry: animal models. *Neuropharmacology*

- gy, 1(122), 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.03.023>
- Lovinger, D. M. y Roberto, M. (2013). Synaptic effects induced by alcohol. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 13, 31–86. https://doi.org/10.1007/7854_2011_143
- Lu, H. y Mackie, K. (2021). Review of the endocannabinoid system. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- Maccioni, P., Colombo, G. y Carai, M. (2010). Blockade of the cannabinoid CB1 receptor and alcohol dependence: Preclinical evidence and preliminary clinical data. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9, 55–59. <https://doi.org/10.2174/187152710790966623>
- Metna-Laurent, M. y Marsicano, G. (2015). Rising stars modulation of brain functions by astroglial type-1 cannabinoid receptors. *GLIA*, 63(3), 353–364. <https://doi.org/10.1002/glia.22773>
- Ministerio de Salud. (2025). *Estudes 2025*.
- Navarrete, F., Garcia-Gutierrez, M. S., Gasparyan, A., Navarro, D., Lopez-Picon, F., Morcuende, A., Femenía, T. y Manzanares, J. (2022). Biomarkers of the endocannabinoid system in substance use disorders. *Biomolecules*, 12(3), 396. <https://doi.org/10.3390/biom12030396>
- Ortiz, S., Oliva, J. M., Pérez-Rial, S., Palomo, T. y Manzanares, J. (2004). Chronic ethanol consumption regulates cannabinoid CB1 receptor gene expression in selected regions of rat brain. *Alcohol and Alcoholism*, 39(2), 88–92. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agh036>
- Patten, A., Brocardo, P. S. y Christie, B. R. (2013a). Omega-3 supplementation can restore glutathione levels and prevent oxidative damage caused by prenatal ethanol exposure. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(5), 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.04.003>
- Patten, A., Sickmann, H. M., Dyer, R. A., Innis, S. M. y Christie, B. R. (2013b). Omega-3 fatty acids can reverse the long-term deficits in hippocampal synaptic plasticity caused by prenatal ethanol exposure. *Neuroscience Letters*, 551, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.05.051>
- Pava, M. y Woodward, J. (2012). A Review of the interactions between alcohol and the endocannabinoid system: implications for alcohol dependence and future directions for research. *Alcohol*, 46(3), 185–204. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2012.01.002.A>
- Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Fontaine, C. J., Ramos, A., Reguero, L., Gerrikagoitia, I., Rodríguez de Fonseca, F., Barrondo, S., Aretxabala, X., García del Caño, G., Elezgarai, I., Nahirney, P., Christie, B. R. y Grandes, P. (2020). Intermittent ethanol exposure during adolescence impairs cannabinoid type 1 receptor-dependent long-term depression and recognition memory in adult mice. *Neuropsychopharmacology*, 45, 309–318. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0530-5>
- Puente, N., Reguero, L., Elezgarai, I., Canduela, M. J., Mendizabal-Zubiaga, J., Ramos-Uriarte, A., Fernández-Espejo, E. y Grandes, P. (2015). The transient receptor potential vanilloid-1 is localized at excitatory synapses in the mouse dentate gyrus. *Brain Structure and Function*, 220(2), 1187–1194. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0711-2>
- Rhodes, J. S., Best, K., Belknap, J. K., Finn, D. A. y Crabbe, J. C. (2005). Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiology and Behavior*, 84, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.10.007>
- Rico-Barrio, I., Peñasco, S., Lekunberri, L., Serrano, M., Egaña-Huguet, J., Mimenza, A., Soria-Gomez, E., Ramos, A., Buceta, I., Gerrikagoitia, I., Mendizabal-Zubiaga, J., Elezgarai, I., Puente, N. y Grandes, P. (2021). Environmental enrichment rescues endocannabinoid-dependent synaptic plasticity lost in young adult male mice after ethanol exposure during adolescence. *Biomedicine*, 9(7), 825. <https://doi.org/10.3390/biomedicine9070825>
- Rico-Barrio, I., Peñasco, S., Puente, N., Ramos, A., Fontaine, C. J., Reguero, L., Giordano, M. E., Buceta, I., Terradillos, I., Lekunberri, L., Mendizabal-Zubiaga, J., Rodríguez de Fonseca, F., Gerrikagoitia, I., Elezgarai, I. y Grandes, P. (2019). Cognitive and neurobehavioral benefits of an enriched environment on young adult mice after chronic ethanol consumption during adolescence. *Addiction Biology*, 24(5), 969–980. <https://doi.org/10.1111/adb.12667>
- Risher, M. L., Fleming, R. L., Risher, C., Miller, K., Klein, R., Wills, T., Acheson, S., Moore, S., Wilson, W., Eroglu, C. y Swartzwelder, H. S. (2015). Adolescent intermittent alcohol exposure: persistence of structural and functional hippocampal abnormalities into adulthood. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(6), 989–997. <https://doi.org/10.1111/acer.12725>
- Sabeti, J. (2011). Ethanol exposure in early adolescence inhibits intrinsic neuronal plasticity via sigma-1 receptor activation in hippocampal CA1 neurons. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(5), 885–904. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01419.x>
- Sanchez-Marin, L., Flores-Lopez, M., Pastor, A., Gavito, A., Suarez, J., De la Torre, R., Pavón, F., Rodríguez de Fonseca, F. y Serrano, A. (2022). Acute stress and alcohol exposure during adolescence results in an anxious phenotype in adulthood: Role of altered glutamate/endocannabinoid transmission mechanisms. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 8(113), 110460. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110460>
- Sanz-Martos, A. B., Fuentes-Verdugo, E., Merino, B., Morales, L., Pérez, V., Capellán, R., Pellón, R., Miguéns, M. y del Olmo, N. (2023). Schedule-induced alcohol intake during adolescence sex dependently impairs hippocam-

- pal synaptic plasticity and spatial memory. *Behavioural Brain Research*, 452, 114576. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114576>
- Serrano, A., Pavon, F., Buczynsky, M., Schlosburg, J., Natividad, L. A., Polis, I., Stouffer, D., Zorrilla, E., Roberto, M., Cravatt, B., Martin-Fardon, R., Rodriguez de Fonseca, F. y Parsons, L. H. (2018). Deficient endocannabinoid signaling in the central amygdala contributes to alcohol dependence-related anxiety-like behavior and excessive alcohol intake. *Neuropsychopharmacology*, 43(9), 1840–1850. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0055-3>
- Serrano, A., Rivera, P., Pavon, F., Decara, J., Suarez, J., Rodriguez de Fonseca, F. y Parsons, L. (2012). Differential effects of single versus repeated alcohol withdrawal on the expression of endocannabinoid system-related genes in the rat amygdala. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36(6), 984–994. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01686.x>
- Serrano, M., Rico-Barrio, I. y Grandes, P. (2023). The effect of omega-3 fatty acids on alcohol-induced damage. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1068343. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1068343>
- Serrano, M., Saumell-Esnaola, M., Ocerin, G., García del Caño, G., Puente, N., Sallés, J., Rodriguez de Fonseca, F., Rodriguez Arias, M., Guerricagotia, I. y Grandes, P. (2024). Impact of omega-3 on endocannabinoid system expression and function, enhancing cognition and behavior in male mice. *Nutrients*, 16(24), 4344. <https://doi.org/10.3390/nu16244344>
- Serrano, M., Saumell-Esnaola, M., Ocerin, G., García del Caño, G., Soria-Gómez, E., Mimenza, A., Puente, N., Bonilla-Del Río, I., Ramos-Uriarte, A., Reguero, L., Christie, B. R., Rodriguez De Fonseca, F., Rodriguez Arias, M., Gerrikagotia, I. y Grandes, P. (2025). Omega-3 fatty acids mitigate long-lasting disruption of the endocannabinoid system in the adult mouse hippocampus following adolescent binge drinking. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 5507. <https://doi.org/10.3390/ijms26125507>
- Spear, L. P. (2018). Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(4), 197–214. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.10>
- Stopponi, S., Fotio, Y., Domi, A., Borruto, A., Natividad, L., Roberto, M., Ciccocioppo, R. y Cannella, N. (2018). Inhibition of fatty acid amide hydrolase in the central amygdala alleviates co-morbid expression of innate anxiety and excessive alcohol intake. *Addiction Biology*, 23(6), 1223–1232. <https://doi.org/10.1111/adb.12573>
- Takamiya, S., Shiotani, K., Ohnuki, T., Osako, Y., Taniyama, Y., Yuki, S., Manabe, H., Hirokawa, J. y Sakurai, Y. (2021). Hippocampal CA1 neurons represent positive feedback during the learning process of an associative memory task. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 15, 718619. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.718619>
- Vetreno, R. P. y Crews, F. T. (2015). Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00035>
- Vinod, K. Y., Yalamanchili, R., Xie, S., Cooper, T. B. y Hungund, B. L. (2006). Effect of chronic ethanol exposure and its withdrawal on the endocannabinoid system. *Neurochemistry International*, 49, 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.05.002>
- Wolfe, S., Vozella, V. y Roberto, M. (2022). The synaptic interactions of alcohol and the endogenous cannabinoid system. *Alcohol Research*, 42(1), 03. <https://doi.org/10.35946/arc.v42.1.03>