



SOCIDROGALCOHOL
Sociedad Científica Española
de Estudios sobre el Alcohol,
el Alcoholismo y las otras Toxicomanías

ADICCIONES

2025 ■ VOL. 37 ■ N. 4 ■ PÁGS. 369–382

www.adicciones.es

ADICCIONES



ORIGINAL

El historial previo de estrés modula los cambios transcripcionales inducidos por alcohol en la adolescencia en las vías glutamatérgicas y endocannabinoides del estriado

Prior stress history shapes adolescent alcohol-induced transcriptional changes in striatal glutamatergic and endocannabinoid pathways

Laura Sánchez-Marín*, **; Berke Canoluk*, ***; Julia Verheul-Campos*, **; Ana L. Gavito*, **; Raquel Reviriego*, **; Francisco J. Pavón-Morón*, ****, *****; Antonia Serrano*, **; Fernando Rodríguez de Fonseca*, **.

* Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina-IBIMA Plataforma BIONAND, Málaga, España.

** Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, España.

*** Unidad de Gestión Clínica de Neurología, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, España.

**** Unidad de Gestión Clínica Área del Corazón, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, España.

***** CIBER de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

Resumen

La adolescencia es una etapa de desarrollo crítica durante la cual la exposición al estrés y al alcohol puede inducir alteraciones neurobiológicas de larga duración. El consumo de alcohol en atracción es especialmente disruptivo para los circuitos corticoestriatales, sin embargo, aún se conoce poco sobre hasta qué punto la historia previa de estrés modula estos efectos. En este estudio investigamos cómo el estrés por inmovilización, ya sea agudo o repetido, antes de la exposición intermitente al alcohol durante la adolescencia modula los cambios transcripcionales en el estriado dorsal de ratas macho. Los animales fueron expuestos a una sesión única (agudo) o a cinco días consecutivos (repetido) de estrés por inmovilización entre los días posnatales (DPN) 32–36, seguido de cuatro semanas de administración intermitente intragástrica de etanol (3 g/kg) o solución salina. En la edad adulta se cuantificó la expresión de ARNm estriatal de genes dopaminérgicos (*Drd1*, *Drd2*, *Th*), glutamatérgicos (*Gls*, *Gls2*, *Gria2*, *Grin2a*, *Grin2b*), endocannabinoides (*Cnr1*, *Cnr2*, *Napepld*, *Faah*, *Dagla*, *Daglb*, *Mgl1*), neurotróficos (*Bdnf*, *Ntrk2*) y gliales (*Gfap*, *Aif1*). La exposición al alcohol incrementó la expresión de genes asociados con la síntesis de glutamato y la señalización de receptores, el metabolismo endocannabinoide y la activación astrocítica. El estrés agudo amplificó la expresión inducida por alcohol de *Gls*, *Gls2*, *Gria2*, *Napepld*, *Faah*, *Daglb*, *Ntrk2* y *Gfap*, mientras que el estrés repetido atenuó estos efectos y aumentó selectivamente la expresión de *Drd1*, *Drd2*, *Grin2a* y *Bdnf*. La activación microglial (*Aif1*) se incrementó por el alcohol independientemente del estrés. Estos resultados sugieren que el estrés agudo sensibiliza las vías glutamatérgicas y endocannabinoides al alcohol, mientras que el estrés repetido activa mecanismos adaptativos consistentes con la hipótesis de la inoculación de estrés. En conjunto, el historial de estrés determina de manera crítica los resultados neurobiológicos de la exposición al alcohol durante la adolescencia, con implicaciones para la resiliencia y la vulnerabilidad a la psicopatología inducida por alcohol.

Palabras clave: alcohol, estrés, adolescencia, estriado, glutamatérgico, endocannabinoide

Abstract

Adolescence is a critical developmental window during which exposure to stress and alcohol can induce long-lasting neurobiological alterations. Binge-like alcohol consumption is particularly disruptive to cortico-striatal circuits, but the extent to which prior stress history modulates these effects remains poorly understood. Here, we investigated how acute versus repeated restraint stress before intermittent alcohol exposure during adolescence shapes transcriptional changes in the dorsal striatum of male rats. Animals were exposed either to a single (acute) or five-day (repeated) restraint stress at postnatal day (PND) 32–36, followed by four weeks of intermittent intragastric ethanol (3 g/kg) or saline administration. At adult age, striatal mRNA expression of dopaminergic (*Drd1*, *Drd2*, *Th*), glutamatergic (*Gls*, *Gls2*, *Gria2*, *Grin2a*, *Grin2b*), endocannabinoid (*Cnr1*, *Cnr2*, *Napepld*, *Faah*, *Dagla*, *Daglb*, *Mgl1*), neurotrophic (*Bdnf*, *Ntrk2*), and glial (*Gfap*, *Aif1*) genes was quantified. Alcohol exposure upregulated genes associated with glutamate synthesis and receptor signaling, endocannabinoid metabolism, and astrocytic activation. Acute stress amplified alcohol-induced expression of *Gls*, *Gls2*, *Gria2*, *Napepld*, *Faah*, *Daglb*, *Ntrk2*, and *Gfap*, while repeated stress blunted these effects and selectively enhanced *Drd1*, *Drd2*, *Grin2a*, and *Bdnf* expression. Microglial activation (*Aif1*) was increased by alcohol independently of stress. These results suggest that acute stress sensitizes glutamatergic and endocannabinoid pathways to alcohol, whereas repeated stress engages adaptive mechanisms consistent with the stress inoculation hypothesis. Overall, stress history critically determines the neurobiological outcomes of adolescent alcohol exposure, with implications for resilience and vulnerability to alcohol-induced psychopathology.

Keywords: alcohol, stress, adolescence, striatum, glutamatergic, endocannabinoid

■ Recibido: Septiembre 2025; Aceptado: Noviembre 2025.

■ ISSN: 0214-4840 / E-ISSN: 2604-6334

■ Enviar correspondencia a:

Fernando Rodríguez de Fonseca (fernando.rodriguez@ibima.eu) y Antonia Serrano (antonia.serrano@ibima.eu). Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina-IBIMA Plataforma BIONAND, Avenida Severo Ochoa 35, 29590, Málaga, España.

La adolescencia es una ventana crítica del desarrollo en la que influencias externas, como el estrés, las drogas, las infecciones o los traumas, pueden inducir consecuencias a largo plazo sobre la función emocional y cognitiva. La intensidad y la secuencia temporal de estas influencias son fundamentales, ya que pueden conducir a resultados que van desde una alteración cognitiva y emocional grave hasta fenotipos resilientes. Sin embargo, los mecanismos involucrados en el fenotipo final del desarrollo no se comprenden completamente. En el caso del alcohol, un patrón de consumo muy extendido como es el consumo en atracón (consumo repetido y de alta intensidad) ha demostrado ser particularmente perjudicial. Los modelos con roedores han demostrado que la exposición al alcohol durante la adolescencia produce déficits en la memoria de reconocimiento, la flexibilidad cognitiva, un aumento de la desinhibición y resistencia al aprendizaje de extinción en la edad adulta (Sanchez-Marin et al., 2022a; Sanchez-Marin et al., 2017), a menudo asociados con conductas de tipo ansioso y depresivo. Los estudios de neuroimagen en humanos vinculan el consumo excesivo de alcohol en la adolescencia con alteraciones en la microestructura cortico-subcortical y una conectividad funcional alterada en circuitos críticos para la memoria y la recompensa, cambios que predicen un peor control cognitivo y un mayor riesgo de trastornos por uso de sustancias en el futuro (Huntley et al., 2020; Morris et al., 2018). Los hallazgos en humanos y roedores convergen: el consumo intermitente de alcohol en la adolescencia produce déficits persistentes en el aprendizaje de extinción de la conducta de búsqueda de alcohol que perduran hasta la edad adulta, comportamientos que se asemejan a problemas reales de toma de decisiones en individuos con exposición temprana e intensa al alcohol (Gass et al., 2014). Estos datos subrayan la importancia para la salud pública del consumo en atracón durante la adolescencia y su capacidad de influir en el desarrollo de psicopatologías en la edad adulta.

Numerosos estudios sitúan al estriado dorsal, un nodo clave para la selección de acciones y el aprendizaje de hábitos, en el centro de estos efectos duraderos del alcohol (Clabough et al., 2021; O'Tousa y Grahame, 2014; Salinas et al., 2022; Vretou et al., 2017; Wilcox et al., 2014). La exposición al alcohol durante la adolescencia altera los mecanismos de plasticidad estriatal que sustentan el control flexible dirigido a objetivos, lo que coincide con la tendencia observada en la edad adulta hacia respuestas habituales tras la exposición adolescente al alcohol (Gass et al., 2014). A nivel sináptico, un estudio previo ha demostrado que el etanol crónico deteriora la depresión a largo plazo (LPD) dependiente de mGlu2 en el estriado de ratones de manera dependiente de la edad, proporcionando un precedente mecanístico de cómo la exposición durante la adolescencia puede alterar la maduración corticoestriatal crítica para el aprendizaje adaptativo (Johnson et al., 2020). Trabajos previos también han mostrado que la exposición al alcohol durante la adolescencia puede remodelar las redes de

interneuronas estriatales y las redes perineuronales en la edad adulta (Dannenhoffer et al., 2022), destacando sustratos específicos de tipo celular a través de los cuales las funciones del estriado dorsal pueden reconfigurarse de manera duradera. Estos hallazgos evidencian que la exposición al alcohol durante la adolescencia produce cambios perdurables en los circuitos estriatales, los cuales pueden servir como base mecanística para estudiar las interacciones entre estrés y alcohol.

Desde un punto de vista mecanístico, el alcohol durante la adolescencia remodela múltiples sistemas neuromoduladores en el estriado. Entre ellos, los sistemas de señalización dopaminérgica, glutamatérgica y endocannabinoide (eCB) son particularmente relevantes debido a su papel central en la función estriatal y su sensibilidad tanto al alcohol como al estrés. El sistema dopaminérgico experimenta una profunda maduración durante la adolescencia, modulando el aprendizaje por refuerzo, la motivación y la sensibilidad a la recompensa (Hoops y Flores, 2017). La exposición al alcohol durante este periodo altera de forma persistente la transmisión dopaminérgica, con respuestas potenciadas al alcohol y señalización basal atenuada dependiendo de la subregión y el patrón de exposición, lo que indica una señal de refuerzo sensibilizada pero desregulada (Carrara-Nascimento et al., 2020; Shnitko et al., 2016; Zandy et al., 2015). Complementando estos efectos funcionales, la exposición al alcohol durante la adolescencia cambia la expresión de genes colinérgicos y dopaminérgicos (Hauser et al., 2021) y deja las interneuronas colinérgicas alteradas, asociadas a déficits cognitivos (Galaj et al., 2019). De forma paralela, las aferencias glutamatérgicas desde la corteza proporcionan el principal impulso excitatorio a las neuronas estriatales. El alcohol adolescente altera este sistema en múltiples niveles, incluyendo un aumento del glutamato extracelular durante la sensibilización y una regulación presináptica y metabotrópica deteriorada, lo que socava la plasticidad corticoestriatal y la flexibilidad conductual (Carrara-Nascimento et al., 2011; Johnson et al., 2020; Pascual et al., 2009). Finalmente, el sistema eCB actúa como un regulador clave de la excitación/inhibición corticoestriatal y se ve afectado tanto directamente por el alcohol intermitente durante la adolescencia como indirectamente a través de interacciones estrés-alcohol (Sanchez-Marin et al., 2022a; Sanchez-Marin et al., 2022b; Sanchez-Marin et al., 2020; Sanchez-Marin et al., 2017). En conjunto, las alteraciones convergentes en estos sistemas de neurotransmisión proporcionan un marco coherente para entender cómo el consumo en atracón durante la adolescencia puede sesgar los circuitos estriatales dorsales hacia un comportamiento habitual e inflexible en la edad adulta. Debido a que estos sistemas aún están madurando durante la adolescencia, el estrés y el alcohol pueden interactuar para producir neuroadaptaciones duraderas que alteren la sensibilidad a la recompensa y aumenten la vulnerabilidad a los trastornos por uso de sustancias.

El estrés y el trauma durante la adolescencia pueden influir adicionalmente en los efectos del alcohol sobre la función estriatal y el comportamiento adulto. Estudios preclínicos indican que el impacto del estrés temprano en el comportamiento adulto depende de su intensidad, duración, momento de exposición y previsibilidad, siendo frecuente que la exposición durante la adolescencia produzca resultados tanto beneficiosos como perjudiciales en un patrón de respuesta en forma de campana (Sandi y Pinelo-Nava, 2007). De manera consistente con el concepto de “inoculación de estrés”, el estrés repetido de leve a moderado durante la adolescencia puede proteger frente a deterioros cognitivos inducidos por traumas o la exposición al alcohol (Chaby et al., 2020; Sircar, 2020). Originalmente descrita por Lyons y Parker (Lyons y Parker, 2007), la inoculación de estrés se refiere a un mecanismo conservado evolutivamente mediante el cual el estrés moderado potencia la resiliencia, probablemente a través de neuroplasticidad adaptativa (Lotan et al., 2018).

Estos efectos duales se ilustran con los hallazgos de que el estrés en etapas tempranas de la vida y durante la adolescencia aumenta la ingesta de alcohol y altera la señalización eCB. Por ejemplo, la separación materna eleva el consumo de alcohol y reduce los niveles de eCB en el estriado y la corteza prefrontal (Favoretto et al., 2025; Portero-Tresserra et al., 2018). En animales expuestos al alcohol en la adolescencia, el estrés exagera el afecto negativo y los déficits en el procesamiento de la recompensa, junto con alteraciones en CRF, monoaminas y glutamato, poniendo de relieve una sinergia estrés-alcohol que altera los circuitos motivacionales (Boutros et al., 2018; Van Waes et al., 2011). Al mismo tiempo, la inoculación de estrés mediante exposiciones repetidas, controlables o moderadas puede promover resiliencia. Así, estudios previos han mostrado que el estrés repetido en la mitad de la adolescencia atenúa las consecuencias conductuales, noradrenérgicas y epigenéticas del estrés severo en la adultez temprana (Chaby et al., 2020), mientras que manipulaciones ambientales, como la actividad en la rueda durante la adolescencia, previenen la escalada del consumo de alcohol inducida por estrés (Reguilón et al., 2025).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la investigación en alcohol debe comparar explícitamente estrés agudo y repetido durante la adolescencia para distinguir mecanismos de vulnerabilidad frente a inoculación, particularmente dentro de los circuitos estriatales dorsales donde convergen los sistemas de estrés, eCB, colinérgico, dopaminérgico y glutamatérgico para moldear la selección de acciones y el riesgo de adicción a largo plazo. Aunque múltiples regiones cerebrales, como la corteza prefrontal, el hipocampo, la amígdala y el núcleo accumbens, están críticamente involucradas en la respuesta al estrés y en conductas relacionadas con la adicción (Juliano et al., 2025), nos centramos en el estriado dorsal debido a que la exposición al alcohol en la adolescencia produce adaptaciones robustas y duraderas en esta región. Además, el estriado dorsal integra múltiples sistemas neuromoduladores, proporcionando un marco

mecanístico adecuado para analizar transcripcionalmente las interacciones estrés-alcohol. Por lo tanto, el presente estudio se diseñó para comparar los efectos del estrés único frente al repetido antes del consumo en atracción de alcohol sobre un conjunto específico de genes representativos de las vías dopaminérgicas, glutamatérgicas y eCB, así como marcadores neurotróficos y gliales, seleccionados por su relevancia establecida para la plasticidad estriatal inducida por estrés y alcohol en la adolescencia. Los marcadores neurotróficos, específicamente el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y su receptor TrkB, fueron incluidos dado su papel central en la plasticidad sináptica dependiente de la actividad y en las respuestas adaptativas al estrés y alcohol durante la adolescencia (Binder y Scharfman, 2004; Logrip et al., 2015; Murakami et al., 2005). Las alteraciones en esta vía pueden influir en la función del circuito estriatal a largo plazo y en los resultados conductuales, proporcionando un sustrato mecanístico para los cambios inducidos por estrés y alcohol. En este estudio se seleccionaron únicamente animales machos para reducir la variabilidad relacionada con los efectos neuroprotectores específicos del sexo de las hormonas ováricas, que podrían confundir la interpretación de los cambios transcripcionales inducidos por estrés y alcohol. Aunque las adolescentes también consumen alcohol en atracción, incluirlas en este estudio inicial podría dificultar la interpretación mecanística; estudios futuros deberán incorporar ambos sexos para evaluar posibles diferencias en vulnerabilidad y resiliencia.

Método

Animales y declaración ética

Se utilizaron un total de 88 ratas Wistar macho (Charles River Laboratories, Francia), con un peso de 75–100 g a su llegada, distribuidas en dos protocolos experimentales incluidos en este estudio. Las ratas fueron recibidas en el día postnatal (DPN) 21 y alojadas por parejas en un animalario con humedad y temperatura controladas, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luces apagadas a las 19:00h). Durante todo el estudio, se proporcionaron alimento estándar en pellets y agua ad libitum. Todos los animales fueron aclimatados a las condiciones de alojamiento durante varios días antes de iniciar cualquier procedimiento experimental.

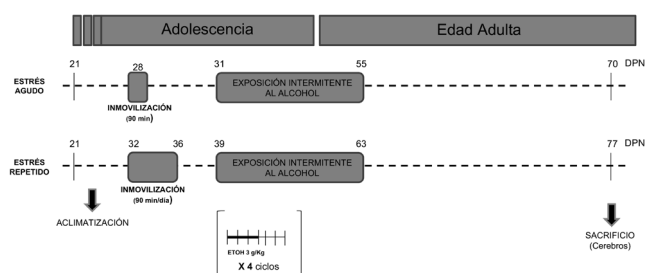
El estudio fue diseñado y llevado a cabo de acuerdo con la Directiva Europea 2010/63/EU para la protección de los animales utilizados con fines científicos, así como con la normativa española vigente (Real Decreto 53/2013 y 178/2004; Ley 32/2007 y 9/2003; Decreto 320/2010). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación de la Universidad de Málaga (CEUMA) y se ajustaron a las directrices ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments). Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento animal y emplear el número mínimo necesario de animales.

Diseño experimental

El diseño experimental ha sido descrito previamente en dos estudios independientes (Sanchez-Marin et al., 2022a; Sanchez-Marin et al., 2022b). Se utilizaron un total de 88 ratas Wistar macho adolescentes divididas en dos cohortes experimentales. En ambas, los animales fueron asignados aleatoriamente a condiciones de estrés o no estrés, y posteriormente subdivididos en grupos de tratamiento con alcohol o solución salina, dando lugar a seis subgrupos experimentales principales: sin estrés + salino; estrés agudo + salino; estrés repetido + salino; no estrés (control) + alcohol; estrés agudo + alcohol; estrés repetido + alcohol.

Figura 1

Diseño experimental



Nota. Para la exposición a estrés agudo, la mitad de las ratas macho adolescentes ($n = 24$) fueron expuestas a 90 min de estrés por inmovilización el día postnatal (DPN) 28, mientras que la otra mitad permaneció sin manipular en su jaula. Para el estrés repetido, la mitad de las ratas macho adolescentes ($n = 20$) fueron expuestas a estrés por inmovilización durante 90 min diarios durante 5 días consecutivos (DPN 32–36), y la otra mitad permaneció sin manipular. Tras la exposición al estrés, la mitad de los animales previamente sin manipular y la mitad de los animales estresados en cada condición de estrés (estrés único vs. estrés repetido) fueron expuestos a 4 ciclos de administración intragástrica de alcohol (3 g/kg). Cada ciclo consistió en 4 días consecutivos de tratamiento con alcohol seguidos de 3 días de descanso. Los animales restantes recibieron una solución salina isovolumétrica siguiendo el mismo calendario. Los animales fueron sacrificados 2 semanas después de la última administración de alcohol/salino, y se recogieron muestras del estriado dorsal para el análisis de la expresión de ARNm. Este protocolo dio lugar a 6 subgrupos experimentales: no estrés+salino, estrés agudo+salino, estrés repetido+salino, no estrés (control)+alcohol, estrés agudo+alcohol y estrés repetido+alcohol.

Exposición al estrés

En la primera cohorte ($n=48$), las ratas fueron sometidas a una única sesión de estrés por inmovilización (90 min en DPN28), mientras que en la segunda cohorte ($n=40$), el estrés consistió en 5 sesiones diarias de 90 min cada una (DPN32–36). Las ratas no expuestas a estrés en ambas cohortes permanecieron sin manipulación.

Procedimiento de alcohol intermitente

Tal como se describió previamente (Sanchez-Marin et al., 2022a; Sanchez-Marin et al., 2022b), las ratas de los grupos de alcohol recibieron 3 g/kg de etanol (25% v/v en salino mediante gavage intragástrico durante 4 días consecutivos, seguido de un periodo de 3 días sin alcohol. Este ciclo se repitió durante 4 semanas. Los grupos de salino recibieron una solución salina isovolumétrica siguiendo el mismo calendario. Todas las administraciones fueron realizadas por personal investigador entrenado.

Obtención de muestras y disección cerebral

Dos semanas después de la última administración de alcohol (DPN70–77), las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) para la obtención del tejido cerebral. Los cerebros fueron extraídos rápidamente, congelados inmediatamente en hielo seco y almacenados a -80°C hasta los análisis moleculares. Para la disección, los cerebros congelados se colocaron en matrices de acero inoxidable para cerebro de rata, y se obtuvieron secciones coronales de 2 mm de grosor utilizando cuchillas. El estriado dorsal se diseccionó bilateralmente usando un sacabocados, guiándose por las referencias anatómicas del atlas cerebral de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1998).

Aislamiento de ARN y análisis por RT-qPCR

Se utilizó PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) para medir los niveles relativos de expresión de ARNm de genes seleccionados implicados en la señalización dopaminérgica, la transmisión glutamatérgica, el metabolismo endocannabinoide, el soporte neurotrófico y marcadores neuroinflamatorios. Los genes analizados fueron: receptores de dopamina D1 (*Drd1*) y D2 (*Drd2*); tirosina hidroxilasa (*Th*); subunidades de receptores de glutamato *Gria2* (AMPA), *Grin2a* y *Grin2b* (NMDA); isoformas de glutaminasa *Gls* y *Gls2*; genes relacionados con el sistema endocannabinoide, incluyendo los receptores cannabinoides CB₁ (*Cnr1*) y CB₂ (*Cnr2*), monoacilglicerol lipasa (*Mgll*), diacilglicerol lipasa alfa (*Dagla*) y beta (*Daglb*), N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (*Napepld*) y la amida hidrolasa de ácidos grasos (*Faah*); así como el factor neurotrófico derivado del cerebro (*Bdnf*), su receptor TrkB (*Ntrk2*), la proteína ácida fibrilar glial (*Gfap*) y el factor inflamatorio de aloinjerto 1 (*Aif1*).

El ARN total se extrajo del tejido cerebral diseccionado utilizando el reactivo TRIzol (Gibco BRL Life Technologies, Baltimore, MD, EE. UU.), según lo descrito previamente (Sanchez-Marin et al., 2022a). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un sistema CFX Duet Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules City, CA, EE. UU.) utilizando el formato de marcaje FAM de los TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Todos los valores de expresión se normalizaron utilizando el gen de referencia β -actina (*Actb*), que mostró expresión estable entre los grupos experimentales. La expresión génica relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, expresando los niveles de expresión en relación con el grupo control. Los cebadores y sondas TaqMan fueron seleccionadas a partir de secuencias validadas de ARNm de rata del repositorio de Applied Biosystems (<https://www.thermofisher.com/order/genome-database/>), y la información detallada se encuentra en la Tabla Suplementaria S1.

Análisis estadístico

Todos los datos representados en gráficos se expresan como media \pm SEM. La distribución normal de los datos se evaluó

mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias dentro y entre grupos se evaluaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) [factores: f1 “estrés” (no estrés (control)/estrés único/estrés repetido) y f2 “alcohol” (salino (alcohol)]. La prueba de Tukey se utilizó como análisis post hoc para comparaciones múltiples entre subgrupos cuando el ANOVA de dos vías reveló interacción (f1 × f2).

Los valores estadísticos y grados de libertad se indican en la descripción de los resultados y se presentan en tablas dentro de las figuras para facilitar la interpretación. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Resultados

En el presente estudio evaluamos la expresión de genes seleccionados relacionados con la señalización dopaminérgica, la transmisión glutamatérgica, la señalización eCB, el soporte neurotrófico y marcadores gliales reactivos (neuroinflamatorios) en el estriado dorsal de ratas macho adultas jóvenes (DPN 70–77) previamente expuestas a estrés por inmovilización (agudo o repetido) y posteriormente sometidas a cuatro semanas de exposición intermitente al alcohol durante la adolescencia.

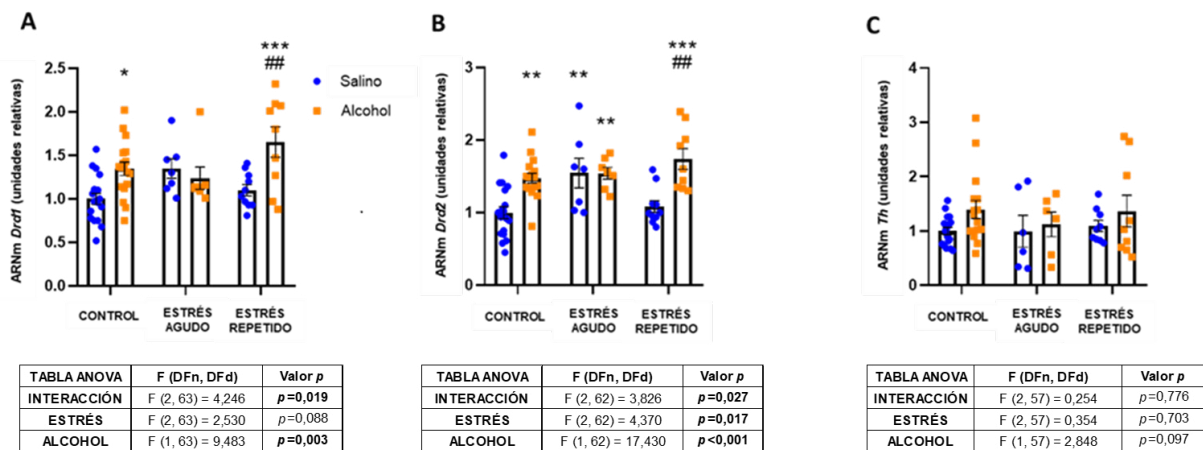
Efectos del estrés por inmovilización y del alcohol intermitente sobre la expresión de ARNm de genes de señalización dopaminérgica en el estriado dorsal

En primer lugar, evaluamos los efectos del estrés y/o la exposición intermitente al alcohol durante la adolescencia sobre la expresión de ARNm de los receptores de dopamina

(*Drd1* y *Drd2*), y de *Th*, la enzima limitante en la síntesis de dopamina. El ANOVA reveló un efecto principal significativo de “alcohol” y una interacción significativa “estrés” × “alcohol” sobre los niveles de ARNm de *Drd1*. El análisis post hoc para comparaciones múltiples mostró que el alcohol aumentó los niveles de ARNm de este receptor en el subgrupo control+alcohol en comparación con el subgrupo sin estrés+salino ($*p < 0,05$), y en el subgrupo estrés repetido+alcohol comparado con control+salino ($***p < 0,001$) y estrés repetido+salino ($##p < 0,01$). Notablemente, este efecto no se observó en animales expuestos a estrés agudo, donde los subgrupos tratados con salino o alcohol mostraron valores similares (Figura 2A). Estos resultados indicaron que el estrés agudo atenuó el aumento inducido por el alcohol en *Drd1*, mientras que el estrés repetido lo potenció. Para la expresión de *Drd2* (Figura 2B), el ANOVA mostró efectos principales significativos de “alcohol” y “estrés”, así como una interacción significativa “estrés” × “alcohol”. El análisis post hoc mostró que los niveles de ARNm de *Drd2* aumentaron significativamente en todos los subgrupos tratados con alcohol en comparación con los animales control+salino ($**p < 0,01$ y $***p < 0,001$), excepto en el subgrupo estrés repetido+salino, sugiriendo que el efecto del estrés agudo se atenuó en animales con estrés repetido y salino. Además, las ratas con estrés repetido+alcohol mostraron un aumento significativo en la expresión de ARNm de este receptor en comparación con el subgrupo estrés repetido+salino ($##p < 0,01$). En contraste, la expresión de *Th* no se vio afectada significativamente por “estrés” o “alcohol”, aunque se observó una tendencia no significativa hacia un aumento de la expresión en los animales expuestos al alcohol, probablemente debido a una variabilidad interindividual (Figura 2C).

Figura 2

Efectos diferenciales del estrés agudo y repetido previo sobre el impacto de la exposición intensiva al alcohol durante la adolescencia en la expresión de ARNm de genes de señalización dopaminérgica en el estriado dorsal de ratas adultas



Nota. Expresión relativa de ARNm de *Drd1* (A); *Drd2* (B); y *Th* (C). Las columnas representan la media ± SEM (7–10 ratas/subgrupo). Las tablas situadas bajo cada panel muestran los resultados del ANOVA de dos factores. Los valores p en negrita indican efectos principales significativos de los factores “estrés” y “alcohol” o interacción significativa (“estrés” × “alcohol”). $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$ indican diferencias significativas con respecto al subgrupo control+salino, y $##p < 0,01$ indica diferencias significativas con respecto al subgrupo estrés repetido+salino utilizando pruebas post hoc para comparaciones múltiples cuando se detecta una interacción entre factores.

Efectos del estrés por inmovilización y del alcohol intermitente sobre la expresión de ARNm de genes de señalización glutamatergica en el estriado dorsal

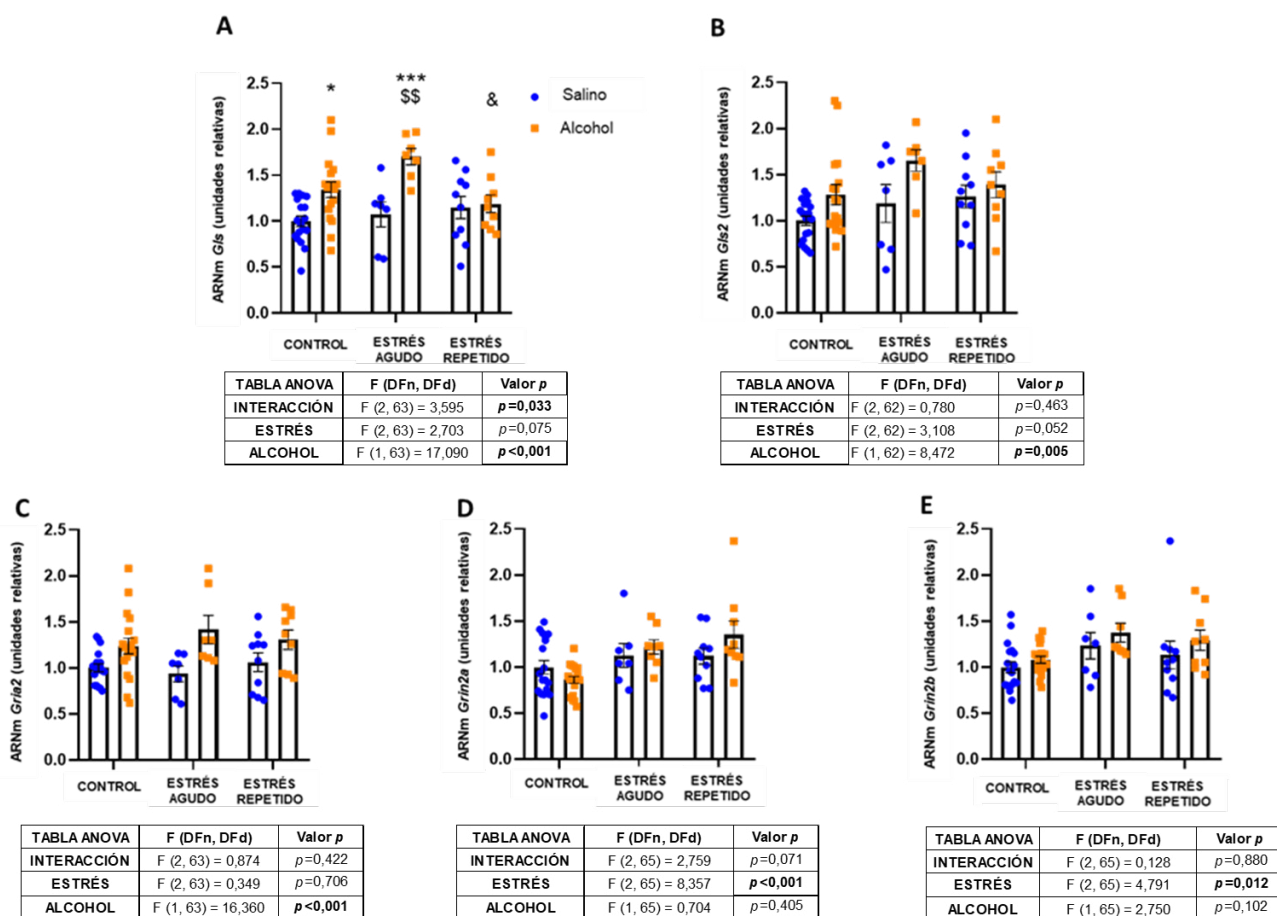
A continuación, evaluamos los efectos del estrés y/o la exposición intermitente al alcohol durante la adolescencia sobre la expresión de ARNm de los genes que codifican las isoformas de glutaminasa *Gls* y *Gls2*, enzimas responsables de convertir la glutamina en glutamato, un paso clave en la neurotransmisión excitatoria, así como sobre la expresión de las subunidades de los receptores de glutamato *Gria2* (AMPA), *Grin2a* y *Grin2b* (NMDA).

Como se muestra en la Figura 3A, el análisis estadístico reveló un efecto principal significativo de “alcohol” sobre la expresión de ARNm de *Gls*, así como una interacción significativa “estrés” × “alcohol”. El análisis post hoc mostró un aumento significativo en los niveles de ARNm de *Gls* en los subgrupos control+alcohol y estrés agudo+alcohol en comparación con los animales control+salino ($*p<0,05$ y

$***p<0,001$, respectivamente). Además, los animales del subgrupo estrés agudo+alcohol mostraron niveles de *Gls* significativamente mayores que estrés agudo+salino ($^{ss}p<0,01$) y estrés repetido+alcohol ($^{\&}p<0,05$). Estos resultados sugieren que, mientras que el alcohol aumentó la disponibilidad de glutamato, el estrés agudo amplificó este efecto, y el estrés repetido lo atenuó. Para la expresión de *Gls2* (Figura 3B), el análisis estadístico también reveló un efecto principal significativo de “alcohol”, indicando un aumento inducido por el alcohol en la disponibilidad de glutamato. El estrés por sí solo no alteró la expresión de *Gls* o *Gls2*. Para los receptores AMPA (Figura 3C), el alcohol aumentó significativamente la expresión de ARNm de la subunidad *Gria2*. Finalmente, para los receptores NMDA (Figuras 3D y 3E), el ANOVA mostró efectos principales significativos de “estrés” sobre la expresión de ARNm de *Grin2a* y *Grin2b*. Los animales estresados mostraron niveles más altos de ARNm de estas subunidades de receptores NMDA en comparación con los controles no estresados.

Figura 3

Efectos diferenciales del estrés agudo y repetido previo sobre el impacto de la exposición intensiva al alcohol durante la adolescencia en la expresión de ARNm de genes de señalización glutamatergica en el estriado dorsal de ratas adultas



Nota. Expresión relativa de ARNm de *Gls* (A); *Gls2* (B); *Gria2* (C); *Grin2a* (D); y *Grin2b* (E). Las columnas representan la media ± SEM (7–10 ratas/subgrupo). Las tablas situadas bajo cada panel muestran los resultados del ANOVA de dos factores. Los valores p en negrita indican efectos principales significativos de los factores (“estrés” y “alcohol”) o interacción significativa (“estrés” × “alcohol”). * $p<0,05$ y *** $p<0,001$ indican diferencias significativas con respecto al subgrupo control+salino, $^{ss}p<0,01$ indica diferencias significativas con respecto al subgrupo estrés agudo+salino, y $^{\&}p<0,05$ indica diferencias significativas con respecto al subgrupo estrés agudo+alcohol utilizando pruebas post hoc para comparaciones múltiples cuando se detecta una interacción entre factores.

Efectos del estrés por inmovilización y del alcohol intermitente sobre la expresión de ARNm de genes de señalización endocannabinoide en el estriado dorsal

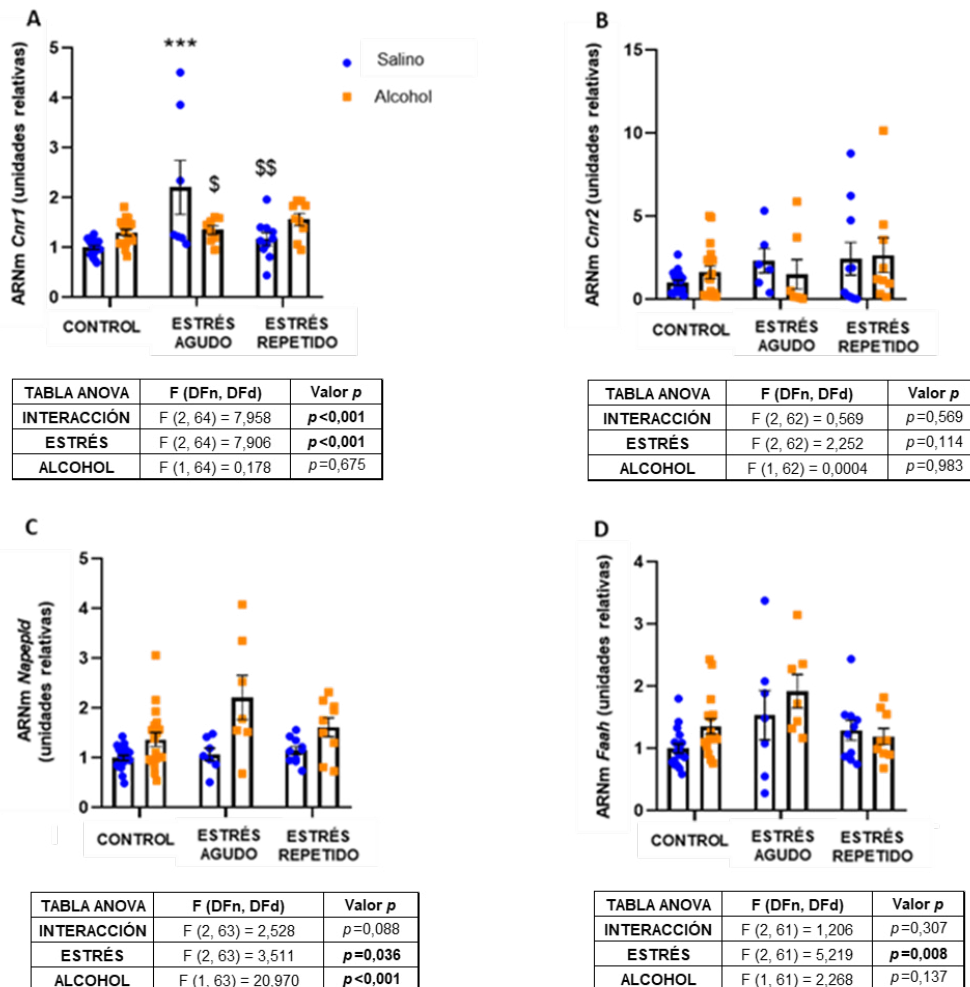
Dado que la actividad del glutamato está regulada por el sistema eCB, el principal sistema de señalización retrógrada en las sinapsis glutamatérgicas, evaluamos los efectos del estrés y/o la exposición intermitente al alcohol durante la adolescencia sobre la expresión de ARNm de genes que codifican receptores y enzimas implicadas en la síntesis, señalización y degradación de eCB.

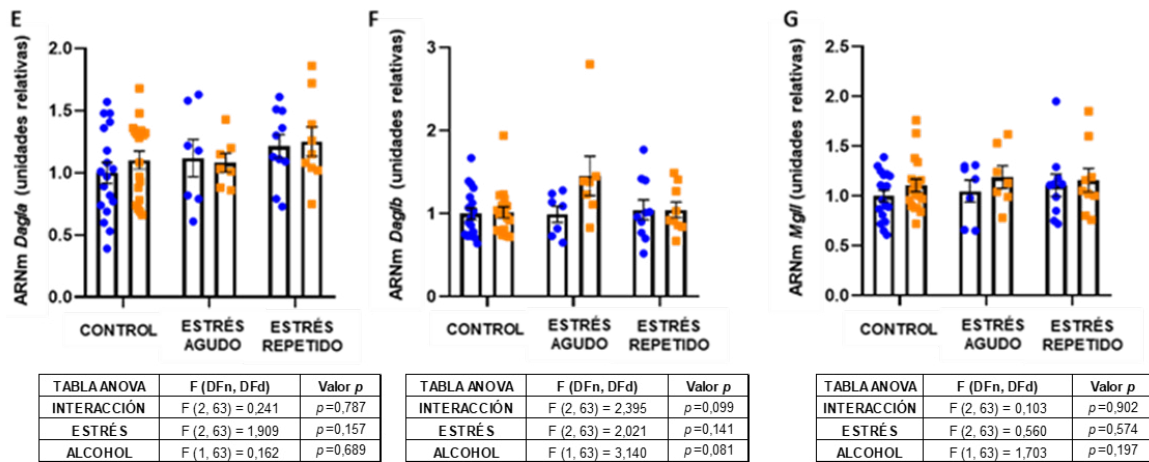
Para la expresión de *Cnr1*, el ANOVA reveló un efecto principal significativo de “estrés”, así como una interacción significativa “estrés” × “alcohol” (Figura 4A). El análisis post hoc mostró un aumento marcado en los niveles de ARNm de *Cnr1* en las ratas estrés agudo+salino en comparación con los subgrupos control+salino ($^{***}p<0,001$), estrés agudo+alcohol ($^{\$}p<0,05$) y estrés repetido+salino ($^{SS}p<0,01$), sugiriendo que el estrés repetido contrarrestó el

aumento observado tras el estrés agudo. Por el contrario, no se encontraron efectos significativos de “estrés” o “alcohol” sobre la expresión de *Cnr2* (Figura 4B). En cuanto a las enzimas relacionadas con las acilglucolípidos, el ANOVA reveló efectos principales significativos de “alcohol” y “estrés” sobre la expresión de *Napepld* (Figura 4C). Este efecto fue atribuible al aumento inducido por el alcohol en la expresión de esta enzima en los animales estresados. Específicamente, las ratas expuestas al alcohol mostraron niveles de ARNm de *Napepld* más altos que los animales tratados con salino siendo el efecto más pronunciado en los animales con estrés agudo. Para la expresión de *Faah* (Figura 4D), el ANOVA reveló un efecto principal significativo de “estrés”, con ratas estresadas mostrando niveles de ARNm más altos que los animales no estresados. Finalmente, para las enzimas implicadas en el metabolismo de acilglicérols, *Dagla* (Figura 4E), *Daglb* (Figura 4F) y *Mgll* (Figura 4G), no se observaron efectos principales significativos de “estrés” o “alcohol”.

Figura 4

Efectos diferenciales del estrés agudo y repetido previo sobre el impacto de la exposición intensiva al alcohol durante la adolescencia en la expresión de ARNm de genes de señalización endocannabinoide en el estriado dorsal de ratas adultas





Nota. Expresión relativa de ARNm de *Cnr1* (A); *Cnr2* (B); *Napepld* (C); *Faah* (D); *Dag1a* (E); *Dag1b* (F); y *Mgl1* (G). Las columnas representan la media ± SEM (7–10 ratas/subgrupo). Las tablas situadas bajo cada panel muestran los resultados del ANOVA de dos factores. Los valores *p* en negrita indican efectos principales significativos de los factores (“estrés” y “alcohol”) o interacción significativa (“estrés” × “alcohol”). ****p* < 0,001 indica diferencias significativas con respecto al subgrupo control+salino, **p* < 0,05 y ***p* < 0,01 indican diferencias significativas con respecto al subgrupo estrés agudo+ salino utilizando pruebas post hoc para comparaciones múltiples cuando se detecta una interacción entre factores.

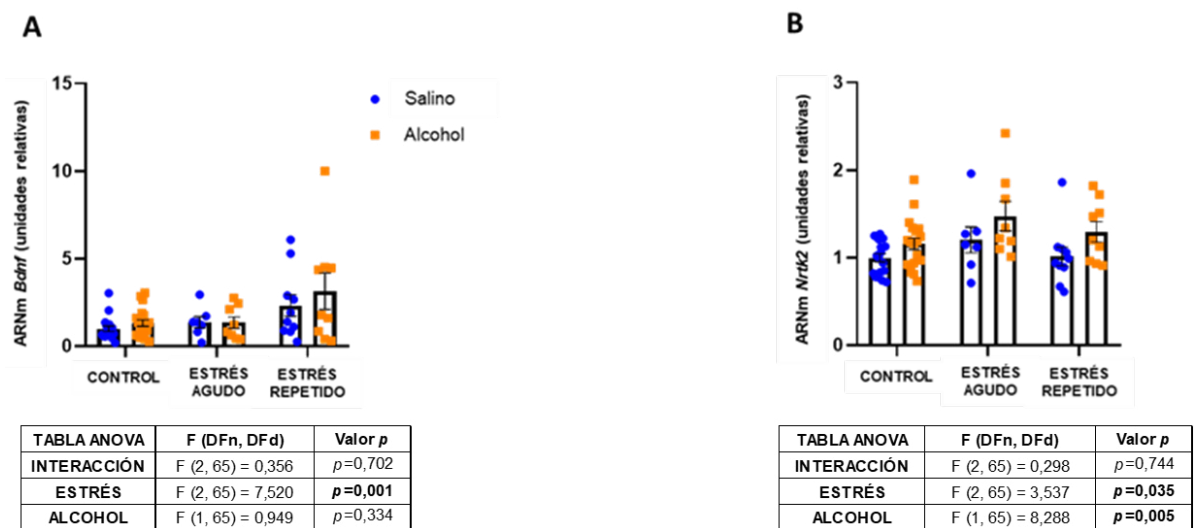
Efectos del estrés por inmovilización y del alcohol intermitente sobre la expresión de ARNm de genes neurotróficos en el estriado dorsal

A continuación, evaluamos los efectos del estrés y/o la exposición intermitente al alcohol durante la adolescencia sobre la expresión de ARNm de *Bdnf* y de su receptor *Ntrk2*. Esta vía neurotrófica representa una importante señal molecular adaptativa en respuesta tanto al estrés como al alcohol.

Como se muestra en la Figura 5A, el análisis estadístico reveló efectos principales significativos de “estrés” sobre la expresión de *Bdnf*. Las ratas estresadas mostraron niveles de ARNm de *Bdnf* más altos que los animales no estresados. En cuanto a su receptor (Figura 5B), el ANOVA reveló efectos principales significativos de “alcohol” y “estrés”. Específicamente, las ratas expuestas al alcohol mostraron niveles de ARNm de *Ntrk2* más altos que los animales tratados con salino. Aunque el ANOVA también indicó un efecto principal del estrés, este efecto fue menos evidente visualmente, probablemente debido a la variabilidad interindividual.

Figura 5

Efectos diferenciales del estrés agudo y repetido previo sobre el impacto de la exposición intensiva al alcohol durante la adolescencia en la expresión de ARNm de genes relacionados con factores neurotróficos en el estriado dorsal de ratas adultas



Nota. Expresión relativa de ARNm de *Bdnf* (A); y *Ntrk2* (B). Las columnas representan la media ± SEM (7–10 ratas/subgrupo). Las tablas situadas bajo cada panel muestran los resultados del ANOVA de dos factores. Los valores *p* en negrita indican efectos principales significativos de los factores (“estrés” y “alcohol”) o interacción significativa (“estrés” × “alcohol”).

Efectos del estrés por inmovilización y del alcohol intermitente sobre marcadores astrocíticos y microgliales en el estriado dorsal

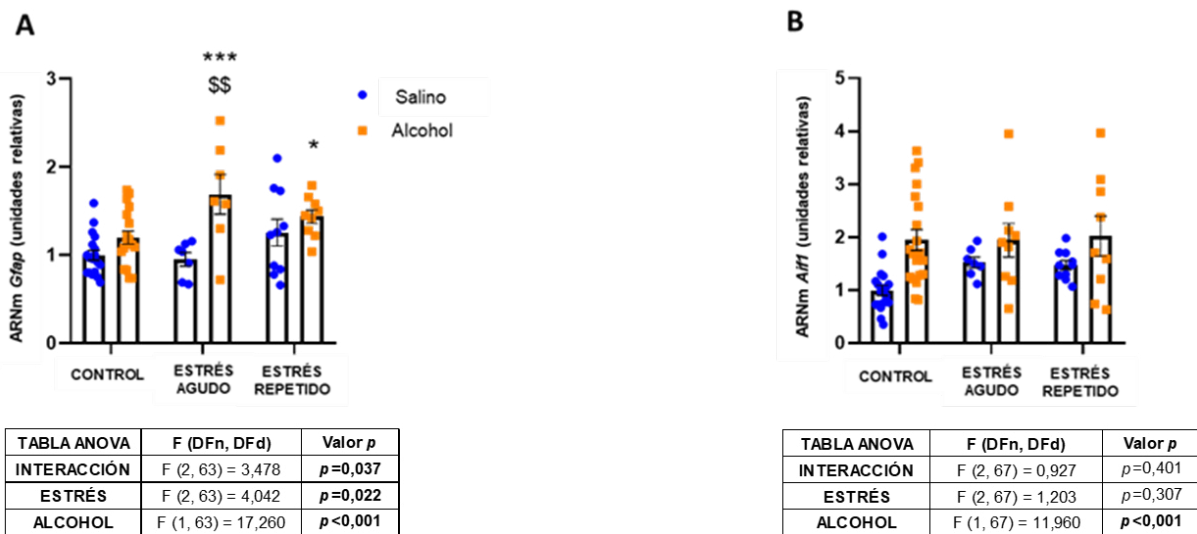
Finalmente, evaluamos los efectos del estrés y/o la exposición intermitente al alcohol durante la adolescencia sobre la expresión de ARNm de *Gfap* y *Aif1*, marcadores de astrocitos y de microglía activada, respectivamente.

El ANOVA reveló efectos principales significativos de “estrés” y “alcohol”, así como una interacción significativa “estrés” × “alcohol” sobre la expresión de *Gfap* (Figura 6A). El análisis post hoc mostró un aumento marcado en

los niveles de ARNm de *Gfap* en los subgrupos estrés agudo+alcohol y estrés repetido+alcohol en comparación con los animales control+salino ($^{***}p<0,001$ y $^{*}p<0,05$, respectivamente). Además, las ratas del subgrupo estrés agudo+alcohol mostraron niveles de ARNm significativamente más altos que el subgrupo estrés agudo+salino ($^{SS}p<0,01$). Para la microglía, el análisis reveló un efecto principal significativo de “alcohol” sobre la expresión de *Aif1*, independientemente del estrés (Figura 6B). En todos los grupos, las ratas expuestas al alcohol mostraron niveles más altos de ARNm de *Aif1* que los animales tratados con salino.

Figura 6

Efectos diferenciales del estrés agudo y repetido previo sobre el impacto de la exposición intensiva al alcohol durante la adolescencia en la expresión de ARNm de genes marcadores astrocíticos y microgliales en el estriado dorsal de ratas adultas



Nota. Expresión relativa de ARNm de *Gfap* (A); y *Aif1* (B). Las columnas representan la media ± SEM (7–10 ratas/subgrupo). Las tablas situadas bajo cada panel muestran los resultados del ANOVA de dos factores. Los valores p en negrita indican efectos principales significativos de los factores (“estrés” y “alcohol”) o interacción significativa (“estrés” × “alcohol”). $^{***}p<0,001$ indica diferencias significativas con respecto al subgrupo control+salino, y $^{SS}p<0,01$ indica diferencias significativas con respecto al subgrupo estrés agudo+salino utilizando pruebas post hoc para comparaciones múltiples cuando se detecta una interacción entre factores.

Discusión

El presente estudio confirma que el estrés previo durante la adolescencia modula las consecuencias neurobiológicas de la exposición al alcohol sobre la expresión de genes dopaminérgicos, glutamatérgicos, eCB, neurotróficos y gliales en el estriado dorsal. Estas vías fueron seleccionadas debido a su papel central en la plasticidad sináptica estriatal, la regulación del estrés y las neuroadaptaciones inducidas por el alcohol. En conjunto, proporcionan un marco mecanístico amplio para entender cómo el historial de estrés configura los efectos del alcohol durante la adolescencia. Estos hallazgos se suman a la evidencia previa de que los efectos del estrés adolescente son altamente dependientes del contexto, variando según el momento, la intensidad y la cronicidad (Sandi y Pinelo-Nava, 2007). Es importante destacar que los resultados observados aquí fueron claramente dependientes del tipo de exposición al estrés. El estrés agudo potenció la regulación al alza inducida por el alcohol de *Gls*, *Gls2*, *Gria2*, *Napepld*, *Faah*,

Daglb, *Ntrk2* y *Gfap*, mientras que el estrés repetido atenuó estos incrementos inducidos por el alcohol, potenciando selectivamente la expresión de *Drd1*, *Drd2*, *Grin2a* y *Bdnf*. Estos hallazgos apoyan la idea de que la inoculación de estrés durante la adolescencia podría producir efectos protectores frente a los daños inducidos por el abuso temprano de alcohol.

La exposición al alcohol aumentó de forma significativa la expresión de *Drd1* y *Drd2* en el estriado dorsal en condiciones de no estrés, pero este efecto desapareció en los animales expuestos a estrés agudo. Por el contrario, el estrés repetido no atenuó esta respuesta, sino que potenció la regulación al alza de los genes de los receptores de dopamina inducida por alcohol. Además de la interacción con el alcohol, cabe señalar que el estrés agudo por sí solo incrementó la expresión de *Drd1* y *Drd2*, mientras que el estrés repetido no lo hizo. Este patrón sugiere que el estrés agudo aumenta transitoriamente la disponibilidad de receptores dopaminérgicos que podría facilitar respuestas conductuales adaptativas frente a desa-

fios agudos pero que, si se activa repetidamente por el estrés o la exposición al alcohol, podría contribuir a procesos de refuerzo maladaptativo. La ausencia de este efecto tras una exposición repetida al estrés puede reflejar mecanismos reguladores adaptativos que limitan la sobreactivación dopaminérgica tras exposiciones repetidas al estrés, consistente con la evidencia de que el estrés crónico o repetido puede atenuar la respuesta dopaminérgica (Baik, 2020). En conjunto, estos resultados sugieren que el estrés agudo altera transitoriamente las adaptaciones dopaminérgicas inducidas por el alcohol, posiblemente activando mecanismos inhibitorios u homeostáticos a corto plazo, mientras que el estrés repetido facilita una regulación compensatoria al alza de los receptores de dopamina. Este patrón es coherente con la sensibilización cruzada entre estrés y alcohol a nivel de las neuronas dopaminérgicas mesoestriales (Cheng et al., 2018; Wilcox et al., 2014). El aumento de la disponibilidad de receptores bajo estrés repetido puede representar una adaptación dirigida a mantener el impulso motivacional, lo que, a su vez, podría aumentar la vulnerabilidad a exposiciones posteriores a alcohol o estrés reforzando la sensibilización dopaminérgica.

En cuanto a las interacciones alcohol-glutamato, se sabe que el alcohol altera fuertemente la señalización glutamatérgica en los circuitos corticoestriales, aumentando la liberación presináptica de glutamato y alterando la expresión de subunidades de receptores ionotrópicos, incluidos los componentes AMPAR y NMDAR (Abraham et al., 2017). Estos cambios impulsan adaptaciones a largo plazo vinculadas al refuerzo y a la búsqueda de alcohol. El aumento inducido por el alcohol en la expresión de *Gls* y *Gls2* observado en nuestro estudio es consistente con un aumento de la síntesis de glutamato a través del ciclo glutamina-glutamato, proporcionando el suministro excitador necesario para sostener el consumo de alcohol en patrón de atracón. El estrés agudo amplificó aún más este efecto, lo que probablemente refleja la facilitación mediada por glucocorticoides de la liberación presináptica de glutamato y el aumento del tráfico de receptores (Popoli et al., 2011; Yuen et al., 2009). Por el contrario, el estrés repetido atenuó la inducción de *Gls/Gls2* por el alcohol, un patrón consistente con una amortiguación adaptativa del tono glutamatérgico que puede representar una forma de metaplasticidad (Franklin et al., 2012). Este patrón se extendió a los receptores ionotrópicos, ya que el alcohol incrementó significativamente los niveles de ARNm de *Gria2* y el estrés agudo potenció esta inducción. Sin embargo, observamos una mayor expresión de *Grin2a* y *Grin2b* en los animales estresados en comparación con los controles no estresados, lo que sugiere que el estrés, más que el alcohol, modula la expresión de subunidades de receptores NMDA en este paradigma. En conjunto, estos resultados sugieren que los aumentos inducidos por el alcohol en la síntesis de glutamato y en la expresión de receptores AMPA son potenciados por el estrés agudo, pero atenuados por el estrés repetido, mien-

tras que el estrés por sí mismo potencia selectivamente la expresión de subunidades de receptores NMDA. Este patrón puede reflejar una modulación adaptativa de la transmisión excitatoria corticoestriatal dependiente del historial de estrés.

Dado que la actividad glutamatérgica está fuertemente regulada por el sistema eCB, también examinamos genes que codifican receptores cannabinoides y enzimas metabólicas. Los receptores CB₁ se expresan densamente en los terminales glutamatérgicos estriales, donde los eCB como la anandamida (AEA) y el 2-AG actúan retrógradamente para reducir la probabilidad de liberación presináptica y sostener tanto la plasticidad a corto como a largo plazo (Katona y Freund, 2012; Zou y Kumar, 2018). Nuestros datos mostraron una expresión aumentada de *Cnr1* en los animales estrés agudo+salino en comparación con los controles no estresados, mientras que este efecto se atenuó tanto por la exposición al alcohol como por el estrés repetido. Este aumento probablemente refleja un mecanismo compensatorio transitorio dirigido a restaurar el equilibrio homeostático en la transmisión glutamatérgica. El estrés agudo incrementa la liberación de corticosterona, lo que potencia la actividad glutamatérgica en los circuitos corticoestriales y límbicos (Caudal et al., 2010; Yuen et al., 2009). La elevada expresión de *Cnr1* puede, por tanto, representar una respuesta adaptativa para contrarrestar el impulso excitador inducido por el estrés facilitando la inhibición presináptica mediada por eCB de la liberación de glutamato. Esta interpretación coincide con evidencias previas que muestran que el estrés agudo puede reducir los niveles de AEA mediante un aumento de la actividad de FAAH (Morena et al., 2019), mientras que el estrés repetido a menudo regula a la baja la función de los receptores CB₁ (Morena et al., 2016). Así, los hallazgos actuales refuerzan la idea de que el sistema eCB muestra una adaptación bifásica al estrés, con activación tras la exposición aguda y supresión en condiciones crónicas o repetidas, lo que puede influir de forma crítica en la resiliencia y vulnerabilidad durante la adolescencia. Por el contrario, la expresión de *Cnr2* no mostró cambios significativos, consistente con el papel predominante de los receptores CB₁ en la regulación de la transmisión sináptica estriatal (Loving y Mathur, 2012). Además, en este estudio, la exposición al alcohol durante la adolescencia mediante gavage no produjo cambios significativos en la expresión de ARNm de los receptores cannabinoides en el estriado dorsal de animales que no habían sido sometidos a estrés. Estos resultados difieren de los observados previamente por nuestro grupo (Sánchez-Marín et al., 2017), donde la administración intraperitoneal de alcohol, asociada a concentraciones de alcohol en sangre cercanas a 200 mg/dL, provocó una reducción de la expresión de *Cnr1* en el estriado. Una posible explicación de esta discrepancia es que el protocolo de gavage utilizado en el presente estudio generó niveles de alcohol en sangre más bajos (~133–140 mg/dL) y una absorción sistémica más lenta, lo que podría no ser suficiente para inducir cambios detectables

en la expresión génica. Además, el presente estudio analizó específicamente el estriado dorsal, mientras que el estudio anterior evaluó el estriado completo. Dada la heterogeneidad en la expresión de receptores eCB entre subregiones estriatales y en la sensibilidad al alcohol, estas diferencias metodológicas probablemente contribuyen a los resultados divergentes. En cuanto a las enzimas implicadas en el metabolismo de eCB, tanto el alcohol como el estrés influyeron significativamente en la expresión de *Napepld*. La exposición al alcohol incrementó los niveles de ARNm de esta enzima en animales estresados, particularmente en aquellos sometidos a estrés agudo, indicando un aumento en la síntesis de AEA en estas condiciones. Igualmente, la expresión de *Faah* se incrementó por el estrés, sugiriendo una mayor degradación de AEA. La regulación al alza concurrente de *Napepld* y *Faah* implica una alta tasa de recambio de AEA, que potencialmente genera un estado de señalización eCB dinámico pero inestable durante el estrés agudo y la exposición al alcohol. Por el contrario, los genes implicados en el metabolismo de 2-AG (*Dagla*, *Daglb*, *Mgll*) no se vieron significativamente afectados ni por el estrés ni por el alcohol. La ausencia de cambios importantes en estas enzimas indica que la modulación del sistema eCB por estrés y alcohol en el estriado dorsal se centra principalmente en la vía de AEA más que al metabolismo del 2-AG. Estas adaptaciones moleculares pueden representar eventos tempranos que influyen en la regulación a largo plazo de los circuitos de estrés y recompensa. Dirigir intervenciones a componentes específicos del sistema eCB, como FAAH o NAPE-PLD, podría proporcionar estrategias para restaurar la homeostasis y aumentar la resiliencia frente a los cambios neuroplásticos inducidos por el estrés y el alcohol.

Tanto el estrés agudo como el repetido aumentaron la expresión de *Bdnf* en el estriado dorsal, siendo niveles ligeramente superiores con estrés repetido. Además, el grupo estrés repetido+alcohol mostró visualmente un mayor aumento, sugiriendo una posible tendencia aditiva. Estas observaciones indican que la exposición al estrés puede impulsar aumentos adaptativos de *Bdnf*, resaltando un posible mecanismo de resiliencia. La señalización BDNF–TrkB sostiene la plasticidad sináptica y el remodelado estructural, facilitando respuestas adaptativas a los desafíos ambientales (Lotan et al., 2018). El aumento de la expresión de BDNF se ha relacionado con la inoculación de estrés en modelos preclínicos (Chaby et al., 2020; Sircar, 2020) y, en este contexto, puede proteger contra la neurotoxicidad inducida por el alcohol.

Nuestros resultados también distinguen entre las respuestas microgliales y astrocíticas al alcohol. La expresión de *Aif1* se incrementó de forma significativa por el alcohol en todos los grupos, consistente con la activación directa de la microglía por el alcohol vía TLR4 (Alfonso-Loeches et al., 2010). Estos resultados indican que la activación microglial en el estriado dorsal estuvo asociada principalmente a la exposición al alcohol más que al estrés, sugiriendo que el estrés por sí solo no fue suficiente para alterar la expresión génica

microglial en estas condiciones. Por el contrario, la expresión de *Gfap* se vio incrementada en los grupos estrés agudo+alcohol y estrés repetido+alcohol en comparación con los controles sin estrés, con el mayor aumento en el grupo estrés agudo+alcohol, lo que indica que la reactividad astrocítica inducida por el alcohol es más sensible al historial de estrés y puede ser atenuada por la inoculación de estrés.

En conjunto, estos resultados sugieren un modelo unificado de interacción estrés–alcohol en la adolescencia. Bajo la condición estrés agudo+alcohol, la liberación de glutamato impulsada por glucocorticoides actúa de forma sinérgica con los efectos excitatorios del alcohol, aumentando la expresión de *Gls/Gls2* y potenciando *Gria2*. Al mismo tiempo, el aumento de *Napepld* y *Faah* intenta limitar la excitación a través de la señalización CB₁, mientras que las respuestas astrocítica y microglial contribuyen a cascadas neuroinflamatorias. Por el contrario, el estrés repetido+alcohol activa mecanismos protectores de metaplasticidad: amortiguando la inducción por alcohol de genes del metabolismo glutamatérgico y de *Napepld*, favoreciendo la subunidad *Grin2a* de los receptores NMDA y aumentando *Bdnf*. Estas adaptaciones reflejan la inoculación de estrés, en la que el estrés repetido previo reconfigura los circuitos estriatales para amortiguar perturbaciones posteriores (Franklin et al., 2012). Aunque en este estudio se examinaron múltiples sistemas de señalización, nuestro objetivo fue captar las adaptaciones moleculares coordinadas que emergen de la interacción estrés–alcohol, más que aislar una única vía. Los sistemas dopaminérgico, glutamatérgico y eCB, junto con los mecanismos neurotróficos y gliales, forman una red integrada que regula la respuesta al estrés, la recompensa y la plasticidad sináptica. Identificar cómo interactúan estas vías proporciona una comprensión a nivel de sistema sobre resiliencia y vulnerabilidad. No obstante, nuestros resultados señalan dianas terapéuticas específicas que merecen una exploración más profunda, en particular la modulación del metabolismo eCB y la señalización BDNF–TrkB, ambas aparentemente capaces de amortiguar el impacto neurotóxico de la exposición al alcohol en la adolescencia. Las intervenciones farmacológicas dirigidas a estos mecanismos podrían representar estrategias prometedoras para restaurar el equilibrio corticoestriatal y promover la resiliencia al estrés.

Para situar estos hallazgos en un contexto más amplio, estos resultados en el estriado dorsal deben interpretarse junto con nuestros estudios previos que examinan los efectos del estrés y la exposición al alcohol durante la adolescencia en otras regiones cerebrales relacionadas con el estrés, como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal medial (Sanchez-Marín et al., 2022a; Sanchez-Marín et al., 2022b; Verheul-Campos et al., 2025). En particular, estos estudios muestran que el estrés agudo durante la adolescencia produce alteraciones duraderas en la señalización glutamatérgica y eCB en la amígdala, que se ven además moduladas por la exposición concurrente al alcohol (Sanchez-Marín et al., 2022b). Del mismo modo, el estrés repetido y la exposición al

alcohol en la adolescencia inducen cambios transcripcionales y conductuales duraderos en el hipocampo y la corteza prefrontal medial (Sanchez-Marin et al., 2022; Verheul-Campos et al., 2025). Junto con los hallazgos presentes, estos resultados sugieren que el historial de estrés modula la neuroplasticidad inducida por el alcohol en múltiples nodos corticolímbicos y estriatales, configurando vulnerabilidad o resiliencia en función del patrón temporal y la intensidad de la exposición al estrés. Estudios futuros deberán ampliar estas investigaciones para determinar si existen mecanismos similares en otras regiones sensibles al estrés, como el hipotálamo, y para caracterizar mejor el impacto del estrés agudo en estas estructuras interconectadas. Este enfoque integrador ayudará a aclarar cómo la experiencia de estrés reorganiza las redes neuronales que median la psicopatología relacionada con el alcohol.

Conclusión

Este estudio demuestra que las consecuencias neurobiológicas de la exposición al alcohol durante la adolescencia están críticamente determinadas por el historial de estrés previo. El estrés agudo sensibiliza los sistemas excitatorio y endocannabinoide, exacerbando el impacto del alcohol sobre las vías glutamatérgicas y astrocíticas, mientras que el estrés repetido atenúa estos efectos y activa adaptaciones dopaminérgicas y neurotróficas consistentes con la resiliencia. Estos hallazgos respaldan a nivel molecular a la hipótesis de la inoculación de estrés y resaltan la importancia de considerar el historial de estrés al evaluar la vulnerabilidad frente a la resiliencia al alcohol durante el desarrollo.

Limitaciones

Una limitación clave es que solo se estudiaron animales machos. Dada la evidencia de que las hembras muestran una resiliencia relativa frente a la neurotoxicidad inducida por el alcohol debido a la neuroprotección dependiente de esteroides sexuales, la generalización de estos hallazgos es limitada. Futuros estudios deberían incorporar ambos sexos y examinar correlaciones conductuales, como la sensibilidad a la recompensa y la flexibilidad cognitiva, para relacionar mejor los cambios transcripcionales con los resultados funcionales. Además, aunque se cuantificó la expresión génica, es necesario medir los niveles proteicos y realizar ensayos funcionales para confirmar los efectos posteriores sobre la fisiología sináptica.

Agradecimientos

El presente estudio fue apoyado por las siguientes ayudas: Proyectos financiados por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y cofinanciados por la Unión Europea y el ERDF-EU (PI20/01399, PI22/00427 y PI22/01833); Programa RICORS RIAPAD financiado por ISCIII y cofinanciado por la Unión Europea (RD21/0009/0003 y

RD24/0003/0012); Proyecto financiado por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad y Consumo (PNSD2022/020); Programa Fortalece financiado por ISCIII, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FORT23/00013).

Conflictos de interés

Los autores no declaran intereses financieros biomédicos ni posibles conflictos de interés.

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>
- Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A. M., Sanchez-Vera, I. y Guerri, C. (2010). Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J. Neurosci*, 30(24), 8285-8295. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010>
- Baik, J. H. (2020). Stress and the dopaminergic reward system. *Exp Mol Med*, 52(12), 1879-1890. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00532-4>
- Binder, D. K. y Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*, 22(3), 123-131. <https://doi.org/10.1080/08977190410001723308>
- Boutros, N., Der-Avakian, A., Kesby, J. P., Lee, S., Markou, A. y Semenova, S. (2018). Effects of adolescent alcohol exposure on stress-induced reward deficits, brain CRE, monoamines and glutamate in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 235(3), 737-747. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4789-0>
- Carrara-Nascimento, P. F., Griffin, W. C., 3rd, Pastrello, D. M., Olive, M. F. y Camarini, R. (2011). Changes in extracellular levels of glutamate in the nucleus accumbens after ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent and adult mice. *Alcohol*, 45(5), 451-460. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2011.01.002>
- Carrara-Nascimento, P. F., Hoffmann, L. B., Florio, J. C., Planeta, C. S. y Camarini, R. (2020). Effects of Ethanol Exposure During Adolescence or Adulthood on Locomotor Sensitization and Dopamine Levels in the Reward System. *Front Behav Neurosci*, 14, 31. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00031>
- Caudal, D., Godsil, B. P., Mailliet, F., Bergerot, D. y Jay, T. M. (2010). Acute stress induces contrasting changes in AMPA receptor subunit phosphorylation within the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus. *PLoS One*, 5(12), e15282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015282>
- Chaby, L. E., Sadik, N., Burson, N. A., Lloyd, S., O'Donnell, K., Winters, J.,... Perrine, S. A. (2020). Repeated stress exposure in mid-adolescence attenuates behavioral, noradrenergic, and epigenetic effects of trauma-like stress in early adult

- male rats. *Sci Rep*, 10(1), 17935. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74481-3>
- Cheng, Y., Wang, X., Wei, X., Xie, X., Melo, S., Miranda, R. C. y Wang, J. (2018). Prenatal Exposure to Alcohol Induces Functional and Structural Plasticity in Dopamine D1 Receptor-Expressing Neurons of the Dorsomedial Striatum. *Alcohol Clin Exp Res*. <https://doi.org/10.1111/acer.13806>
- Clabough, E., Ingersoll, J., Reekes, T., Gleichsner, A. y Ryan, A. (2021). Acute Ethanol Exposure during Synaptogenesis Rapidly Alters Medium Spiny Neuron Morphology and Synaptic Protein Expression in the Dorsal Striatum. *Int J Mol Sci*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010290>
- Dannenhoffer, C. A., Gomez, A. A., Macht, V. A., Jawad, R., Sutherland, E. B., Vetreno, R. P.,...Robinson, D. L. (2022). Impact of adolescent intermittent ethanol exposure on interneurons and their surrounding perineuronal nets in adulthood. *Alcohol Clin Exp Res*, 46(5), 759-769. <https://doi.org/10.1111/acer.14810>
- Favoretto, C. A., Bertagna, N. B., Anjos-Santos, A., Loss, C. M., Rodolpho, B. T., Righi, T.,...Cruz, F. C. (2025). Impacts of maternal separation stress on ethanol intake and endocannabinoid system in adolescent mice. *Neuroscience*, 565, 124-137. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2024.11.037>
- Franklin, T. B., Saab, B. J. y Mansuy, I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*, 75(5), 747-761. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.016>
- Galaj, E., Kipp, B. T., Floresco, S. B. y Savage, L. M. (2019). Persistent Alterations of Accumbal Cholinergic Interneurons and Cognitive Dysfunction after Adolescent Intermittent Ethanol Exposure. *Neuroscience*, 404, 153-164. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.062>
- Gass, J. T., Glen, W. B., Jr., McGonigal, J. T., Trantham-Davidson, H., Lopez, M. E., Randall, P. K.,...Chandler, L. J. (2014). Adolescent alcohol exposure reduces behavioral flexibility, promotes disinhibition, and increases resistance to extinction of ethanol self-administration in adulthood. *Neuropsychopharmacology*, 39(11), 2570-2583. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.109>
- Hauser, S. R., Mulholland, P. J., Truitt, W. A., Waeiss, R. A., Engleman, E. A., Bell, R. L. y Rodd, Z. A. (2021). Adolescent Intermittent Ethanol (AIE) Enhances the Dopaminergic Response to Ethanol within the Mesolimbic Pathway during Adulthood: Alterations in Cholinergic/Dopaminergic Genes Expression in the Nucleus Accumbens Shell. *Int J Mol Sci*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111733>
- Hoops, D. y Flores, C. (2017). Making Dopamine Connections in Adolescence. *Trends Neurosci*, 40(12), 709-719. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.09.004>
- Huntley, E. D., Marusak, H. A., Berman, S. E., Zundel, C. G., Hatfield, J. R. B., Keating, D. P. y Rabinak, C. A. (2020). Adolescent substance use and functional connectivity between the ventral striatum and hippocampus. *Behav Brain Res*, 390, 112678. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112678>
- Johnson, K. A., Liput, D. J., Homanics, G. E. y Lovinger, D. M. (2020). Age-dependent impairment of metabotropic glutamate receptor 2-dependent long-term depression in the mouse striatum by chronic ethanol exposure. *Alcohol*, 82, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2019.06.003>
- Juliano, V. A. L., Albernaz-Mariano, K. A., Covre, L. H. H., Juca, P. M., Pereira, R. M., Shigeo-de-Almeida, A.,...Munhoz, C. D. (2025). Neurobiological intersections of stress and substance use disorders. *Front Neurosci*, 19, 1548372. <https://doi.org/10.3389/fnins.2025.1548372>
- Katona, I. y Freund, T. F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 35, 529-558. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150420>
- Logrip, M. L., Barak, S., Warnault, V. y Ron, D. (2015). Corticostriatal BDNF and alcohol addiction. *Brain Res*, 1628(Pt A), 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.03.025>
- Lotan, A., Lifschytz, T., Wolf, G., Keller, S., Ben-Ari, H., Tatarsky, P.,...Lerer, B. (2018). Differential effects of chronic stress in young-adult and old female mice: cognitive-behavioral manifestations and neurobiological correlates. *Mol Psychiatry*, 23(6), 1432-1445. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.237>
- Lovinger, D. M. y Mathur, B. N. (2012). Endocannabinoids in striatal plasticity. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1(Suppl 1), S132-134. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(11\)70041-4](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70041-4)
- Lyons, D. M. y Parker, K. J. (2007). Stress inoculation-induced indications of resilience in monkeys. *J Trauma Stress*, 20(4), 423-433. <https://doi.org/10.1002/jts.20265>
- Morena, M., Aukema, R. J., Leitel, K. D., Rashid, A. J., Vecchiarelli, H. A., Josselyn, S. A. y Hill, M. N. (2019). Upregulation of Anandamide Hydrolysis in the Basolateral Complex of Amygdala Reduces Fear Memory Expression and Indices of Stress and Anxiety. *J Neurosci*, 39(7), 1275-1292. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2251-18.2018>
- Morena, M., Patel, S., Bains, J. S. y Hill, M. N. (2016). Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 80-102. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.166>
- Morris, L. S., Dowell, N. G., Cercignani, M., Harrison, N. A. y Voon, V. (2018). Binge drinking differentially affects cortical and subcortical microstructure. *Addict Biol*, 23(1), 403-411. <https://doi.org/10.1111/adb.12493>
- Murakami, S., Imbe, H., Morikawa, Y., Kubo, C. y Senba, E. (2005). Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res*, 53(2), 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.06.008>
- O'Tousa, D. y Grahame, N. (2014). Habit formation: implications for alcoholism research. *Alcohol*, 48(4), 327-335. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.02.004>
- Pascual, M., Boix, J., Felipo, V. y Guerri, C. (2009). Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *J Neu-*

- rochem*, 108(4), 920-931. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05835.x>
- Paxinos, G. y Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York: Academic Press, Spiral Bound.*
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S. y Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*, 13(1), 22-37. <https://doi.org/10.1038/nrn3138>
- Portero-Tresserra, M., Gracia-Rubio, I., Cantacorps, L., Pozo, O. J., Gomez-Gomez, A., Pastor, A.,... Valverde, O. (2018). Maternal separation increases alcohol-drinking behaviour and reduces endocannabinoid levels in the mouse striatum and prefrontal cortex. *Eur Neuropsychopharmacol*, 28(4), 499-512. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.02.003>
- Reguilón, M. D., Ferrer-Perez, C., Manzanedo, C., Minarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2025). Voluntary wheel running during adolescence prevents the increase in ethanol intake induced by social defeat in male mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 242(5), 979-996. <https://doi.org/10.1007/s00213-023-06461-0>
- Salinas, A. G., Nadel, J. A., Mateo, Y., Huynh, T., Augustin, S. M., Pacak, K. y Lovinger, D. M. (2022). Chronic Ethanol Consumption Alters Presynaptic Regulation of Dorsal Striatal Dopamine Release in C57BL/6J Mice. *Int J Mol Sci*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231910994>
- Sanchez-Marin, L., Flores-Lopez, M., Gavito, A. L., Suarez, J., Pavon-Moron, F. J., de Fonseca, F. R. y Serrano, A. (2022a). Repeated Restraint Stress and Binge Alcohol during Adolescence Induce Long-Term Effects on Anxiety-like Behavior and the Expression of the Endocannabinoid System in Male Rats. *Biomedicine*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/biomedicine10030593>
- Sanchez-Marin, L., Flores-Lopez, M., Pastor, A., Gavito, A. L., Suarez, J., de la Torre, R.,... Serrano, A. (2022b). Acute stress and alcohol exposure during adolescence result in an anxious phenotype in adulthood: Role of altered glutamate/endocannabinoid transmission mechanisms. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 113, 110460. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110460>
- Sanchez-Marin, L., Gavito, A. L., Decara, J., Pastor, A., Castilla-Ortega, E., Suarez, J.,... Serrano, A. (2020). Impact of intermittent voluntary ethanol consumption during adolescence on the expression of endocannabinoid system and neuroinflammatory mediators. *Eur Neuropsychopharmacol*, 33, 126-138. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.01.012>
- Sanchez-Marin, L., Pavon, F. J., Decara, J., Suarez, J., Gavito, A., Castilla-Ortega, E.,... Serrano, A. (2017). Effects of Intermittent Alcohol Exposure on Emotion and Cognition: A Potential Role for the Endogenous Cannabinoid System and Neuroinflammation. *Front Behav Neurosci*, 11, 15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00015>
- Sandi, C. y Pinelo-Nava, M. T. (2007). Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast*, 2007, 78970. <https://doi.org/10.1155/2007/78970>
- Shnitko, T. A., Spear, L. P. y Robinson, D. L. (2016). Adolescent binge-like alcohol alters sensitivity to acute alcohol effects on dopamine release in the nucleus accumbens of adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 233(3), 361-371. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4106-8>
- Sircar, R. (2020). Repeated unpredictable stress blunts alcohol-induced memory deficit in adolescent rat. *Neuroreport*, 31(15), 1090-1095. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001519>
- Van Waes, V., Darnaudery, M., Marrocco, J., Gruber, S. H., Talavera, E., Mairesse, J.,... Morley-Fletcher, S. (2011). Impact of early life stress on alcohol consumption and on the short- and long-term responses to alcohol in adolescent female rats. *Behav Brain Res*, 221(1), 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.033>
- Verheul-Campos, J., Sanchez-Marin, L., Lopez, Y., Gavito, A. L., Grandes, P., Serrano, P.,... de Fonseca, F. R. (2025). Prior restraint stress counteracts memory deficits associated with adolescent alcohol exposure by targeting both the hippocampal endocannabinoid and glutamatergic systems. *Drug Alcohol Depend*, 276, 112891. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2025.112891>
- Vrettou, M., Granholm, L., Todkar, A., Nilsson, K. W., Wallen-Mackenzie, A., Nylander, I. y Comasco, E. (2017). Ethanol affects limbic and striatal presynaptic glutamatergic and DNA methylation gene expression in outbred rats exposed to early-life stress. *Addict Biol*, 22(2), 369-380. <https://doi.org/10.1111/adb.12331>
- Wilcox, M. V., Cuzon Carlson, V. C., Sherazee, N., Sprow, G. M., Bock, R., Thiele, T. E.,... Alvarez, V. A. (2014). Repeated binge-like ethanol drinking alters ethanol drinking patterns and depresses striatal GABAergic transmission. *Neuropsychopharmacology*, 39(3), 579-594. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.230>
- Yuen, E. Y., Liu, W., Karatsoreos, I. N., Feng, J., McEwen, B. S. y Yan, Z. (2009). Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33), 14075-14079. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906791106>
- Zandy, S. L., Matthews, D. B., Tokunaga, S., Miller, A., Blaha, C. D. y Mittleman, G. (2015). Reduced dopamine release in the nucleus accumbens core of adult rats following adolescent binge alcohol exposure: age and dose-dependent analysis. *Psychopharmacology (Berl)*, 232(4), 777-784. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3712-1>
- Zou, S. y Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>