

ORIGINAL

Diferencias sexuales en tareas emocionales y cognitivas en ratas expuestas a atracones de alcohol y en controles durante la adultez temprana

Sex differences in emotional and cognitive tasks in rats exposed to alcohol binges and controls during early adulthood

LETICIA LÓPEZ-VALENCIA^{*,**}; EVA BONILLA ^{*,**,*}; BERTA ESCUDERO^{*,**,*}; LAURA ORIO^{*,**,*}.

* Departamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias del Comportamiento, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, Pozuelo de Alarcón 28223, España.

** Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario 12 de Octubre (imas12), 28041, Madrid, España.

*** Red de Investigación en Atención Primaria de Adicciones (RIAPAd) (Research network in primary care in addictions), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), España.

Resumen

Integrar la perspectiva de sexo en estudios preclínicos sobre la exposición excesiva a alcohol durante la juventud o la adultez temprana sigue siendo limitada. Este estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de altas dosis de etanol en el comportamiento emocional y la cognición en ratas de 8 semanas de edad, considerando diferencias de sexo. Machos y hembras fueron expuestos a atracones de etanol (3 g/kg, vía oral; 3 veces al día durante 4 días) en un paradigma de dos días alternos, y evaluados en el laberinto elevado en cruz (EPM), la prueba de natación forzada (FST), la prueba de preferencia de sacarina (SPT), el laberinto acuático de Morris (MWM) y la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR).

Se observaron diferencias basales entre machos y hembras controles en tareas emocionales, motivacionales y cognitivas. Además, la Exposición Intensiva al Alcohol (EIA) ejerció efectos específicos por sexo en: a) EPM: los machos mostraron ansiedad y ningún efecto en las hembras; b) FST: síntomas similares a la depresión en ambos sexos, pero un tiempo de inmovilidad más pronunciado en las hembras; c) Prueba NOR: Se observó deterioro de la memoria a corto plazo en ambos sexos, pero las hembras mostraron un mejor rendimiento a largo plazo en comparación con sus controles. No se observaron efectos relacionados con la EIA en las pruebas de conducta SPT ni en MWM.

Estos resultados sugieren diferencias inherentes entre sexos en el rendimiento de los roedores en pruebas conductuales que evalúan las conductas emocionales, motivacionales y cognitivas. Además, la EIA podría afectar de forma diferente a machos y hembras durante la abstinencia en adultez temprana. Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar el sexo como una variable crítica en los estudios preclínicos.

Palabras clave: Alcohol, juventud, comportamiento, atracones, diferencias sexuales

Abstract

A sex perspective in the behavioural effects induced by alcohol binge exposure during youth or early adulthood remain limited. This study aimed to evaluate the effects of high doses of ethanol on emotional behaviour and cognition in 8-weeks old rats, from a sex perspective. Male and female animals were exposed to ethanol binges (3 g/kg, i.g.; 3 times/day x 4 days) in a 2days on-2days off paradigm and assessed in the elevated plus maze (EPM), forced swimming test (FST), saccharin preference test (SPT), Morris water maze (MWM) and novel object recognition (NOR) test.

Baseline differences between control male and females were observed in emotional, motivational and cognitive tasks. Additionally, Intensive Alcohol Exposure (IAE) exerted sex-specific effects in: a) EPM: males showed anxiety and no effect in females; b) FST: depressive-like symptoms in both sexes but more pronounced immobility time in females; c) NOR test: impairment in a short-term memory in both sexes but females displayed improved performance in a long-term versus their controls. No IAE-related effects were found in the SPT or MWM.

These results suggest inherent sex-differences in rodent performance in behavioural tests assessing emotional, motivational and cognitive behaviours. Additionally, IAE may impact male and females differently during abstinence in early adulthood. These findings underscore the importance of considering sex as a critical variable for preclinical studies.

Key words: Alcohol, youth, behaviour, binge drinking, sex differences

■ Recibido: Julio 2025; Aceptado: Octubre 2025.

■ Enviar correspondencia a:

Dr. Laura Orío Ortiz. Departamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias del Comportamiento, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid. Campus de Somosaguas, Ctra. de Húmera, s/n. Madrid, Pozuelo de Alarcón, 28223, España.

E-mail: lorio@psi.ucm.es. Tlf: +34 913943074.

■ ISSN: 0214-4840 / E-ISSN: 2604-6334

Tradicionalmente, la mayoría de los estudios preclínicos en modelos animales se han realizado en machos y, por lo tanto, existe una significativa falta de información y un sesgo por sexo en una gran cantidad de resultados biomédicos y psicobiológicos. Durante la última década, se ha producido un giro vertiginoso en la comunidad científica sobre este tema, instando a la incorporación de la variable sexo en todas las investigaciones preclínicas y también de la perspectiva de género en los estudios en humanos. De hecho, los cambios políticos, como el mandato de 2016 de los National Institutes of Health (NIH), enfatizan la inclusión del sexo como una variable biológica crítica en la investigación preclínica y clínica (Campbell et al., 2024; Costa-Valle et al., 2022; Kaluve et al., 2022). Esta necesidad emergente de comprender las diferencias por sexo en la investigación preclínica también afecta a los estudios relacionados con el abuso de alcohol. Aunque los esfuerzos para abordar estos sesgos metodológicos se han intensificado en los últimos años, la exploración de las diferencias basadas en el sexo en el contexto del abuso de alcohol sigue siendo escasa, específicamente el impacto del abuso de alcohol en las respuestas conductuales, incluidas las subdivisiones emocionales y cognitivas.

Varias líneas de investigación que estudian el impacto del consumo de alcohol en atracón (CAA) en jóvenes o adultos tempranos, incluida nuestra propia experiencia, han conducido a importantes consecuencias biológicas y conductuales de este patrón tan peligroso de consumo de alcohol sin un enfoque específico en la variable sexo (Antón et al., 2017, 2018), y solo más recientemente hemos abordado esta cuestión importante (López-Valencia et al., 2024; Orio et al., 2018).

El CAA consiste en una exposición intensiva al alcohol (EIA). Se define como el consumo de 4 o 5 unidades estándar de bebida (UBE) en un corto período de tiempo. Se sabe que el aumento agudo en los niveles de etanol en sangre (BELs) alcanzado durante este patrón de consumo de alcohol (≥ 80 g/dL) contribuye a los efectos neurotóxicos y a las alteraciones en la plasticidad cerebral (Patrick et al., 2021; Waszkiewicz et al., 2018), y está asociado con neuroinflamación y alteraciones emocionales y cognitivas (Antón et al., 2017; Crews et al., 2016; Orio et al., 2018; Pascual et al., 2007, 2014). A pesar de sus resultados adversos, el CAA es particularmente prevalente entre adolescentes y jóvenes, quienes suelen sentirse atraídos hacia este patrón de consumo debido a su asociación con la desinhibición conductual. La OMS y otros sistemas globales de monitoreo han informado sobre la prevalencia del consumo episódico intenso en diferentes grupos de edad, enfatizando su impacto en la salud pública (World Health Organization, 2024). Los jóvenes son más vulnerables a los efectos reforzadores de las drogas, especialmente del alcohol, que a menudo es fácilmente accesible en muchos entornos. De hecho, una combinación de vulnerabilidad biológica y una predisposición a buscar nuevas experiencias aumenta el riesgo de consumo y abuso de sustancias durante la adolescencia (Chung et al., 2018; Maldonado-Devincci et al., 2022; Sicher et al., 2022; Spear, 2018).

Este estudio tiene como objetivo investigar los efectos de la EIA de manera comparativa en ratas jóvenes macho y hembra durante la abstinencia temprana, utilizando un modelo animal validado y centrándose en comportamientos cognitivos y emocionales. Buscar posibles diferencias específicas por sexo en el desempeño de varias pruebas nos ayudará potencialmente a comprender mejor las diferencias basales en el comportamiento normal y el mecanismo subyacente del abuso de alcohol para cada sexo en un futuro próximo.

Material y métodos

Animales

Cincuenta y siete ratas Wistar (Envigo®, Barcelona, España) de siete semanas de edad a su llegada se utilizaron en todos los experimentos. Las hembras y los machos fueron alojados en diferentes habitaciones aisladas en grupos de 3-4 por jaula. Se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad ($59 \pm 10\%$) bajo un ciclo invertido de 12 h oscuridad-luz (luces encendidas a las 8:00 p.m.), con libre acceso a comida y agua. Los animales se habituaron a estas condiciones durante una semana antes de los experimentos y luego fueron manipulados suavemente para aclimatare a los experimentadores y al procedimiento de gavage.

Todos los procedimientos fueron aprobados y se ajustaron a las directrices del Comité de Bienestar Animal de la Universidad Complutense de Madrid (referencias de aprobación ética: PROEX 312/19; PROEX 122.7/23), siguiendo la legislación europea (2010/63/EU).

Diseño experimental

Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a los grupos control y alcohol: grupo control macho ($n=9$), grupo alcohol macho ($n=10$), grupo control hembra ($n=18$) y grupo alcohol hembra ($n=20$). Las ratas recibieron dosis intermitentes intragástricas (i.g.) de etanol o agua tres veces al día durante cuatro días utilizando cánulas específicas (aguja 16-G, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), en un protocolo de 2 días de administración/2 días de descanso (Fig. 1A). Este es un protocolo modificado (de Antón et al., 2017; Obernier et al., 2002; Rodríguez-González et al., 2021) previamente utilizado por nuestro grupo (Lopez-Valencia et al., 2024), que introduce un periodo de abstinencia, un factor relevante implicado en los efectos perjudiciales del consumo en atracón (Pascual et al., 2007). Los experimentos en hembras se realizaron por duplicado para aumentar la validez interna de los resultados, que se presentan como un conjunto de datos procedentes de dos experimentos idénticos.

Evaluación conductual

La evaluación conductual fue programada con un intervalo de tiempo suficiente para evitar interferencias entre las pruebas, y se realizó durante la fase oscura (ver Fig. 1B para la línea temporal experimental). Las ratas fueron evaluadas en

pruebas tradicionales utilizadas para analizar alteraciones emocionales y cognitivas, siguiendo una alternancia de los grupos experimentales en todas las pruebas. Los análisis se realizaron mediante un protocolo doble ciego para asegurar la veracidad de los resultados.

**Conducta tipo ansiosa:
Laberinto en Cruz Elevado**

Para evaluar la conducta tipo ansiosa, realizamos la prueba del Laberinto en Cruz Elevado (EPM) 12 h después del último atracón de etanol. El EPM se basa en un equilibrio entre el miedo y la curiosidad hacia la novedad, y está diseñado para evaluar conductas relacionadas con la ansiedad en roedores (Cosquer et al., 2005; Pellow et al., 1985).

El EPM se realizó sobre dos brazos abiertos de plástico negro y gris (50 x 10 cm) y dos brazos cerrados perpendiculares del mismo tamaño pero con paredes opacas de 50 cm de altura. La unión de los cuatro brazos formaba una zona central cuadrada (10 cm²). El aparato estaba elevado 65 cm sobre el suelo. La intensidad de luz se ajustó a 20 lux. El día de la prueba, cada rata se colocó en la plataforma central mirando hacia un brazo cerrado y en posición opuesta al experimentador. Luego, el animal pudo explorar libremente el laberinto durante 5 min. Entre animales, el laberinto se limpió cuidadosamente con etanol al 5% para eliminar posibles olores. Una rata cayó inicialmente del EPM y fue excluida del análisis. El número de entradas y el tiempo empleado en todos los brazos fueron medidos me-

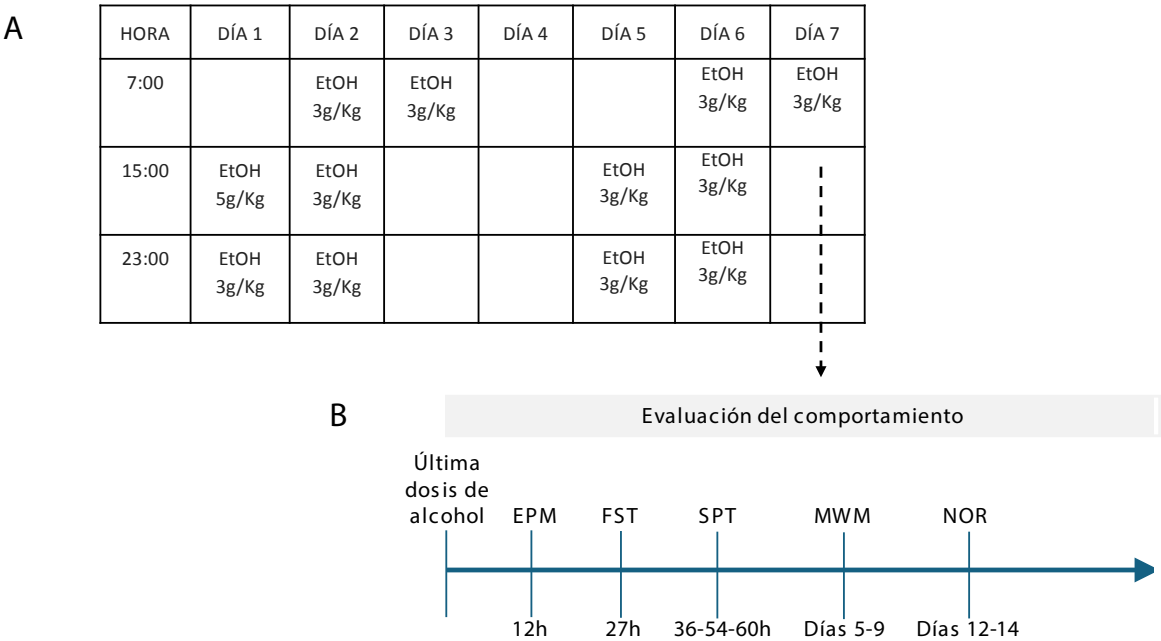
diante un sistema controlado por ordenador (Mazesoft-4) que registraba las interrupciones de haces infrarrojos situados a lo largo de cada brazo. El porcentaje de cada parámetro se calculó a partir del total de entradas en cualquier brazo y del tiempo total empleado en ambos tipos de brazos, respectivamente. Se consideró una visita siempre que el animal entrara en un brazo con las cuatro extremidades. La conducta tipo ansiosa se definió como una disminución en el número de entradas y del tiempo empleado en los brazos abiertos en relación con las entradas totales y el tiempo total, respectivamente.

**Conducta tipo depresiva:
Prueba de Natación Forzada**

La Prueba de Natación Forzada (FST) se basa en el método descrito por Porsolt (Porsolt et al., 1977) y es uno de los ensayos más comunes para el estudio de la conducta tipo depresiva en roedores (Slattery y Cryan, 2012; Yankelevitch-Yahav et al., 2015), aunque existen opiniones contradictorias (Armario, 2021).

Los animales fueron evaluados 27 h después de la última administración de etanol (ver Fig. 1 para el diseño experimental). Se colocaron individualmente en cilindros transparentes (47 x 35 cm) llenos de agua (25 ± 1°C) durante 5 min. Se analizaron conductas orientadas al escape, como nado (movimientos horizontales en el tanque), trepa (movimientos verticales de las patas delanteras), inmovilidad y latencia a la inmovilidad. Todos los ensayos se realizaron bajo luz roja

Figura 1
Representación esquemática del diseño experimental



Nota. A) Exposición intensiva al alcohol; los atracones fueron administrados por vía intragástrica, 3g/kg, excepto la dosis inicial que fue de 5 g/kg, cada 8 horas en un protocolo de 2 días ON-2 días OFF-2 días ON; **B)** Línea temporal de las pruebas de comportamiento. EtOH: etanol; **EPM:** elevated plus maze (laberinto en cruz elevado); **FST:** forced swimming test (test de natación forzada); **SPT:** saccharin preference test (test de preferencia por la sacarina); **MWM:** Morris water maze test (laberinto acuático de Morris); **NOR:** novel object recognition test (test de reconocimiento de objetos novedosos).

y fueron grabados para análisis posterior. Un aumento de la inmovilidad o una disminución en los tiempos de nado, escalada o latencia se consideraron indicativos de conducta depresiva, reflejando una falta de persistencia en el escape (Cryan et al., 2002; Detke et al., 1995).

Conducta anhedónica:

Prueba de Preferencia por Sacarina

La Prueba de Preferencia por Sacarina (SPT) se utiliza para medir la sensibilidad a la recompensa en roedores (Scheggi et al., 2018). Una vez finalizado el FST, alrededor de 27 h tras el último atracón, los animales fueron secados con una toalla y alojados individualmente, con comida *ad libitum*. En cada jaula individual, se ofreció a las ratas una elección libre entre 2 botellas, una con sacarina al 0,1% (p/v) y otra con agua del grifo. Las botellas se pesaron para determinar el consumo de líquido y se colocaron en la jaula alternando la posición del agua y la sacarina para evitar preferencia por localización. El consumo de líquido se midió en momentos específicos de abstinencia desde el último atracón (36 h, 54 h, 60 h) y se calculó el consumo acumulado. La preferencia por sacarina se mostró como el porcentaje de sacarina consumida respecto al total de líquido ingerido. Una disminución en la preferencia por la solución dulce (recompensa natural) se considera una manifestación de anhedonia, un síntoma central de la conducta tipo depresiva (Scheggi et al., 2018; Slaterry et al., 2007).

Memoria espacial:

Laberinto Acuático de Morris

La prueba del Laberinto Acuático de Morris (MWM) se utiliza para medir el aprendizaje y la memoria espacial en roedores (Rendeiro et al., 2009). Esta prueba se llevó a cabo durante 5 días consecutivos en una piscina circular (diámetro 122 cm). El agua del tanque se volvió opaca con témpera blanca no tóxica (temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$). La piscina estaba en una sala con señales externas visibles y la intensidad de luz controlada. El experimentador también actuaba como señal. Una plataforma (diámetro 10 cm) estaba sumergida 1-2 cm bajo la superficie del agua en uno de los cuatro cuadrantes imaginarios iguales. Durante 4 días consecutivos, los animales fueron entrenados para encontrar la plataforma sumergida en una ubicación fija del MWM. Cada día consistía en 4 ensayos en los que los animales eran liberados mirando hacia la pared desde diferentes puntos. Cada ensayo tenía una latencia máxima de 60 s, en los que los animales exploraban libremente la piscina para alcanzar la plataforma. Todas las ratas permanecían en la plataforma 10 s más antes de ser retiradas del agua. Las latencias para encontrar la plataforma se registraron en cada ensayo y se calculó el promedio por día y animal. Tras cada ensayo, los animales eran secados y retornados a sus jaulas de origen.

El quinto día, la prueba se realizó sin la plataforma durante 60 s con una nueva posición de inicio en la piscina para asegurar

que los animales recordaran la localización objetivo y no una trayectoria específica. Aquí, se midió la latencia para alcanzar la localización previa de la plataforma, el número de cruces sobre dicha localización y el tiempo empleado dentro de un anillo imaginario (diámetro 30 cm) alrededor de donde había estado la plataforma. Todos los ensayos fueron grabados por una cámara situada encima de la piscina para su análisis posterior (Vorhees y Williams, 2006).

Memoria de reconocimiento:

Prueba de Reconocimiento de Objetos

La Prueba de Reconocimiento de Objetos (NOR) se realizó para estudiar posibles alteraciones de memoria basadas en la tendencia de los roedores a interactuar más con un objeto nuevo que con uno familiar (Bevins y Besheer, 2006).

La prueba se realizó en un recinto cuadrado (80 x 80 x 42 cm) con paredes y suelo pintados en negro mate. El recinto se subdividió en 4 secciones iguales, permitiendo la evaluación simultánea de 4 ratas. El NOR se realizó de acuerdo con estudios previos (Marco et al., 2013; Moya et al., 2022) bajo condiciones de baja iluminación (20 lux). La prueba se organizó en tres fases: habituación (tiempo = 0), fase de entrenamiento (pre-test) y dos sesiones de prueba, a las 4 h y 24 h tras la fase de entrenamiento. Durante la habituación, los animales exploraron libremente la arena durante 5 min sin objetos. En la fase de entrenamiento, 2 objetos idénticos (botellas de vidrio) se colocaron en esquinas opuestas la arena, y los animales los exploraron libremente durante 3 min. En la sesión de prueba 4 h después del entrenamiento, uno de los objetos familiares (F, botella de vidrio) fue sustituido por un objeto nuevo (N1, cenicero verde), y las ratas exploraron ambos objetos durante 5 min. En la sesión de 24 h, el objeto nuevo N1 fue sustituido por otro objeto nuevo (N2, hucha), y las posiciones de los objetos se alternaron para evitar preferencias por localización. Tanto las sesiones de entrenamiento como las de prueba fueron grabadas en vídeo (Sony DCRDV-D310E, España). Se consideró exploración de un objeto cuando los animales dirigían el hocico hacia él a una distancia ≤ 1 cm, mientras que girar alrededor, trepar o morder los objetos no se consideró exploración. Se registró la latencia para explorar por primera vez el objeto nuevo en las sesiones de prueba y se calculó el índice de discriminación (DI) como la diferencia entre el tiempo explorando el objeto nuevo y el familiar en relación con el tiempo total de exploración de ambos objetos.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como media \pm S.E.M. y se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de 2 vías), comparando los factores [alcohol/agua] frente a sexo [macho/hembra], cuando se verificó la normalidad; de lo contrario, se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis. La prueba de preferencia por sacarina se analizó mediante un ANOVA de tres vías con tiempo (36 h, 54 h, 60 h), tratamiento de alcohol (agua frente a alcohol) y sexo (machos vs. hembras) como factores independientes. Se reali-

zaron comparaciones *post hoc* (Bonferroni o Dunn) en caso de interacción significativa entre factores. La homocedasticidad se comprobó mediante la prueba de Barlett y los datos se transformaron (sqrt, log10) cuando fue necesario. Los valores outliers se excluyeron utilizando la prueba de Grubbs. Se estableció un valor $p < 0,05$ como umbral de significación estadística en todos los análisis. Todos los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Aspectos éticos

Todos los protocolos han sido aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad Complutense de Madrid (referencia: PROEX 312/19), siguiendo la legislación europea (2010/63/EU).

Resultados

Efectos sobre la ansiedad

En el EPM, observamos un aparente efecto opuesto del alcohol en machos y hembras frente a sus controles a las 12 h de abstinencia, en relación con el porcentaje de entradas en los brazos abiertos (Fig. 2A). La prueba de Kruskal-Wallis fue significativa (Kruskal-Wallis = 10,66, $p=0,0137$), y la prueba *post hoc* de Dunn sugirió una conducta ansiógena en los machos tratados con alcohol comparados con sus controles (tendencia, muy cercana a la significación ($p=0,055$)), que no

se observó en las hembras. De hecho, los datos en hembras parecen seguir el patrón opuesto y, a pesar de no existir diferencias significativas entre los grupos control y etanol en hembras, las ratas hembra tratadas con etanol entraron más en los brazos abiertos comparado con los machos tratados con etanol (Fig. 2A; $p=0,0168$).

Respecto al porcentaje de tiempo empleado en los brazos (Fig. 2B), el ANOVA de 2 vías mostró una interacción significativa entre etanol y sexo ($F_{(1,49)}=14,01$, $p=0,0005$) y un efecto principal de etanol ($F_{(1,49)}=7,290$, $p=0,0095$). Las comparaciones *post hoc* de Bonferroni revelaron una diferencia entre controles machos y hembras, con las hembras pasando menos tiempo en los brazos abiertos ($p<0,05$). La EIA indujo un efecto claramente ansiógeno en los machos ($p<0,01$) pero no en las hembras ($p>0,05$, n.s.) en comparación con sus respectivos controles (Fig. 2B), como también sugirieron los datos mencionados en la Fig. 2A.

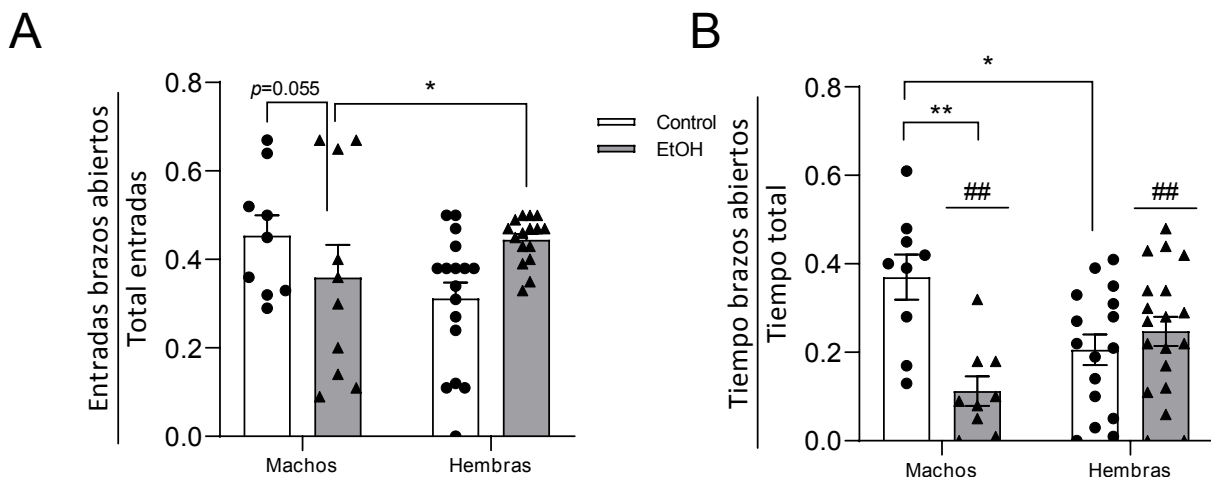
Efectos sobre la conducta tipo depresiva

En el FST, el tratamiento con atracones de etanol indujo reducciones en la latencia a la primera inmovilidad (Fig. 3A; $F_{(1,53)}=0,01111$, $p=0,0090$), sin diferencias por sexo, indicativo de una conducta tipo depresiva durante la abstinencia temprana de alcohol (~27 h).

La interacción entre factores (tratamiento y sexo) estuvo en el límite de la significación para la inmovilidad (Fig. 3B; $F_{(1,53)}=3,964$, $p=0,0517$) y fue significativa para el tiempo de

Figura 2

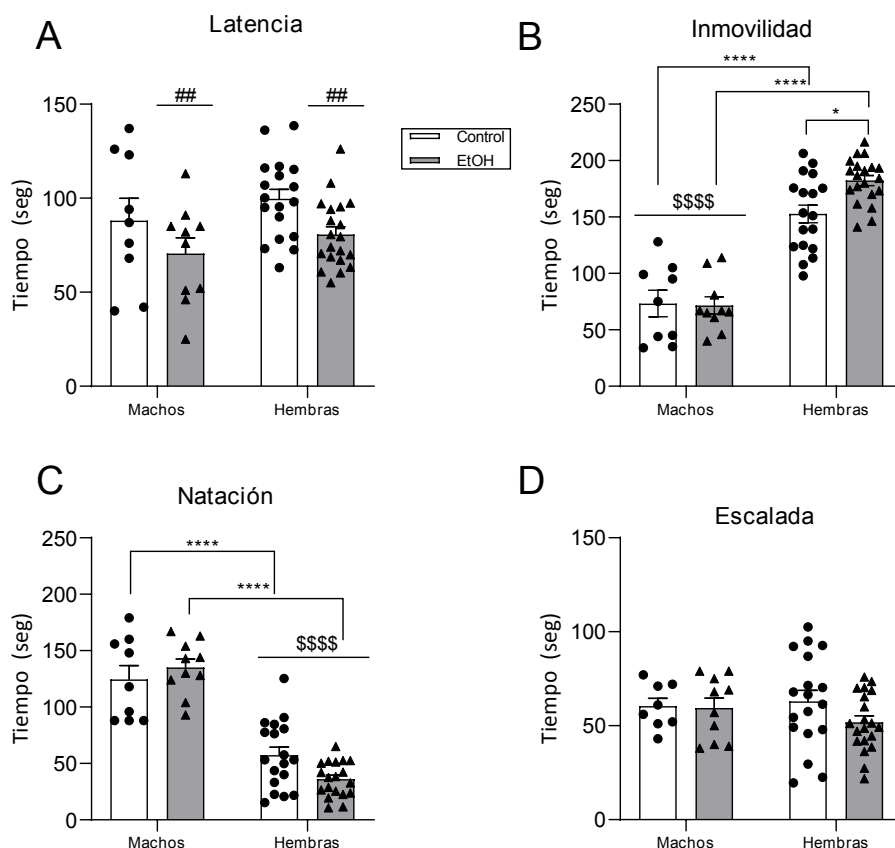
Test del laberinto en cruz elevada (EPM) para evaluar el comportamiento similar a la ansiedad en machos y hembras



Nota. A) Ratio de entradas en los brazos abiertos sobre el total de entradas; B) Ratio del tiempo pasado en los brazos abiertos sobre el total de tiempo pasado en ambos brazos. Los animales fueron evaluados 12h después de la última administración de alcohol. Los resultados representan la media \pm S.E.M. ($n=9-10$ los machos y $n=18-20$ las hembras; agrupación de sujetos de dos experimentos idénticos). Análisis no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de la prueba *post hoc* de Dunn (A): $*p < 0,05$. ANOVA de dos vías (B): Interacción medida por la prueba *post hoc* de Bonferroni (Fig.2A): $*p < 0,05$, $**p < 0,001$. Efecto principal del alcohol (EtOH): $##p < 0,001$.

Figura 3

Test de natación forzada (FST) para evaluar el comportamiento de tipo depresivo



Nota. A) Latencia a la inmovilidad; B) Tiempo de inmovilidad; C) Tiempo de natación; D) Tiempo de escalada. Los animales fueron evaluados con esta prueba en torno a 27h después de la última administración de alcohol. Los resultados representan la media \pm S.E.M. ($n=9-10$ los machos y $n=18-20$ las hembras = sujetos agrupados procedentes de dos experimentos idénticos). ANOVA de dos vías: Efecto principal del alcohol (EtOH) $^{**}p < 0,001$; efecto principal del sexo $^{ssss}p < 0,0001$; interacción tras *post hoc* de Bonferroni: las hembras tratadas con alcohol difieren de las hembras control $^{*}p < 0,05$; las hembras difieren de los machos $^{*}p < 0,0001$.

nado (Fig. 3C; $F_{(1,52)}=4,622$, $p=0,0362$), con pruebas post hoc de Bonferroni indicando que las hembras tratadas con etanol podrían tener mayor inmovilidad frente a sus controles hembra ($p < 0,05$). Un efecto principal del sexo para la inmovilidad y el nado ($F_{(1,53)}=146,1$, $p < 0,0001$ y $F_{(1,52)}=126,5$, $p < 0,0001$, respectivamente) indicó que las hembras mostraron mayor duración de inmovilidad y menor tiempo de nado, un efecto también mostrado tras la prueba post hoc de Bonferroni (Fig. 3B, $p < 0,0001$; Fig. 3C, $p < 0,0001$, respectivamente).

No se observaron diferencias en los tiempos de escalada entre grupos experimentales (Fig. 3D; efecto principal EtOH: $F_{(1,52)}=1,241$, $p=0,2705$; efecto principal Sexo: $F_{(1,52)}=0,2063$, $p=0,6516$; interacción entre factores: $F_{(1,52)}=0,8724$, $p=0,3546$).

Efectos sobre el estado motivacional negativo o anhedonia

El SPT comenzó 27 h después de la última exposición a atracones y registramos el consumo acumulado durante las 36 h, 54 h y 60 h de abstinencia alcohólica (Fig. 4). El ANOVA de 3 vías de medidas repetidas, comparando tratamiento, sexo

y tiempo, encontró efectos principales del tiempo de abstinencia ($F_{(1,768,85,73)}=4,034$, $p=0,0255$) y del sexo ($F_{(1,52)}=55,90$, $p < 0,0001$), siendo las hembras el sexo que mostró mayor preferencia por la sacarina a lo largo del tiempo. Dado que el ANOVA de 3 vías indicó una interacción entre tiempo y sexo ($F_{(2,97)}=3,191$, $p=0,0455$) independientemente del tratamiento con etanol, realizamos un ANOVA de 2 vías (tiempo x sexo) y la prueba post hoc de Bonferroni confirmó que las hembras mostraron mayores preferencias a las 36 h ($p < 0,0001$), 54 h ($p < 0,001$) y 60 h ($p < 0,0001$) (Fig. 3).

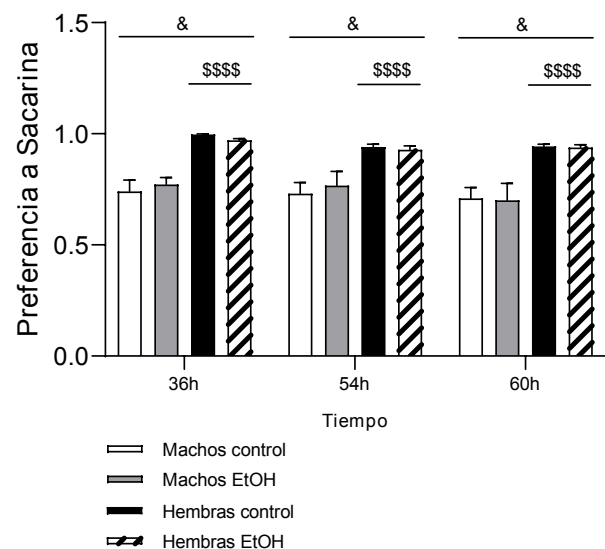
A pesar de estas diferencias, en los tiempos de evaluación en este experimento los posibles efectos de la IAE sobre la conducta anhedónica no fueron evidentes, ya que no encontramos efectos del alcohol en machos ni en hembras frente a sus respectivos controles en ningún momento evaluado ($p > 0,05$, n.s.).

Efectos sobre la memoria espacial

Para estudiar si el consumo de alcohol afectaba al aprendizaje y la memoria espacial de manera diferencial en machos y hembras, realizamos la prueba de MWM. Durante la curva

Figura 4

Test de preferencia por la sacarina (SPT) para evaluar la anhedonia



Nota. La preferencia por la sacarina fue calculada como el porcentaje de sacarina consumida sobre el total de líquido consumido. Se evaluó el consumo acumulado de los animales, iniciando en torno a las 27h después de la última administración de alcohol y tomando medidas a las 36h, 54h y 60h de abstinencia de alcohol. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=9-10 los machos y n=18-20 las hembras = agrupación de sujetos de dos experimentos idénticos). ANOVA de 3 vías de medidas repetidas (sexo x tratamiento x tiempo): efecto principal del sexo: efecto $^{ssss}p < 0,0001$; efecto principal del tiempo $^{*}p < 0,05$; interacción (tiempo x sexo) (no representado en la figura).

de aprendizaje, no hubo diferencias significativas ningún día entre los grupos (Fig. 5A) y el tiempo necesario para encontrar la plataforma disminuyó conforme avanzaron las sesiones para todos los sujetos.

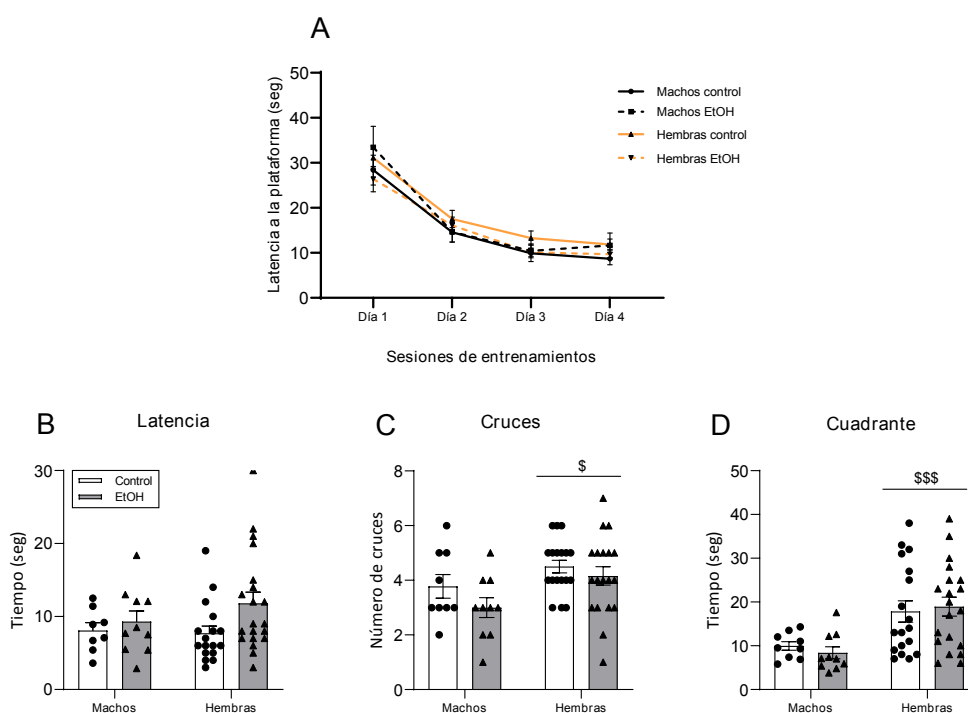
En la prueba de referencia, no observamos efectos significativos de los atracones de alcohol en las variables de latencia, cruces o exploración del cuadrante en la prueba (Fig. 5B,C,D; $F_{(1,51)}=3,051$, $p=0,0867$; $F_{(1,52)}=2,535$, $p=0,1174$; $F_{(1,53)}=0,009591$, $p=0,9224$, respectivamente), aunque se observó una tendencia a una mayor latencia en hembras tratadas con etanol frente a sus controles (Fig. 5B, $p=0,0867$, n.s.). Sin embargo, hubo un efecto principal del sexo en los cruces sobre la plataforma y el tiempo de nado alrededor del cuadrante de localización de la plataforma (Fig. 5C,D; $F_{(1,52)}=7,144$, $p=0,0100$; $F_{(1,53)}=14,76$, $p=0,0003$, respectivamente), con mayores valores en hembras que en machos.

Efectos sobre la memoria de reconocimiento

En el NOR, observamos un efecto principal del alcohol en la latencia al primer acercamiento al objeto nuevo 4 h después de la fase de entrenamiento (Fig. 6A, $F_{(1,46)}=4,491$, $p=0,0395$), ya que tanto machos como hembras tratadas con etanol mostraron mayores latencias que los controles, indicativo de alteraciones en la memoria a corto plazo. La interacción entre factores (sexo x tratamiento) estuvo cerca de la significación ($F_{(1,46)}=3,551$, $p=0,065$), sugiriendo que el efecto del alcohol podría ser más fuerte en machos (Fig. 6A). No hubo efecto principal del sexo ($F_{(1,46)}=0,8515$, $p=0,3609$). En cuanto al

Figura 5

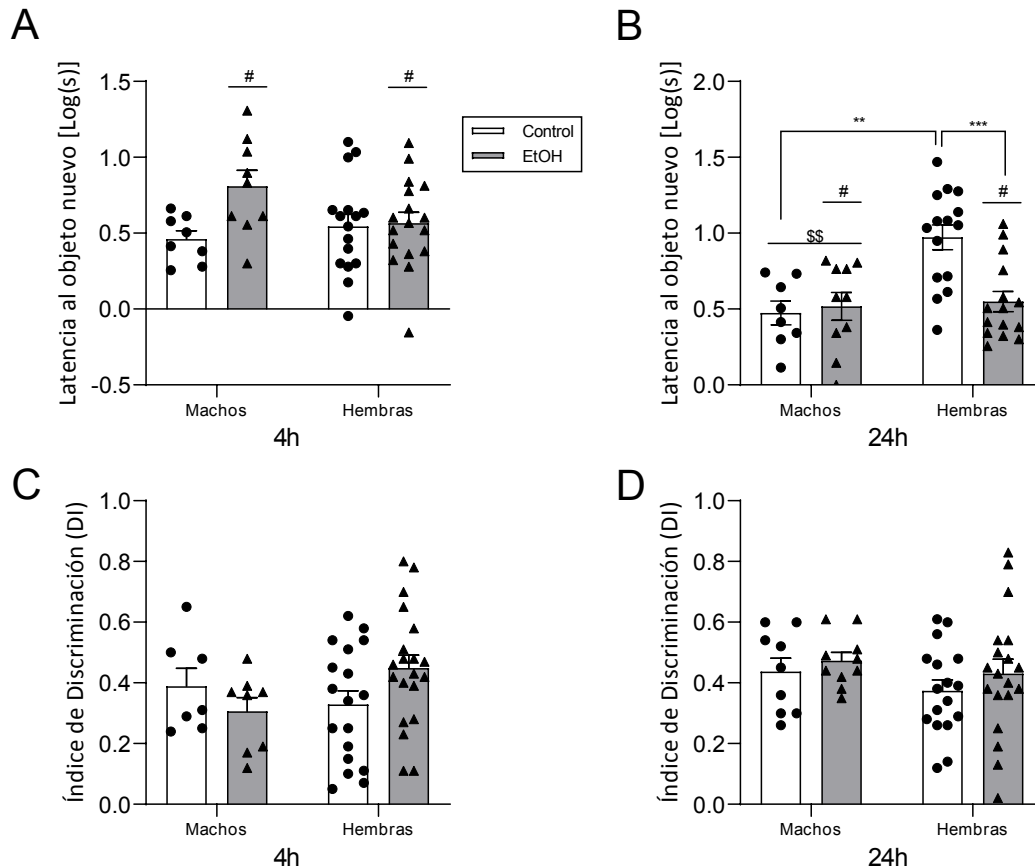
Laberinto acuático de Morris (MWM) para evaluar la memoria espacial



Nota. A) Curva de aprendizaje incluyendo el promedio de cada grupo experimental durante los cuatro ensayos. B) Latencia para encontrar la ubicación de la plataforma. C) Número de cruces sobre la localización de la plataforma. D) Tiempo de nado en torno al cuadrante de la plataforma. Los resultados representan la media \pm S.E.M. ANOVA de dos vías: efecto principal del sexo $^{*}p < 0,05$, $^{sss}p < 0,0001$.

Figura 6

Prueba de reconocimiento de objetos (NOR) para evaluar la memoria de reconocimiento



Nota. A) Latencia de exploración del objeto nuevo a las 4h. B) Latencia de exploración del objeto nuevo a las 24h. C) Índice de discriminación a las 4h. D) Índice de discriminación a las 24h. Los resultados representan la media \pm S.E.M. ANOVA de dos vías: efecto principal del EtOH * p < 0,05; efecto principal del sexo ** p < 0,001; interacción medida por la prueba *post hoc* de Bonferroni: ** p < 0,001, *** p < 0,0001.

DI, la interacción estuvo nuevamente cerca de la significación (Fig. 6C; $F_{(1,49)}=3,399$, $p=0,0713$, n.s.) y no se encontraron efectos principales del alcohol o del sexo ($F_{(1,49)}=0,1159$, $p=0,7350$; $F_{(1,49)}=0,5682$, $p=0,4546$, respectivamente).

A largo plazo, 24 h después de la fase de entrenamiento, el ANOVA de 2 vías reveló efectos principales de etanol y sexo (Fig. 6B; $F_{(1,44)}=5,153$, $p=0,0282$; $F_{(1,44)}=10,09$, $p=0,0027$, respectivamente) con una interacción entre factores ($F_{(1,44)}=7,816$, $p=0,0076$). Las comparaciones *post hoc* revelaron que los animales control hembra tuvieron mayores latencias a las 24 h para explorar el objeto nuevo que los controles machos ($p<0,01$). En la prueba a largo plazo, solo las hembras tratadas con etanol mostraron una reducción en la latencia frente a sus controles hembra ($p<0,001$) (Fig. 6B). En cuanto al DI, el ANOVA de 2 vías no mostró interacción entre factores (Fig. 6D; $F_{(1,51)}=0,04861$, $p=0,8264$), ni efectos principales de etanol o sexo 24 h después del entrenamiento (Fig. 6D; $F_{(1,51)}=1,037$, $p=0,3132$; $F_{(1,51)}=1,330$, $p=0,2541$, respectivamente).

En conjunto, el análisis de latencia en el NOR revela un patrón de comportamiento diferente en machos y hembras en

las pruebas a corto y largo plazo. La EIA parece afectar negativamente la memoria a corto plazo en ambos sexos (Fig. 6A), mientras que a largo plazo la EIA induce el efecto contrario (disminución en la latencia) solo en las hembras (Fig. 6B).

Discusión

Este estudio explora los efectos diferenciales de la exposición a atracones de alcohol en ratas macho y hembra durante la adultez temprana. Al centrarse tanto en comportamientos cognitivos como emocionales, pretende descubrir diferencias específicas por sexo que configuran el comportamiento animal en condiciones fisiológicas (control) en varias pruebas ampliamente utilizadas en estudios preclínicos, así como el impacto de la EIA durante la adultez temprana desde esta perspectiva de sexo. Nuestros resultados sugieren algunas diferencias por sexo tanto en condiciones control como de etanol dependiendo de la prueba, destacando la imperiosa necesidad de incluir ambos sexos en cualquier estudio preclínico que evalúe el comportamiento emocional y

cognitivo en animales. Las implicaciones de estas diferencias se discuten a continuación.

Diferencias por sexo en el comportamiento en condiciones fisiológicas (control)

En términos de estado emocional, se observaron diferencias por sexo en las conductas de tipo ansiosa y depresiva en condiciones control, según lo mostrado por el rendimiento de los animales en el EPM y el FST. El EPM es una prueba ampliamente utilizada para evaluar la conducta tipo ansiosa en roedores. Estas tareas explotan el conflicto entre el impulso exploratorio de los roedores y su tendencia a evitar los espacios abiertos (Campbell et al., 2024; Chen et al., 2024; Donner y Lowry, 2013). Nuestros resultados indican que las hembras pasan significativamente menos tiempo en los brazos abiertos del EPM en comparación con los machos en condiciones normales. Aunque la literatura generalmente establece que las hembras tienden a exhibir un comportamiento menos ansioso, mostrando más interés en las áreas abiertas que los machos (Campbell et al., 2024), muchos autores proponen que las diferencias sexuales en este patrón conductual pueden reflejar estrategias alternativas de afrontamiento o exploración ambiental, más que verdaderos comportamientos relacionados con la ansiedad (Donner y Lowry, 2013).

El FST y el SPT son métodos estándar para evaluar los efectos antidepresivos en roedores (Scheggi et al., 2018; Slattery et al., 2007), aunque la utilidad del FST para este propósito ha sido cuestionada recientemente (Armario, 2021). En el FST, las conductas de nado y escalada representan la respuesta adaptativa del animal ante una situación adversa, sugiriendo que la ausencia de estas conductas o una mayor tendencia a la inmovilidad son indicadores de desesperanza conductual o comportamiento tipo depresivo (Dalla et al., 2010). Por otro lado, el SPT evalúa la conducta motivacional. Parte del supuesto de que los animales consumirán más sacarina debido a sus propiedades hedónicas, y la disminución en la preferencia por ella (una recompensa natural) representa anhedonia, un síntoma central de la depresión, inducido por diferentes estresores (Campbell et al., 2024; Sayd et al., 2015). Es común encontrar diferencias por sexo relacionadas con el estado emocional basal en la literatura, indicando que las hembras muestran más conductas tipo depresivas comparadas con los machos en tareas como el FST (Dalla et al., 2010), en consonancia con nuestros resultados. No obstante, los resultados en tareas relacionadas con la conducta tipo depresiva son inconsistentes; como señalan Kokras et al. (2015), en el FST, un tercio de los estudios muestra mayor inmovilidad en hembras, como mostramos aquí, un tercio en machos (Pavlova et al., 2020; Xia et al., 2023) y un tercio no encuentra diferencias por sexo. Por el contrario, en el SPT, las hembras parecen mostrar una mayor preferencia por la sacarina, tanto en nuestro estudio como en trabajos previos, exhibiendo un impacto diferente en el sistema de recompen-

sa, lo que cuestiona el uso de estas pruebas como medida de comportamiento depresivo (Dalla et al., 2010; Kokras et al., 2015). Esto subraya la necesidad de validar tareas representativas que describan correctamente las diferencias conductuales entre animales macho y hembra, para poder traducir los resultados al comportamiento humano.

Respecto al rendimiento cognitivo, el MWM proporciona información sobre la capacidad de aprendizaje y memoria espacial mediante medidas como el tiempo que tarda el animal en encontrar la plataforma o el tiempo que pasa nadando alrededor de ella (Zorzo et al., 2024). Aunque la mayoría de los trabajos previos comparando machos y hembras en navegación espacial han encontrado una superioridad en el rendimiento de los machos (Bowman et al., 2022; Gutiérrez-Menéndez et al., 2023; Zorzo et al., 2024), en nuestro estudio no se encontraron diferencias por sexo durante la fase de aprendizaje, en línea con investigaciones previas (Qi et al., 2016), aunque en el día de la prueba las hembras mostraron más cruces y tiempo de nado alrededor de la plataforma que los machos. Estudios neurobiológicos relacionados con esta capacidad han descrito diferentes estrategias utilizadas por ambos grupos; los machos tienden a apoyarse en estrategias espaciales globales, mientras que las hembras parecen favorecer señales espaciales del entorno (Shansky, 2018; Zorzo et al., 2024). El elevado número de señales visuales dispuestas en nuestro montaje experimental podría haber favorecido el rendimiento de las hembras.

Otra función cognitiva relacionada con la memoria es la capacidad de reconocer objetos nuevos. El NOR permite evaluar esta habilidad obteniendo medidas de la latencia de aproximación y el índice de discriminación del objeto novedoso, tanto a corto plazo (4 h después de la fase de entrenamiento) como a largo plazo (24 h después de la fase de entrenamiento) (Marco et al., 2013; Moya et al., 2022). Nuestros resultados sugieren que no hay diferencias en el rendimiento de machos y hembras control en esta prueba a corto plazo, aunque las hembras rinden peor a largo plazo. La ausencia de diferencias sexuales en la memoria de reconocimiento coincide con la mayoría de los estudios (Campbell et al., 2024; Van Hees et al., 2022) y solo algunos trabajos describen una ligera superioridad de las hembras, en distintas fases del ciclo estral (Koszałka et al., 2023; van Goethem et al., 2012).

Diferencias por sexo en los efectos de la exposición intensiva al alcohol

La mayoría de los estudios que exploran diferencias por sexo en el consumo de alcohol se realizaron en ratones C57BL/6J, con paradigmas de acceso intermitente y voluntario —como el paradigma de elección entre dos botellas o el “drinking in the dark” (DID)—, en los que se estudian los efectos del consumo a largo plazo (Ardinger et al., 2024; Leonardo Jimenez Chavez et al., 2020; Magee et al., 2024; Maldonado-Devinci et al., 2022; Rath et al., 2020; Rivera-Irizarry et al., 2023). En ratas, existen estudios de consumo voluntario de alcohol

Tabla 1

Resumen de las diferencias sexuales en el comportamiento en condiciones fisiológicas (control)

Pruebas de comportamiento	Diferencias sexuales en animales control
EPM	Las hembras pasan menos tiempo en los brazos abiertos en comparación con los machos.
FST	Las hembras pasan menos tiempo nadando y más tiempo inmóviles que los machos.
SPT	Las hembras exhiben mayor preferencia por la sacarina que los machos.
MWM	No aparecen diferentes durante la fase de aprendizaje; en la prueba de referencia las hembras cruzan más veces y nadan durante más tiempo en torno a la ubicación de la plataforma que los machos.
NOR	No hay diferencias a las 4h; las hembras muestran peor rendimiento a las 24h.

mediante el paradigma de dos botellas (Abderrahim et al., 2022; Albrechet-Souza et al., 2020; Buján et al., 2024). Solo unos pocos estudios con perspectiva de sexo emplearon la administración intragástrica de etanol, generalmente durante periodos largos, y los resultados siguen siendo mixtos (Healey et al., 2023; Jia et al., 2024; Penta et al., 2024; Varlinskaya et al., 2020). Hasta donde sabemos, ninguna investigación previa ha examinado diferencias sexuales en la EIA con este protocolo específico de administración, empleando dosis altas de etanol en un periodo corto de tiempo. Nuestros resultados sugieren que la exposición forzada a atracones de alcohol afecta de forma diferente a ratas macho y hembra solo en algunas pruebas, que se discuten a continuación.

Nuestros resultados mostraron que el efecto de la EIA sobre la ansiedad en el EPM fue claro para los machos, en concordancia con nuestros estudios previos con este modelo animal (Antón et al., 2017), pero este efecto no está presente en las hembras tratadas con etanol, que no mostraron diferencias con sus controles hembra. Cabe señalar que las hembras tratadas con etanol mostraron una tendencia en dirección opuesta (efecto ansiolítico), y esta posible diferencia sexual también ha sido destacada por otros autores utilizando otros paradigmas de administración de etanol (Albrechet-Souza et al., 2020; Buján et al., 2024; Costa-Valle et al., 2022).

Además de esto, nuestro estudio aporta evidencia de que la exposición en atracón tiene efectos depresivos en ambos sexos, pero predominantemente en las hembras, que muestran mayores tiempos de inmovilidad en el FST, en concordancia con otros estudios. La conducta tipo depresiva inducida por el alcohol durante la abstinencia en machos concuerda con nuestros datos previos utilizando este modelo CAA (Antón et al., 2017) y con estudios empleando exposición a vapor de etanol (Bach et al., 2021; Walker et al., 2010).

Las reducciones en la preferencia por la sacarina en el SPT se relacionarían con este efecto depresivo. Sin embargo,

en nuestro estudio no encontramos efectos de la EIA en esta prueba. Hemos observado previamente que un estado inflamatorio inducido por la administración de lipopolisacáridos, que se sabe que aumenta después de la EIA (Antón et al., 2017, 2018), induce un estado anhedónico en machos (Sayd et al., 2015), pero no habíamos evaluado antes a los animales bajo este modelo de EIA. Es posible que el periodo de abstinencia al inicio de la prueba fuera demasiado tardío para observar este efecto, ya que la disminución en la preferencia por sacarina depende en gran medida del estado inflamatorio del animal (Abderrahim et al., 2022; Sayd et al., 2015).

En términos de la función cognitiva evaluada en el MWM, en nuestro estudio no observamos efectos significativos del alcohol sobre la memoria espacial, aunque se observó una tendencia (no significativa) en las hembras tratadas con etanol, que mostraron una aparente mayor latencia en el tiempo requerido para localizar la plataforma. Otros estudios describieron efectos negativos del alcohol sobre la memoria espacial en machos siguiendo un protocolo de acceso intermitente y voluntario al alcohol (Sanz-Martos et al., 2023), aunque en nuestro estudio no se observaron efectos del etanol en los machos.

En el NOR, encontramos que los grupos tratados con etanol muestran comportamientos diferentes en las dos sesiones de prueba, a las 4 h y 24 h después de la fase de entrenamiento. A las 4 h, el alcohol muestra efectos significativos en ambos sexos, aumentando la latencia de aproximación al objeto novedoso, con un posible efecto más fuerte en machos (tendencia; interacción no significativa $p=0,06$). Sin embargo, a las 24 h, los machos tratados con alcohol experimentan un aumento en la latencia, como sucedió en el corto plazo, pero las hembras exhibieron una menor latencia respecto a su grupo control hembra. Este efecto fue sorprendente y podría estar favorecido por los altos tiempos de latencia observados en las hembras control. Otros autores han mostrado que diferentes paradigmas de administración de etanol tienen efectos negativos sobre la capacidad de reconocer objetos medida mediante esta tarea (Lamont et al., 2020; Moya et al., 2022), pero no se han descrito diferencias sexuales (Van Hees et al., 2022). Estos resultados en hembras necesitan ser confirmados en estudios futuros, y debe explorarse el posible papel de la EIA en la consolidación de la memoria a largo plazo.

En conjunto, estos resultados sugieren que muchas pruebas conductuales que se han utilizado ampliamente hasta la fecha para evaluar tareas emocionales y cognitivas en modelos animales preclínicos pueden ser ejecutadas de manera diferente por machos y hembras en condiciones fisiológicas, lo que tiene implicaciones para una extrapolación adecuada de los resultados. Machos y hembras difieren biológicamente en varios aspectos, incluido el perfil hormonal. Numerosos estudios han demostrado la influencia crítica de las hormonas en la regulación del comportamiento (Hamson et al., 2016; Shirazi et al., 2021), por lo que este podría ser un factor que contribuya a las variaciones observadas entre resultados de machos y hembras. Es importante señalar que la adolescencia y la adultez tem-

Tabla 2
Resumen de las diferencias sexuales en el comportamiento después del EIA

Pruebas de comportamiento	Diferencias sexuales en los animales tratados con alcohol
EPM	Los machos tratados con alcohol entran menos veces y pasan menos tiempo en los brazos abiertos en comparación con su grupo control, mientras que este efecto no se observa en las hembras.
FST	Las hembras tratadas con alcohol pasan más tiempo inmóviles que las hembras control, mientras que este efecto no se observa en machos.
NOR	En el ensayo a largo plazo, el alcohol mejora el rendimiento de las hembras en comparación con sus controles, mientras que este efecto no se observa en machos.

prana son periodos cruciales para la maduración, durante los cuales los niveles hormonales fluctúan significativamente con el tiempo y varían por sexo, desempeñando un papel clave en el desarrollo neurobiológico (Vijayakumar et al., 2018). Hormonas sexuales como el estradiol (predominante en hembras) y la testosterona (predominante en machos) ejercen efectos distintos sobre el desarrollo cerebral adolescente. Evidencias recientes sugieren que el estradiol mejora la neurogénesis y la plasticidad en regiones como el hipocampo, lo que podría estar relacionado con el rendimiento superior de las hembras en el MWM. En contraste, niveles elevados de testosterona parecen estar asociados con una mayor sensibilidad al refuerzo y una mayor propensión a conductas de riesgo, lo que podría explicar las diferencias sexuales observadas en la preferencia por sacarina y el comportamiento exploratorio en el EPM (Erol y Karpyak, 2015; He et al., 2024).

Por otro lado, los efectos de la EIA pueden inducir efectos diferenciales en machos y hembras; por ejemplo, los atracones de alcohol indujeron un claro efecto ansiógeno en los machos en el EPM y empeoraron la capacidad de reconocimiento en el NOR, en consonancia con la literatura previa, mientras que la EIA parece tener un efecto más desinhibitorio en el rendimiento en el EPM en hembras en el mismo periodo de abstinencia y un efecto potenciador de la memoria de reconocimiento en la NOR, lo cual es intrigante y merece mayor investigación. Algunos autores sugieren que las fluctuaciones hormonales a lo largo de las fases del ciclo estral influyen tanto en el comportamiento animal como en los efectos de la exposición al alcohol (Corbett et al., 2024; Klein Marcondes et al., 2001; Paiva-Santos et al., 2022; Scholl et al., 2019; Sircar, 2019). La evidencia científica también sugiere que el consumo de alcohol puede alterar los niveles circulantes de hormonas sexuales. Por ejemplo, la intoxicación alcohólica aguda, como la observada en la EIA, se asocia con una disminución en los niveles de testosterona. Dado que la testosterona se ha asociado con una mayor propensión a conductas de riesgo, las reducciones inducidas por el etanol en el

número de entradas y en el tiempo en los brazos abiertos en el EPM podrían explicarse parcialmente por este efecto. En nuestro estudio no exploramos el ciclo estral de las hembras ni los niveles hormonales, por lo que esta hipótesis sigue siendo especulativa y requiere más experimentación.

Además, algunos autores sugieren que las diferencias hormonales relacionadas con el sexo pueden interferir con el metabolismo del alcohol, afectando su absorción y distribución en el organismo, lo que finalmente conduce a efectos conductuales distintos (Erol y Karpyak, 2015). En este sentido, algunos autores han sugerido que las hembras tienen un metabolismo del alcohol más rápido que los machos (Baraona et al., 2001; Desroches et al., 1995; Kishimoto et al., 2002; Thomasson, 2002). La eliminación más rápida del alcohol por parte de las hembras podría deberse a una mayor actividad de enzimas hepáticas (Kishimoto et al., 2002; Elena Quintanilla et al., 2007; Simon et al., 2002), aunque otros autores no encontraron diferencias (Livy et al., 2003; Lopez et al., 2003). Estas diferencias sexuales en el metabolismo del alcohol podrían explicar algunas de las discrepancias conductuales que la EIA indujo en machos y hembras en nuestro estudio. En estos experimentos no medimos BELs ni enzimas hepáticas, por lo que no podemos confirmar esta hipótesis, y esta es una limitación del estudio.

Recientemente, se ha demostrado que el patrón de EIA utilizado en este estudio afecta la microbiota intestinal, la integridad de la barrera intestinal, provocando la translocación de patógenos hacia la circulación sistémica y desencadenando una respuesta inflamatoria periférica y la disrupción de la barrera hematoencefálica que contribuye a la neuroinflamación inducida por alcohol, lo cual está relacionado con alteraciones emocionales y cognitivas (Antón et al., 2018; Orio et al., 2019; Orio, 2020; Rodriguez-Gonzalez y Orio, 2020; Rodriguez-Gonzalez et al., 2021; Rodriguez-Gonzalez et al., 2023).

Investigaciones específicas sobre la microbiota han mostrado que las hormonas sexuales y la dieta afectan la proliferación de diferentes comunidades microbianas, que a su vez impactan en el sistema inmunitario, siendo estas diferencias más evidentes durante la adolescencia (Org et al., 2016). La mayoría de los estudios mencionados se han realizado en machos y solo recientemente disponemos de algunos datos sobre el impacto diferencial de este protocolo de EIA en el eje intestino-cerebro de machos y hembras (López-Valencia et al., 2024). En cualquier caso, el CAA parece afectar el rendimiento cognitivo de manera diferente en hombres y mujeres jóvenes (Lees et al., 2019), lo cual podría estar relacionado con componentes inflamatorios (Orio et al., 2018).

A pesar de aportar datos interesantes sobre posibles diferencias por sexo en el comportamiento, reconocemos varias limitaciones del estudio actual. Primero, aunque las pruebas conductuales utilizadas en este estudio están ampliamente descritas en la literatura y se administraron secuencialmente según un diseño para evitar interferencias entre pruebas (Moya et al., 2022; Moya et al., 2021; Marco et al., 2017), debe te-

nerse en cuenta que la mayoría de ellas fueron validadas en machos, por lo que es posible que su interpretación en hembras esté sesgada y no podamos descartar interferencias en los animales hembra. En segundo lugar, este es un estudio que se centra exclusivamente en el comportamiento; la ausencia de medidas bioquímicas como BELs, hormonas o enzimas hepáticas limita la interpretación de los resultados. Finalmente, una limitación intrínseca del uso de este modelo de EIA es que no permite identificar diferencias significativas en el patrón de consumo en atracón entre machos y hembras (mayor en hembras), lo que compromete el carácter traslacional del estudio.

Nuestros hallazgos destacan la importancia de una caracterización rigurosa de las pruebas ampliamente utilizadas para evaluar el comportamiento en modelos animales preclínicos, considerando el rendimiento diferencial de las hembras en algunas de estas pruebas, para mejorar la relevancia traslacional de la investigación. En términos de valor traslacional, visibilizar las diferencias específicas por sexo en los efectos de la EIA durante la adultez temprana es fundamental para cuestionar la suposición de que el alcohol ejerce efectos idénticos en ambos sexos, rompiendo la perspectiva homogénea que aún persiste respecto a sus mecanismos de acción, toxicidad, prevención y tratamiento. Así, la incorporación de una perspectiva basada en el sexo en futuras investigaciones es vital para la detección temprana de problemas relacionados con el alcohol en ambos sexos, así como para orientar el diseño de intervenciones más efectivas.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (España), cofinanciado por FEDER (Unión Europea) (número de proyecto PID2021-127256OB-I00 para L.O.) y por RICORS – RIAPAd (proyecto RD24/0003/0010 para L.O.), cofinanciado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y por la Unión Europea (Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias

- Abderrahim, L., Hicham, E. M., Aboubaker, E., Fatima, A., Tarik, T., Soufiane, B. y Abdelhalim, M. (2022). Sex differences in behavioral, cognitive and voluntary ethanol-intake effects in Dexamethasone-induced depression-like state in Wistar rat. *AIMS Neuroscience*, 30(7), 228–249. <https://doi.org/10.3934/neuroscience.2022012>
- Albrechet-Souza, L., Schratz, C. L. y Gilpin, N. W. (2020). Sex differences in traumatic stress reactivity in rats with and without a history of alcohol drinking. *Biology of Sex Differences*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00303-w>
- Antón, M., Alén, F., Gómez de Heras, R., Serrano, A., Pavón, F. J., Leza, J. C., García-Bueno, B., Rodríguez de Fonseca, F. y Orio, L. (2017). Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addict. Biol.*, 22(3), 724–741. <https://doi.org/10.1111/adb.12365>
- Antón, M., Rodríguez-González, A., Ballesta, A., González, N., Del Pozo, A., de Fonseca, F.R., Gómez-Lus, M.L., Leza, J.C., García-Bueno, B., Caso, J.R. y Orio, L. (2018). Alcohol binge disrupts the rat intestinal barrier: the partial protective role of oleoylethanolamide. *Br J Pharmacol.* 175(24), 4464–4479. <https://doi.org/10.1111/bph.14501>
- Ardinger, C. E., Chen, Y., Kimbrough, A., Grahame, N. J. y Lapish, C. C. (2024). Sex differences in neural networks recruited by frontloaded binge alcohol drinking. *Addiction Biology*, 29(9). <https://doi.org/10.1111/adb.13434>
- Armario, A. (2021). The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 128, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.06.014>
- Bach, E. C., Morgan, J. W., Ewin, S. E., Barth, S. H., Raab-Graham, K. F. y Weiner, J. L. (2021). Chronic Ethanol Exposures Leads to a Negative Affective State in Female Rats That Is Accompanied by a Paradoxical Decrease in Ventral Hippocampus Excitability. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.669075>
- Baraona, E., Abittan, C. S., Dohmen, K., Moretti, M., Pozzato, G., Chayes, Z. W., Schaefer, C. y Lieber, C. S. (2001). Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(4), 502–507. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02242.x>
- Bevins, R. A. y Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: A one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory.” *Nature Protocols*, 1(3), 1306–1311. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>
- Bowman, R., Frankfurt, M. y Luine, V. (2022). Sex differences in cognition following variations in endocrine status. In *Learning and Memory* (Vol. 29, Issue 9, pp. 234–245). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/lm.053509.121>
- Buján, G. E., D'Alessio, L., Serra, H. A., Guelman, L. R. y Molina, S. J. (2024). Assessment of Hippocampal-Related Behavioral Changes in Adolescent Rats of both Sexes Following Voluntary Intermittent Ethanol Intake and Noise Exposure: A Putative Underlying Mechanism and Implementation of a Non-pharmacological Preventive Strategy. *Neurotoxicity Research*, 42(3). <https://doi.org/10.1007/s12640-024-00707-1>
- Campbell, H. M., Guo, J. D. y Kuhn, C. M. (2024). Applying the Research Domain Criteria to Rodent Studies of

- Sex Differences in Chronic Stress Susceptibility. In *Biological Psychiatry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2024.05.016>
- Chen, L., Lu, Y., Hua, X., Zhang, H., Sun, S. y Han, C. (2024). Three methods of behavioural testing to measure anxiety – A review. In *Behavioural Processes* (Vol. 215). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2024.104997>
- Chung, T., Creswell, K. G., Bachrach, R., Clark, D. B. y Martin, C. S. (2018). *Adolescent Binge Drinking Developmental Context and Opportunities for Prevention*.
- Corbett, C. M., Bozarth, S. L. y West, E. A. (2024). Effects of sex and estrous cycle on action-outcome contingencies. *Behavioural Brain Research*, 477. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2024.115317>
- Cosquer, B., Galani, R., Kuster, N. y Cassel, J. C. (2005). Whole-body exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields does not alter anxiety responses in rats: A plus-maze study including test validation. *Behavioural Brain Research*, 156(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.007>
- Costa-Valle, M. T., Gomes, J. F., De Oliveira, C. R., Scherer, A., Franco De Oliveira, S. C. W. de S. E., Menezes, R. C. R., Leal, M. B., Romão, P. R. T. y Dallegrave, E. (2022). Energy drinks and alcohol in a binge drinking protocol in Wistar rats: Male and female behavioral and reproductive effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 221. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2022.173487>
- Crews, F.T., Vetreno, R.T., Broadwater, M.A. y Robinson, D.N. (2016) Adolescent Alcohol Exposure Persistently Impacts Adult Neurobiology and Behavior. *Pharmacol Rev* 68(4):1074-1109. <https://doi.org/10.1124/pr.115.012138>.
- Cryan, J. F., Markou, A. y Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 23(5). [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(02\)002017-5](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)002017-5)
- Dalla, C., Pitychoutis, P. M., Kokras, N. y Papadopoulou-Daifoti, Z. (2010). Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 106(3), 226–233. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00516.x>
- Detke, M. J., Rickels, M., Lucki, I., Rickels, M. y Detke, M. J. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, 121, 66–72. <https://doi.org/10.1007/BF02245592>
- Desroches, D., Orevillo, C. y Verina, D. (1995). Sex-and Strain-Related Differences in First-Pass Alcohol Metabolism in Mice. *Alcohol*, 12(3), 221–226
- Donner, N. C. y Lowry, C. A. (2013). Sex differences in anxiety and emotional behavior. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 465, Issue 5, pp. 601–626). <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1271-7>
- Elena Quintanilla, M., Tampier, L., Sapag, A., Gerdtsen, Z. y Israel, Y. (2007). Sex differences, alcohol dehydrogenase, acetaldehyde burst, and aversion to ethanol in the rat: A systems perspective. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293, E531–E537. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00187.2007>
- Erol, A. y Karpyak, V. M. (2015). Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: Contemporary knowledge and future research considerations. *Drug and Alcohol Dependence*, 156, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.08.023>
- Gutiérrez-Menéndez, A., Méndez, M. y Arias, J. L. (2023). Learning and metabolic brain differences between juvenile male and female rats in the execution of different training regimes of a spatial memory task. *Physiology & Behavior*, 267, 114203. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2023.114203>
- Hamson, D. K., Roes, M. M. y Galea, L. A. M. (2016). Sex hormones and cognition: Neuroendocrine influences on memory and learning. *Comprehensive Physiology*. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150031>
- He, W., Zhang, S., Qi, Z. y Liu, W. (2024). Unveiling the potential of estrogen: Exploring its role in neuropsychiatric disorders and exercise intervention. *Pharmacological Research*, 204, 107201. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107201>
- Healey, K. L., Kibble, S., Dubester, K., Bell, A. y Swartzwelder, H. S. (2023). Adolescent intermittent ethanol exposure enhances adult stress effects in male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 223, 173513. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2022.173513>
- Jia, W., Li, C., Chen, H., Wang, X., Liu, Y., Shang, W., Wang, B., Meng, W., Guo, Y., Zhu, L., Wang, D., Zhou, D., Zhao, B. y Wei, L. (2024). ISRIB ameliorates spatial learning and memory impairment induced by adolescent intermittent ethanol exposure in adult male rats. *Neurochemistry International*, 179, 105834. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105834>
- Kaluve, A. M., Le, J. T. y Graham, B. M. (2022). Female rodents are not more variable than male rodents: A meta-analysis of preclinical studies of fear and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 143, 104962. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104962>
- Kishimoto, R., Ogishi, Y., Ueda, M., Matsdsaki, M., Amako, K., Goda, K. y Park, S.-S. (2002). Gender-related differences in mouse hepatic ethanol metabolism. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 48(3), 216–224.
- Klein Marcondes, F., Miguel, K. J., Lins Melo, L. y Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(11), 1491–1498. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2001001100006>
- Kokras, N., Antoniou, K., Mikail, H. G., Kafetzopoulos, V., Papadopoulou-Daifoti, Z. y Dalla, C. (2015). Forced swim test: What about females? *Neuropharmacology*, 99, 408–421. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.016>

- Koszalka, A., Lustyk, K. y Pytko, K. (2023). Sex-dependent differences in animal cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 153, 105374. <https://doi.org/10.1016/j.neubio-rev.2023.105374>
- Lamont, M. G., McCallum, P., Head, N., Blundell, J. y Weber, J. T. (2020). Binge drinking in male adolescent rats and its relationship to persistent behavioral impairments and elevated proinflammatory/proapoptotic proteins in the cerebellum. *Psychopharmacology*, 237(5), 1305–1315. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05458-3>
- Lees, B., Mewton, L., Stapinski, L. A., Squeglia, L. M., Rae, C. D. y Teesson, M. (2019). Neurobiological and cognitive profile of young binge drinkers: A systematic review and meta-analysis. *Neuropsychology Review*, 29(3), 357–385. <https://doi.org/10.1007/s11065-019-09411-w>
- Leonardo Jimenez Chavez, C., Coelho, M. A., Brewin, L. W., Swauncy, I., Tran, T., Albanese, T., Laguna, A., Gabriela, I. y Szumlinski, K. K. (2020). Incubation of negative affect during protracted alcohol withdrawal is age-, but not sex-selective. *Brain Sciences*, 10(6), Article 405. <https://doi.org/10.3390/brainsci10060405>
- Lopez, M. F., Simpson, D. D., White, N. M. y Randall, C. L. (2003). Age- and sex-related differences in alcohol and nicotine effects in C57BL/6J mice. *Addiction Biology*, 8(4), 419–427. <https://doi.org/10.1080/13556210310001648176>
- Livy, D. J., Parnell, S. E. y West, J. R. (2003). Blood ethanol concentration profiles: A comparison between rats and mice. *Alcohol*, 29(3), 165–171. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(03\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(03)00025-9)
- López-Valencia, L., Moya, M., Escudero, B., García-Bueno, B. y Orio, L. (2024). Bacterial lipopolysaccharide forms aggregates with apolipoproteins in male and female rat brains after ethanol binges. *Journal of Lipid Research*, 65(3), 100509. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2024.100509>
- Magee, S. N., Sereno, A. C. y Herman, M. A. (2024). Sex differences in basal motivated behavior, chronic ethanol drinking, and amygdala activity in female and male mice. *Alcohol*, 120, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2024.06.004>
- Maldonado-Devincci, A. M., Makdisi, J. G., Hill, A. M., Waters, R. C., Hall, N. I., Shobande, M. J. y Kumari, A. (2022). Adolescent intermittent ethanol exposure induces sex-dependent divergent changes in ethanol drinking and motor activity in adulthood in C57BL/6J mice. *Journal of Neuroscience Research*, 100(8), 1560–1572. <https://doi.org/10.1002/jnr.24814>
- Marco, E. M., Ballesta, J. A., Irala, C., Hernández, M. D., Serrano, M. E., Mela, V. y Viveros, M. P. (2017). Sex-dependent influence of chronic mild stress (CMS) on voluntary alcohol consumption; study of neurobiological consequences. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 152, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.11.005>
- Marco, E. M., Valero, M., De La Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., Ramirez, M. J. y Viveros, M. P. (2013). Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology*, 68, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.08.014>
- Moya, M., López-Valencia, L., García-Bueno, B. y Orio, L. (2022). Disinhibition-like behavior correlates with frontal cortex damage in an animal model of chronic alcohol consumption and thiamine deficiency. *Biomedicine*, 10(2), 260. <https://doi.org/10.3390/biomedicine10020260>
- Moya, M., San Felipe, D., Ballesta, A., Alén, F., de Fonseca, F. R., García-Bueno, B. y Orio, L. (2021). Cerebellar and cortical TLR4 activation and behavioral impairments in Wernicke-Korsakoff Syndrome: Pharmacological effects of oleoylethanolamide. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 108, 110190. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110190>
- Obernier, J. A., Bouldin, T. W. y Crews, F. T. (2002). Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(4), 547–557. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2002.tb02574.x>
- Org, E., Mehrabian, M., Parks, B. W., Shipkova, P., Liu, X., Drake, T. A. y Lusi, A. J. (2016). Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes*, 7(4), 313–322. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1203502>
- Orio, L., Antón, M., Rodríguez-Rojo, I. C., Correias, Á., García-Bueno, B., Corral, M., de Fonseca, F. R., García-Moreno, L. M., Maestú, F. y Cadaveira, F. (2018). Young alcohol binge drinkers have elevated blood endotoxin, peripheral inflammation and low cortisol levels: Neuropsychological correlations in women. *Addiction Biology*, 23(5), 1130–1144. <https://doi.org/10.1111/adb.12543>
- Orio, L. (2020). The multifaceted potential of the lipid transmitter oleoylethanolamide to treat alcohol-induced neuroinflammation and alcohol use disorders. *Neural Regeneration Research*, 15(1), 71–72. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.264457>
- Orio, L., Alén, F., Pavón, F. J., Serrano, A. y García-Bueno, B. (2019). Oleoylethanolamide, neuroinflammation, and alcohol abuse. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 490. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00490>
- Paiva-Santos, M. A., Leão, A. H. F. F., Kurita, J. P. F., Becegato, M. S., Lima, A. C., Bioni, V. S., Meurer, Y. S. R., Cunha, D. M. G., Medeiros, A. M. y Silva, R. H. (2022). Sex differences in the acute ethanol effects on object recognition memory: Influence of estrous cycle. *Behavioural Pharmacology*, 33(5), 322–332. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000680>
- Pascual, M., Blanco, A. M., Cauli, O., Miñarro, J. y Guerri, C. (2007). Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *European Journal of Neuro-*

- ciencia*, 25(2), 541–550. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05298.x>
- Pascual, M., Pla, A., Miñarro, J. y Guerri, C. (2014). Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: A review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol*, 49(2), 187–192. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agt164>
- Patrick, M. E., Evans-Polce, R. J., Parks, M. J. y Terry-McElrath, Y. M. (2021). Drinking intensity at age 29/30 as a predictor of alcohol use disorder symptoms at age 35 in a national sample. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 82(6), 740–748. <https://doi.org/10.15288/jsad.2021.82.740>
- Pavlova, I. V., Broshevitskaya, N. D., Onufriev, M. V. y Moiseeva, Y. V. (2020). Sex-related differences in anxious-depressive and defensive behavior in Wistar rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 50(9), 1163–1175. <https://doi.org/10.1007/s11055-020-01028-4>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. y Briley, M. (1985). Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Penta, P. T., Villarreal, S., Rameas, C. I., Collins, E. C., Towner, T. T., Varlinskaya, E. I. y Werner, D. F. (2024). Sex-dependent effects of ethanol withdrawal from a single- and repeated binge episode exposures on social anxiety-like behavior and neuropeptide gene expression in adolescent rats. *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2024.10.001>
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M. y Jalfre, M. (1977). Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730–732. <https://doi.org/10.1038/266730a0>
- Qi, X., Zhang, K., Xu, T., Yamaki, V. N., Wei, Z., Huang, M., Rose, G. M. y Cai, X. (2016). Sex differences in long-term potentiation at temporoammonic-CA1 synapses: Potential implications for memory consolidation. *PLoS ONE*, 11(11), e0165891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165891>
- Rath, M., Guergues, J., Pinho, J. P. C., Zhang, P., Nguyen, T. G., MacFadyen, K. A., Peris, J., McLaughlin, J. P., Stevens, S. M. y Liu, B. (2020). Chronic voluntary binge ethanol consumption causes sex-specific differences in microglial signaling pathways and withdrawal-associated behaviors in mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 44(9), 1791–1806. <https://doi.org/10.1111/acer.14420>
- Rendeiro, C., Spencer, J. P. E., Vauzour, D., Butler, L. T., Ellis, J. A. y Williams, C. M. (2009). The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: From behaviour to underlying hippocampal mechanisms. *Genes & Nutrition*, 4(4), 251–270. <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0134-6>
- Rivera-Irizarry, J. K., Zallar, L. J., Levine, O. B., Skelly, M. J., Boyce, J. E., Barney, T., Kopyto, R. y Pleil, K. E. (2023). Sex differences in binge alcohol drinking and the behavioral consequences of protracted abstinence in C57BL/6J mice. *Biology of Sex Differences*, 14, 65. <https://doi.org/10.1186/s13293-023-00565-0>
- Rodríguez-González, A., Vitali, F., Moya, M., De Filippo, C., Passani, M. B. y Orio, L. (2021). Effects of alcohol binge drinking and oleoylethanolamide pretreatment in the gut microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 731910. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.731910>
- Rodríguez-González, A. y Orio, L. (2020). Microbiota and alcohol use disorder: Are psychobiotics a novel therapeutic strategy? *Current Pharmaceutical Design*, 26(20), 2426–2437. <https://doi.org/10.2174/138161282666200122153541>
- Rodríguez-González, A., Moya, M., Rodríguez de Fonseca, F., Gómez de Heras, R. y Orio, L. (2023). Alcohol binge drinking induces downregulation of blood-brain barrier proteins in the rat frontal cortex—but not in the hippocampus—that is not prevented by OEA pretreatment. *Advances in Drug and Alcohol Research*, 3, 11091. <https://doi.org/10.3389/adar.2023.11091>
- 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 hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *Behavioural Brain Research*, 452, 114576. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114576>
- Sayd, A., Antón, M., Alén, F., Caso, J. R., Pavón, J., Leza, J. C., De Fonseca, F. R., García-Bueno, B. y Orio, L. (2015). Systemic administration of oleoylethanolamide protects from neuroinflammation and anhedonia induced by LPS in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(6), 1–14. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu111>
- Scheggi, S., De Montis, M. G. y Gambarana, C. (2018). Making sense of rodent models of anhedonia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 21(11), 1049–1065. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy083>
- Scholl, J. L., Afzal, A., Fox, L. C., Watt, M. J. y Forster, G. L. (2019). Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiology and Behavior*, 211, 112670. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112670>
- Shansky, R. M. (2018). Sex differences in behavioral strategies: Avoiding interpretational pitfalls. *Current Opinion in Neurobiology*, 49, 95–98. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.01.007>
- Shirazi, T. N., Levenberg, K., Cunningham, H., Self, H., Dawood, K., Cárdenas, R., Ortiz, T. L., Carré, J. M., Breedlove, S. M. y Puts, D. A. (2021). Relationships between ovarian hormone concentrations and mental rotations performance in naturally-cycling women. *Hormones*

- and Behavior*, 127, 104886. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104886>
- Sicher, A. R., Duerr, A., Starnes, W. D. y Crowley, N. A. (2022). Adolescent alcohol and stress exposure rewires key cortical neurocircuitry. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 896880. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.896880>
- Simon, F. R., Fortune, J., Iwahashi, M., Sutherland, E. y Simon, F. R. (2002). Sexual dimorphic expression of ADH in rat liver: Importance of the hypothalamic-pituitary-liver axis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283, 646–655. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00438.2001>
- Sircar, R. (2019). Estrogen modulates ethanol-induced memory deficit in postpubertal adolescent rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 43(1), 61–68. <https://doi.org/10.1111/acer.13921>
- Slattery, D. A. y Cryan, J. F. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols*, 7(6), 1009–1014. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.044>
- Slattery, D. A., Markou, A. y Cryan, J. F. (2007). Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology*, 190(4), 555–568. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0630-x>
- 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>
- Thomasson, H. R. (2002). Gender differences in alcohol metabolism. In *Recent Developments in Alcoholism* (Vol. 12, pp. 163–179). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-306-47138-8_9
- van Goethem, N. P., Rutten, K., van der Staay, F. J., Jans, L. A. W., Akkerman, S., Steinbusch, H. W. M., Blokland, A., van't Klooster, J. y Prickaerts, J. (2012). Object recognition testing: Rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. *Behavioural Brain Research*, 232(2), 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.023>
- Van Hees, L., Didone, V., Charlet-Briart, M., Van Ingelgom, T., Alexandre, A., Quertemont, E., Nguyen, L. y Laguesse, S. (2022). Voluntary alcohol binge-drinking in adolescent C57Bl6 mice induces delayed appearance of behavioural defects in both males and females. *Addiction Biology*, 27(1), e13102. <https://doi.org/10.1111/adb.13102>
- Varlinskaya, E. I., Hosová, D., Towner, T., Werner, D. F. y Spear, L. P. (2020). Effects of chronic intermittent ethanol exposure during early and late adolescence on anxiety-like behaviors and behavioral flexibility in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 378, 112292. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112292>
- Vijayakumar, N., Op de Macks, Z., Shirtcliff, E. A. y Pfeifer, J. H. (2018). Puberty and the human brain: Insights into adolescent development. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 92, 417–436. <https://doi.org/10.1016/j.neubio-rev.2018.06.004>
- Vorhees, C. V. y Williams, M. T. (2006). Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Walker, B. M., Drimmer, D. A., Walker, J. L., Liu, T., Mathé, A. A. y Ehlers, C. L. (2010). Effects of prolonged ethanol vapor exposure on forced swim behavior, and neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor levels in rat brains. *Alcohol*, 44(6), 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2010.04.003>
- Waszkiewicz, N., Galińska-Skok, B., Nestsiarovich, A., Kułak-Bejda, A., Wilczyńska, K., Simonienko, K., Kwiatkowski, M. y Konarzewska, B. (2018). Neurobiological effects of binge drinking help in its detection and differential diagnosis from alcohol dependence. *Disease Markers*, 2018, 5623683. <https://doi.org/10.1155/2018/5623683>
- World Health Organization. (2024). *Global status report on alcohol and health and treatment of substance use disorders*.
- World Health Organization. (1948). *Constitution of the World Health Organization*. Alcohol. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>
- Xia, J., Wang, H., Zhang, C., Liu, B., Li, Y., Li, K., Li, P. y Song, C. (2023). The comparison of sex differences in depression-like behaviors and neuroinflammatory changes in a rat model of depression induced by chronic stress. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1059594>
- Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A. y Doron, R. (2015). The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(97). <https://doi.org/10.3791/52587>
- Zorzo, C., Arias, J. L. y Méndez, M. (2024). Are there sex differences in spatial reference memory in the Morris water maze? A large-sample experimental study. *Learning and Behavior*, 52(2), 179–190. <https://doi.org/10.3758/s13420-023-00598-w>