

# **POTENCIAL UTILIDAD TERAPÉUTICA DEL CANNABIDIOL EN EL TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL**

MEMORIA PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**ADRIÁN VIUDEZ MARTÍNEZ**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. JORGE MANZANARES ROBLES

CODIRECTORA DE TESIS:

Dra. MARÍA SALUD GARCÍA GUTIÉRREZ

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS  
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ-CSIC

2018



El Dr. JORGE MANZANARES ROBLES, Catedrático de Farmacología de la Universidad Miguel Hernández (UMH) e Investigador principal del Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto UMH-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y la Dra. MARÍA SALUD GARCÍA GUTIÉRREZ, Profesora Contratada Doctora de la Universidad Miguel Hernández (UMH) e Investigadora del Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto UMH-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICAN:

Que D. ADRIÁN VIUDEZ MARTÍNEZ, graduado en FARMACIA, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge en la Tesis Doctoral por compendio de publicaciones “POTENCIAL UTILIDAD TERAPEÚTICA DEL CANNABIDIOL EN EL TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL”.

Asimismo, confirman que las siguientes publicaciones recogidas en el presente trabajo no han sido utilizadas para la elaboración de otra tesis doctoral:

**Artículo 1. Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior**

**Adrián Viudez-Martínez**, María-Salud García-Gutiérrez, Juan Medrano-Relinque, Carmen Navarrón, Francisco Navarrete, Jorge Manzanares

**Acta Pharmacologica Sinica**. 2018 0:1–7. doi: 10.1038/s41401-018-0032-8

**Cuartil:** Q1      **Rank:** 63/261 Pharmacology & Pharmacy      **Factor de impacto:** 3,562

**Artículo 2. Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice**

**Adrián Viudez-Martínez**, María-Salud García-Gutiérrez, Carmen Navarrón, María-Isabel Morales-Calero, Francisco Navarrete, Ana-Isabel Torres-Suárez, Jorge Manzanares.

**Addiction Biology**. 2018 Jan;23(1):154-164. doi: 10.1111/adb.12495

**Cuartil:** Q1      **Rank:** 45/292 Biochemistry & Molecular Biology      **Factor de impacto:** 5,578

**Artículo 3. Effects of cannabidiol plus naltrexone on motivation and ethanol consumption**

**Adrián Viudez-Martínez**, María-Salud García-Gutiérrez, Ana-Isabel Fraguas-Sánchez, Ana-Isabel Torres-Suárez, Jorge Manzanares.

**British Journal of Pharmacology**. 2018 175 3369–3378. doi: 10.1111/bph.14380.

**Cuartil:** Q1      **Rank:** 12/261 Pharmacology & Pharmacy      **Factor de impacto:** 6,810

**Artículo 4. Gender differences in the effects of cannabidiol on ethanol binge drinking in mice**

Adrián Viudez-Martínez, María-Salud García-Gutiérrez, Jorge Manzanares.

**Addiction Biology:** enviado.

Cuartil: Q1

Rank: 45/292 Biochemistry & Molecular Biology

Factor de impacto: 5,578

Para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden y firman el presente Certificado en Sant Joan d'Alacant, 2 de octubre de 2018.

**Dr. Jorge Manzanares Robles**  
Director de la tesis

**Dra. M<sup>a</sup> Salud García Gutiérrez**  
Codirectora de la tesis

San Juan de Alicante, 5 de septiembre de 2018

INFORME DE LA COMISION ACADEMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
NEUROCIENCIAS

Por la presente, la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Neurociencias: Informa FAVORABLEMENTE el depósito de la Tesis presentada por D. ADRIÁN VIUDEZ MARTÍNEZ, Realizada bajo la dirección del Dr. JORGE MANZANARES ROBLES y la Dra. MARÍA SALUD GARCÍA GUTIÉRREZ

Titulada: POTENCIAL UTILIDAD TERAPEÚTICA DEL CANNABIDIOL EN EL TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL.

Presentada por compendio de publicaciones.

San Juan de Alicante, octubre 2018

***Dr. Miguel Valdeolmillos***

Coordinador del programa de Doctorado en Neurociencias





*“El mundo está en las manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y corren el riesgo de vivir sus sueños”*

Paulo Coelho







A mi familia.



## AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento me gustaría agradecer a todas las personas que, de una manera u otra han contribuido a la realización de este trabajo:

A mi director de tesis. Jorge, gracias por brindarme esta oportunidad, por confiar en mí, por tu paciencia. Gracias por apostar y hacer de este proyecto una realidad.

A mi codirectora de tesis. Salu, compartir esta experiencia contigo ha sido enriquecedora por partida doble. Gracias por contagiarme tu esfuerzo, por enseñarme, y simplemente, por ser.

A mis compañeros del laboratorio. Fran, Auxi y Ani, gracias por los buenos ratos vividos, por vuestra ayuda. Esta experiencia ha sido aún más inolvidable gracias a vosotros.

A la Dra. Esther Caparrós Cayuela, por su afecto e interés.

A todas las personas que han pasado por "el 206": Carmen, Juan, Francesca, Melonie, Anna, gracias por los buenos momentos.

A la Dra. Ana Isabel Torres Suárez, por estar siempre dispuesta a colaborar y por interesarse.

A Pep, por su apoyo técnico, por su colaboración para la realización de esta tesis.

A todo el personal del Instituto de Neurociencias que ha hecho posible esta tesis, en especial a los miembros del animalario (José Antonio, Paco, Darío, Emilio, Eva y Mónica) y de la unidad de lavado (Trini).

A Ana, Aroa, Laura y Virginia. Por estar siempre a mi lado, por apoyarme, porque sencillamente sois excepcionales. Gracias por esta bonita amistad.

A Andrea. Porque las coincidencias de la vida son sencillamente maravillosas. Porque eres única. Porque confías más en mí que yo mismo.

A Rubén, Gely y Ángel. Por hacer que me sienta uno más de la familia, por vuestro afecto.

A Rubén. Por tu facilidad para dibujarme sonrisas despreocupadas, por tu cariño y paciencia. Por ayudarme a mantener la determinación. Conocerme ha sido un auténtico regalo de la vida, te quiero.

A mis abuelos y tíos. Por preocuparse siempre del "niño de la casa". Por todos sus esfuerzos. Especialmente a ti abuela, que tanto me enseñaste sin tú saberlo, gracias.

A mis padres. Por demostrarme que la vida es para los valientes, por ayudarme a luchar, por creer en mí, por quererme incondicionalmente. Por darme todo sin esperar nada a cambio. No podría haber tenido más suerte. Os quiero.







LISTADO DE ABREVIATURAS .....	i
RESUMEN.....	iii
SUMMARY.....	v
INTRODUCCIÓN	
1. TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL: DIAGNÓSTICO, EPIDEMIOLOGÍA Y PATRONES DE CONSUMO .....	1
2. SUSTRATOS NEUROBIOLÓGICOS DEL TUA .....	6
3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL TUA .....	18
4. POTENCIAL UTILIDAD TERAPÉUTICA DEL FITOCANNABINOIDE CANNABIDIOL EN EL TUA .....	24
5. MODELOS ANIMALES DE ADICCIÓN .....	32
HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	40
OBJETIVOS .....	41
RESULTADOS: RESUMEN GLOBAL .....	42
DISCUSIÓN GENERAL .....	46
FUTURAS DIRECCIONES.....	55
CONCLUSIONES FINALES .....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
ANEXO I	
1. Artículo 1.....	79
2. Artículo 2.....	100
3. Artículo 3.....	134
4. Artículo 4.....	162









<b>2-AG</b>	2-araquidonilglicerol
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b><math>\Delta^8</math>-THC</b>	Delta-8-tetrahidrocannabinol
<b><math>\Delta^9</math>-THC</b>	Delta-9-tetrahidrocannabinol
<b>AEA</b>	N-araquidoniletanolamina; anandamida
<b>AMY</b>	Amígdala
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>Asp</b>	Ácido aspártico
<b>CBC</b>	Cannabicromeno
<b>CBD</b>	Cannabidiol
<b>CBE</b>	Cannabielsoína
<b>CBG</b>	Cannabigerol
<b>CBL</b>	Cannabiciclol
<b>CBN</b>	Cannabinol
<b>CBND</b>	Cannabinodiol
<b>CBT</b>	Cannabitriol
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva media
<b>CPP</b>	Condicionamiento de preferencia de lugar
<b>DR</b>	Rafe dorsal
<b>DSM-IV</b>	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 4ª edición
<b>DSM-V</b>	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 5ª edición
<b>EC</b>	Estímulo condicionado
<b>EI</b>	Estímulo incondicionado
<b>EMA</b>	Agencia Europea de Medicamentos
<b>EN</b>	Estímulo neutro
<b>FAAH</b>	Amidohidrolasa de ácidos grasos
<b>FABP</b>	Proteína de unión a ácidos grasos
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos

<b>FJB+</b>	Células fluoro-jade B positivas
<b>FR</b>	Razón fija
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GPR18</b>	Receptor acoplado a proteínas G 18
<b>GPR55</b>	Receptor acoplado a proteínas G 55
<b>HIP</b>	Hipocampo
<b>MAGL</b>	Monoacilglicerol lipasa
<b>mGluR5</b>	Receptor metabotrópico de glutamato 5
<b>NAc</b>	Núcleo accumbens
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NRF2</b>	Factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2
<b>NTX</b>	Naltrexona
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>Oprm1</b>	Gen del receptor mu opioide
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFC</b>	Corteza prefrontal
<b>PR</b>	Razón progresiva
<b>rCB<sub>1</sub></b>	Receptor cannabinoide 1
<b>rCB<sub>2</sub></b>	Receptor cannabinoide 2
<b>RI</b>	Respuesta incondicionada
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>TRPV1</b>	Receptor de potencial transitorio V1
<b>TUA</b>	Trastorno por uso de alcohol
<b>VDAC1</b>	Canal de voltaje dependiente de aniones
<b>VTA</b>	Área del tegmento ventral





Diversos estudios sugieren que el cannabidiol (CBD), compuesto extraído de la planta *Cannabis sativa*, podría resultar de utilidad en el manejo terapéutico del trastorno por uso de alcohol (TUA) debido a su acción ansiolítica, antidepresiva, antipsicótica y neuroprotectora.

En la presente tesis doctoral se explora en detalle la potencial eficacia del CBD en el tratamiento del TUA. En primer lugar, se evalúa su potencial como droga de abuso en las pruebas de condicionamiento preferente de lugar, autoadministración oral y abstinencia espontánea a cannabinoides. A continuación, se estudian los efectos del CBD, solo o en combinación con fármacos comúnmente empleados en el tratamiento del TUA, como la naltrexona (NTX), en el consumo voluntario y en forma de atracón y, en la autoadministración oral de etanol. Asimismo, se evalúa la acción del CBD sobre diferentes efectos fisiológicos inducidos por el etanol (concentración plasmática de etanol, hipotermia y presencia de convulsiones). Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción por el cual el CBD modula las propiedades reforzantes del etanol, se analizan los cambios en la expresión génica relativa de diferentes dianas implicadas en el proceso de adicción alcohólica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) a tiempo real. Más en detalle, se evalúa el papel del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en los efectos mediados por el CBD en la autoadministración oral de etanol mediante el pre-tratamiento con el antagonista 5-HT<sub>1A</sub> WAY100635.

Los resultados indican que el CBD no induce preferencia de lugar, ni autoadministración ni signos de abstinencia. Conjuntamente, estos hallazgos corroboran que el CBD carece de potencial como droga de abuso (**artículo 1**). Asimismo, los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la potencial utilidad terapéutica del CBD en el TUA (**artículo 2-4**). Esta afirmación se fundamenta en que el CBD reduce la preferencia, el consumo, la motivación y la recaída a etanol en roedores en los diferentes paradigmas experimentales evaluados (consumo voluntario, autoadministración oral y consumo en forma de atracón). El tratamiento con CBD evita que se produzcan los efectos fisiológicos inducidos por el etanol sin alterar su concentración plasmática, confirmando que el CBD no modifica el proceso de absorción ni de metabolización del etanol. A su vez, se demuestra como la combinación de dosis subefectivas de CBD y NTX presenta mayor eficacia en la autoadministración oral de etanol. Estos cambios comportamentales se asocian con alteraciones en la expresión génica de tirosina hidroxilasa en el área del tegmento ventral, receptor  $\mu$  opioide, receptores cannabinoides 1 y 2 y receptor acoplado a proteínas G 55 en el núcleo accumbens y receptor serotoninérgico 1A (5-HT<sub>1A</sub>) en el rafe dorsal. El pretratamiento con el antagonista WAY100635 evita los efectos del CBD sobre el consumo y la motivación en la autoadministración oral de etanol, poniendo de manifiesto que este receptor es una de las principales dianas por las que el CBD media su acción sobre el etanol.

En su conjunto, los datos obtenidos en la presente tesis refuerzan el papel del CBD como herramienta terapéutica de interés para el tratamiento del TUA, sentando las bases para la realización de futuros ensayos pre-clínicos y clínicos.









Various studies suggest that cannabidiol (CBD), compound extracted from the plant *Cannabis sativa*, could be useful in the therapeutic management of alcohol use disorder (AUD) due to its anxiolytic, antidepressant, antipsychotic and neuroprotective properties.

In the present doctorate thesis, the possible utility of CBD in the treatment of AUD is explored. Firstly, the potential of CBD as a drug of abuse is evaluated with different experimental procedures: place preference conditioning, oral self-administration and cannabinoid spontaneous withdrawal. Consecutively, the effects of CBD, alone or in combination with other drug commonly employed for treating AUD, such as naltrexone (NTX), are studied in the voluntary intake and binge drinking patterns as well as in the oral ethanol self-administration. Furthermore, the action of CBD on the physiological effects induced by ethanol (ethanol blood concentrations, hypothermia and seizures) was also evaluated. With the aim of delving into the action mechanism by which CBD modulates ethanol reinforcing properties, relative gene expression changes in different targets involved in alcohol addiction were analyzed by real time polymerase chain reaction (qPCR). Moreover, the role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the effects mediated by CBD in the oral ethanol self-administration was studied in detail by previously administering WAY100635, a 5-HT<sub>1A</sub> antagonist.

The results show that CBD does not induce place preference, self-administration or withdrawal symptoms. These data corroborate that CBD does not display drug abuse potential (**article 1**). Likewise, the results obtained in this work show the potential therapeutic utility of CBD in AUD (**articles 2-4**). This statement is based on the reduction of ethanol preference, consumption, motivation and ethanol-induced relapse observed in rodents treated with CBD and exposed to distinct experimental paradigms (voluntary intake, oral ethanol self-administration and binge drinking). The administration of CBD prevents the physiological effects induced by ethanol without altering its plasma concentration, thus confirming that CBD does not modify ethanol absorption or metabolism. Additionally, here is also demonstrated how the combination of sub-effective doses of CBD and NTX show greater efficacy in reducing ethanol consumption and motivation in the oral ethanol self-administration. These behavioural changes are associated with alterations in the gene expression of tyrosine hydroxylase in the ventral tegmental area;  $\mu$  opioid receptor, cannabinoid receptors 1 and 2 and G protein coupled receptor 55 in nucleus accumbens and serotonergic receptor 1A in dorsal raphe. Pretreatment with the antagonist WAY100635 prevents the effects of CBD on ethanol intake and motivation in the oral ethanol self-administration, thus showing that this receptor is one of the main targets involved in the effects mediated by CBD on the reinforcing properties of ethanol.

Taken together, the results derived from the present thesis highlight the potential interest of CBD as a therapeutic tool for the treatment of AUD, setting the basis for future pre-clinical and clinical trials.







## **1. TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL: DIAGNÓSTICO, EPIDEMIOLOGÍA Y PATRONES DE CONSUMO**

En la actualidad, el trastorno por uso de alcohol (TUA) es una de las enfermedades mentales más prevalentes (Kessler et al., 2005; Rehm et al., 2015). Desde un punto de vista psiquiátrico, el TUA y, en general, los trastornos por uso de sustancias (TUS), se pueden definir como trastornos de recaída crónicos caracterizados por (Koob, 2014):

- (1) compulsión por la búsqueda y el consumo de la droga,
- (2) pérdida del control para limitar el consumo,
- (3) síndrome de abstinencia caracterizado por la aparición de un estado emocional negativo (principalmente disforia, ansiedad e irritabilidad) cuando se priva al sujeto del acceso a la droga.

Una de las principales herramientas empleadas en psiquiatría para el diagnóstico clínico del TUA es el *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM)*, de sus siglas en inglés "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders", editado por la Asociación Estadounidense de Psiquiatría). La publicación de su V edición en 2013 supuso un gran cambio respecto a su versión anterior (DMS-IV) en relación a los criterios diagnósticos *per se* del TUA. En el caso del DSM-IV los criterios diagnósticos permitían diferenciar entre abuso y dependencia (ver **Tabla 1**). De esta forma, si el paciente cumplía un criterio de abuso durante los 12 meses previos, se diagnosticaba abuso de alcohol, mientras que, si cumplía tres o más criterios de dependencia durante el mismo período, se diagnosticaba dependencia por el alcohol (American Psychiatric Association, 1994). Por el contrario, en el DSM-V no se diferencia entre abuso y dependencia, sino que el diagnóstico de TUA se establece cuando el paciente cumple dos de los once criterios diagnósticos establecidos durante un período mínimo de 12 meses (ver **Tabla 2**). Además, permite establecer la gravedad basándose en el número total de criterios que cumple el paciente (leve: presencia de dos o tres criterios, moderado: presencia de cuatro o cinco criterios, y severo: presencia de seis o más criterios) (American Psychiatric Association, 2013).

**Tabla 1. Criterios diagnósticos del TUA según el DSM-IV (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994)**

- 
- A) Se entiende por abuso de alcohol la presencia de 1 (o más) de los siguientes criterios, durante un período de 12 meses:
- a. El uso recurrente de alcohol produce una incapacidad para llevar a cabo obligaciones laborales, escolares o domésticas.
  - b. Uso recurrente de alcohol en situaciones en las que es peligroso para la integridad física.
  - c. Problemas legales por el uso recurrente de alcohol.
  - d. Consumo de alcohol continuado a pesar de los persistentes problemas sociales o intrapersonales causados o exacerbados por los efectos del alcohol.
- B) Se entiende por dependencia al alcohol la presencia de 3 (o más) de los siguientes criterios, durante un período de 12 meses:
- a. Tolerancia, definida como cualquiera de las siguientes:
    - i. Necesidad de beber una cantidad creciente de alcohol para lograr un mismo estado de embriaguez.
    - ii. Percepción de que el número de bebidas ingeridas habitualmente tiene menos efecto.
  - b. Abstinencia, definida por cualquiera de las siguientes:
    - i. Cuando los efectos del alcohol desaparecen se experimentan síntomas de abstinencia como dificultad para conciliar el sueño, agitación, inquietud, náuseas, sudoración, taquicardia o crisis comiciales, etc.
    - ii. Cuando se consume alcohol (o una sustancia relacionada, como benzodiazepinas) para aliviar o evitar síntomas de la abstinencia.
  - c. Con frecuencia el consumo de alcohol es mayor en cantidad y duración al pretendido inicialmente por parte del paciente.
  - d. Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos por disminuir o cesar el consumo de alcohol.
  - e. Se invierte una gran cantidad de tiempo en actividades relacionadas con la obtención de alcohol, su uso o en la recuperación de los efectos del mismo.
  - f. Reducción o cese en la realización de actividades sociales, recreacionales u ocupacionales debido al consumo de alcohol.
  - g. Persistencia del consumo de alcohol a pesar de sufrir un problema físico o psicológico recurrente o persistente que se puede ver agravado por el consumo de alcohol.

**Tabla 2. Criterios diagnósticos del TUA según el DSM-V (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013)**

- 
- A) Se entiende por TUA un patrón de consumo problemático de alcohol que conlleva un impedimento clínico significativo o distrés, manifestando al menos 2 de los siguientes criterios, durante un período de 12 meses:
- a. Con frecuencia el consumo de alcohol es mayor en cantidad y duración al pretendido inicialmente por parte del paciente.
  - b. Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos por disminuir o cesar el consumo de alcohol.
  - c. Consumo de alcohol durante largos períodos de tiempo, o consecuencias desagradables del consumo (embriaguez, síntomas de intoxicación alcohólica).
  - d. Presencia de deseo de consumir irrefrenable o "craving" que centra toda la atención del paciente.
  - e. El consumo recurrente de alcohol resulta en una incapacidad para llevar a cabo las obligaciones laborales, escolares y/o domésticas.
  - f. Consumo de alcohol continuado a pesar de los persistentes problemas sociales o intrapersonales causados o exacerbados por los efectos del alcohol.
  - g. Reducción o cese en la realización de actividades sociales, recreacionales u ocupacionales debido al consumo de alcohol.
  - h. Uso recurrente de alcohol en situaciones en las que es peligroso para la integridad física.
  - i. Persistencia del consumo de alcohol a pesar de sufrir un problema físico o psicológico recurrente o persistente que se puede ver agravado por el consumo de alcohol.
  - j. Tolerancia, definida como cualquiera de las siguientes:



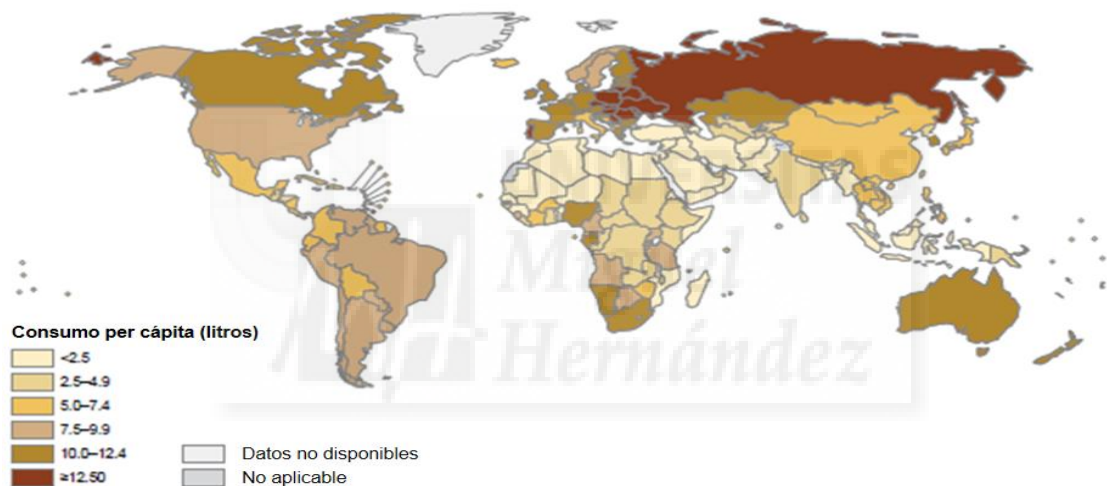
- i. Necesidad de beber una cantidad creciente de alcohol para lograr un mismo estado de embriaguez.
- ii. Percepción de que el número de bebidas ingeridas habitualmente tiene menos efecto.
- k. Abstinencia, definida por cualquiera de las siguientes:
  - i. Cuando los efectos del alcohol desaparecen se experimentan síntomas de abstinencia como dificultad para conciliar el sueño, agitación, inquietud, náuseas, sudoración, taquicardia o crisis comiciales, etc.
  - ii. Cuando se consume alcohol (o una sustancia relacionada, como benzodiazepinas) para aliviar o evitar síntomas de la abstinencia.

Según el último *Informe del Estado Global Sobre Alcohol y Salud* emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2014, el TUA presenta un notable impacto sociosanitario a nivel mundial dada la elevada tasa de morbilidad asociada (Organización Mundial de la Salud, 2014). El consumo problemático de alcohol se sitúa dentro de las tres primeras causas de enfermedad, discapacidad y muerte a escala mundial, siendo responsable de más de 3,3 millones de muertes anuales (Organización Mundial de la Salud, 2014). Además, conforme a lo publicado en la décima edición de la *Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud*, el alcohol se identifica como componente causal en más de 200 enfermedades y condiciones patológicas (Organización Mundial de la Salud, 2014) como cirrosis hepática y distintos tipos de cáncer (Shield et al., 2013), así como con una mayor incidencia de ciertas enfermedades infecciosas (tuberculosis y síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA)) y una menor adherencia al tratamiento de estas (Lonroth et al., 2008; Hendershot et al., 2009; Rehm et al., 2009; Azar et al., 2010; Baliunas et al., 2010).

El consumo problemático de alcohol no se traduce solamente en un aumento de la incidencia de distintas patologías, sino que también se relaciona con un peor pronóstico de determinadas enfermedades (Organización Mundial de la Salud, 2014). En este sentido, durante las últimas décadas, diversos estudios han demostrado que la comorbilidad de un trastorno adictivo, como el TUA, con otra patología psiquiátrica comporta un peor pronóstico para ambas patologías en comparación a si se presentan de forma aislada. En estos pacientes se han observado síntomas más graves, menor respuesta a los tratamientos, mayor tasa de recaídas y dificultad en el diagnóstico diferencial (Guardia Serecigni et al., 2008). Adicionalmente, varios autores han demostrado que los pacientes con patología adictiva presentan un riesgo aumentado de desarrollar otros trastornos psiquiátricos a lo largo de la vida respecto a la población general y viceversa. De hecho, se estima que al menos un 44% de los pacientes admitidos a tratamiento por problemas relacionados con un consumo excesivo de alcohol padecen, como mínimo, otro trastorno mental. Alternativamente, al menos un 34% de los pacientes con algún trastorno mental

desarrollan problemas relacionados con el consumo de alcohol a lo largo de la vida (Guardia Serecigni et al., 2008).

Cabe destacar que determinados aspectos, tales como el volumen consumido o el patrón de consumo, pueden resultar de utilidad a la hora de predecir, en mayor o menor medida, la magnitud de las consecuencias derivadas del consumo de alcohol (Rehm et al., 2003; Rehm et al., 2010). En este sentido, la OMS indica que se pueden emplear diferentes parámetros para evaluar los niveles de consumo de alcohol, entre los que cabría destacar el “consumo de alcohol per cápita en litros de alcohol puro por año”, que permite conocer las diferencias de consumo entre distintas áreas geográficas. Atendiendo a este indicador, se puede apreciar que las tasas de consumo más elevadas se observan en los países más desarrollados, concretamente, en países de Europa y América (ver **Figura 1**).



**Figura 1. Consumo de alcohol total per cápita en población adulta (>15 años) en litros de alcohol puro. Imagen extraída y adaptada del informe *Global Status Report on Alcohol and Health, 2014*, elaborado por la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2014).**

Durante los últimos años se ha registrado una evolución en el patrón de consumo de alcohol, siendo cada vez más frecuentes ciertos patrones de consumo de riesgo, entendidos como aquellos en los que la ingesta de alcohol supera los límites del consumo moderado (o prudente) y que aumenta el riesgo de sufrir enfermedades, accidentes, lesiones y trastornos mentales o del comportamiento (Gunzerath et al., 2004) (ver **Figura 2**). Un claro ejemplo de ello es el incremento de la incidencia del consumo abusivo episódico o “heavy episodic drinking”, definido como el consumo de 60 gramos (o más) de alcohol puro en, al menos, una ocasión al mes. Dicho patrón



Asimismo, también se ha registrado un aumento en la frecuencia del consumo de alcohol en atracón o “binge drinking” (Soler-Vila et al., 2014; Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2014), caracterizado por la ingesta de 5 bebidas alcohólicas o más en el caso de los hombres, y 4 o más en el de las mujeres, en un lapso de tiempo inferior a 2 horas, llegando a provocar concentraciones de alcohol en sangre superiores a 0.08 g/dl (NIAAA, 2004). Este aumento en la prevalencia de “binge drinking” es especialmente notable entre la población adolescente (Hermens and Lagopoulos, 2018). Los últimos datos proporcionados por el estudio EDADES 2016 del Plan Nacional Sobre Drogas, señalan que la frecuencia de este patrón de consumo entre la población de 15 a 64 años se triplicó entre el periodo comprendido entre el año 2005 al 2015 en España (5 vs. 17,9% respectivamente). De manera más específica, se detalla que el 75% de los adolescentes admite haber consumido alcohol durante el último año y un 22,5% lo ha hecho en forma atracón en los últimos 30 días (Observatorio Español de la Droga y las Adicciones, 2016). Estos datos resultan altamente preocupantes considerando que la evidencia disponible señala que este tipo de consumo resulta especialmente perjudicial para los adolescentes (Dir et al., 2017). Esto se debe a que este período del desarrollo resulta crítico para la maduración del sistema nervioso central (SNC) (Spear and Brake, 1983; Giedd, 2004; Tamnes et al., 2011), por lo que el consumo de alcohol durante edades tempranas induce importantes cambios en la plasticidad cerebral de diferentes regiones del cerebro (Sullivan et al., 1995; Agartz et al., 1999; Beresford et al., 2006; Hermos et al., 2008) y, además, aumenta el riesgo de desarrollar TUA durante la etapa adulta (Hingson et al., 2006b, a).

## **2. SUSTRATOS NEUROBIOLÓGICOS DEL TUA**

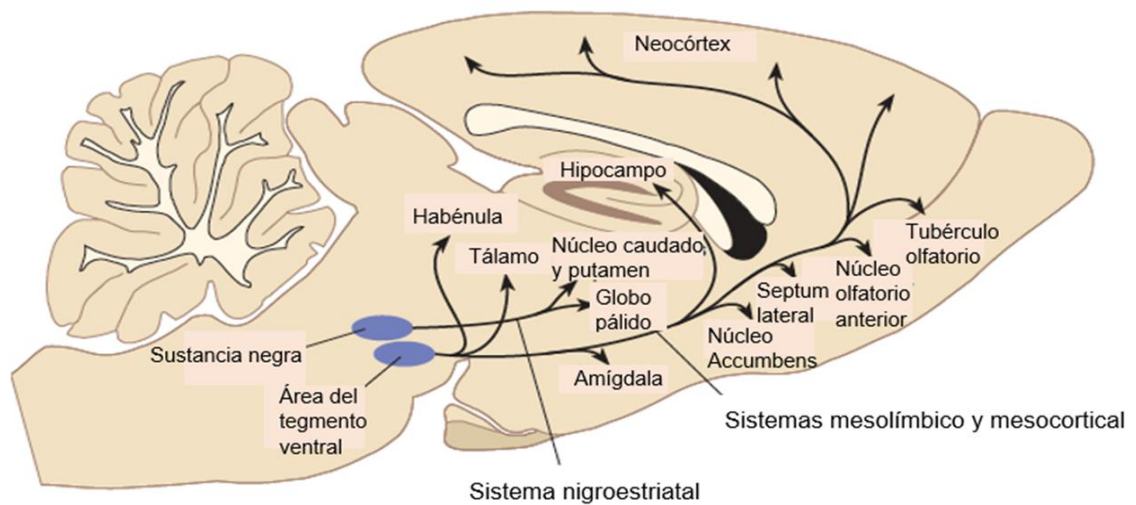
La neurobiología de la adicción tiene como objetivo principal comprender los diferentes mecanismos neuroadaptativos de los circuitos cerebrales de recompensa, responsables del refuerzo producido por una droga e implicados en la transición de un consumo controlado y ocasional a un estado patológico, caracterizado por una búsqueda continua y un consumo descontrolado de la sustancia, conocido como adicción/dependencia (Koob, 2014). Cualquier proceso adictivo se entiende como un trastorno que se mueve de la impulsividad a la compulsividad en un ciclo comprendido por 3 fases: preocupación/anticipación, intoxicación en atracón y abstinencia/afectación negativa (Koob and Volkow, 2016) que empeora con el transcurso del tiempo, provocando cambios en la neuroplasticidad, la regulación del estrés y las

funciones ejecutivas (Koob and Le Moal, 1997; Goldstein and Volkow, 2002; Koob and Volkow, 2016).

Distintos estudios llevados a cabo a lo largo de la década de los años 50, ha permitido elaborar un mapa cerebral de las vías implicadas en el refuerzo, en el que destaca la relevancia de la *vía dopaminérgica mesolímbica-mesocortical* (Olds and Milner, 1954). Posteriores investigaciones han demostrado que esta vía representa el principal sistema de recompensa en el cerebro, siendo común a todas las drogas de abuso. Se relaciona con las respuestas condicionadas unidas al “craving” o deseo de consumir, así como con los cambios emocionales y motivacionales observados en el síndrome de abstinencia (Koob and Volkow, 2010). No obstante, los trastornos por abuso de sustancias, como el TUA, se deben entender como el resultado de una alteración en la regulación que afecta a distintos sistemas neuroquímicos y no exclusivamente a uno de ellos. En este sentido, los principales sistemas de neurotransmisión implicados en la vulnerabilidad por el consumo de alcohol y el desarrollo de TUA son los sistemas dopaminérgico, opioidérgico, serotoninérgico, endocannabinoide, glutamatérgico y gabaérgico.

## **2.1 Sistema dopaminérgico**

Los experimentos de autoestimulación intracraneal desarrollados por Olds y Milner en 1954 ratas permitieron comprobar que, tras la colocación de electrodos en determinadas zonas cerebrales del sistema *dopaminérgico mesolímbico-mesocortical*, los animales accionaban la palanca responsable de la activación de estos electrodos de forma repetida, demostrando así que la descarga eléctrica en estas regiones producía un refuerzo positivo (Olds and Milner, 1954). Tras este descubrimiento, diversos estudios han ayudado a caracterizar esta vía dopaminérgica de la recompensa, describiendo su origen en el *área del tegmento ventral (VTA)*, desde donde los cuerpos neuronales se proyectan hacia diferentes estructuras límbicas, como el *núcleo accumbens (NAc)*, la *amígdala (AMY)*, el *hipocampo (HIP)* y la *corteza prefrontal (PFC)*. Además, desde el NAc surgen proyecciones eferentes hacia el núcleo pálido ventral y VTA, formando así un bucle de control recíproco (Cami and Farre, 2003) (ver **Figura 4**).



**Figura 4.** Vía dopaminérgica mesolímbico-mesocortical en cerebro de rata. Imagen extraída y adaptada de (Carlson, 2013).

En base al aumento del tono dopaminérgico observado en esta vía tras el consumo de drogas de abuso, se postuló la “hipótesis dopaminérgica de la adicción” (Wise, 1987; Di Chiara and Imperato, 1988), que ha sido respaldada posteriormente por numerosos estudios electrofisiológicos en los que se muestra que determinadas neuronas dopaminérgicas se activan en respuesta a estímulos condicionados predictivos de un refuerzo (Hollerman and Schultz, 1998; Schultz, 2001). En relación al TUA, diversos estudios de tomografía de emisión de positrones realizados en la última década, revelan que dosis elevadas de alcohol producen una marcada liberación de dopamina en el NAc (Volkow et al., 2007; Mitchell et al., 2012), lo que se asocia con la sensación subjetiva de euforia percibida tras el consumo de la droga (Volkow et al., 2003). Este pronunciado aumento del tono dopaminérgico parece ser dosis-dependiente (Weiss et al., 1993; Weiss et al., 1996) y provoca la activación de los receptores dopaminérgicos  $D_1$  o de baja afinidad, responsables de las respuestas condicionadas y del refuerzo desencadenado por el alcohol (Zweifel et al., 2009). Este hecho resulta esencial, ya que diversos estudios señalan que si tan solo se produjese la activación de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  o de alta afinidad no se produciría refuerzo (Caine et al., 2002; Norman et al., 2011).

Por otra parte, es necesario destacar que un consumo continuado de alcohol provoca cambios neuroadaptativos en las neuronas dopaminérgicas del VTA, lo que se traduce en un aumento persistente de la sensibilidad de estas neuronas a los efectos estimulantes del alcohol (Ding et al., 2009) y parece estar asociado con alteraciones en la funcionalidad de receptores

dopaminérgicos en el NAc (Franklin et al., 2009). Asimismo, la abstinencia tras un consumo prolongado de alcohol resulta en una disminución de la actividad dopaminérgica en el VTA (Shen and Chiodo, 1993) y en la concentración extracelular de dopamina en el NAc (Weiss et al., 1996), lo que sugiere que la ingesta crónica de alcohol produce una hipofunción dopaminérgica que incentivaría el consumo de alcohol y el subsecuente desarrollo de dependencia.

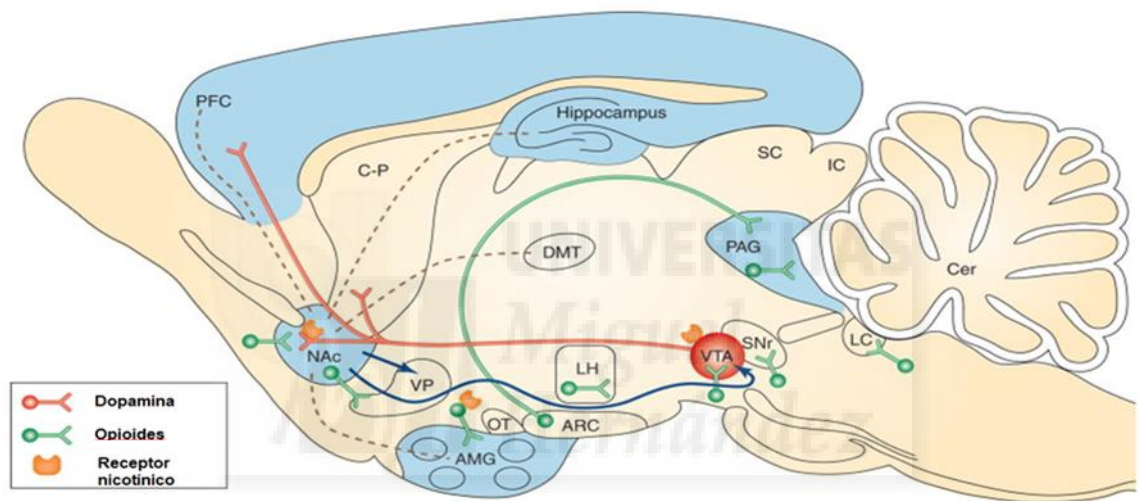
A pesar de todas estas evidencias, la “teoría dopaminérgica de la adicción” presenta importantes limitaciones. En primer lugar, el incremento de los niveles de dopamina en el NAc no se origina únicamente en respuesta a drogas de abuso, sino que también se produce en respuesta al estrés y ante estímulos aversivos. Por otro lado, estudios realizados en ratones modificados genéticamente de tal manera que no sintetizan dopamina, han demostrado que este neurotransmisor no es imprescindible para las propiedades reforzantes de las drogas (Hnasko et al., 2005) ni de los refuerzos naturales (Cannon and Palmiter, 2003), por lo que diversos neurotransmisores y péptidos adicionales han sido relacionados con el TUA.

## **2.2 Sistema opioide**

En la década de los años 70, Davis y Walsh observaron que los alcaloides derivados de la morfina se formaban *in vivo* a partir de acetaldehído y metabolitos de la dopamina (Seevers et al., 1970), postulando por primera vez la potencial implicación del sistema opioide endógeno en la dependencia alcohólica, y sirviendo de referencia para estudios posteriores que terminarían de definir y caracterizar el sistema opioide endógeno. En la actualidad, se conoce que el consumo de alcohol tiene efectos sobre este sistema de neurotransmisión, pues modifica la expresión y la función de los distintos receptores opioideérgicos ( $\mu$ ),  $\delta$  y  $\kappa$ ) (Fadda et al., 1999) y modifica la síntesis y la liberación de opioides endógenos como endorfinas, encefalinas y dinorfinas (Ulm et al., 1995). De hecho, se ha observado un aumento de la liberación de péptidos opioides en la corteza orbitofrontal y en el NAc en sujetos alcohólicos (Mitchell et al., 2012), así como una alteración en la regulación de los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  en la fase de abstinencia/afectación negativa (Koob and Volkow, 2016).

También se ha descrito una importante interacción entre el sistema opioide y la vía mesolímbica-mesocortical dopaminérgica, pues la activación de los receptores opioides modula la liberación de dopamina en distintas regiones cerebrales como el VTA y el NAc (ver **Figura 5**). Concretamente, las  $\beta$ -endorfinas y las encefalinas producen un aumento de la liberación de dopamina en el NAc a través de la activación de los receptores  $\mu$  y  $\delta$ , produciendo así efectos

reforzantes (Koob, 1992). Por el contrario, la activación de los receptores  $\kappa$  disminuye la liberación de dopamina provocando aversión (Rattan et al., 1992; Herz, 1998). Todos estos hallazgos se ven respaldados por estudios en los que se demuestra que ratones que no expresan el receptor  $\mu$ , no muestran signos típicos de refuerzo tras la administración de opiáceos (Matthes et al., 1996) y por el hecho de que la administración de naltrexona (NTX), un antagonista opioide, reduce el consumo de alcohol en modelos animales (Middaugh and Bandy, 2000; Zalewska-Kaszubska et al., 2008), y constituye una de las principales herramientas farmacoterapéuticas aprobadas para el tratamiento del TUA (Volpicelli et al., 1992; Volpicelli et al., 1995; Volpicelli et al., 1997; Srisurapanont and Jarusuraisin, 2005a, b).

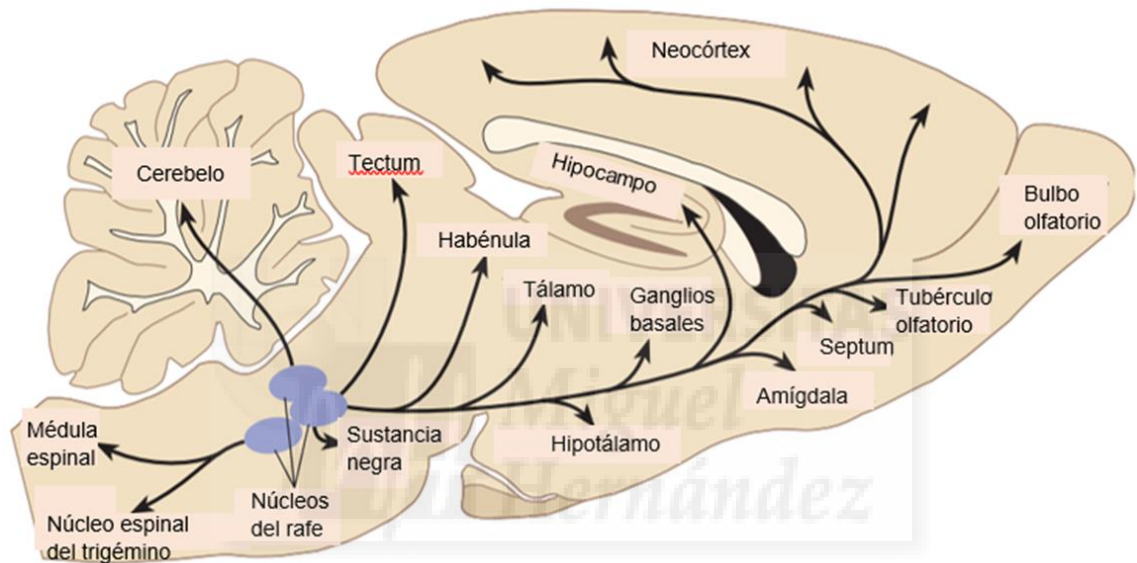


**Figura 5. Interacción de la vía mesolímbica-mesocortical dopaminérgica y opioidérgica en cerebro de rata. Imagen extraída y adaptada de (Nestler, 2004).** AMG: amígdala, ARC: núcleo arqueado, Cer: cerebelo, C-P: caudado putamen, IC: colículo inferior, LH: hipotálamo lateral, NAc: núcleo accumbens, OT: núcleo del tracto óptico, OT: núcleo del tracto óptico, PAG: sustancia gris periacueductal, PFC: corteza prefrontal, SC: colículo superior, SNr: sustancia negra, VTA: área tegmental ventral, VP: pálido ventral.



### 2.3 Sistema serotoninérgico

Tras la caracterización de la vía dopaminérgica de la recompensa, se propuso que el rafe dorsal (DR) podría desempeñar un papel importante en el procesamiento de los estímulos reforzantes dado el elevado número de proyecciones serotoninérgicas que emergen de esta región cerebral (Simon et al., 1976; Rompre and Miliaressis, 1985) (ver **Figura 6**) y forman numerosas interconexiones con distintas estructuras cerebrales de la vía de la recompensa, incluyendo el NAc (Peyron et al., 1998; Johnson, 2004; Liu et al., 2014; Ogawa et al., 2014; Weissbourd et al., 2014).



**Figura 6.** Proyecciones serotoninérgicas en cerebro de ratona. Imagen extraída y adaptada de (Carlson, 2013).

Sin embargo, a pesar de que algunos estudios realizados empleando distintos enfoques como la manipulación farmacológica, lesión de áreas cerebrales específicas, electrofisiología y estudios de conducta, apoyan la implicación del sistema serotoninérgico en procesos reforzantes, el papel del mismo en el TUA continúa siendo controvertido a día de hoy (Luo et al., 2015). Algunos autores postulan que la preferencia por el consumo de alcohol está inversamente relacionada con el tono serotoninérgico (McBride and Li, 1998), pues tradicionalmente se ha descrito una reducción de este tono en pacientes con TUA (Virkkunen et al., 1994; Fils-Aime et al., 1996) y en modelos animales de consumo crónico de alcohol (Johansson et al., 1999; Hensler et al., 2003), que parece revertir tras el consumo agudo de alcohol (Koob and Volkow, 2016). Esta hipótesis se apoya en estudios que muestran como el aumento de las concentraciones de

serotonina (5-HT) a nivel cerebral tras la administración de determinados fármacos, como los inhibidores de la recaptación de 5-HT, disminuye el consumo espontáneo de alcohol (Sellers et al., 1992; Kelai et al., 2003).

Al mismo tiempo, existen evidencias de que la modulación de distintos receptores serotoninérgicos podría ser de utilidad terapéutica en el manejo del TUA. Hasta la fecha se han descrito 7 familias de receptores serotoninérgicos, diferenciados según su naturaleza en receptores acoplados a proteína G (5-HT<sub>1-2</sub> y 5-HT<sub>4-7</sub>) y canales iónicos (5-HT<sub>3</sub>). A pesar de que se han llevado a cabo estudios en los que tanto el antagonismo de receptores de potencial excitatorio postsináptico (5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub>) como la administración de agonistas de los receptores inhibitorios (5-HT<sub>1A</sub>) reducen el consumo de alcohol (Fadda et al., 1991; Roberts et al., 1998), la ubicuidad del 5-HT<sub>1A</sub> y su papel crítico en la regulación de la transmisión serotoninérgica, lo convierten en la diana serotoninérgica de mayor relevancia a la hora de entender las interacciones del alcohol con el sistema serotoninérgico (Sari et al., 2011).

En el SNC, diversas regiones como la corteza cerebral, el HIP, la AMY y los núcleos del rafe presentan una densidad elevada de receptor 5-HT<sub>1A</sub>, mientras que, regiones como los ganglios basales y el tálamo se caracterizan por una densidad baja de este receptor (Ito et al., 1999; de Almeida and Mengod, 2008). El receptor 5-HT<sub>1A</sub> actúa como autorreceptor presináptico en los núcleos del rafe, regulando el tono serotoninérgico, y postsinápticamente como heteroreceptor en el resto de regiones cerebrales (Richardson-Jones et al., 2011).

Estudios de neuroimagen realizados a lo largo de la última década han permitido obtener información novedosa respecto a la interacción de este receptor con los efectos reforzantes del alcohol. Kelai y colaboradores han demostrado que tras un consumo progresivo de alcohol durante 3 semanas, se producen modificaciones importantes en la homeostasis de 5-HT a nivel central como consecuencia de la supersensibilidad del 5-HT<sub>1A</sub> en el DR en ratones C57BL/6J (Kelai et al., 2008). En esta misma línea, Hillmer y colaboradores han observado que la exposición a un consumo crónico de alcohol, aumenta la unión de ligandos específicos al receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Hillmer et al., 2014).

Complementariamente, estudios farmacológicos han demostrado que la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> mediante agonistas parciales no selectivos, como la buspirona, reduce el consumo de alcohol en ratas (Hedlund and Wahlstrom, 1996). Estos resultados han sido criticados por algunos autores debido a la actividad de la buspirona sobre receptores dopaminérgicos D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>, sobre los que actúa como antagonista, hecho que podría enmascarar los efectos de la activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> sobre el consumo alcohol. Sin embargo, un

estudio reciente ha demostrado que la tandospirona, un agonista parcial 5-HT<sub>1A</sub> con escasa actividad sobre receptores dopaminérgicos y adrenérgicos, disminuye el consumo de alcohol, así como la ansiedad y el detrimento de la neurogénesis asociados al consumo de esta droga (Belmer et al., 2018).

## **2.4 Sistema cannabinoide endógeno**

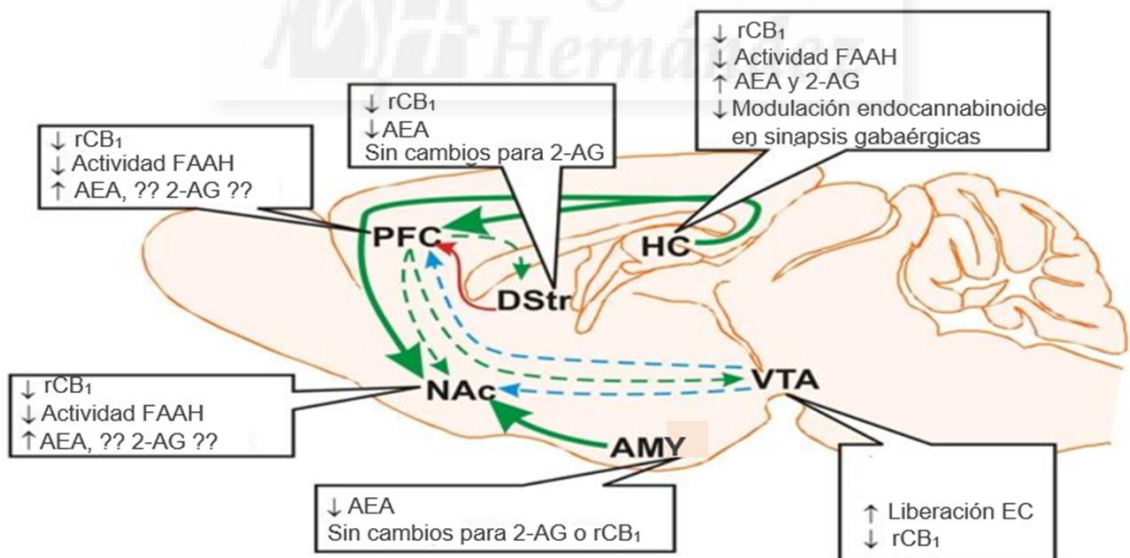
El sistema cannabinoide endógeno está formado por dos grandes familias de ligandos endógenos de naturaleza lipídica, que reciben el nombre de endocannabinoides (EC) y derivan de la degradación de los fosfolípidos de membrana (Piomelli, 2003). Los EC más representativos son la N-araquidoniletanolamina (anandamida; AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Hillard, 2015), sintetizados por la fosfodiesterasa selectiva de N-acil-fosfatidiletanolamina y la diacilglicerol lipasa respectivamente, y que ejercen su acción uniéndose a los receptores cannabinoide 1 y 2 (rCB<sub>1</sub> y rCB<sub>2</sub>) (Devane et al., 1992; Munro et al., 1993). En cuanto a su metabolización, la AEA es degradada por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Cravatt et al., 1996; Bracey et al., 2002) y el 2-AG a través de la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Dinh et al., 2002; Gulyas et al., 2004). A diferencia de la mayoría de los neurotransmisores, los EC no se almacenan en vesículas sinápticas, sino que se sintetizan y liberan a demanda por neuronas y células gliales postsinápticas, actuando sobre neuronas presinápticas en respuesta a cambios en la actividad neuronal (Freund et al., 2003; Piomelli, 2003; Bisogno et al., 2005).

El rCB<sub>1</sub> presenta una amplia distribución en el cerebro (corteza cingulada, corteza entorrinal, núcleo caudado y putamen, HIP, AMY, tálamo, sustancia nigra, hipotálamo medial, globo pálido, núcleo entopeduncular, formación reticular, sustancia blanca del cuerpo calloso, tronco del encéfalo, núcleo del tracto solitario, cerebelo y sustancia gelatinosa de la médula espinal (Herkenham et al., 1991; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Glass et al., 1997). Ha sido propuesto como diana terapéutica en el tratamiento de náuseas y vómitos asociados a quimioterapia (Heim et al., 1984; Walsh et al., 2003), en el tratamiento de anorexia en pacientes con SIDA (Timpone et al., 1997; Abrams et al., 2003), dolor crónico (Wallace et al., 2015), dolor espástico en esclerosis múltiple (Langford et al., 2013), psicosis (Leweke et al., 2012) y en trastornos de ansiedad y depresión (El-Alfy et al., 2010; Gomes et al., 2011; de Mello Schier et al., 2014).

Respecto al rCB<sub>2</sub>, los primeros intentos llevados a cabo para identificar su expresión en el cerebro en condiciones normales resultaron fallidos (Chakrabarti et al., 1995; Derocq et al., 1995; Schatz et al., 1997; Griffin et al., 1999; Carlisle et al., 2002). No fue hasta el año 2005, cuando

Van Sickle y colaboradores publicaron los primeros datos que identificaban la expresión neuronal del rCB<sub>2</sub> en el tronco cerebral de rata, ratón y hurón en condiciones normales (Van Sickle et al., 2005). Estos resultados sirvieron de precedente para la completa caracterización de la expresión del rCB<sub>2</sub> en el cerebro de rata y ratón años más tarde (Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Garcia-Gutierrez et al., 2010). La amplia distribución del rCB<sub>2</sub>, tanto en neuronas como glía, en diversas áreas cerebrales (cuerpo estriado, corteza cerebral, AMY, HIP, sustancia nigra, tubérculo olfatorio, núcleos talámicos, núcleo ventromedial del hipotálamo, núcleo paralemniscal, núcleos pontinos, núcleo rojo, colículo inferior, núcleo espinal, núcleo paratroclear y cerebelo), acaba con la idea de que el rCB<sub>2</sub> presente un papel exclusivamente periférico, dando paso a la investigación sobre su potencial implicación en diferentes funciones cerebrales y enfermedades neuropsiquiátricas (Gong et al., 2006; Ishiguro et al., 2007; Onaivi et al., 2008b; Garcia-Gutierrez et al., 2010; Ishiguro et al., 2010; Garcia-Gutierrez and Manzanares, 2011; Ortega-Alvaro et al., 2011).

En relación a la implicación del sistema cannabinoide endógeno en TUA, se han identificado diferentes alteraciones en elementos de este sistema de neurotransmisión en diferentes áreas cerebrales tras un consumo prolongado de alcohol. De manera más específica, se ha observado una disminución del rCB<sub>1</sub> en áreas cerebrales como la PFC, el NAc y el VTA, estructuras tradicionalmente relacionadas con la vía de la recompensa (ver **Figura 7**).



**Figura 7. Efectos de la exposición crónica a etanol en cerebro de rata. Imagen extraída y adaptada de (Pava and Woodward, 2012).** AMY: amígdala, DStr: estriado dorsal, HC: hipocampo, NAc: núcleo accumbens, PFC: corteza prefrontal, VTA: área tegmental ventral.

Asimismo, el tratamiento con el antagonista del rCB<sub>1</sub>, SR141716, disminuye el consumo voluntario (Arnone et al., 1997; Colombo et al., 1998) y el consumo operante de etanol en ratas (Rodríguez de Fonseca et al., 1999), así como la sensibilización a los efectos locomotores producidos por etanol tanto en ratones con alta vulnerabilidad por esta sustancia (Marinho et al., 2015), como en cepas que no la poseen (Arnone et al., 1997; Vinod et al., 2008b). Análogamente, el tratamiento con agonistas inversos del rCB<sub>1</sub>, como el AM251 y el SR147778, reduce el consumo de etanol en distintas cepas de ratas (Lallemant and De Witte, 2006; Femenia et al., 2010). Estos resultados demuestran que la alteración de la señalización mediada por el rCB<sub>1</sub> causa una pronunciada reducción en el consumo voluntario de etanol en ratones y ratas. De manera complementaria, se ha observado que los ratones carentes del rCB<sub>1</sub> (CB<sub>1</sub>KO) presentan un consumo de etanol reducido en comparación con ratones “wild-type” en condiciones de acceso a etanol limitado (Poncelet et al., 2003; Thanos et al., 2005) y acceso continuo (Hungund et al., 2003; Naassila et al., 2004; Vinod et al., 2008b). Asimismo, estudios recientes de tomografía de emisión de positrones, señalan que existe una correlación entre la dependencia alcohólica y una disminución de la unión de [<sup>18</sup>F]FMPEP-d<sub>2</sub>, ligando rCB<sub>1</sub>, a este receptor cannabinoide (Hirvonen et al., 2013).

Por otro lado, también se ha examinado el efecto de los agonistas del rCB<sub>1</sub> en el consumo voluntario de etanol. La administración sistémica de un agonista puro del rCB<sub>1</sub> (WIN 55212-2), aumenta el consumo de etanol en ratones C57BL/6J sometidos al modelo de consumo en atracción (*drinking in the dark*) (Linsenbardt and Boehm, 2009). En la misma dirección, la administración de los agonistas puros del rCB<sub>1</sub>, WIN 55212-2 o CP-55940, aumenta de forma dosis-dependiente el consumo voluntario en ratas con acceso continuo a etanol al 10% (Colombo et al., 2002).

En cuanto al receptor rCB<sub>2</sub>, existen menos estudios que expliquen su potencial implicación en el consumo de etanol debido a su más reciente caracterización a nivel central (Van Sickle et al., 2005). No obstante, los resultados obtenidos hasta la fecha indican que el rCB<sub>2</sub> desempeña un papel relevante en los TUS (Onaivi et al., 2008b). Los estudios realizados con ratones desprovistos del rCB<sub>2</sub>, CB<sub>2</sub>KO, muestran como la ausencia de este receptor se relaciona con un mayor consumo de etanol en un modelo de consumo voluntario, así como con una mayor motivación por la adquisición de esta droga en la autoadministración oral de etanol (Ortega-Alvaro et al., 2015). Del mismo modo, Ishiguro y colaboradores han observado la incidencia significativa de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en un locus del gen CNR2, R63Q, en una cohorte de pacientes alcohólicos japoneses. Este SNP produce una mutación sin sentido

en el primer dominio intracelular, que resulta en una disminución de la respuesta celular a ligandos del rCB<sub>2</sub> (Ishiguro et al., 2007). Complementariamente, se ha observado que la administración de, un agonista rCB<sub>2</sub>, reduce el condicionamiento de preferencia de lugar y el consumo de etanol en ratones (Al Mansouri et al., 2014; Navarrete et al., 2018b)

Recientemente, Pradier y colaboradores han demostrado que el rCB<sub>2</sub> está involucrado en el afrontamiento de situaciones estresantes que provocan un incremento del consumo de etanol (Pradier et al., 2015). De hecho, se ha comprobado que el tratamiento con el compuesto JWH015, un agonista del rCB<sub>2</sub>, aumenta el consumo de etanol en ratones sometidos a estrés, mientras que la administración de un antagonista del rCB<sub>2</sub> lo disminuye. Cabe destacar que este efecto no ocurre cuando los animales no son expuestos a estrés (Ishiguro et al., 2007). En este sentido, estudios previos demuestran que ratones que sobreexpresan el rCB<sub>2</sub> (CB<sub>2</sub>XP) presentan mayor resistencia frente a estímulos que promueven un estado depresivo y ansioso, reforzando así la implicación del rCB<sub>2</sub> en la regulación de la respuesta al estrés (García-Gutiérrez et al., 2010; García-Gutiérrez and Manzanares, 2011).

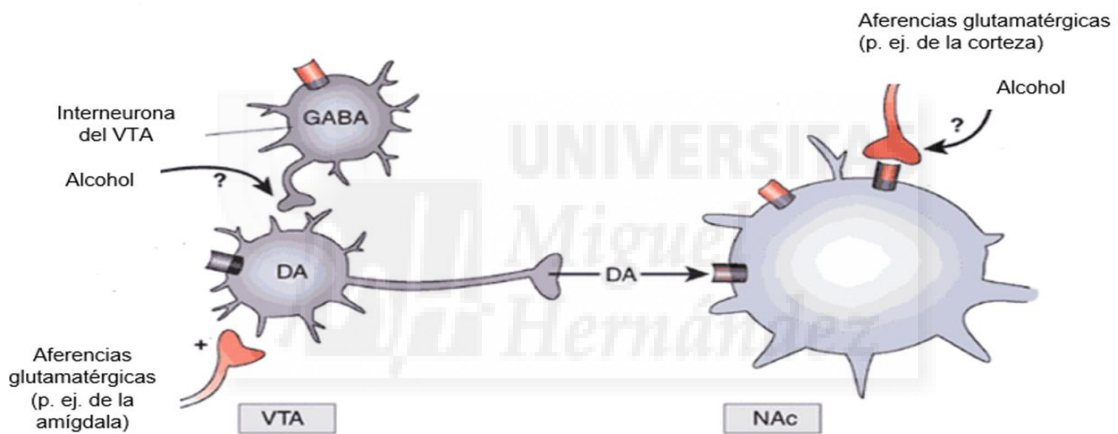
De acuerdo con estos resultados, se ha registrado una disminución de la expresión génica del rCB<sub>1</sub>, rCB<sub>2</sub>, MAGL en la AMY (Serrano et al., 2012) y del rCB<sub>1</sub> y rCB<sub>2</sub> en el estriado (Sanchez-Marin et al., 2017) de ratas expuestas a ciclos de abstinencia repetida de etanol.

## **2.5 Sistemas glutamatérgico y gabaérgico**

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor con acción inhibitoria del SNC y el glutamato el principal aminoácido excitador. Conjuntamente, los sistemas glutamatérgico y gabaérgico se encargan de regular las proyecciones dopaminérgicas que van desde el VTA hasta las regiones estriatales y límbicas (Spanagel, 2009) (ver **Figura 8**).

Durante los últimos años, varios estudios han permitido identificar como el consumo crónico de alcohol modifica la conformación del receptor GABA<sub>A</sub>, dando lugar a receptores con una funcionalidad reducida (Follesa et al., 2006; Liang et al., 2007) y, por ende, una transmisión inhibitoria menos efectiva (Kumar et al., 2009). A su vez, se ha observado un aumento de la expresión del receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) (Gass and Olive, 2008), del tono glutamatérgico (Tsai and Coyle, 1998) y de la tolerancia al alcohol (Krystal et al., 2003) así como un déficit de la función ejecutiva atribuible a alteraciones en la regulación de la transmisión glutamatérgica en la PFC (Koob and Volkow, 2016). Cuando este consumo crónico cesa, como ocurre durante los primeros días de abstinencia, se produce una liberación masiva de glutamato,

precipitándose así un estado “hiperglutamatérgico” (Holmes et al., 2013), que combinado con la reducción de la función gabaérgica produce una señalización excitatoria excesiva, contribuyendo al desarrollo del síndrome de abstinencia al alcohol, potencialmente mortal (Hillmer et al., 2015). Esta afirmación se fundamenta en diversos estudios de neuroimagen en los que se observan niveles elevados de glutamato y glutamina en la corteza cingulada anterior y NAc en pacientes con TUA durante la fase de abstinencia (Bauer et al., 2013; Yeo et al., 2013), así como en la menor disponibilidad de receptores GABA<sub>A</sub> observada principalmente en la corteza, el cerebelo, el NAc y el HIP de estos pacientes (Lingford-Hughes et al., 1998; Lingford-Hughes et al., 2012). Estos datos explican que tras la administración de acamprosato, un modulador del receptor NMDA y agonista parcial del receptor GABA<sub>B</sub>, se observe una reducción del cociente glutamato/creatina en la corteza cingulada durante la abstinencia, y que se corrija, al menos en parte, la alteración en los procesos de regulación excitatoria/inhibitoria (Hillmer et al., 2015).



**Figura 8. Regulación gabaérgica y glutamatérgica de las proyecciones dopaminérgicas que salen desde el VTA (área tegmental ventral) hasta el NAc (núcleo accumbens). Imagen extraída y adaptada de (Nestler, 2005). DA: dopamina, GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico, NAc: núcleo accumbens, VTA: área tegmental ventral.**

### **3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL TUA**

El abordaje terapéutico del TUA no va dirigido únicamente a tratar la dependencia y la recaída, sino que también está orientado al manejo clínico de diversas situaciones relacionadas con el abuso de alcohol, como la intoxicación y la abstinencia. La ingesta de alcohol puede producir cuadros de intoxicación aguda tanto en bebedores esporádicos como en bebedores crónicos, especialmente si se dan patrones de consumo de riesgo como el consumo abusivo episódico o el consumo en atracón. Además, resulta necesario destacar que la intensidad de los síntomas, la existencia o no de un consumo crónico de alcohol previo, así como las características del paciente y de su entorno, condicionarán su manejo terapéutico (Guardia Serecigni et al., 2008).

#### **3.1 Fármacos empleados en la intoxicación aguda**

El cuadro clínico propio de la intoxicación alcohólica aguda se caracteriza por incoordinación motora, marcha inestable, nistagmo, alteración de la atención y de la memoria, lenguaje desordenado, estupor e incluso coma, que se acompañan de cambios psicológicos y conductuales, hecho que se refleja en las alteraciones emocionales y de la capacidad de juicio (American Psychiatric Association, 2013). El tratamiento durante esta fase de intoxicación aguda tiene como objetivo el manejo de la sintomatología, controlando factores clínicos como el reequilibrio hidroelectrolítico, a la vez que se pauta vitaminoterapia (con tiamina para evitar evolución a Wernicke-Korsakoff), tratando las enfermedades médicas intercurrentes y la posible comorbilidad psiquiátrica, y previniendo, en última instancia, su evolución a un síndrome de abstinencia alcohólica grave (Saitz and O'Malley, 1997).

El síndrome de abstinencia puede precipitarse cuando un paciente con dependencia física al alcohol interrumpe su consumo. Normalmente, aparecen síntomas relacionados con el desequilibrio de la homeostasis cerebral, causado por la supresión repentina del efecto del alcohol y asociado a cambios en la producción, liberación y regulación de múltiples neurotransmisores (Nutt, 1999; De Witte et al., 2003). A pesar de que el efecto tras el cese del consumo es observable en los diferentes sistemas de neurotransmisión, la alteración en los procesos de regulación es especialmente notable en los sistemas gabaérgico (Dodd et al., 2000) y glutamatérgico (Tsai et al., 1995), resultando finalmente en un estado de hiperactividad glutamatérgica (Alele and Devaud, 2005) como se ha mencionado previamente. Es precisamente esta descompensación neuroquímica la que justifica el uso de fármacos con actividad



gabaérgica, como los benzodiazepinas, en el tratamiento del síndrome de abstinencia y en la prevención de la aparición del *delirium tremens* (Holbrook et al., 1999).

También es habitual el empleo de fármacos agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos como la clonidina, útiles en asociación con otros fármacos para controlar la sintomatología provocada por el aumento del tono noradrenérgico (Guardia Serecigni et al., 2008). Asimismo, también se emplean fármacos anticonvulsivantes que antagonizan receptores glutamatérgicos y canales de sodio como la carbamazepina y la oxcarbazepina. En este sentido, se han llevado a cabo ensayos clínicos en los que se ha evaluado la potencial utilidad terapéutica de ciertos agentes antiepilépticos, como la oxcarbazepina, para el tratamiento del síndrome de abstinencia al alcohol (Croissant et al., 2009). El empleo de este anticonvulsivante parece resultar eficaz a la hora de reducir la sintomatología característica del síndrome de abstinencia al alcohol. Además, no presenta riesgo de abuso o depresión respiratoria, al contrario que los fármacos clásicamente empleados para este fin, como las benzodiazepinas (Schik et al., 2005). No obstante, el nivel de evidencia disponible hasta la fecha no es concluyente respecto a los efectos de la oxcarbazepina en el TUA. Por este motivo, la realización de estudios adicionales es fundamental para avalar la utilidad de este antiepiléptico en el síndrome de abstinencia a alcohol (Koethe et al., 2007).

### **3.2 Fármacos empleados en la deshabitación alcohólica**

A pesar del grave impacto socio sanitario que constituye el TUA, las opciones de tratamiento disponibles para la deshabitación alcohólica presentan una eficacia limitada (Lee and Leggio, 2014). Hasta la fecha, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia de Medicamentos Europea (EMA) han aprobado solo tres principios activos para el tratamiento farmacológico de la dependencia alcohólica: NTX, disulfiram y acamprosato (Rosner et al., 2010a; Rosner et al., 2010b; Jarosz et al., 2013; Skinner et al., 2014).

#### **3.2.1 Fármacos antidipsotrópicos o interdictores**

Los fármacos antidipsotrópicos o interdictores, pueden resultar convenientes en pacientes con disposición a mantenerse abstemios, siempre y cuando se administren bajo supervisión sanitaria o familiar. Con este fin, se utiliza tanto el disulfiram como la cianamida cálcica. Ambos se caracterizan por bloquear la enzima aldehído-deshidrogenasa, lo que impide la transformación del acetaldehído, derivado de la deshidrogenación del alcohol, en acetato. Esto provoca una acumulación de acetaldehído en el torrente sanguíneo, desencadenando así un síndrome

acetaldehídico que se caracteriza por vasodilatación, taquicardia, palpitaciones, mareo-vértigo, sudoración, dolor precordial, rubefacción facial, náuseas, vómitos, diplopía o visión borrosa, alteraciones de la presión arterial, cefalea, dificultad respiratoria y sudoración. Estos síntomas, que suelen aparecer entre los primeros 10-20 minutos tras el inicio del consumo de alcohol, presentan una intensidad proporcional a la dosis de disulfiram y a la cantidad de alcohol ingerida, llegando a producir, en los casos más graves, depresión respiratoria, arritmia, infarto agudo de miocardio, colapso cardiovascular, pérdida de conciencia, convulsiones e incluso la muerte (Guardia Serecigni et al., 2008). Cabe destacar que la administración supervisada de disulfiram consigue una mayor reducción del número de días de consumo excesivo de alcohol, un mayor número de días globales sin beber, e incluso, un mayor número de días hasta el primer consumo de alcohol que la NTX y el acamprosato (Laaksonen et al., 2008).

El principal problema que deriva del tratamiento con disulfiram es que, si los pacientes no presentan un alto grado de motivación por mantenerse sobrios, la adherencia terapéutica es muy baja, pues el paciente evita tomar la medicación con el fin de prevenir los efectos desagradables que experimenta cuando vuelve a consumir alcohol. Esta problemática ha tratado de paliarse mediante el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de disulfiram de liberación prolongada. Sin embargo, a pesar de constituir una alternativa muy interesante, la marcada variabilidad de la biodisponibilidad de este fármaco tras su implantación subcutánea (Garbutt et al., 1999), así como la notable incoherencia entre los resultados obtenidos (revisión: (Garbutt et al., 1999)), han provocado la desestimación de esta alternativa terapéutica como una opción superior a la administración oral de disulfiram.

### 3.2.2 Fármacos anti-deseo

El deseo de consumo o “craving” es un estado motivacional intenso por consumir una pequeña cantidad de alcohol o de otras sustancias psicotrópicas, que puede ser acentuado por estímulos condicionados, así como por eventos que puedan provocar estrés en el paciente (Anton, 1999). Durante los últimos veinte años, diversos estudios han tratado de explicar el sustrato neurobiológico del “craving”, señalando la responsabilidad directa de las estructuras anatómicas y los sistemas de neurotransmisión que componen el circuito de la recompensa cerebral en el desarrollo de este estado (Koob et al., 1998). Entre los fármacos que poseen un notable efecto anti-deseo o “anti-craving” destaca la NTX, fármaco con afinidad por los receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ . Su utilidad farmacológica en la deshabitación alcohólica se relaciona

principalmente con el antagonismo del receptor  $\mu$ , que produce: a) inhibición de la estimulación de neuronas dopaminérgicas en el NAc, a pesar del aumento de la liberación de  $\beta$ -endorfinas inducido por el alcohol; y b) reducción de la desinhibición mediada por  $\beta$ -endorfinas en distintas regiones cerebrales.

Hasta la fecha, distintos metaanálisis y revisiones sistemáticas han confirmado que el uso de NTX parece efectivo en el manejo del TUA, pues reduce el “craving” o deseo irrefrenable de consumo, así como el número de días en los que se produce un consumo elevado de alcohol (Rosner et al., 2010b; Maisel et al., 2013). Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto la elevada variabilidad interindividual entre los pacientes tratados con NTX (Kranzler and Van Kirk, 2001; Streeton and Whelan, 2001; Srisurapanont and Jarusuraisin, 2005a), mostrando que el tratamiento con este fármaco no resulta siempre efectivo. Entre las posibles causas de esta variabilidad, se ha postulado que el trasfondo genético de los pacientes tratados podría influir notablemente en la respuesta terapéutica (Monterosso et al., 2001; Rubio et al., 2005). Concretamente, se ha visto que un SNP en el exón 1 del gen del receptor  $\mu$  opioide (Oprm1) (118 A>G) provoca una sustitución de una asparagina (Asn) por un aspartato (Asp) en la posición 40 de la secuencia de aminoácidos del receptor  $\mu$ -opioide (Asn40Asp), produciéndose 3 genotipos distintos (AA, AG y GG). De entre estos, la  $\beta$ -endorfina se une con una afinidad 3 veces superior al receptor que presenta la variante mutada (AG) cuando se compara con la forma alélica común (AA) (Bond et al., 1998; Chamorro et al., 2012). En base a la evidencia disponible, parece que este motivo es responsable de que el tratamiento con NTX sea más efectivo en aquellos pacientes que presentan el genotipo AG o GG (Chamorro et al., 2012).

A lo largo de los últimos años, otros fármacos capaces de modular el sistema opioide interno han sido propuestos como nuevas herramientas farmacológicas en el manejo terapéutico del TUA (Mann et al., 2016). Este es el caso del nalmefeno, un antagonista de los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$ , que actúa, a su vez, como agonista parcial de los receptores  $\kappa$  (Bart et al., 2005). Sin embargo, a pesar de que existen numerosas revisiones sistemáticas y metaanálisis que avalan su eficacia a la hora de reducir el consumo de alcohol (Keating, 2013; Soyka, 2014; Mann et al., 2016), otros estudios señalan la necesidad de ensayos clínicos en los que este fármaco se compare con un control activo (NTX) y no frente a placebo (Fitzgerald et al., 2016). Asimismo, varios autores ponen de manifiesto la inexistencia de estudios coste-efectividad que sustenten el uso del nalmefeno y critican las irregularidades metodológicas de estudios que apoyan su uso (Braillon, 2014; Spence, 2014; Fitzgerald et al., 2016), o bien, directamente concluyen que no existe evidencia suficiente que avale su uso en el manejo del TUA (Palpacuer et al., 2015).

Otro de los fármacos comúnmente empleados en el tratamiento de la deshabituación alcohólica es el acamprosato. Este fármaco, está relacionado estructuralmente con la taurina, el GABA y el glutamato. Su mecanismo de acción se basa en restaurar la actividad GABAérgica disminuida por el consumo crónico de alcohol, corrigiendo así el estado de hiperexcitabilidad neuronal observado en pacientes con TUA en proceso de deshabituación (Guardia Serecigni et al., 2008). Esta neuroregulación reduce el “craving” o deseo compulsivo de beber, hecho que explica que el acamprosato reduzca la gravedad y el número de recaídas en el tratamiento de pacientes alcohólicos en período de abstinencia (Chick et al., 2003; Mann et al., 2004; Donoghue et al., 2015; Plosker, 2015).

No obstante, Spanagel y colaboradores han propuesto recientemente que el efecto terapéutico que presenta el acamprosato sobre el TUA se debe al calcio presente en su formulación como sal (Spanagel et al., 2014). Según los estudios que llevaron a cabo *in vitro*, el acamprosato no es capaz de activar el receptor glutamatérgico metabotrópico 5 (mGluR5) ni el de NMDA, a los que clásicamente se ha atribuido su acción terapéutica, demostrando que carece de efectos psicoactivos. Además, comprobaron que la administración de la sal cálcica de acamprosato o solamente la administración de cloruro de calcio reducía el consumo de etanol en ratas, mientras que la administración de una sal sódica de este fármaco no producía ningún efecto. A la vista de estos resultados, se llevó a cabo un ensayo clínico en el cual se observó que la concentración plasmática de calcio de los pacientes se correlacionaba con el éxito del tratamiento, esto es, los pacientes que presentaban una calcemia más elevada permanecían abstinentes durante mayor tiempo (Spanagel et al., 2014). En base a estos resultados, los autores concluyeron que el acamprosato no es psicoactivo *per se* y que su utilidad terapéutica reside en la sal cálcica empleada para su formulación (Spanagel et al., 2014).

### 3.2.3 Estrategias terapéuticas adicionales

Al margen de los fármacos aprobados para el tratamiento de la deshabituación del TUA, es habitual el empleo de diversos tratamientos farmacológicos fuera de indicación, como el topiramato. Este antiepiléptico presenta un mecanismo de acción de amplio espectro y ha demostrado ser potencialmente efectivo en el tratamiento de la dependencia alcohólica (Johnson et al., 2003; Navarrete et al., 2014; Guglielmo et al., 2015), principalmente por sus propiedades anti-impulsivas (Rubio et al., 2009; Navarrete et al., 2012), uno de los rasgos conductuales más relacionados con la vulnerabilidad por el consumo de sustancias de abuso como el alcohol. Sin

embargo, la severidad y la frecuencia de algunos efectos adversos sobre la capacidad de concentración y memoria ligados al uso del topiramato, registrados en diversos estudios clínicos (Olmsted and Kockler, 2008; Stringer et al., 2008), resaltan la necesidad de búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

En este sentido, durante los últimos años distintos fármacos que actúan sobre el sistema serotoninérgico, como la bupiriona (agonista parcial del receptor 5-HT<sub>1A</sub>) y el ondansetrón (antagonista de los receptores 5-HT<sub>3</sub>) han demostrado ser de utilidad clínica, especialmente en el manejo de los cuadros de ansiedad que acompañan al TUA (Johnson et al., 2000; Johnson et al., 2011; Marcinkiewicz et al., 2016). Otros autores también han evaluado la potencial eficacia de determinados agentes antipsicóticos como la olanzapina, la quetiapina o el aripiprazol, que han resultado eficaces en la prevención de recaídas, especialmente en pacientes diagnosticados de trastornos psicóticos o esquizofrenia (Hutchison et al., 2006; Ray et al., 2010; Brunetti et al., 2012; Shibasaki et al., 2012).

Otra estrategia comúnmente empleada en el tratamiento del TUA es la asociación de varios fármacos, con el objeto de alcanzar un efecto terapéutico superior al obtenido en monoterapia. Este enfoque se fundamenta en la utilización de dosis inferiores de cada uno de los fármacos a las empleadas en monoterapia, hecho que permite disminuir la frecuencia e intensidad de algunas reacciones adversas y, por lo tanto, mejorar la adherencia terapéutica. Además, el hecho de combinar varios fármacos que presenten un mecanismo de acción diferente, permite obtener una respuesta terapéutica superior (Lee and Leggio, 2014). En este sentido, existen diversos estudios en los que se evalúa la combinación de NTX con otros fármacos, tales como la gabapentina o los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, mostrando efectos superiores a los obtenidos en monoterapia con NTX (Anton et al., 2011; Froehlich et al., 2013). Sin embargo, dada la variabilidad metodológica entre estos estudios no se puede concluir que el empleo de una combinación farmacológica sea más eficaz en todos los pacientes (Lee and Leggio, 2014).

Otra de las herramientas esenciales para un correcto manejo terapéutico del TUA es el abordaje psicoterapéutico, que permite al paciente desarrollar habilidades para mantenerse abstemio y evitar recaídas. Esto se consigue mediante distintas intervenciones, tales como entrevista motivacional, intervención breve, terapia cognitivo-conductual, tratamiento residencial, grupos de apoyo y manejo de contingencia. En este sentido, los estudios disponibles constatan que los tratamientos con mayor evidencia científica son las terapias cognitivo-conductuales, las

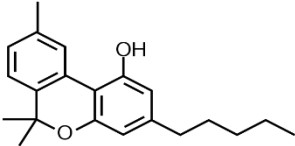
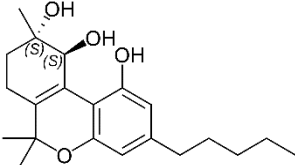
técnicas de autocontrol, el abordaje de refuerzo comunitario y el entrenamiento en habilidades sociales (Martin and Rehm, 2012).

A pesar de todas las herramientas de tratamiento expuestas, el resultado clínico de las intervenciones en pacientes con TUA sigue siendo limitado, ya que entre el 60% y el 90% de los pacientes con TUA recaen en un período de 6 meses (Finney et al., 1996; Swift, 1999). Por este motivo, resulta indispensable seguir profundizando en los mecanismos neurobiológicos que subyacen al TUA, así como en la identificación de nuevas dianas y agentes terapéuticos que permitan disminuir la tasa de recaídas y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

#### **4. POTENCIAL UTILIDAD TERAPÉUTICA DEL FITOCANNABINOIDE CANNABIDIOL EN EL TUA**

A lo largo de las últimas décadas, numerosas investigaciones se han centrado en caracterizar las bases biológicas y moleculares implicadas en las propiedades psicoactivas de los extractos de la planta *Cannabis sativa*. Hasta la fecha se han aislado un total de 120 cannabinoides, que se clasifican en 11 grupos en función de su estructura química:  $\Delta^9$ -trans-tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC),  $\Delta^8$ -trans-tetrahidrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC), cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), cannabidiol (CBD), cannabinodiol (CBND), cannabielsoína (CBE), cannabiciclol (CBL), cannabinol (CBN), cannabitriol (CBT) y un último grupo en el que se engloban varios compuestos con diferente estructura química (Kinghorn et al., 2017) (**Tabla 3**).

Grupo químico	Estructura del compuesto de referencia	Número de compuestos dentro del grupo
$\Delta^9$ -THC		23
$\Delta^8$ -THC		5
CBG		16
CBC		9
CBD		7
CBND		2
CBE		5
CBL		3

<b>CBN</b>		11
<b>CBT</b>		9
<b>Miscelánea</b>	En este grupo se incluyen compuestos de estructuras diversas	30
<b>Total</b>		120

**Tabla 3. Clasificación de los principales fitocannabinoides extraídos de *C. sativa* atendiendo a su estructura química** (adaptado de (Kinghorn et al., 2017)).  $\Delta^9$ -THC:  $\Delta^9$ -trans-tetrahidrocannabinol,  $\Delta^8$ -THC:  $\Delta^8$ -trans-tetrahidrocannabinol, CBG: cannabigerol, CBC: cannabicromeno, CBD: cannabidiol, CBND: cannabinodiol, CBE: cannabielsoína, CBL: cannabicitol, CBN: cannabinol y CBT: cannabitriol.

El principal compuesto presente en la planta es el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), caracterizado por Gaoni y Mechoulam en 1964, y al que se le atribuyen las propiedades reforzantes del cannabis (Gaoni and Mechoulam, 1964; Gaoni and Mechoulam, 1971). El siguiente compuesto mayoritario, es el cannabidiol (CBD), originalmente aislado por Adams y colaboradores (Adams et al., 1940), cuya estructura química se caracterizó por completo en 1963 (Mechoulam and Shvo, 1963).

En base a la proporción de ambos fitocannabinoides se diferencian 3 fenotipos distintos de *C. sativa*: fenotipo I, con mayor proporción de  $\Delta^9$ -THC (>0.5%) que de CBD (<0.5%) ( $\Delta^9$ -THC/CBD>>1); fenotipo II, en el que ambos componentes están presentes en concentraciones similares ( $\Delta^9$ -THC/CBD $\approx$ 1); y fenotipo III, caracterizado por presentar un bajo contenido en  $\Delta^9$ -THC y alto en CBD ( $\Delta^9$ -THC/CBD<<1) (Kinghorn et al., 2017).

A pesar de que ambos compuestos tienen una estructura química parecida, el hecho de que presenten una conformación espacial diferente, podría ayudar a explicar, al menos en parte, las diferencias observadas en relación a sus propiedades farmacológicas. En este sentido, el  $\Delta^9$ -THC se caracteriza por poseer una estructura plana que le permite unirse al rCB<sub>1</sub> (Burstein, 2015). Sin embargo, en el caso del CBD, su estructura ligeramente angular produce un impedimento estérico que obstaculiza su capacidad de unión a este receptor (Burstein, 2015).



Este hecho hace que el CBD presente una afinidad por el  $rCB_1$  hasta 100 veces menor que la que presenta el  $\Delta^9$ -THC (Zlebnik and Cheer, 2016). Esta diferencia podría justificar la ausencia de propiedades reforzantes del CBD en contraposición al  $\Delta^9$ -THC (Burstein, 2015). De hecho, los datos obtenidos hasta la fecha demuestran que la administración de CBD no produce euforia ni intoxicación en voluntarios sanos (Fusar-Poli et al., 2009; Winton-Brown et al., 2011; Martin-Santos et al., 2012). De manera complementaria, estudios preliminares realizados en ratones indican que el CBD no es capaz de inducir condicionamiento preferente de lugar, común en drogas con potencial de abuso como la cocaína (Parker et al., 2004; Vann et al., 2008).

#### **4.1 Propiedades farmacológicas del CBD**

Durante los últimos años, numerosas investigaciones se han centrado en explorar la potencial utilidad terapéutica del CBD en diferentes patologías poniendo de manifiesto su posible eficacia antimicrobiana, inmunosupresora, antiemética, antirresortiva, espasmolítica, antitumoral, antifibrótica, antiinflamatoria y anticonvulsivante (El-Remessy et al., 2006; Aviello et al., 2012; Karmaus et al., 2013; Pisanti et al., 2017). Algunas de estas propiedades se han explorado más en detalle, lo que ha llevado a la aprobación de su uso tanto por la EMA como por la FDA, del producto comercializado bajo el nombre de Sativex® (asociación  $\Delta^9$ -THC:CBD (1:1)), para el alivio sintomático de la espasticidad en esclerosis múltiple (Syed et al., 2014). Asimismo, recientemente ha sido aprobado su uso como antiepiléptico (Epidiolex®) en niños con síndrome de Lennox-Gastaut (Devinsky et al., 2018; FDA, 2018). Es interesante destacar que no se han observado efectos adversos significativos derivados del tratamiento con CBD en los estudios preclínicos ni en los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, lo que avala su buen perfil de seguridad (Zuardi et al., 1995).

Por otro lado, las evidencias encontradas hasta la fecha sugieren que el CBD también podría ser útil en el abordaje farmacológico de diferentes trastornos neurodegenerativos (Iuvone et al., 2009; Kozela et al., 2011; Martin-Moreno et al., 2011; Perez et al., 2013) y psiquiátricos (de Mello Schier et al., 2014; Blessing et al., 2015; Iseger and Bossong, 2015; Pisanti et al., 2017). Tanto los estudios básicos como los preclínicos indican que el CBD presenta propiedades ansiolíticas (Bergamaschi et al., 2011; Crippa et al., 2011; Schier et al., 2012; Blessing et al., 2015; Marinho et al., 2015), antidepresivas (El-Alfy et al., 2010; de Mello Schier et al., 2014; Linge et al., 2016) y antipsicóticas (Zuardi et al., 1995; Leweke et al., 2012).

En este sentido, se ha observado que el CBD ejerce un efecto ansiolítico en el laberinto elevado en cruz (Onaivi et al., 1990) y en el test de conflicto de Vogel (Moreira et al., 2006), modelos animales empleados habitualmente para la evaluación de fármacos ansiolíticos como las benzodiazepinas. De manera complementaria, el CBD es capaz de reducir la frecuencia cardíaca en el modelo de ansiedad de condicionamiento al miedo en ratas (Resstel et al., 2006). Análogamente, los estudios en humanos ponen de manifiesto la capacidad del CBD para reducir la ansiedad y mejorar el déficit cognitivo en pacientes con fobia social (Bergamaschi et al., 2011). El conjunto de estas evidencias ha dado lugar a la realización de un ensayo clínico de fase II diseñado para evaluar el efecto ansiolítico del CBD como fármaco adyuvante en pacientes adultos con ansiedad generalizada (identificación: NCT02548559) empleando como variables de estudio la capacidad de mejorar la calidad del sueño, el deterioro cognitivo, así como la autopercepción de salud por parte de los pacientes. Los primeros resultados de este proyecto se conocerán a partir de junio de 2019.

Por otro lado, el CBD ha demostrado presentar efectos antidepresivos en diferentes modelos animales. En roedores, su administración es capaz de reducir algunos signos representativos de conducta depresiva en las pruebas de natación forzada (Zanelati et al., 2010; de Mello Schier et al., 2014; de Moraes et al., 2018; Sales et al., 2018) y suspensión por la cola (El-Alfy et al., 2010). Recientemente, también se ha observado su eficacia antidepresiva en ratones sometidos a una bulbectomía olfatoria (Linge et al., 2016), procedimiento experimental que se caracteriza por inducir cambios conductuales, neuroquímicos e inmunológicos similares a los observados en pacientes depresivos (Wang et al., 2007). De igual modo, en un estudio llevado a cabo empleando un modelo animal genético de depresión con ratas Wistar-Kyoto (WKY), el tratamiento con CBD mejoró la capacidad de reconocimiento de objetos y redujo la anhedonia, incrementando la preferencia por sacarina (Shoval et al., 2016). En base a la potencial utilidad del CBD como antidepresivo, en 2017 se inició un ensayo clínico con el objeto de probar su eficacia terapéutica en la fase depresiva del trastorno bipolar (identificación: NCT03310593); sin embargo, los resultados de este estudio no se conocerán hasta octubre de 2019.

En relación a sus propiedades antipsicóticas, varios estudios basados en modelos animales de esquizofrenia señalan que la administración de CBD podría reducir diferentes síntomas positivos, como los movimientos estereotipados inducidos por apomorfina (Zuardi et al., 1991) y la hiperactividad motora causada por sustancias psicotomiméticas (Moreira and Guimaraes, 2005; Gururajan et al., 2011). A su vez, el tratamiento con CBD corrige las alteraciones del procesamiento de la información que afectan a la regulación sensoriomotora, presentes en

algunas cepas animales (Levin et al., 2014) o precipitadas por la administración de anfetamina (Pedrazzi et al., 2015). Recientemente se ha publicado una revisión sistemática que muestra los resultados de diferentes estudios llevados a cabo en humanos en los que se sugiere que el CBD podría resultar de interés como antipsicótico (Iseger and Bossong, 2015). El CBD es capaz de contrarrestar el deterioro cognitivo y los síntomas psicóticos derivados del uso de cannabis y/o de la administración de THC. Estos efectos parecen explicarse, al menos en parte, por la acción opuesta del CBD y del THC en regiones clave implicadas en la fisiopatología de la esquizofrenia, tales como el estriado, el HIP y la PFC (Iseger and Bossong, 2015). En base a estos resultados, a lo largo de los últimos años se han iniciado diferentes ensayos clínicos en los que se pretende comparar la utilidad antipsicótica del CBD frente a placebo (identificación: NCT02504151, NCT02932605), otros antipsicóticos (identificación: NCT00628290, NCT02051387) o como fármaco coadyuvante (identificación: NCT02926859). No obstante, aún no hay datos disponibles sobre estos estudios debido a que la mayoría concluirán a finales de 2018.

De manera complementaria, el CBD presenta propiedades neuroprotectoras con interés terapéutico para el tratamiento de determinadas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer. En este sentido, se ha observado que el CBD reduce la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal en un modelo de enfermedad de Parkinson en ratas (Lastres-Becker et al., 2005; Garcia-Arencibia et al., 2007). Asimismo, varios estudios muestran la capacidad del CBD para reducir la hiperfosforilación de la proteína tau (Esposito et al., 2006), así como la producción y la neurotoxicidad mediada por el péptido  $\beta$ -amiloide (Janefjord et al., 2014; Scuderi et al., 2014) en diferentes modelos experimentales de enfermedad de Alzheimer. Del mismo modo, su administración reduce el área dañada tras un cuadro de isquemia (Hayakawa et al., 2008a; Hayakawa et al., 2008b; Hayakawa et al., 2009; Ceprian et al., 2017), independientemente de cuando se administre, así como las lesiones estriatales inducidas por hierro (da Silva et al., 2014) y ácido 3-nitropropiónico (Sagredo et al., 2007). A pesar de que son necesarios más estudios, parece que las propiedades neuroprotectoras del CBD podrían relacionarse con sus efectos antioxidantes (Hampson et al., 1998; Garcia-Arencibia et al., 2007), antiapoptóticos (Iuvone et al., 2004; Castillo et al., 2010) y antiinflamatorios (Santos et al., 2015; Juknat et al., 2016).

De manera conjunta, las propiedades ansiolíticas, antidepresivas, antipsicóticas y neuroprotectoras del CBD, sugieren que podría ser útil en el tratamiento de TUS. Es por ello que recientemente el número de trabajos orientados a esclarecer el posible uso terapéutico del CBD en la adicción ha aumentado. Los resultados obtenidos indican que el CBD es capaz de modular

algunos aspectos relacionados con el consumo problemático de cocaína, anfetamina, opiáceos, cannabinoides y alcohol. Específicamente, la administración de CBD disminuye los signos de abstinencia y las propiedades reforzantes de la morfina en roedores (Bhargava, 1976; Katsidoni et al., 2013). Al mismo tiempo reduce la recaída y el “craving” en ratas que se autoadministran heroína (Ren et al., 2009). De igual modo, el CBD reduce la autoadministración y las convulsiones producidas por cocaína (Gobira et al., 2015; Weiss F LA, 2016) así como la preferencia de lugar inducida por anfetamina (Parker et al., 2004). Además, un artículo publicado este mismo año demuestra la potencial utilidad terapéutica del CBD en el tratamiento de la abstinencia espontánea a cannabinoides y cómo la administración de este fármaco modula las alteraciones producidas en la expresión génica de determinados genes implicados en las propiedades reforzantes de las drogas como tirosina hidroxilasa (TH), Oprm1, rCB<sub>1</sub> y rCB<sub>2</sub> (Navarrete et al., 2018a).

Sin embargo, solamente un estudio llevado a cabo por Liput y colaboradores ha señalado la potencial utilidad del CBD en el tratamiento de los efectos derivados de la intoxicación alcohólica. En este trabajo, se demuestra que la administración intraperitoneal o transdérmica de CBD consigue reducir la neurotoxicidad observada en un modelo de consumo de etanol en forma de atracción (Liput et al., 2013). Concretamente, se produce una reducción del número de células fluoro-jade B positivas (FJB+) en la corteza entorrinal (Liput et al., 2013), indicador empleado para conocer el grado de neurodegeneración (Schmued and Hopkins, 2000)

#### **4.2 Efectos del CBD sobre dianas relacionadas con el sistema de recompensa**

Hasta la fecha se han identificado más de 65 sustratos moleculares sobre los que parece actuar el CBD (Ibeas Bih et al., 2015). Entre ellos se incluye el receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, el receptor acoplado a proteínas G 55 (GPR55), el transportador de nucleósidos 1 (ENT1), la proteína de unión a ácidos grasos (FABP), el factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2 (NRF2), el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1), los canales de calcio voltaje-dependientes tipo T, los receptores de glicina y adenosina, los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  y el canal de voltaje dependiente de aniones 1 (VDAC1), entre otros (Ibeas Bih et al., 2015).

Respecto al sistema cannabinoide endógeno, los primeros estudios *in vitro* indicaron que el CBD, a concentraciones submicromolares, podía actuar como antagonista del rCB<sub>1</sub> y agonista inverso del rCB<sub>2</sub> (Thomas et al., 2007). Sin embargo, evidencias posteriores obtenidas en estudios *in vivo* muestran que el CBD presenta baja afinidad por estas dianas (Mechoulam et al.,

2007; Izzo et al., 2009; McPartland et al., 2015). En el caso del rCB<sub>1</sub>, el CBD parece actuar como modulador alostérico negativo (McPartland et al., 2015), alterando la potencia y eficacia con la que los EC activan el receptor (Laprairie et al., 2015). En relación al rCB<sub>2</sub>, los últimos estudios realizados muestran que, a pesar de que el CBD puede actuar como un agonista inverso del mismo, esta acción se observa solo a concentraciones muy elevadas (McPartland et al., 2015). Asimismo, el CBD inhibe la recaptación de AEA induciendo un aumento del tono cannabinoide endógeno. Sin embargo, al igual que ocurre con el rCB<sub>2</sub>, la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) de CBD requerida para producir este efecto *in vivo* es muy elevada (De Petrocellis et al., 2011).

De manera complementaria, varios estudios han demostrado la capacidad del CBD para actuar como antagonista de otros receptores no cannabinoide como el GPR18 y el GPR55 (Whyte et al., 2009; Sylantsev et al., 2013), proponiéndose el GPR55 como una de las principales dianas del CBD (Ibeas Bih et al., 2015).

También se ha observado que el CBD puede actuar sobre otras dianas clave en la vía de la recompensa, como el sistema opioide endógeno (Vaysse et al., 1987; Kathmann et al., 2006), el sistema dopaminérgico (Poddar and Dewey, 1980; Pandolfo et al., 2011; Seeman, 2016) y glutamatérgico (Pandolfo et al., 2011). En este sentido, el CBD parece actuar como modulador alostérico de los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  (Vaysse et al., 1987; Kathmann et al., 2006). Asimismo, el CBD inhibe *in vitro* la recaptación de dopamina y glutamato en sinaptosomas de neuronas hipotalámicas y estriatales de rata y ratón (Poddar and Dewey, 1980; Pandolfo et al., 2011). Recientemente se ha demostrado, por primera vez, la capacidad del CBD para actuar como agonista parcial sobre los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> en el estriado de ratas, al competir con la domperidona, un antagonista D<sub>2</sub>, impidiendo su unión a este receptor (Seeman, 2016). Estos datos confirman la acción directa del CBD sobre este sistema de neurotransmisión y avalando su potencial uso como antipsicótico.

Durante los últimos años, también se ha evaluado la implicación del sistema serotoninérgico en la acción farmacológica del CBD (Kinghorn et al., 2017). Varios estudios *in vitro* han demostrado que la administración de concentraciones submicromolares de CBD aumenta la actividad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en respuesta a un agonista (Russo et al., 2005; Rock et al., 2012). Análogamente, estudios *in vivo* ponen de manifiesto la capacidad del CBD para inducir respuestas fisiológicas mediadas por los receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Concretamente, su administración produce una reducción dosis dependiente de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial media en ratas sometidas a un modelo de restricción de movimiento, a la vez que aumenta la conducta exploratoria en el laberinto elevado en cruz (Resstel et al., 2009). Además, el tratamiento con

CBD disminuye el tiempo de flotación o de desesperanza en ratones expuestos al test de natación forzada de Porsolt, por lo que parece reducir los rasgos depresivos en roedores (Zanelati et al., 2010). Curiosamente, en estos estudios se ha observado que estos efectos se bloquean con la administración de WAY100635, un antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, lo que confirma la implicación de este receptor en las acciones farmacológicas del CBD.

## **5. MODELOS ANIMALES DE ADICCIÓN**

Los modelos animales son paradigmas experimentales, que tratan de reproducir algunos de los síntomas observables en las diversas patologías psiquiátricas que modelan, y en este sentido, debería entenderse su validez y utilidad. Actualmente, el empleo conjunto de varios paradigmas experimentales constituye una valiosa herramienta para estudiar las alteraciones neurobiológicas que subyacen a un determinado trastorno psiquiátrico, el mecanismo de acción de fármacos comercializados y la eficacia terapéutica de nuevas moléculas (McGonigle and Ruggeri, 2014).

Con el objetivo de asegurar que los resultados que se obtengan con el uso de los modelos animales sean aplicables a humanos, se han establecido diferentes tipos de validez: 1) *de semejanza*, que compara la analogía entre la conducta observada en el modelo experimental animal y la sintomatología clínica del trastorno que pretende modelar; 2) *causal y de constructo*, referida a que los factores que inducen el modelo animal se correspondan con los factores que podrían desencadenar el trastorno en el ser humano; y 3) *predictiva o de correlación*, que se fundamenta en la existencia de correlación entre los efectos de determinados fármacos en paradigmas experimentales llevados a cabo en animales y los observados en la clínica.

En el campo de las adicciones, el empleo de modelos animales ha permitido comprender de manera más detallada los TUS (Koob and Volkow, 2016), principalmente debido al desarrollo de paradigmas experimentales de naturaleza muy heterogénea que permiten evaluar distintos aspectos del proceso de adicción. En el caso del TUA, durante el último siglo se han validado modelos animales que permiten evaluar diferentes aspectos del consumo de etanol (Koob, 2014) como el “craving”, la motivación por adquirir la droga, la preferencia por la droga frente a una sustancia no reforzante y el proceso de recaída. La combinación de estos modelos conductuales con estudios de biología molecular, comúnmente empleados para analizar cambios en la expresión génica o proteica de distintas dianas implicadas en el proceso de adicción, permite comprender en mayor profundidad las distintas alteraciones neuroplásticas y funcionales que subyacen al TUA.

La ejecución de todos los procedimientos descritos a continuación, se describe con mayor detalle en el apartado de materiales y métodos de los artículos adjuntados como parte del presente trabajo.

### **5.1. Metodologías empleadas en el estudio de las propiedades reforzantes de las drogas de abuso**

Gran parte de los modelos animales empleados en la investigación de conductas adictivas se fundamentan en el aprendizaje condicionado, que implica modificaciones en la conducta como respuesta a cambios en las condiciones ambientales. El aprendizaje condicionado puede clasificarse en *clásico* o *Pauloviano* y *operante* o *instrumental*.

El *condicionamiento clásico* o *Pauloviano*, descrito originalmente por Iván Pávlov en 1927, se fundamenta en el aprendizaje asociativo, es decir, en como los estímulos biológicamente relevantes como comida, agua, sexo y drogas son capaces de producir por sí mismos una respuesta en un organismo, actuando como estímulos incondicionados.

Este tipo de condicionamiento se fundamenta en las siguientes premisas:

- 1) Un estímulo incondicionado (EI) activa una respuesta incondicionada (RI). Sin necesidad de un aprendizaje previo, un estímulo puede provocar un reflejo denominado respuesta incondicionada, que es involuntaria y no requiere ser aprendida para que se produzca.
- 2) Un estímulo neutro (EN) no provoca una RI. Cuando un organismo es expuesto a un EN, no se produce ningún tipo de respuesta.
- 3) El EN puede convertirse en un estímulo condicionado (EC). Si el EI y EN se emparejan de forma repetida y son presentados conjuntamente al organismo, el EN se transforma en un EC, que es capaz por sí mismo de provocar una respuesta parecida a la que provocaba el EI.

En relación al *condicionamiento operante* o *instrumental*, introducido por Skinner en 1938 (F. Skinner, 1938), este propone que los animales adquieren conductas en función de las consecuencias de cada acción. Según esta premisa, para producir un condicionamiento operante o instrumental es necesario que una acción vaya sucedida por un refuerzo (positivo o negativo), entendiéndose por refuerzo positivo cualquier estímulo que incremente la frecuencia de la respuesta operante, y por refuerzo negativo, lo contrario. En este tipo de condicionamiento el animal debe aprender una tarea tal como presionar una palanca o introducir la cabeza en un

agujero para así obtener una recompensa, en este caso una droga de abuso. El estudio de las propiedades reforzantes y la motivación por las drogas en modelos animales se ha venido realizando a lo largo de los años mediante la utilización de los paradigmas de condicionamiento espacial (condicionamiento por preferencia de lugar (CPP)) y condicionamiento operante (autoadministración). Los estudios de CPP y autoadministración han proporcionado una valiosa información en relación a las acciones reforzantes de la mayoría de drogas de abuso.

#### 5.1.1 Condicionamiento espacial: condicionamiento por preferencia de lugar (CPP)

Este paradigma experimental permite evaluar las propiedades reforzantes de una droga de abuso cuando se asocian con un contexto determinado (Cunningham et al., 2006). Para su realización, se requiere de una caja con dos compartimentos claramente diferenciados (distintas texturas y colores en las superficies) comunicados por una puerta que permanecerá abierta o cerrada en función de la fase del procedimiento (Cunningham et al., 2000; Cunningham et al., 2006):

**Fase de precondicionamiento:** el primer día de la prueba el ratón explora libremente los dos compartimentos durante un período de 15-20 minutos. El objetivo de esta fase es descartar aquellos animales que presentan preferencia por uno de los dos compartimentos de manera natural. Consecuentemente, los ratones que permanezcan más del 75% del tiempo en cualquiera de los dos compartimentos, serán excluidos de la prueba.

**Fase de condicionamiento:** durante los 8-10 días que dura la fase de condicionamiento, los animales se distribuyen aleatoriamente en dos grupos (droga o vehículo). La mitad de los animales de cada grupo recibirán la droga o el vehículo en un compartimento y el resto lo hará en el otro, evitando de esta forma la preferencia natural del roedor por uno de los contextos determinados.

**Test de preferencia:** una vez concluida la fase de condicionamiento, los ratones se dejan transitar libremente entre los dos compartimentos durante 15-20 minutos, midiéndose el tiempo de permanencia en el lado donde fueron condicionados a la droga. Los animales que muestren una preferencia por el compartimento asociado con las propiedades reforzantes de la droga permanecerán más tiempo en el compartimento donde la recibieron. Una de las principales ventajas de este diseño experimental es la ausencia de la sustancia que se pretende estudiar durante la realización del test de preferencia, evitando de esta forma muchos efectos secundarios de las drogas como sedación o alteraciones motoras que podrían falsear los resultados.



### 5.1.2 Condicionamiento operante: auto-administración oral

La autoadministración oral es un procedimiento experimental basado en el condicionamiento operante, comúnmente empleada como alternativa a la autoadministración intravenosa para el estudio de refuerzos naturales y drogas de abuso. Este procedimiento se realiza en cajas modulares de Skinner, en las que el accionamiento de una palanca o agujero activo desencadenará la liberación de una sustancia reforzante, permitiendo conocer la cantidad de sustancia consumida por el roedor, mientras que, la activación de la palanca inactiva no tiene ninguna consecuencia.

En el caso de la autoadministración oral de etanol, el procedimiento comienza con una fase de entrenamiento en la que los roedores reciben como recompensa una solución de sacarina, favoreciendo así la adquisición de la conducta operante. A continuación, se reduce progresivamente el contenido de sacarina de esta solución y se incrementa la concentración de etanol. De esta forma, la palatabilidad del etanol no resulta tan aversiva hasta que los roedores se acostumbran a su ingesta (Samson, 1986). Una vez habituados al consumo de etanol, los animales son expuestos a fases de razón fija (FR) creciente, de forma que, conforme avance el experimento, tienen que realizar un esfuerzo superior para conseguir la misma cantidad de droga que en las fases previas. Por último, se lleva a cabo una fase de razón progresiva (PR) en la que se evalúa la motivación del animal por conseguir la droga. Para ello, se aplica un incremento gradual del número de activaciones necesario para conseguir un refuerzo y se evalúa el punto de corte que alcanza cada ratón, que equivale al número de veces que es capaz de accionar la palanca para conseguir un refuerzo (Soria et al., 2005).

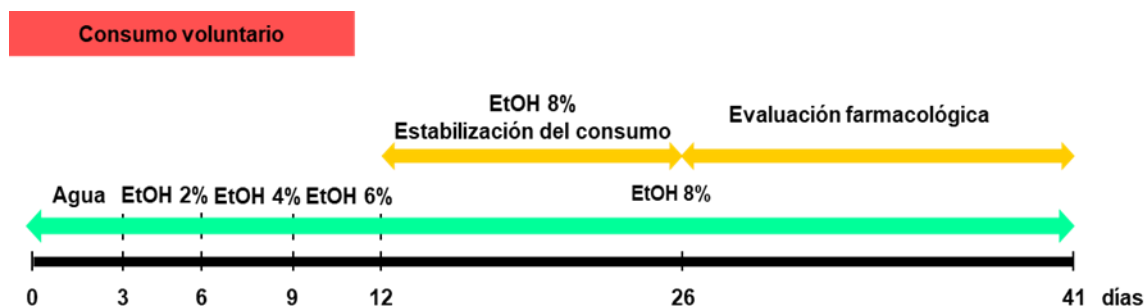
## **5.2 Evaluación del consumo crónico voluntario y preferencia de etanol**

### 5.2.1 Sistema de dos botellas

Este procedimiento, ampliamente utilizado en modelos animales de alcoholismo (Little, 1999; Hungund et al., 2003; Oliva and Manzanares, 2007; Femenia et al., 2010; Femenia and Manzanares, 2012), permite conocer la preferencia y el consumo de etanol en roedores. Con este fin, los animales son estabulados individualmente en jaulas equipadas con dos biberones volumétricos, que permiten medir la cantidad exacta de líquido ingerido.

Durante los primeros días, ambos biberones contienen agua, lo que permite la habituación al biberón y la estabilización de la ingesta de líquido. Una vez transcurrido este período, uno de los

biberones contendrá etanol y su concentración se incrementará cada 3 días (2, 4, 6, 8% v/v) (ver **Figura 9**), mientras que el otro biberón siempre contendrá agua, lo que permitirá evaluar la preferencia de consumo por un líquido u otro. La posición de los biberones se va intercambiando a lo largo de los días para evitar sesgos de preferencia de lugar. La cantidad total de etanol consumido se calcula individualmente para cada animal y se promedia para cada concentración de etanol como g/kg/día. La preferencia por el consumo de etanol se determina como consumo etanol / consumo etanol + consumo agua.



**Figura 9.** Diagrama temporal del consumo voluntario de etanol. EtOH: etanol.

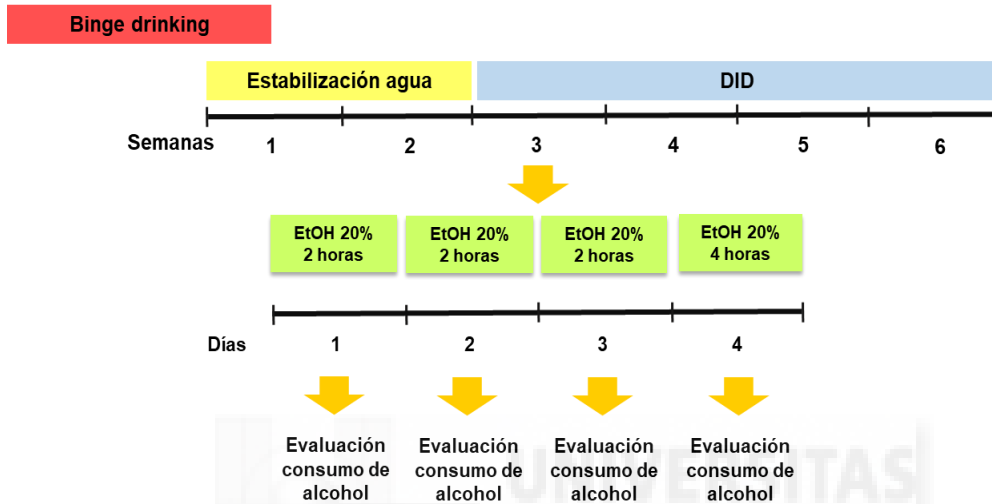
### **5.3 Evaluación de diferentes patrones de consumo de etanol**

#### **5.3.1 Consumo de etanol en atracón o “binge drinking”**

El modelo de “drinking in the dark”, puesto a punto por Rhodes y colaboradores, es un modelo de consumo de etanol en forma de atracón o “binge drinking” (Rhodes et al., 2005). Este paradigma permite aproximarse al TUA con un enfoque más traslacional, debido al aumento de frecuencia de patrones de consumo de riesgo como el “binge drinking” registrado durante los últimos años (Rhodes et al., 2005). Este modelo permite alcanzar concentraciones plasmáticas de etanol superiores (>1 mg/ml) a las obtenidas con otros modelos animales. Además, esta tasa de etanol en sangre se mantiene invariable durante un período de tiempo más largo en comparación con otros modelos como la autoadministración oral, simulando de forma más fehaciente un cuadro de intoxicación alcohólica (Rhodes et al., 2005).

Dos semanas antes del comienzo del procedimiento experimental, los ratones se individualizan en jaulas con biberones volumétricos que contienen agua para garantizar la adquisición de un consumo estable. Los ratones son expuestos a un modelo de “binge drinking” (4 días/semana) en el que tendrán acceso a una solución de etanol al 20% v/v durante dos horas

al día, tres días a la semana. El cuarto día, el acceso a la solución de etanol se ampliará hasta un total de 4 horas. Este ciclo se repetirá una vez por semana, durante 4 semanas consecutivas (ver **figura 10**). Se medirá el consumo de etanol (ml) todos los días, expresándose el consumo en g/kg.



**Figura 10.** Diagrama temporal del consumo en atracón. DID: drinking in the dark.

#### **5.4 Precipitación del síndrome de abstinencia**

El síndrome de abstinencia se define como el conjunto de manifestaciones somáticas que aparecen al interrumpir el consumo de una droga que previamente ha producido un cuadro de dependencia física. La utilización de un modelo animal de abstinencia permite evaluar este componente físico de la dependencia para algunas drogas tales como los cannabinoides (Cook et al., 1998; Hutcheson et al., 1998) y el alcohol (Macey et al., 1996). Este síndrome de abstinencia puede deberse a la interrupción del tratamiento crónico de la droga (*abstinencia espontánea*) o precipitarse tras la administración de un antagonista específico de la diana de la droga objeto de estudio (*abstinencia inducida*). Independientemente del modelo, ambos inducen un síndrome de abstinencia en el animal, con la aparición de una serie de signos y manifestaciones cuantificables (acicalamientos, rascaduras, levantamientos, etc.), similares a los descritos en humanos. Además, la precipitación de un síndrome de abstinencia afecta a la conducta motora de los animales, incrementándola, por lo que la evaluación de la distancia recorrida también se emplea para estudiar la abstinencia. En el caso de los cannabinoides, se

ha descrito un cuadro de abstinencia espontánea en ratones cuando se interrumpe el tratamiento con un agonista del  $rCB_1$  (Oliva et al., 2003, 2004; Aracil-Fernandez et al., 2013). Al mismo tiempo, se ha observado un aumento de la liberación de factor liberador de corticotropina en la AMY central, que podría estar directamente relacionado con la manifestación de los efectos ansiogénicos del síndrome de abstinencia (Rodríguez de Fonseca et al., 1997).

### **5.5 Evaluación de los efectos fisiológicos inducidos por el consumo de etanol**

Como método complementario se pueden emplear diversas pruebas que tienen como objeto estudiar los efectos fisiológicos del etanol, evaluando el grado de metabolización del mismo y la sensibilidad que presentan los animales de experimentación a esta sustancia, lo que permite conocer los efectos de una determinada manipulación genética o tratamiento farmacológico sobre sus propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas. Estas pruebas incluyen **la medición de la concentración plasmática de etanol, y la evaluación del grado de hipotermia, de la pérdida del reflejo de enderezamiento y de la presencia de movimientos y/o convulsiones** inducidas por etanol.

La medición de la **concentración plasmática de etanol** tras su administración por vía oral de manera aguda (3 g/kg) permite conocer los niveles de etanol en sangre, pudiendo detectar así posibles alteraciones en su absorción y/o metabolismo (Nowak et al., 2006). De esta forma, se puede concluir que, si la administración de un tratamiento modifica las concentraciones plasmáticas de etanol en comparación al grupo control pertinente, puede estar produciéndose una alteración en la farmacocinética del etanol.

La evaluación del **grado de hipotermia** inducida por etanol permite evaluar la sensibilidad de los roedores a los efectos del etanol sobre la temperatura corporal tras la administración oral de una dosis aguda de etanol (3 g/kg), que puede verse afectada por diferencias genéticas entre distintas cepas o como consecuencia de la exposición a un tratamiento farmacológico (Radcliffe et al., 2005; Chen and Holmes, 2009). En este test, se mide la temperatura rectal antes de la administración de etanol, para obtener los valores basales, y después, a diferentes tiempos, hasta que se vuelve a alcanzar la temperatura basal, relacionándose una menor hipotermia con una mayor resistencia a los efectos fisiológicos del etanol.

La evaluación de la **pérdida del reflejo de enderezamiento** inducido por el etanol se emplea para evaluar la sensibilidad del roedor a una administración intraperitoneal aguda de etanol (3,8 g/kg), midiendo el tiempo que tarda en despertar, o en recuperar su postura, tras las

administración de etanol (Vinod et al., 2008a). Existe una mayor sensibilidad al etanol si el animal no consigue recuperar su postura o si transcurre mucho tiempo hasta que consigue hacerlo.

La evaluación de la **presencia de movimientos y/o convulsiones** inducidos por la manipulación tras la administración oral de altas dosis de etanol (4 g/kg), permite analizar la magnitud del síndrome de abstinencia tras la intoxicación de etanol (Goldstein, 1972; Ripley et al., 2002; Vinod et al., 2008a). Para ello, la respuesta del animal se evalúa valorando signos físicos (ausencia de respuesta, movimientos faciales, convulsiones tónicas, clónicas y crisis tónico-clónicas), relacionándose la aparición de crisis tónico-clónicas con una mayor gravedad del síndrome de abstinencia.







---

**HIPÓTESIS DE TRABAJO**





En la actualidad, el TUA constituye uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. De hecho, según los últimos informes emitidos por la OMS, un 5,1% de la carga de enfermedad y hasta un 5,9% de las defunciones registradas a nivel global derivan del consumo de alcohol. De estos datos se desprende el hecho de que la prevención y el tratamiento adecuado de esta patología psiquiátrica suponen una necesidad sociosanitaria innegable.

Hasta la fecha, el manejo terapéutico de los pacientes con TUA se ha fundamentado en la combinación de un tratamiento farmacológico con terapias cognitivo-conductuales. No obstante, los tratamientos y recursos disponibles presentan una limitada eficacia, que se refleja en la elevada tasa de recaídas (60-90%) dentro del primer año de deshabituación. Ante este hecho, se hace necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que, por sí mismas o combinadas con las ya existentes, supongan una mejora en el tratamiento de la dependencia alcohólica. En este sentido, diversos estudios han sugerido que el CBD podría ser útil en el tratamiento de diferentes patologías psiquiátricas que presentan una alta comorbilidad con TUA tales como ansiedad, depresión y psicosis.

En base a la evidencia disponible, parece plausible hipotetizar que el CBD podría presentar potencial utilidad terapéutica en el tratamiento del TUA. Para confirmar o descartar dicha hipótesis, en la presente propuesta de tesis doctoral se pretende estudiar en detalle la eficacia del CBD en distintos modelos animales empleados para evaluar las propiedades reforzantes del etanol. Con este fin, se evaluarán los efectos del tratamiento con este cannabinoide sobre la preferencia, el consumo, la motivación y la recaída por el etanol, empleando diferentes dosis y patrones de administración. Asimismo, se profundizará en los mecanismos neurobiológicos por los cuáles el CBD podría ser útil en el tratamiento de TUA.





---

**OBJETIVOS**



## **OBJETIVO GENERAL**

Este proyecto pretende analizar la potencial utilidad terapéutica del CBD en el tratamiento del TUA. Con este fin, se evaluarán los efectos de la administración del CBD (solo o en combinación con otros fármacos) sobre las propiedades reforzantes del etanol en diferentes paradigmas experimentales llevados a cabo en ratones C57BL/6J. De manera complementaria, se caracterizarán cambios neurobiológicos inducidos por el CBD sobre distintas dianas relacionadas con el sistema de recompensa.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Evaluar las propiedades reforzantes intrínsecas del CBD mediante modelos animales diseñados específicamente para este fin (**Artículo 1**).
- II. Explorar la potencial utilidad terapéutica del CBD en la modulación de las propiedades reforzantes del etanol (motivación y consumo) en los paradigmas de consumo voluntario de etanol y en la autoadministración oral de etanol, así como su potencial utilidad terapéutica en la prevención de recaídas (**Artículo 2**).
- III. Estudiar el efecto del CBD sobre los efectos fisiológicos inducidos por una administración aguda de etanol (**Artículo 2**).
- IV. Caracterizar los efectos de la administración del CBD en la expresión génica relativa de distintas dianas relacionadas con las propiedades reforzantes del alcohol: TH en VTA y Oprm1, rCB<sub>1</sub>, rCB<sub>2</sub> y GPR55 en NAc (**Artículo 2**).
- V. Evaluar la eficacia de la asociación de dosis subefectivas de CBD y NTX en la modulación de las propiedades reforzantes del etanol (motivación y consumo) en la autoadministración oral de etanol (**Artículo 3**).
- VI. Analizar los cambios producidos por el CBD, solo y asociado a NTX, en la expresión génica relativa de dianas relacionadas con las propiedades reforzantes del alcohol: TH en VTA, Oprm1 en NAc y 5-HT<sub>1A</sub> en DR (**Artículo 3**).
- VII. Explorar si la administración previa del antagonista del 5-HT<sub>1A</sub>, WAY-100635, modifica los efectos de la asociación CBD + NTX, para comprender con mayor profundidad la relevancia de este receptor en las acciones farmacológicas del CBD (**Artículo 3**).
- VIII. Estudiar la potencial utilidad terapéutica del CBD en un patrón de consumo de etanol en forma atracón (**Artículo 4**).









En el presente estudio se ha explorado la posible utilidad terapéutica del CBD en el tratamiento del TUA. En primer lugar, se ha evaluado el potencial del CBD como droga de abuso. Para ello, se han empleado diversos modelos animales usados habitualmente en el estudio de las propiedades reforzantes de distintas drogas: 1) *condicionamiento preferente de lugar*, 2) *modelo de síndrome de abstinencia espontáneo a cannabinoides*, y 3) *autoadministración oral de CBD*. Los resultados muestran como la administración de CBD a distintas dosis (15, 30 o 60 mg/kg; i.p.) no induce preferencia de lugar en ratones C57BL/6J (**Anexo I: artículo 1, figura 1**). De manera complementaria, no se observan diferencias en ninguno de los parámetros evaluados (*distancia recorrida, número de acicalamientos, rascaduras y levantamientos*) tras la precipitación de un síndrome de abstinencia espontáneo en ratones tratados con CBD (30 mg/kg; i.p.; 2 veces al día durante 6 días) (**Anexo I: artículo 1, figura 3**). Para garantizar que la ausencia de síntomas de abstinencia no es debida a la presencia residual de CBD, se han analizado las concentraciones plasmáticas de este cannabinoide a diferentes intervalos durante 24 horas tras su administración aguda (30 mg/kg; i.p.). Se observa que transcurridas 12h la concentración de CBD en plasma ha disminuido considerablemente (-85%) (**Anexo I: artículo 1, figura 2**). Asimismo, los ratones expuestos a la autoadministración oral de CBD no presentan un mayor número de palancas activas accionadas (**Anexo I: artículo 1, figura 4d**) ni un mayor consumo en comparación con su correspondiente grupo control expuesto a una solución no reforzante (agua) (**Anexo I: artículo 1, figura 4g**). En conjunto, estos datos sugieren que el CBD no presenta potencial como droga de abuso.

Seguidamente, se ha evaluado la posible eficacia del CBD en la modulación de diferentes aspectos relacionados con el proceso de adicción al alcohol mediante el empleo de distintos paradigmas experimentales: *consumo voluntario de etanol* (preferencia y consumo de etanol) y *autoadministración oral de etanol* (motivación y consumo de etanol). Los resultados indican que dosis crecientes de CBD (30, 60 y 120 mg/kg, i.p.) son capaces de reducir la preferencia (-45%) (**Anexo I: artículo 2, figura 1b**) y el consumo de etanol (-40%) en el sistema de dos botellas (**Anexo I: artículo 2, figura 1c**).

De manera análoga, el tratamiento con una formulación de micropartículas de liberación controlada de CBD (30 mg/kg/día; s.c.), que proporciona concentraciones estables de CBD durante 14 días, disminuye notablemente el número de palancas activas accionadas (-30%) (**Anexo I: artículo 2, figura 3b**) y el consumo de etanol (-35%) (**Anexo I: artículo 2, figura 3c**) durante las fases FR1 y FR3, así como el punto de corte o “breaking point” durante la fase de PR (**Anexo I: artículo 2, figura 3d**). Por consiguiente, el CBD reduce tanto el consumo como la

motivación por el etanol. Cabe destacar que el tratamiento con CBD no produce ningún efecto en la autoadministración oral de agua (**Anexo I: artículo 2, figura suplementaria 3**), lo que permite inferir que este fármaco actúa sobre los efectos reforzantes del etanol sin alterar el consumo de sustancias neutras.

Otro de los aspectos que se ha estudiado es la posible interacción entre el CBD y el alcohol, evaluando los efectos del CBD sobre diferentes parámetros representativos de la respuesta fisiológica al etanol. Los resultados señalan que el tratamiento con CBD (60 mg/kg; i.p.) previene las convulsiones inducidas por una dosis elevada de etanol (4 g/kg; i.p.) (**Anexo I: artículo 2, figura suplementaria 2a**) y la hipotermia (3 g/kg; p.o.) (**Anexo I: artículo 2, figura suplementaria 2b**). Al mismo tiempo, se ha comprobado que el CBD no reduce la concentración plasmática de etanol (**Anexo I: artículo 2, figura suplementaria 2c**), sugiriendo que la administración de este cannabinoide no alteraría ni la absorción ni el metabolismo del etanol.

Para investigar algunos de los posibles cambios funcionales asociados a las acciones conductuales inducidas por el CBD, se ha analizado la expresión génica relativa de diferentes dianas implicadas en el proceso de adicción. Los ratones tratados con CBD presentan una reducción de la TH en VTA y del Oprm1, rCB<sub>1</sub>, rCB<sub>2</sub> y GPR55 en NAc, y un aumento del rCB<sub>2</sub> en el NAc, tanto en el consumo voluntario (**Anexo I: artículo 2, figura 2a-e**) como en la autoadministración oral de etanol (**Anexo I: artículo 2, figura 4a-e**).

Adicionalmente se ha evaluado la potencial eficacia del CBD en la prevención de recaídas en el paradigma experimental de autoadministración oral de etanol. La administración de CBD (60 mg/kg; i.p.) no produce cambios significativos en ninguno de los parámetros evaluados (número de palancas activas accionadas y consumo de etanol). Sin embargo, empleando una dosis más elevada (120 mg/kg; i.p.) sí se ha observado una reducción del número de palancas activas accionadas (-35%) (**Anexo I: artículo 2, figura 5a**) y del consumo de etanol (-40%) (**Anexo I: artículo 2, figura 5b**) en ratones C57BL/6J reexpuestos a la droga tras un período de extinción.

El estudio del valor terapéutico del CBD en el manejo del TUA se ha completado mediante la evaluación de sus efectos en combinación con NTX, fármaco habitualmente empleado en el tratamiento de la dependencia por el alcohol. En la autoadministración oral de etanol, el tratamiento con CBD (20 mg/kg/día; s.c.), NTX (0,7 mg/kg; p.o.) o la combinación de ambos fármacos reduce el número de palancas activas accionadas (-30%) (**Anexo I: artículo 3, figura 2a**) y el consumo de etanol (-37,5%) (**Anexo I: artículo 3, figura 2b**) durante FR1. Sin embargo, únicamente su combinación resulta eficaz a la hora de disminuir el número de palancas activas

accionadas (-30%) (**Anexo I: artículo 3, figura 2a**) y la ingesta de etanol (-32,5%) (**Anexo I: artículo 3, figura 2b**) durante FR3 y la motivación (“breaking point”) durante la fase de PR (**Anexo I: artículo 3, figura 2c**). Estos datos señalan que la combinación farmacológica CBD + NTX presenta una mayor eficacia a la hora de reducir el consumo y la motivación que cualquiera de los tratamientos administrados de forma aislada. De igual modo, en los estudios de qPCR se ha observado que, a pesar de que el tratamiento con CBD o la combinación CBD + NTX reduce la expresión génica de la TH en VTA (**Anexo I: artículo 3, figura 3a**) y del 5-HT<sub>1A</sub> en el DR (**Anexo I: artículo 3, figura 3c**), solamente la administración de CBD + NTX reduce la expresión génica del receptor opioide Oprm1 en el NAc (**Anexo I: artículo 3, figura 3b**).

En resumen, los resultados en el análisis de expresión génica, sugieren que las alteraciones inducidas por el CBD en dianas clave en el proceso de adicción al etanol (TH, Oprm1, GPR55, CB<sub>2r</sub>, CB<sub>1r</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>), podrían contribuir, al menos en parte, a su eficacia en reducir la preferencia, el consumo, la motivación y prevenir la recaída. Para precisar la importancia de alguna de estas dianas en el efecto del CBD, se ha estudiado si el bloqueo del receptor 5-HT<sub>1A</sub> puede bloquear los efectos del CBD. Los resultados muestran que la administración del antagonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, WAY-100635 (0,3 mg/kg; i.p.), bloquea los efectos terapéuticos de la combinación CBD + NTX sobre la motivación y el consumo de etanol (**Anexo I: artículo 3, figura 4**), lo que pone de manifiesto la relevancia del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la acción terapéutica del CBD.

De manera complementaria, se ha evaluado la eficacia del CBD en un patrón de consumo en forma de atracón empleando el modelo de “drinking in the dark”. En este estudio se han empleado ratones C57BL/6J de ambos sexos, debido al mayor consumo y velocidad de progresión de “binge drinking” a TUA descrita en mujeres. Los resultados obtenidos confirman que las hembras expuestas a un modelo de “binge drinking” presentan un mayor consumo de etanol al observado en machos (**Anexo I: artículo 4, figura 2**). Es de interés destacar que la administración aguda de CBD (15, 30 o 60 mg/kg; i.p.) no tiene efectos sobre el consumo de etanol en atracón en ninguno de los dos sexos (**Anexo I: artículo 4, figura 3a y 3b**). Sin embargo, su administración repetida (30 o 60 mg/kg; i.p., durante 4 días) reduce el consumo de etanol (30-50%) en machos (**Anexo I: artículo 4, figura 3c-d**).

A nivel neuroquímico, las hembras tratadas con vehículo presentan mayor expresión génica de la TH en el VTA (**Anexo I: artículo 4, figura 4a**) y del Oprm1 en el NAcc (**Anexo I: artículo 4, figura 4d**) en comparación con los machos. Asimismo, los cambios comportamentales observados en machos tratados con CBD (60 mg/kg; i.p.) se acompañan de una reducción de la expresión de la TH en (-25%) (**Anexo I: artículo 4, figura 4b**) y del Oprm1 (-30%) (**Anexo I:**

**artículo 4, figura 4e)** en el VTA y en el NAc, respectivamente. No obstante, el tratamiento repetido con CBD no produce cambios significativos en ninguna de las dianas analizadas en hembras (**Anexo I: artículo 4, figura 4c y 4f**).

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran la potencial utilidad terapéutica del CBD, solo o en combinación con NTX, en el tratamiento del TUA. Asimismo, los hallazgos presentados señalan que el CBD modifica la expresión génica de distintas dianas cerebrales relacionadas con las propiedades reforzantes del etanol (TH en VTA, Oprm1, rCB<sub>1</sub>, rCB<sub>2</sub> y GPR55 en NAc y 5-HT<sub>1A</sub>).







Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen de manifiesto la potencial utilidad terapéutica del CBD en el tratamiento del TUA. Esta afirmación se apoya en las siguientes evidencias: 1) el CBD carece de potencial como droga de abuso; 2) el tratamiento con CBD reduce la preferencia, el consumo, la motivación y la recaída al etanol, en una serie de modelos animales clásicamente empleados para evaluar diferentes aspectos del proceso de adicción alcohólica; 3) la asociación de CBD con dosis subefectivas de NTX induce una reducción de la motivación y del consumo de etanol en la autoadministración oral superior a la producida por cualquiera de los fármacos por separado; 4) el tratamiento con CBD modula la expresión génica de distintas dianas relacionadas con las propiedades reforzantes del etanol (TH en VTA, Oprm1, rCB<sub>1</sub>, rCB<sub>2</sub> y GPR55 en NAc y 5-HT<sub>1A</sub> en DR) y 5) la administración repetida de CBD reduce el consumo de etanol en forma de atracón y las alteraciones en la expresión génica relacionadas (TH en VTA y Oprm1 en NAc) en ratones machos.

En la actualidad, el TUA se encuentra entre las tres primeras causas de enfermedad, discapacidad y muerte (Organización Mundial de la Salud, 2014). A pesar de las herramientas terapéuticas disponibles para su tratamiento, entre un 60-90% de los pacientes presenta recaídas durante el primer año de abstinencia (Finney et al., 1996; Swift, 1999; Moos and Moos, 2006). Por este motivo, es imprescindible el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que, por sí mismas o en combinación con las ya existentes, permitan su correcto manejo terapéutico, contribuyendo a reducir la tasa de recaídas y la morbilidad asociada, aumentando en última instancia la calidad de vida de los pacientes y de sus familiares.

En este sentido, el creciente número de estudios que sugiere que el CBD presenta eficacia como ansiolítico, antidepresivo, antipsicótico y como neuroprotector (El-Alfy et al., 2010; Leweke et al., 2012; Liput et al., 2013; Blessing et al., 2015) ha propiciado que se evalúe su posible eficacia en el tratamiento de diferentes patologías psiquiátricas, como los TUS. Al tratarse de un compuesto extraído del cannabis, en algunos países se encuentra clasificado como droga de abuso (Gobierno de Estados Unidos., 1970; Gobierno de Canada., 2018), hecho que dificulta la realización de estudios básicos y clínicos. Cabe destacar que esta consideración resulta incoherente con la evidencia disponible, que demuestra que el CBD: 1) presenta baja afinidad por el rCB<sub>1</sub>, responsable de las propiedades reforzantes del  $\Delta^9$ -THC (Burstein, 2015; Zlebnik and Cheer, 2016), y 2) no induce síntomas de euforia o intoxicación en voluntarios sanos (Fusar-Poli et al., 2009; Winton-Brown et al., 2011; Martin-Santos et al., 2012). Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio ha sido diseñado específicamente para explorar las posibles propiedades

reforzantes del CBD. Por consiguiente, el primer bloque de experimentos se ha centrado en caracterizar el posible perfil del CBD como droga de abuso.

En primer lugar, se ha observado que la administración de CBD a dosis elevadas (15, 30 y 60 mg/kg; i.p.) no produce sesgo atencional en la prueba de CPP. Estos resultados coinciden con el trabajo realizado por Vann y colaboradores, en el que se demuestra que el CBD (1 y 10 mg/kg; i.p.) no induce CPP en ratas (Vann et al., 2008). Seguidamente, se ha evaluado la capacidad del CBD para inducir síntomas de dependencia física analizando los signos somáticos y la actividad motora tras la precipitación de un síndrome de abstinencia espontánea a CBD, empleando un protocolo previamente descrito (Oliva et al., 2003, 2004; Aracil-Fernandez et al., 2013). Los datos obtenidos muestran como tras la interrupción del tratamiento con CBD (60 mg/kg; i.p. 2 veces al día), no aumenta el número de levantamientos, rascaduras, acicalamientos ni la distancia recorrida, lo que pone de manifiesto la incapacidad del CBD para inducir abstinencia. Además, el hecho de que no se detecten concentraciones plasmáticas de CBD en el momento de la evaluación de estos parámetros (12 horas tras la interrupción del tratamiento con CBD), confirma que la ausencia de signos somáticos y de alteraciones en la actividad motora no es debida a concentraciones residuales de CBD. Adicionalmente, en este estudio se ha podido comprobar que el CBD no induce autoadministración oral, al no observarse diferencias entre el número de palancas activas accionadas entre los ratones que se autoadministran CBD en comparación con una sustancia neutra (agua). Estos resultados coinciden con un estudio previo publicado por Katsidoni y colaboradores, en el que se propone que el CBD por sí mismo no parece activar el sistema de recompensa (Katsidoni et al., 2013). En conjunto, estos hallazgos ratifican que el CBD no presenta potencial como droga de abuso, permitiendo descartar que sus posibles efectos sobre otras drogas puedan ser debidos a sus propias propiedades reforzantes.

A continuación, se ha evaluado si el CBD puede modular el consumo y la preferencia por el etanol empleando el modelo de consumo voluntario de las dos botellas. Los resultados indican que el CBD (30, 60 y 120 mg/kg; i.p.) reduce la preferencia y el consumo de etanol, sugiriendo así que el CBD podría regular las propiedades reforzantes del etanol.

Posteriormente, se han analizado los efectos del CBD sobre la motivación por consumir etanol en el paradigma de la autoadministración oral de etanol. En este estudio, se ha empleado una formulación de micropartículas de liberación controlada de CBD (30 mg/kg; s.c.) que proporciona concentraciones plasmáticas estables durante 2 semanas (Hernán Pérez de la Ossa, 2012). Esta formulación supone un gran avance terapéutico, puesto que evita el marcado efecto de primer paso hepático característico de la administración por vía oral de CBD (Siemens et al., 1980;



Mattes et al., 1993), mejorando así su biodisponibilidad. Además, la vía subcutánea constituye una alternativa más traslacional que la administración intraperitoneal, pues ayuda a mejorar la adherencia al tratamiento. Los datos obtenidos indican que el tratamiento con CBD, mediante esta nueva formulación, reduce la ingesta de etanol y la motivación por su consumo, representada a través del número de palancas activas accionadas, en todas las fases de la autoadministración (FR1, FR3 y PR). En esta misma línea, otros autores han demostrado que el tratamiento con una formulación transdérmica de CBD (2,5g de CBD por cada 100 g de gel) reduce notablemente la autoadministración de cocaína en ratas (Weiss F LA, 2016; Gonzalez-Cuevas et al., 2018). De manera complementaria, el CBD no produce ninguna alteración en el consumo de sustancias sin propiedades reforzantes, como el agua, lo que permite confirmar que la acción del CBD es específica sobre drogas con potencial de abuso.

Teniendo en cuenta la elevada tasa de recaídas en pacientes diagnosticados de TUA (Finney et al., 1996; Swift, 1999) y la capacidad del CBD para reducir la recaída a determinadas drogas, como los opiáceos (Hurd et al., 2015), se ha analizado también su posible eficacia en minimizar el proceso de recaída a alcohol. La recaída se ha evaluado empleando un modelo de autoadministración oral de etanol (Blegen et al., 2018), con pequeñas modificaciones, en el que se alternan períodos de privación de etanol (2 días) con períodos de consumo (5 días). Tras el segundo periodo de privación, y una vez estabilizado el consumo de etanol, se lleva a cabo una fase de extinción de la conducta operante durante 5 días. Durante esta fase, el accionamiento de la palanca activa no provoca la emisión de ningún estímulo (ni acústico ni visual) ni la liberación de etanol (Zghoul et al., 2007). Transcurrido este período de abstinencia forzada, los sujetos se exponen de nuevo al etanol. El CBD (120 mg/kg; i.p.) reduce la recaída por el etanol (número de palancas y consumo). Estos resultados coinciden con los publicados por González-Cuevas y colaboradores recientemente, donde muestran que el tratamiento con una formulación transdérmica de CBD (15 o 30 mg/kg) reduce la recaída por el etanol inducida farmacológicamente o por contexto en ratas Wistar (Gonzalez-Cuevas et al., 2018). A pesar de que son necesarios futuros estudios en los que se exploren dosis y patrones de administración de CBD adicionales, los datos obtenidos hasta el momento señalan la posible utilidad del CBD en el proceso de recaída en el TUA.

Para completar estos resultados, se han estudiado los efectos de la administración de CBD sobre la respuesta fisiológica inducida por etanol. El tratamiento con CBD (60 mg/kg; i.p.) bloquea la hipotermia y las convulsiones inducidas por una dosis elevada de etanol. Además, el CBD (60 mg/kg; i.p.) no modifica las concentraciones plasmáticas de etanol. En su conjunto, estos datos

ponen de manifiesto que el CBD no induce ninguna alteración en el metabolismo/absorción del etanol. Consecuentemente, es posible afirmar que la acción del CBD sobre las propiedades reforzantes del etanol no es debida a interacciones farmacocinéticas.

La asociación de dos o más fármacos se ha convertido en una de las estrategias terapéuticas empleadas con mayor frecuencia en la práctica clínica para el tratamiento del TUA. Con este tipo de abordaje se pretende alcanzar un efecto terapéutico superior al observado en monoterapia y reducir las reacciones adversas derivadas del tratamiento farmacológico. Por ello, en los últimos años, múltiples estudios se han centrado en evaluar la eficacia de la combinación de NTX, fármaco de referencia en el tratamiento del TUA, con otras herramientas farmacológicas comúnmente empleadas en la deshabitación alcohólica (Lee and Leggio, 2014; Navarrete et al., 2014; Sawicka and Tracy, 2017; Nicholson et al., 2018). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, ninguna combinación ha resultado ser terapéuticamente superior como consecuencia de la elevada variabilidad entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados (Lee and Leggio, 2014). Dada la descrita eficacia del CBD para modular las propiedades reforzantes del etanol, se ha evaluado si la administración conjunta de CBD y NTX podría resultar de interés terapéutico en el tratamiento del TUA. Para ello, se han explorado los efectos de la combinación de dosis subefectivas de NTX (0,7 mg/kg; i.p.) y CBD (20 mg/kg; s.c.) en la autoadministración oral de etanol. La selección de estas dosis se ha realizado teniendo en cuenta estudios previos. En el caso de la NTX, se ha seleccionado la dosis de 0,7 mg/kg (p.o.), dosis considerablemente inferior a la utilizada en la mayoría de estudios, ya que a pesar de ser eficaz en reducir el consumo de etanol en algún trabajo (Navarrete et al., 2014), esta dosis no siempre resulta efectiva (Oliva and Manzanares, 2007). En el caso del CBD, se ha seleccionado una dosis inferior (20 mg/kg; s.c.) a la dosis utilizada (30 mg/kg; s.c.) en el estudio previo que había demostrado ser eficaz en reducir el consumo y la motivación por el etanol (Viudez-Martinez et al., 2018b). Los resultados obtenidos reflejan que la asociación de CBD y NTX reduce tanto el consumo como la motivación por el etanol (número de palancas activas accionadas) en todas las fases de la autoadministración oral de etanol estudiadas (FR1, FR3 y PR). A pesar de que, tanto el CBD (20 mg/kg; s.c.) como la NTX (0,7 mg/kg; p.o.) administrados por separado consiguen reducir el consumo de etanol y el número de palancas activas durante FR1, solamente su asociación es capaz de reducir ambos parámetros conforme se aumenta el esfuerzo necesario para conseguir la recompensa (FR3 y PR). Consecuentemente, este estudio demuestra la superioridad terapéutica de la combinación CBD + NTX frente a la administración de cualquiera

de estos fármacos por separado, sugiriendo así la potencial utilidad de esta asociación en el manejo del TUA.

Para profundizar en los mecanismos neuroquímicos a través de los cuales el CBD ejerce sus efectos sobre las propiedades reforzantes del etanol, se ha analizado mediante qPCR la expresión génica de diferentes dianas implicadas en el sistema de recompensa. Este sistema está integrado por las proyecciones dopaminérgicas del VTA al NAc (Nestler et al., 1993; Koob et al., 1998). Diversos estudios revelan que tras el consumo de alcohol, se produce una activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA, que resulta en una marcada liberación de dopamina en el NAc (Volkow et al., 2007; Mitchell et al., 2012). Este aumento del tono dopaminérgico parece ser dosis-dependiente (Weiss et al., 1993; Weiss et al., 1996) y resulta coherente con la sobreexpresión de la TH, enzima limitante para la síntesis de dopamina, descrita en el VTA de ratones y ratas tras la exposición aguda (Oliva et al., 2008) o crónica a etanol (Ortiz et al., 1995; Lee et al., 2005). Al mismo tiempo, estos cambios parecen estar regulados mediante el sistema opioide endógeno. Concretamente, las  $\beta$ -endorfinas y las encefalinas producen un aumento de la liberación de dopamina en el NAc a través de la activación de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  tras la ingesta de etanol, por lo que las alteraciones en estas dianas también tienen una repercusión directa en el sistema de recompensa (Koob, 1992). En base a esta evidencia, se ha estudiado la expresión de TH en el VTA y del Oprm1 en el NAc de ratones tratados con CBD y sometidos a las pruebas de consumo voluntario y autoadministración oral de etanol. En todos los estudios realizados se ha observado que el CBD (30 mg/kg; i.p.) reduce la expresión de TH en el VTA, independientemente del patrón de consumo de etanol analizado (consumo voluntario y autoadministración oral). Estos resultados concuerdan con estudios previos, en los que se demuestra que la reducción de la TH es característica de fármacos que modulan el consumo de etanol (Jacobsen et al., 2018). En el estudio de la asociación CBD + NTX, la reducción observada tras la administración conjunta de ambos fármacos fue más significativa (-50%) que la producida por el CBD (-35%). A diferencia de los resultados obtenidos en estudios previos realizados por nuestro grupo (Navarrete et al., 2014), no se ha observado ninguna alteración de la expresión de la TH en el VTA de los ratones tratados únicamente con NTX. Esta discrepancia podría deberse, al menos en parte, a que las dosis subefectivas de NTX empleadas en este estudio no siempre resultan eficaces a la hora de reducir el consumo de etanol en roedores (Oliva and Manzanares, 2007) y a las diferencias en el fondo genético de los animales empleados en cada estudio (C57BL/6 OlaHsd en el estudio de

(Navarrete et al., 2014) y C57BL/6J en los realizados en la presente tesis (Viudez-Martinez et al., 2018a; Viudez-Martinez et al., 2018b).

En el caso del Oprm1, se ha observado una disminución de su expresión génica en los animales tratados con CBD, solo o en combinación con NTX. Estos resultados coinciden con los datos publicados en un estudio reciente, en el que se observa que la administración de CBD es capaz de reducir la expresión de Oprm1 en ratones tratados con CP-55,940, un agonista del rCB<sub>1</sub> (Navarrete et al., 2018a). Asimismo, son coherentes con los resultados obtenidos previamente por Kathmann y colaboradores, en los que se muestra la capacidad del CBD para actuar como modulador alostérico de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  opioides (Kathmann et al., 2006). Cabe destacar que determinados fármacos aprobados para el tratamiento del TUA, como la NTX, actúan a través de este receptor. En su conjunto estas evidencias demuestran que los efectos del CBD sobre las propiedades reforzantes del etanol podrían deberse, en parte, a su acción a través de este receptor.

Considerando el creciente número de estudios que señalan la implicación del sistema cannabinoide endógeno en el TUA (Rodríguez de Fonseca et al., 1999; Onaivi et al., 2008a; Onaivi et al., 2008b; Ortega-Alvaro et al., 2015; Liu et al., 2017) y la posible acción directa e indirecta del CBD sobre sus principales receptores (rCB<sub>1</sub> y rCB<sub>2</sub>) (Ibeas Bih et al., 2015; Kinghorn et al., 2017), también se han analizado los efectos del CBD sobre estas dianas en el NAc de ratones expuestos a los modelos de consumo de etanol descritos anteriormente.

En primer lugar, el tratamiento con CBD reduce la expresión génica del rCB<sub>1</sub>. Estos datos coinciden con un estudio previo publicado por Ren y colaboradores, en el que se muestra como el CBD disminuye la expresión de este receptor en el NAc de ratas expuestas a la autoadministración de heroína (Ren et al., 2009). Asimismo resultan coherentes con los resultados derivados de otras investigaciones, donde se propone que el CBD podría actuar como modulador alostérico no competitivo del rCB<sub>1</sub>, alterando la hidrólisis de AEA por inhibición de la FAAH (Bisogno et al., 2001; Laprairie et al., 2015).

En relación al rCB<sub>2</sub>, se produce un aumento de su expresión en el NAc de los ratones tratados con CBD. Este resultado indica que el CBD podría bloquear el descenso de rCB<sub>2</sub> observado tras el consumo de etanol (Sanchez-Marin et al., 2017). Además, teniendo en cuenta que la ausencia de rCB<sub>2</sub> se ha relacionado con una mayor vulnerabilidad por el consumo de etanol (Ortega-Alvaro et al., 2015), los datos derivados de este estudio permiten inferir que los efectos del CBD sobre las propiedades reforzantes del etanol también podrían estar regulados por los efectos de este fármaco sobre el rCB<sub>2</sub>.

Otro de los receptores sobre los que actúan los cannabinoides endógenos es el GPR55, que además parece ser uno de los principales sustratos descritos para el CBD (Kinghorn et al., 2017). En este trabajo se puede comprobar como el CBD reduce la expresión del GPR55 en el NAc en el consumo voluntario y la autoadministración de etanol. Estos hallazgos son coherentes con los publicados recientemente por Agudelo y colaboradores, en los que se muestra una alteración en la expresión del GPR55 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes alcohólicos (Agudelo et al., 2013), reforzando así la potencial implicación de este receptor en el proceso de adicción al alcohol.

Durante las últimas décadas, diferentes estudios han demostrado la implicación del sistema serotoninérgico en el TUA (Sellers et al., 1992; Kelai et al., 2003; Koob, 2003). En este sentido, se ha propuesto que la región del DR podría desempeñar un papel importante en el procesamiento de los estímulos reforzantes, dado el elevado número de proyecciones serotoninérgicas que proceden de esta región cerebral (Simon et al., 1976; Rompre and Miliaressis, 1985) y forman conexiones con distintas estructuras de la vía de recompensa (Peyron et al., 1998; Johnson, 2004; Liu et al., 2014; Ogawa et al., 2014; Weissbourd et al., 2014). Análogamente, se ha observado como el consumo prolongado de etanol produce alteraciones significativas en la homeostasis de 5-HT a nivel central como consecuencia de la supersensibilidad del 5-HT<sub>1A</sub> en el DR (Kelai et al., 2008). Asimismo, la modulación farmacológica de este receptor mediante agonistas parciales reduce el consumo de alcohol (Hedlund and Wahlstrom, 1996; Belmer et al., 2018). Este dato resulta de especial interés, ya que el CBD ha sido propuesto como un posible agonista o modulador alostérico del 5-HT<sub>1A</sub> (Ibeas Bih et al., 2015; Kinghorn et al., 2017). Por este motivo, se ha analizado la expresión de este receptor en el DR de los ratones empleados en el estudio de la combinación CBD + NTX. El tratamiento con CBD, solo o en combinación con NTX, reduce la expresión génica del 5-HT<sub>1A</sub> en el DR. Sin embargo, no hay ninguna modificación en el grupo tratado únicamente con NTX. Estos datos están en consonancia con estudios previos en los que se muestra que el CBD puede actuar como modulador alostérico del 5-HT<sub>1A</sub> (Russo et al., 2005; Campos et al., 2012).

En base a los cambios observados hasta el momento como consecuencia del tratamiento con CBD (disminución de TH en VTA y de 5-HT<sub>1A</sub> en DR, reducción de Oprm1, rCB<sub>1</sub> y GPR55 y aumento del rCB<sub>2</sub> en el NAc) se ha diseñado un estudio farmacológico empleando la autoadministración oral de etanol para profundizar en el mecanismo de acción por el cual el CBD parece modular las propiedades reforzantes del etanol. El tratamiento previo con WAY100635, antagonista del 5-HT<sub>1A</sub>, bloquea los efectos inducidos por la combinación CBD+NTX (reducción

de la motivación y el consumo de etanol), sin presentar acción por sí mismo. Estos datos están de acuerdo con el estudio previo realizado por Kastidoni y colaboradores, en el que el pretratamiento con WAY100635 evita los efectos del CBD sobre la autoadministración intracerebral de morfina (Katsidoni et al., 2013). En su conjunto, estos resultados confirman que el efecto terapéutico del CBD sobre las propiedades reforzantes del etanol parece estar regulado, al menos en parte, por el receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

Durante los últimos años se ha registrado una evolución en el patrón de consumo de alcohol, siendo cada vez más comunes ciertos patrones de consumo de riesgo, entendidos como aquellos en los que la ingesta de alcohol supera los límites del consumo prudente (Gunzerath et al., 2004). Un claro ejemplo de esto es el aumento de frecuencia del consumo de alcohol en atracón o “binge drinking” (Soler-Vila et al., 2014; Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2014), caracterizado por la ingesta de 5 bebidas alcohólicas o más en el caso de los hombres, y 4 o más en el de las mujeres, en un lapso de tiempo inferior a 2 horas. Este incremento de la prevalencia de “binge drinking” es especialmente notable entre la población adolescente (Hermens and Lagopoulos, 2018), ya que el 75% de los entrevistados en la encuesta EDADES admite haber consumido alcohol durante el último año y un 22,2% lo ha hecho en forma atracón en los últimos 30 días (Observatorio Español de la Droga y las Adicciones, 2016). Estos datos son altamente preocupantes considerando que este tipo de consumo resulta especialmente perjudicial para los adolescentes cuyo sistema nervioso está en fase de maduración (Dir et al., 2017) y aumenta el riesgo de desarrollar TUA durante la etapa adulta (Hingson et al., 2006b, a). Por otro lado, las diferencias en función del sexo respecto a este tipo de patrones de consumo han cobrado una gran importancia. Diversos autores han descrito que las mujeres progresan de un consumo en atracón a TUA de manera más rápida que los hombres (Becker et al., 2012) y que existe una mayor vulnerabilidad a la hora de desarrollar trastornos psiquiátricos atribuibles al consumo de alcohol en mujeres (Erol and Karpyak, 2015; Dir et al., 2017). En base a esta evidencia, el último objetivo de esta tesis ha sido evaluar la potencial utilidad del CBD en un patrón de consumo en atracón en ratones de ambos sexos. Los datos obtenidos en este estudio muestran como las hembras consumen una mayor cantidad de etanol que los machos, reforzando así los resultados publicados por otros autores en los que se pone de manifiesto la influencia del sexo en la ingesta de etanol (Melon et al., 2013; Satta et al., 2018). Esta divergencia también fue evidente en los análisis de expresión génica, donde se registran unos valores de TH en el VTA y del Oprm1 en el NAc más elevados en hembras, que podrían ser debidos al mayor consumo de etanol detectado en los estudios de conducta. Cabe destacar que, previamente otros

autores han descrito una regulación diferencial de los sistemas dopaminérgico y opioide endógeno entre ambos sexos (Gillies et al., 2014; Dir et al., 2017), que resulta coherente con los datos obtenidos en este estudio. Puesto que el CBD parece actuar sobre las propiedades reforzantes del etanol modulando estas dianas, parece plausible hipotetizar que las diferencias entre machos y hembras podrían resultar especialmente significativas para observar un efecto terapéutico. Para dilucidar si esta hipótesis es correcta, se han evaluado los efectos de la administración aguda y repetida de CBD sobre el consumo de etanol en atracón en ratones macho y hembra. A pesar de que el tratamiento agudo con este fármaco no produce ningún efecto relevante sobre la conducta de los roedores, la administración repetida de CBD es capaz de reducir notablemente el “binge drinking” en machos, así como la expresión de la TH en el VTA y del Oprm1 en el NAc. En contraposición, no se observa ningún cambio significativo en el consumo o en la expresión génica de ambas dianas en las hembras. En base a estas evidencias, parece sensato inferir que las diferencias descritas por otros autores, respecto a los sistemas dopaminérgico y opioidérgico entre ambos sexos, podrían condicionar la respuesta terapéutica al CBD. Esta afirmación refuerza la idea propuesta por Becker y colaboradores, quienes sugieren que los tratamientos que actúan sobre dianas relacionadas con estos sistemas de neurotransmisión podrían tener un efecto diferencial en función del sexo del sujeto (Becker et al., 2012).

En resumen, los resultados presentados en esta tesis ponen de manifiesto la potencial utilidad terapéutica del CBD en el TUA. La administración de este cannabinoide reduce la preferencia, el consumo, la motivación y la recaída a etanol en roedores, a la vez que modifica la expresión génica de diversas dianas implicadas en el proceso de adicción alcohólica (TH en VTA, Oprm1, rCB<sub>1</sub>, rCB<sub>2</sub> y GPR55 en NAc y 5-HT<sub>1A</sub> en DR). Estos efectos sobre las propiedades reforzantes del etanol parecen estar mediados, al menos en parte, por el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, pues tras el tratamiento previo con un antagonista, la administración de CBD no presenta ninguna acción observable en la prueba de autoadministración oral de etanol. Por último, la capacidad del CBD para reducir el consumo de etanol en un modelo de atracón en roedores termina de completar el cuerpo de evidencia que avala que este fármaco puede resultar de potencial interés en el tratamiento del TUA.









Los resultados de la presente tesis suponen el primer paso para el desarrollo de estudios clínicos sobre la potencialidad terapéutica del CBD en el tratamiento de TUA en humanos. Teniendo en cuenta que el CBD ya se encuentra aprobado por la AEM y la FDA para el tratamiento de la espasticidad en esclerosis múltiple (Sativex®, CBD:THC, 1:1) y recientemente para diferentes síndromes epilépticos en niños (Epidolex®), y su buen perfil de seguridad, ya que no se han descrito efectos adversos destacables, se hace factible realizar un estudio piloto que permita obtener datos preliminares sobre la eficacia del CBD en pacientes que presentan TUA.

De manera complementaria, otras líneas a explorar sería evaluar la utilidad del CBD en otros TUS, como opioides y cocaína, algunas de las cuales ya se han empezado a estudiar en nuestro laboratorio.

Además, también se evaluará la capacidad del CBD de modular la ansiedad y depresión, patologías que presentan una alta comorbilidad con los TUS, como el TUA.



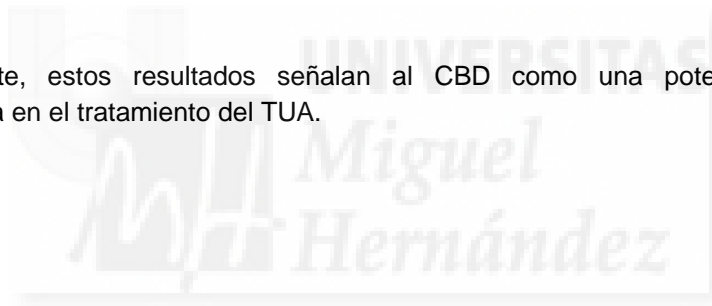




1.



2. El CBD no se comporta como una sustancia de abuso, por lo que su acción terapéutica sobre otras drogas no parece deberse a sus propiedades reforzantes intrínsecas.
3. La administración de CBD reduce el consumo, la preferencia, la motivación y la recaída al etanol en diferentes paradigmas experimentales en roedores.
4. El tratamiento con CBD evita que se produzcan los efectos fisiológicos inducidos por el etanol sin alterar su concentración plasmática, lo que permite afirmar que la acción del CBD no se debe a una interferencia en el proceso de absorción o de metabolización del etanol.
5. La administración de dosis subefectivas de la asociación de CBD con NTX reduce más significativamente la motivación y el consumo de etanol que cualquiera de los dos fármacos por separado.
6. La administración repetida de CBD reduce la ingesta de etanol en forma de atracón.
7. El tratamiento con CBD modula la expresión de diferentes dianas cerebrales implicadas en el proceso de adicción a alcohol (TH en VTA, Oprm1, rCB<sub>1</sub>, rCB<sub>2</sub> y GPR55 en NAc y 5-HT<sub>1A</sub> en DR).
8. Conjuntamente, estos resultados señalan al CBD como una potencial herramienta farmacológica en el tratamiento del TUA.











Abrams DI, Hilton JF, Leiser RJ, Shade SB, Elbeik TA, Aweeka FT, Benowitz NL, Bredt BM, Kosel B, Aberg JA, Deeks SG, Mitchell TF, Mulligan K, Bacchetti P, McCune JM, Schambelan M (2003) Short-term effects of cannabinoids in patients with HIV-1 infection: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Ann Intern Med* 139:258-266.

Adams R, Hunt M, Clark JH (1940) Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marihuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I. *Journal of the American Chemical Society* 62:196-200.

Agartz I, Momenan R, Rawlings RR, Kerich MJ, Hommer DW (1999) Hippocampal volume in patients with alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 56:356-363.

Agudelo M, Yndart A, Morrison M, Figueroa G, Munoz K, Samikkannu T, Nair MP (2013) Differential expression and functional role of cannabinoid genes in alcohol users. *Drug Alcohol Depend* 133:789-793.

Al Mansouri S, Ojha S, Al Maamari E, Al Ameri M, Nurulain SM, Bahi A (2014) The cannabinoid receptor 2 agonist, beta-caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 124:260-268.

Alele PE, Devaud LL (2005) Differential adaptations in GABAergic and glutamatergic systems during ethanol withdrawal in male and female rats. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1027-1034.

American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV*. Fourth edition. Washington, DC : American Psychiatric Association, [1994] ©1994.

American Psychiatric Association (2013) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5*. 5th ed ed. American Psychiatric Association: Arlington, Va.

Anton RF (1999) What is craving? Models and implications for treatment. *Alcohol Res Health* 23:165-173.

Anton RF, Myrick H, Wright TM, Latham PK, Baros AM, Waid LR, Randall PK (2011) Gabapentin combined with naltrexone for the treatment of alcohol dependence. *Am J Psychiatry* 168:709-717.

Aracil-Fernandez A, Almela P, Manzanares J (2013) Pregabalin and topiramate regulate behavioural and brain gene transcription changes induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. *Addict Biol* 18:252-262.

Arnone M, Maruani J, Chaperon F, Thiebot MH, Poncelet M, Soubrie P, Le Fur G (1997) Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 132:104-106.

Aviello G, Romano B, Borrelli F, Capasso R, Gallo L, Piscitelli F, Di Marzo V, Izzo AA (2012) Chemopreventive effect of the non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. *J Mol Med (Berl)* 90:925-934.

Azar MM, Springer SA, Meyer JP, Altice FL (2010) A systematic review of the impact of alcohol use disorders on HIV treatment outcomes, adherence to antiretroviral therapy and health care utilization. *Drug Alcohol Depend* 112:178-193.

Baliunas D, Rehm J, Irving H, Shuper P (2010) Alcohol consumption and risk of incident human immunodeficiency virus infection: a meta-analysis. *Int J Public Health* 55:159-166.

Bart G, Schluger JH, Borg L, Ho A, Bidlack JM, Kreek MJ (2005) Nalmefene induced elevation in serum prolactin in normal human volunteers: partial kappa opioid agonist activity? *Neuropsychopharmacology* 30:2254-2262.

Bauer J, Pedersen A, Scherbaum N, Bening J, Patschke J, Kugel H, Heindel W, Arolt V, Ohrmann P (2013) Craving in alcohol-dependent patients after detoxification is related to glutamatergic dysfunction in the nucleus accumbens and the anterior cingulate cortex. *Neuropsychopharmacology* 38:1401-1408.

Becker JB, Perry AN, Westenbroek C (2012) Sex differences in the neural mechanisms mediating addiction: a new synthesis and hypothesis. *Biol Sex Differ* 3:14.

Belmer A, Patkar OL, Lanoue V, Bartlett SE (2018) 5-HT<sub>1A</sub> receptor-dependent modulation of emotional and neurogenic deficits elicited by prolonged consumption of alcohol. *Sci Rep* 8:2099.

Beresford TP, Arciniegas DB, Alfers J, Clapp L, Martin B, Du Y, Liu D, Shen D, Davatzikos C (2006) Hippocampus volume loss due to chronic heavy drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1866-1870.

Bergamaschi MM, Queiroz RH, Chagas MH, de Oliveira DC, De Martinis BS, Kapczinski F, Quevedo J, Roesler R, Schroder N, Nardi AE, Martin-Santos R, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA (2011) Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. *Neuropsychopharmacology* 36:1219-1226.

Bhargava HN (1976) Effect of some cannabinoids on naloxone-precipitated abstinence in morphine-dependent mice. *Psychopharmacology (Berl)* 49:267-270.

Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134:845-852.

Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V (2005) The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81:224-238.

Blegen MB, da Silva ESD, Bock R, Morisot N, Ron D, Alvarez VA (2018) Alcohol operant self-administration: Investigating how alcohol-seeking behaviors predict drinking in mice using two operant approaches. *Alcohol* 67:23-36.

Blessing EM, Steenkamp MM, Manzanares J, Marmar CR (2015) Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics* 12:825-836.

Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, Gong J, Schluger J, Strong JA, Leal SM, Tischfield JA, Kreek MJ, Yu L (1998) Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9608-9613.

Bracey MH, Hanson MA, Masuda KR, Stevens RC, Cravatt BF (2002) Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science* 298:1793-1796.

Braillon A (2014) Nalmefene in alcohol misuse: junk evaluation by the European Medicines Agency. *BMJ* 348:g2017.

Brewer RD, Swahn MH (2005) Binge drinking and violence. *JAMA* 294:616-618.

Brunetti M, Di Tizio L, Dezi S, Pozzi G, Grandinetti P, Martinotti G (2012) Aripiprazole, alcohol and substance abuse: a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16:1346-1354.

Burstein S (2015) Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorg Med Chem* 23:1377-1385.

Caine SB, Negus SS, Mello NK, Patel S, Bristow L, Kulagowski J, Vallone D, Saiardi A, Borrelli E (2002) Role of dopamine D<sub>2</sub>-like receptors in cocaine self-administration: studies with D<sub>2</sub> receptor mutant mice and novel D<sub>2</sub> receptor antagonists. *J Neurosci* 22:2977-2988.

- Cami J, Farre M (2003) Drug addiction. *N Engl J Med* 349:975-986.
- Campos AC, Ferreira FR, Guimaraes FS (2012) Cannabidiol blocks long-lasting behavioral consequences of predator threat stress: possible involvement of 5HT1A receptors. *J Psychiatr Res* 46:1501-1510.
- Cannon CM, Palmiter RD (2003) Reward without dopamine. *J Neurosci* 23:10827-10831.
- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol* 2:69-82.
- Carlson NR (2013) *Physiology of behavior*. Eleventh ed. Pearson: Boston.
- Castillo A, Tolon MR, Fernandez-Ruiz J, Romero J, Martinez-Orgado J (2010) The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis* 37:434-440.
- Ceprian M, Jimenez-Sanchez L, Vargas C, Barata L, Hind W, Martinez-Orgado J (2017) Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery in a neonatal rat model of arterial ischemic stroke. *Neuropharmacology* 116:151-159.
- Colombo G, Agabio R, Fa M, Guano L, Lobina C, Loche A, Reali R, Gessa GL (1998) Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR-141716. *Alcohol Alcohol* 33:126-130.
- Colombo G, Serra S, Brunetti G, Gomez R, Melis S, Vacca G, Carai MM, Gessa L (2002) Stimulation of voluntary ethanol intake by cannabinoid receptor agonists in ethanol-preferring sP rats. *Psychopharmacology (Berl)* 159:181-187.
- Cook SA, Lowe JA, Martin BR (1998) CB1 receptor antagonist precipitates withdrawal in mice exposed to Delta9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther* 285:1150-1156.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:83-87.
- Crippa JA, Derenusson GN, Ferrari TB, Wichert-Ana L, Duran FL, Martin-Santos R, Simoes MV, Bhattacharyya S, Fusar-Poli P, Atakan Z, Santos Filho A, Freitas-Ferrari MC, McGuire PK, Zuardi AW, Busatto GF, Hallak JE (2011) Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. *J Psychopharmacol* 25:121-130.
- Croissant B, Loeber S, Diehl A, Nakovics H, Wagner F, Kiefer F, Mann K (2009) Oxcarbazepine in combination with Tiaprid in inpatient alcohol-withdrawal--a RCT. *Pharmacopsychiatry* 42:175-181.
- Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA (2006) Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc* 1:1662-1670.
- Cunningham CL, Howard MA, Gill SJ, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK (2000) Ethanol-conditioned place preference is reduced in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Pharmacol Biochem Behav* 67:693-699.
- Chakrabarti A, Onaivi ES, Chaudhuri G (1995) Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq* 5:385-388.
- Chamorro AJ, Marcos M, Miron-Canelo JA, Pastor I, Gonzalez-Sarmiento R, Laso FJ (2012) Association of micro-opioid receptor (OPRM1) gene polymorphism with response to naltrexone in alcohol dependence: a systematic review and meta-analysis. *Addict Biol* 17:505-512.

Chen YC, Holmes A (2009) Effects of topiramate and other anti-glutamatergic drugs on the acute intoxicating actions of ethanol in mice: modulation by genetic strain and stress. *Neuropsychopharmacology* 34:1454-1466.

Chick J, Leher P, Landron F, Plinius Maior S (2003) Does acamprosate improve reduction of drinking as well as aiding abstinence? *J Psychopharmacol* 17:397-402.

da Silva VK, de Freitas BS, da Silva Dornelles A, Nery LR, Falavigna L, Ferreira RD, Bogo MR, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Schroder N (2014) Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNM1L expression levels in rats with brain iron overload: implications for neuroprotection. *Molecular neurobiology* 49:222-233.

de Almeida J, Mengod G (2008) Serotonin 1A receptors in human and monkey prefrontal cortex are mainly expressed in pyramidal neurons and in a GABAergic interneuron subpopulation: implications for schizophrenia and its treatment. *J Neurochem* 107:488-496.

de Mello Schier AR, de Oliveira Ribeiro NP, Coutinho DS, Machado S, Arias-Carrion O, Crippa JA, Zuardi AW, Nardi AE, Silva AC (2014) Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of cannabidiol: a chemical compound of *Cannabis sativa*. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13:953-960.

de Moraes H, Chaves YC, Waltrick APF, Jesus CHA, Genaro K, Crippa JA, da Cunha JM, Zanoveli JM (2018) Sub-chronic treatment with cannabidiol but not with URB597 induced a mild antidepressant-like effect in diabetic rats. *Neurosci Lett* 682:62-68.

De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allara M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V (2011) Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched *Cannabis* extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol* 163:1479-1494.

De Witte P, Pinto E, Anseau M, Verbanck P (2003) Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues. *Neurosci Biobehav Rev* 27:189-197.

Derocq JM, Segui M, Marchand J, Le Fur G, Casellas P (1995) Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations. *FEBS Lett* 369:177-182.

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

Devinsky O, Patel AD, Cross JH, Villanueva V, Wirrell EC, Privitera M, Greenwood SM, Roberts C, Checketts D, VanLandingham KE, Zuberi SM, Group GS (2018) Effect of Cannabidiol on Drop Seizures in the Lennox-Gastaut Syndrome. *N Engl J Med* 378:1888-1897.

Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274-5278.

Ding ZM, Rodd ZA, Engleman EA, McBride WJ (2009) Sensitization of ventral tegmental area dopamine neurons to the stimulating effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 33:1571-1581.

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10819-10824.

Dir AL, Bell RL, Adams ZW, Hulvershorn LA (2017) Gender Differences in Risk Factors for Adolescent Binge Drinking and Implications for Intervention and Prevention. *Front Psychiatry* 8:289.

Dodd PR, Beckmann AM, Davidson MS, Wilce PA (2000) Glutamate-mediated transmission, alcohol, and alcoholism. *Neurochem Int* 37:509-533.

Donoghue K, Elzerbi C, Saunders R, Whittington C, Pilling S, Drummond C (2015) The efficacy of acamprosate and naltrexone in the treatment of alcohol dependence, Europe versus the rest of the world: a meta-analysis. *Addiction* 110:920-930.

El-Alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, Khan I, ElSohly M, Ross S (2010) Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav* 95:434-442.

El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, Tsai NT, Caldwell RB, Liou GI (2006) Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol* 168:235-244.

Erol A, Karpyak VM (2015) Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: Contemporary knowledge and future research considerations. *Drug Alcohol Depend* 156:1-13.

Esposito G, De Filippis D, Carnuccio R, Izzo AA, Iuvone T (2006) The marijuana component cannabidiol inhibits beta-amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/beta-catenin pathway rescue in PC12 cells. *J Mol Med (Berl)* 84:253-258.

F. Skinner B (1938) *The behavior of organisms: An experimental analysis*.

Fadda F, Garau B, Marchei F, Colombo G, Gessa GL (1991) MDL 72222, a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, suppresses voluntary ethanol consumption in alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol* 26:107-110.

Fadda P, Tronci S, Colombo G, Fratta W (1999) Differences in the opioid system in selected brain regions of alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rats. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1296-1305.

FDA (2018) FDA approves first drug comprised of an active ingredient derived from marijuana to treat rare, severe forms of epilepsy.

Femenia T, Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J (2010) CB1 receptor blockade decreases ethanol intake and associated neurochemical changes in fawn-hooded rats. *Alcohol Clin Exp Res* 34:131-141.

Femenia T, Manzanares J (2012) Increased ethanol intake in prodynorphin knockout mice is associated to changes in opioid receptor function and dopamine transmission. *Addict Biol* 17:322-337.

Fils-Aime ML, Eckardt MJ, George DT, Brown GL, Mefford I, Linnoila M (1996) Early-onset alcoholics have lower cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid levels than late-onset alcoholics. *Arch Gen Psychiatry* 53:211-216.

Finney JW, Hahn AC, Moos RH (1996) The effectiveness of inpatient and outpatient treatment for alcohol abuse: the need to focus on mediators and moderators of setting effects. *Addiction* 91:1773-1796; discussion 1803-1720.

Fitzgerald N, Angus K, Elders A, de Andrade M, Raistrick D, Heather N, McCambridge J (2016) Weak evidence on nalmefene creates dilemmas for clinicians and poses questions for regulators and researchers. *Addiction* 111:1477-1487.

Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E, Biggio G (2006) Neurosteroids, GABA<sub>A</sub> receptors, and ethanol dependence. *Psychopharmacology (Berl)* 186:267-280.

Franklin KM, Engleman EA, Ingraham CM, McClaren JA, Keith CM, McBride WJ, Murphy JM (2009) A single, moderate ethanol exposure alters extracellular dopamine levels and dopamine D receptor function in the nucleus accumbens of wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res* 33:1721-1730.

Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017-1066.

Froehlich JC, Hausauer BJ, Rasmussen DD (2013) Combining naltrexone and prazosin in a single oral medication decreases alcohol drinking more effectively than does either drug alone. *Alcohol Clin Exp Res* 37:1763-1770.

Fusar-Poli P, Crippa JA, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Allen P, Martin-Santos R, Seal M, Surguladze SA, O'Carroll C, Atakan Z, Zuardi AW, McGuire PK (2009) Distinct effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. *Arch Gen Psychiatry* 66:95-105.

Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society* 86:1646-1647.

Gaoni Y, Mechoulam R (1971) Isolation and structure of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *Journal of the American Chemical Society* 93:217-224.

Garbutt JC, West SL, Carey TS, Lohr KN, Crews FT (1999) Pharmacological treatment of alcohol dependence: a review of the evidence. *JAMA* 281:1318-1325.

Garcia-Arencibia M, Gonzalez S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J (2007) Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res* 1134:162-170.

Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J (2011) Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J Psychopharmacol* 25:111-120.

Garcia-Gutierrez MS, Perez-Ortiz JM, Gutierrez-Adan A, Manzanares J (2010) Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br J Pharmacol* 160:1773-1784.

Gass JT, Olive MF (2008) Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 75:218-265.

Giedd JN (2004) Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci* 1021:77-85.

Gillies GE, Virdee K, McArthur S, Dalley JW (2014) Sex-dependent diversity in ventral tegmental dopaminergic neurons and developmental programming: A molecular, cellular and behavioral analysis. *Neuroscience* 282:69-85.

Glass M, Dragunow M, Faull RL (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77:299-318.

Gobierno de Canada. (2018) Controlled Drugs and Substance Act. Disponible en: <http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/C-38.8.pdf>. Último acceso en: 31 de julio de 2018.

Gobierno de Estados Unidos. (1970) Comprehensive Drug Abuse Prevention and Control Act of 1970. Available at: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/STATUTE-84/pdf/STATUTE-84-Pg1236.pdf>. Último acceso: 31 de julio de 2018.

Gobira PH, Vilela LR, Goncalves BD, Santos RP, de Oliveira AC, Vieira LB, Aguiar DC, Crippa JA, Moreira FA (2015) Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. *Neurotoxicology* 50:116-121.

Goldstein DB (1972) An animal model for testing effects of drugs on alcohol withdrawal reactions. *J Pharmacol Exp Ther* 183:14-22.

Goldstein RZ, Volkow ND (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* 159:1642-1652.



Gomes FV, Resstel LB, Guimaraes FS (2011) The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 213:465-473.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006) Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071:10-23.

Gonzalez-Cuevas G, Martin-Fardon R, Kerr TM, Stouffer DG, Parsons LH, Hammell DC, Banks SL, Stinchcomb AL, Weiss F (2018) Unique treatment potential of cannabidiol for the prevention of relapse to drug use: preclinical proof of principle. *Neuropsychopharmacology*.

Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, Martin BR, Abood ME (1999) Evaluation of the cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol* 377:117-125.

Guardia Serecigni J, Jiménez Arriero MÁ, Bobes García J (2008) *Alcoholismo : guías clínicas Sociodrogalcohol basadas en la evidencia científica*. 2a. ed ed. Sociodrogalcohol: Barcelona.

Guglielmo R, Martinotti G, Quatralo M, Iacono L, Kadilli I, Di Nicola M, Janiri L (2015) Topiramate in Alcohol Use Disorders: Review and Update. *CNS Drugs* 29:383-395.

Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF (2004) Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 20:441-458.

Gunzerath L, Faden V, Zakhari S, Warren K (2004) National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism report on moderate drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 28:829-847.

Gururajan A, Taylor DA, Malone DT (2011) Effect of cannabidiol in a MK-801-rodent model of aspects of schizophrenia. *Behav Brain Res* 222:299-308.

Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998) Cannabidiol and (-)-Delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8268-8273.

Hayakawa K, Irie K, Sano K, Watanabe T, Higuchi S, Enoki M, Nakano T, Harada K, Ishikane S, Ikeda T, Fujioka M, Orito K, Iwasaki K, Mishima K, Fujiwara M (2009) Therapeutic time window of cannabidiol treatment on delayed ischemic damage via high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Biol Pharm Bull* 32:1538-1544.

Hayakawa K, Mishima K, Hazekawa M, Sano K, Irie K, Orito K, Egawa T, Kitamura Y, Uchida N, Nishimura R, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M (2008a) Cannabidiol potentiates pharmacological effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol via CB(1) receptor-dependent mechanism. *Brain research* 1188:157-164.

Hayakawa K, Mishima K, Irie K, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, Orito K, Egashira N, Katsurabayashi S, Takasaki K, Iwasaki K, Fujiwara M (2008b) Cannabidiol prevents a post-ischemic injury progressively induced by cerebral ischemia via a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Neuropharmacology* 55:1280-1286.

Hedlund L, Wahlstrom G (1996) Buspirone as an inhibitor of voluntary ethanol intake in male rats. *Alcohol* 31:149-156.

Heim ME, Queisser W, Altenburg HP (1984) Randomized crossover study of the antiemetic activity of levonantradol and metoclopramide in cancer patients receiving chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 13:123-125.

Hendershot CS, Stoner SA, Pantalone DW, Simoni JM (2009) Alcohol use and antiretroviral adherence: review and meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52:180-202.

Hensler JG, Ladenheim EE, Lyons WE (2003) Ethanol consumption and serotonin-1A (5-HT<sub>1A</sub>) receptor function in heterozygous BDNF (+/-) mice. *J Neurochem* 85:1139-1147.

Herkenham M, Groen BG, Lynn AB, De Costa BR, Richfield EK (1991) Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum. *Brain Res* 552:301-310.

Hermens DF, Lagopoulos J (2018) Binge Drinking and the Young Brain: A Mini Review of the Neurobiological Underpinnings of Alcohol-Induced Blackout. *Front Psychol* 9:12.

Hermos JA, Winter MR, Heeren TC, Hingson RW (2008) Early Age-of-onset Drinking Predicts Prescription Drug Misuse Among Teenagers and Young Adults: Results from a National Survey. *J Addict Med* 2:22-30.

Hernán Pérez de la Ossa D, Ligresti, A., Gil-Alegre, M.E., Aberturas, M.R., Molpeceres, J., Di Marzo, V. et al. (2012) Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. *Journal of Controlled Release* 161 927–932

Herz A (1998) Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse? *Can J Physiol Pharmacol* 76:252-258.

Hillard CJ (2015) The Endocannabinoid Signaling System in the CNS: A Primer. *Int Rev Neurobiol* 125:1-47.

Hillmer AT, Mason GF, Fucito LM, O'Malley SS, Cosgrove KP (2015) How Imaging Glutamate, gamma-Aminobutyric Acid, and Dopamine Can Inform the Clinical Treatment of Alcohol Dependence and Withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 39:2268-2282.

Hillmer AT, Wooten DW, Tudorascu DL, Barnhart TE, Ahlers EO, Resch LM, Larson JA, Converse AK, Moore CF, Schneider ML, Christian BT (2014) The effects of chronic alcohol self-administration on serotonin-1A receptor binding in nonhuman primates. *Drug Alcohol Depend* 144:119-126.

Hingson RW, Heeren T, Winter MR (2006a) Age at drinking onset and alcohol dependence: age at onset, duration, and severity. *Arch Pediatr Adolesc Med* 160:739-746.

Hingson RW, Heeren T, Winter MR (2006b) Age of alcohol-dependence onset: associations with severity of dependence and seeking treatment. *Pediatrics* 118:e755-763.

Hirvonen J, Zanotti-Fregonara P, Umhau JC, George DT, Rallis-Frutos D, Lyoo CH, Li CT, Hines CS, Sun H, Terry GE, Morse C, Zoghbi SS, Pike VW, Innis RB, Heilig M (2013) Reduced cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor binding in alcohol dependence measured with positron emission tomography. *Mol Psychiatry* 18:916-921.

Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD (2005) Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature* 438:854-857.

Holbrook AM, Crowther R, Lotter A, Cheng C, King D (1999) Meta-analysis of benzodiazepine use in the treatment of acute alcohol withdrawal. *CMAJ* 160:649-655.

Holmes A, Spanagel R, Krystal JH (2013) Glutamatergic targets for new alcohol medications. *Psychopharmacology (Berl)* 229:539-554.

Hollerman JR, Schultz W (1998) Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. *Nat Neurosci* 1:304-309.

Hungund BL, Szakall I, Adam A, Basavarajappa BS, Vadasz C (2003) Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 84:698-704.

Hurd YL, Yoon M, Manini AF, Hernandez S, Olmedo R, Ostman M, Jutras-Aswad D (2015) Early Phase in the Development of Cannabidiol as a Treatment for Addiction: Opioid Relapse Takes Initial Center Stage. *Neurotherapeutics* 12:807-815.

Hutcheson DM, Tzavara ET, Smadja C, Valjent E, Roques BP, Hanoune J, Maldonado R (1998) Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol* 125:1567-1577.

Hutchison KE, Ray L, Sandman E, Rutter MC, Peters A, Davidson D, Swift R (2006) The effect of olanzapine on craving and alcohol consumption. *Neuropsychopharmacology* 31:1310-1317.

Ibeas Bih C, Chen T, Nunn AV, Bazelat M, Dallas M, Whalley BJ (2015) Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics* 12:699-730.

Iseger TA, Bossong MG (2015) A systematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans. *Schizophr Res* 162:153-161.

Ishiguro H, Horiuchi Y, Ishikawa M, Koga M, Imai K, Suzuki Y, Morikawa M, Inada T, Watanabe Y, Takahashi M, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Onaivi ES, Kunugi H, Sasaki T, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Naka I, Ohashi J, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T (2010) Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 67:974-982.

Ishiguro H, Iwasaki S, Teasensfitz L, Higuchi S, Horiuchi Y, Saito T, Arinami T, Onaivi ES (2007) Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. *Pharmacogenomics J* 7:380-385.

Ito H, Halldin C, Farde L (1999) Localization of 5-HT1A receptors in the living human brain using [carbonyl-11C]WAY-100635: PET with anatomic standardization technique. *J Nucl Med* 40:102-109.

Iuvone T, Esposito G, De Filippis D, Scuderi C, Steardo L (2009) Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neurosci Ther* 15:65-75.

Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA (2004) Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 89:134-141.

Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R (2009) Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci* 30:515-527.

Jacobsen JHW, Buisman-Pijlman FTA, Mustafa S, Rice KC, Hutchinson MR (2018) The efficacy of (+)-Naltrexone on alcohol preference and seeking behaviour is dependent on light-cycle. *Brain Behav Immun* 67:181-193.

Janefjord E, Maag JL, Harvey BS, Smid SD (2014) Cannabinoid effects on beta amyloid fibril and aggregate formation, neuronal and microglial-activated neurotoxicity in vitro. *Cellular and molecular neurobiology* 34:31-42.

Jarosz J, Miernik K, Wachal M, Walczak J, Kruppl G (2013) Naltrexone (50 mg) plus psychotherapy in alcohol-dependent patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Drug Alcohol Abuse* 39:144-160.

Johansson AK, Bergvall AH, Hansen S (1999) Behavioral disinhibition following basal forebrain excitotoxin lesions: alcohol consumption, defensive aggression, impulsivity and serotonin levels. *Behav Brain Res* 102:17-29.

Johnson BA (2004) Role of the serotonergic system in the neurobiology of alcoholism: implications for treatment. *CNS Drugs* 18:1105-1118.

Johnson BA, Ait-Daoud N, Bowden CL, DiClemente CC, Roache JD, Lawson K, Javors MA, Ma JZ (2003) Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. *Lancet* 361:1677-1685.

Johnson BA, Ait-Daoud N, Seneviratne C, Roache JD, Javors MA, Wang XQ, Liu L, Penberthy JK, DiClemente CC, Li MD (2011) Pharmacogenetic approach at the serotonin transporter gene as a method of reducing the severity of alcohol drinking. *Am J Psychiatry* 168:265-275.

Johnson BA, Roache JD, Javors MA, DiClemente CC, Cloninger CR, Prihoda TJ, Bordnick PS, Ait-Daoud N, Hensler J (2000) Ondansetron for reduction of drinking among biologically predisposed alcoholic patients: A randomized controlled trial. *JAMA* 284:963-971.

Juknat A, Kozela E, Kaushansky N, Mechoulam R, Vogel Z (2016) Anti-inflammatory effects of the cannabidiol derivative dimethylheptyl-cannabidiol - studies in BV-2 microglia and encephalitogenic T cells. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 27:289-296.

Karmaus PW, Wagner JG, Harkema JR, Kaminski NE, Kaplan BL (2013) Cannabidiol (CBD) enhances lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunotoxicol* 10:321-328.

Kathmann M, Flau K, Redmer A, Trankle C, Schlicker E (2006) Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:354-361.

Katsidoni V, Anagnostou I, Panagis G (2013) Cannabidiol inhibits the reward-facilitating effect of morphine: involvement of 5-HT1A receptors in the dorsal raphe nucleus. *Addict Biol* 18:286-296.

Keating GM (2013) Nalmefene: a review of its use in the treatment of alcohol dependence. *CNS Drugs* 27:761-772.

Kelai S, Aissi F, Lesch KP, Cohen-Salmon C, Hamon M, Lanfumey L (2003) Alcohol intake after serotonin transporter inactivation in mice. *Alcohol Alcohol* 38:386-389.

Kelai S, Renoir T, Chouchana L, Saurini F, Hanoun N, Hamon M, Lanfumey L (2008) Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT(1A) autoreceptors in C57BL/6J mice. *J Neurochem* 107:1660-1670.

Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE (2005) Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62:617-627.

Kinghorn AD, Falk H, Gibbons S, Kobayashi Ji, SpringerLink (Online service) (2017) *Phytocannabinoids : Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa*. Springer International Publishing : Imprint: Springer: Cham.

Koethe D, Juelicher A, Nolden BM, Braunwarth WD, Klosterkötter J, Niklewski G, Wodarz N, Klatt J, Burtscheidt W, Gaebel W, Markus Leweke F (2007) Oxcarbazepine--efficacy and tolerability during treatment of alcohol withdrawal: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter pilot study. *Alcohol Clin Exp Res* 31:1188-1194.

Koob GF (1992) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 654:171-191.

Koob GF (2003) Alcoholism: allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res* 27:232-243.

Koob GF (2014) Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models. *Handb Clin Neurol* 125:33-54.

Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52-58.

Koob GF, Roberts AJ, Schulteis G, Parsons LH, Heyser CJ, Hyttia P, Merlo-Pich E, Weiss F (1998) Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 22:3-9.

- Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:217-238.
- Koob GF, Volkow ND (2016) Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 3:760-773.
- Kozela E, Lev N, Kaushansky N, Eilam R, Rimmerman N, Levy R, Ben-Nun A, Juknat A, Vogel Z (2011) Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *Br J Pharmacol* 163:1507-1519.
- Kranzler HR, Van Kirk J (2001) Efficacy of naltrexone and acamprosate for alcoholism treatment: a meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1335-1341.
- Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L, D'Souza DC (2003) N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther* 99:79-94.
- Kumar S, Porcu P, Werner DF, Matthews DB, Diaz-Granados JL, Helfand RS, Morrow AL (2009) The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl)* 205:529-564.
- Laaksonen E, Koski-Jannes A, Salaspuro M, Ahtinen H, Alho H (2008) A randomized, multicentre, open-label, comparative trial of disulfiram, naltrexone and acamprosate in the treatment of alcohol dependence. *Alcohol Alcohol* 43:53-61.
- Lallemand F, De Witte P (2006) SR147778, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, suppresses ethanol preference in chronically alcoholized Wistar rats. *Alcohol* 39:125-134.
- Langford RM, Mares J, Novotna A, Vachova M, Novakova I, Notcutt W, Ratcliffe S (2013) A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis. *J Neurol* 260:984-997.
- Laprairie RB, Bagher AM, Kelly ME, Denovan-Wright EM (2015) Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol* 172:4790-4805.
- Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 19:96-107.
- Lee MR, Leggio L (2014) Combined pharmacotherapies for the management of alcoholism: rationale and evidence to date. *CNS Drugs* 28:107-119.
- Lee YK, Park SW, Kim YK, Kim DJ, Jeong J, Myrick H, Kim YH (2005) Effects of naltrexone on the ethanol-induced changes in the rat central dopaminergic system. *Alcohol Alcohol* 40:297-301.
- Levin R, Peres FF, Almeida V, Calzavara MB, Zuardi AW, Hallak JE, Crippa JA, Abilio VC (2014) Effects of cannabinoid drugs on the deficit of prepulse inhibition of startle in an animal model of schizophrenia: the SHR strain. *Front Pharmacol* 5:10.
- Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, Klosterkotter J, Hellmich M, Koethe D (2012) Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2:e94.
- Liang J, Suryanarayanan A, Abriam A, Snyder B, Olsen RW, Spigelman I (2007) Mechanisms of reversible GABAA receptor plasticity after ethanol intoxication. *J Neurosci* 27:12367-12377.
- Linge R, Jimenez-Sanchez L, Campa L, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Pazos A, Adell A, Diaz A (2016) Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology* 103:16-26.

Lingford-Hughes A, Reid AG, Myers J, Feeney A, Hammers A, Taylor LG, Rosso L, Turkheimer F, Brooks DJ, Grasby P, Nutt DJ (2012) A [<sup>11</sup>C]Ro15 4513 PET study suggests that alcohol dependence in man is associated with reduced alpha5 benzodiazepine receptors in limbic regions. *J Psychopharmacol* 26:273-281.

Lingford-Hughes AR, Acton PD, Gacinovic S, Suckling J, Busatto GF, Boddington SJ, Bullmore E, Woodruff PW, Costa DC, Pilowsky LS, Eil PJ, Marshall EJ, Kerwin RW (1998) Reduced levels of GABA-benzodiazepine receptor in alcohol dependency in the absence of grey matter atrophy. *Br J Psychiatry* 173:116-122.

Linsenbardt DN, Boehm SL, 2nd (2009) Agonism of the endocannabinoid system modulates binge-like alcohol intake in male C57BL/6J mice: involvement of the posterior ventral tegmental area. *Neuroscience* 164:424-434.

Liput DJ, Hammell DC, Stinchcomb AL, Nixon K (2013) Transdermal delivery of cannabidiol attenuates binge alcohol-induced neurodegeneration in a rodent model of an alcohol use disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 111:120-127.

Little HJ (1999) The contribution of electrophysiology to knowledge of the acute and chronic effects of ethanol. *Pharmacol Ther* 84:333-353.

Liu QR, Canseco-Alba A, Zhang HY, Tagliaferro P, Chung M, Dennis E, Sanabria B, Schanz N, Escosteguy-Neto JC, Ishiguro H, Lin Z, Sgro S, Leonard CM, Santos-Junior JG, Gardner EL, Egan JM, Lee JW, Xi ZX, Onaivi ES (2017) Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference. *Sci Rep* 7:17410.

Liu Z, Zhou J, Li Y, Hu F, Lu Y, Ma M, Feng Q, Zhang JE, Wang D, Zeng J, Bao J, Kim JY, Chen ZF, El Mestikawy S, Luo M (2014) Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron* 81:1360-1374.

Lonroth K, Williams BG, Stadlin S, Jaramillo E, Dye C (2008) Alcohol use as a risk factor for tuberculosis - a systematic review. *BMC Public Health* 8:289.

Luo M, Zhou J, Liu Z (2015) Reward processing by the dorsal raphe nucleus: 5-HT and beyond. *Learn Mem* 22:452-460.

Macey DJ, Schulteis G, Heinrichs SC, Koob GF (1996) Time-dependent quantifiable withdrawal from ethanol in the rat: effect of method of dependence induction. *Alcohol* 13:163-170.

Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48:655-668.

Maisel NC, Blodgett JC, Wilbourne PL, Humphreys K, Finney JW (2013) Meta-analysis of naltrexone and acamprosate for treating alcohol use disorders: when are these medications most helpful? *Addiction* 108:275-293.

Mann K, Leher P, Morgan MY (2004) The efficacy of acamprosate in the maintenance of abstinence in alcohol-dependent individuals: results of a meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 28:51-63.

Mann K, Torup L, Sorensen P, Gual A, Swift R, Walker B, van den Brink W (2016) Nalmefene for the management of alcohol dependence: review on its pharmacology, mechanism of action and meta-analysis on its clinical efficacy. *Eur Neuropsychopharmacol* 26:1941-1949.

Marcinkiewicz CA, Lowery-Gionta EG, Kash TL (2016) Serotonin's Complex Role in Alcoholism: Implications for Treatment and Future Research. *Alcohol Clin Exp Res* 40:1192-1201.

Marinho AL, Vila-Verde C, Fogaca MV, Guimaraes FS (2015) Effects of intra-infralimbic prefrontal cortex injections of cannabidiol in the modulation of emotional behaviors in rats: contribution of 5HT(1)A receptors and stressful experiences. *Behav Brain Res* 286:49-56.

Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramirez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML (2011) Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 79:964-973.

Martin-Santos R, Crippa JA, Batalla A, Bhattacharyya S, Atakan Z, Borgwardt S, Allen P, Seal M, Langohr K, Farre M, Zuardi AW, McGuire PK (2012) Acute effects of a single, oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. *Curr Pharm Des* 18:4966-4979.

Martin GW, Rehm J (2012) The effectiveness of psychosocial modalities in the treatment of alcohol problems in adults: a review of the evidence. *Can J Psychiatry* 57:350-358.

Mattes RD, Shaw LM, Edling-Owens J, Engelman K, Elshohly MA (1993) Bypassing the first-pass effect for the therapeutic use of cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav* 44:745-747.

Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383:819-823.

McBride WJ, Li TK (1998) Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. *Crit Rev Neurobiol* 12:339-369.

McGonigle P, Ruggeri B (2014) Animal models of human disease: challenges in enabling translation. *Biochem Pharmacol* 87:162-171.

McPartland JM, Duncan M, Di Marzo V, Pertwee RG (2015) Are cannabidiol and Delta(9) - tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br J Pharmacol* 172:737-753.

Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO (2007) Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers* 4:1678-1692.

Mechoulam R, Shvo Y (1963) Hashish—I: The structure of Cannabidiol. *Tetrahedron* 19:2073-2078.

Melon LC, Wray KN, Moore EM, Boehm SL, 2nd (2013) Sex and age differences in heavy binge drinking and its effects on alcohol responsivity following abstinence. *Pharmacol Biochem Behav* 104:177-187.

Middaugh LD, Bandy AL (2000) Naltrexone effects on ethanol consumption and response to ethanol conditioned cues in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 151:321-327.

Mitchell JM, O'Neil JP, Janabi M, Marks SM, Jagust WJ, Fields HL (2012) Alcohol consumption induces endogenous opioid release in the human orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. *Sci Transl Med* 4:116ra116.

Monterosso JR, Flannery BA, Pettinati HM, Oslin DW, Rukstalis M, O'Brien CP, Volpicelli JR (2001) Predicting treatment response to naltrexone: the influence of craving and family history. *Am J Addict* 10:258-268.

Moos RH, Moos BS (2006) Rates and predictors of relapse after natural and treated remission from alcohol use disorders. *Addiction* 101:212-222.

Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS (2006) Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1466-1471.

Moreira FA, Guimaraes FS (2005) Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 512:199-205.

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

Naassila M, Pierrefiche O, Ledent C, Daoust M (2004) Decreased alcohol self-administration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 46:243-253.

Navarrete F, Aracil-Fernandez A, Manzanares J (2018a) Cannabidiol regulates behavioural alterations and gene expression changes induced by spontaneous cannabinoid withdrawal. *Br J Pharmacol*.

Navarrete F, Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J (2018b) Pharmacological regulation of cannabinoid CB2 receptor modulates the reinforcing and motivational actions of ethanol. *Biochem Pharmacol*.

Navarrete F, Perez-Ortiz JM, Manzanares J (2012) Pregabalin- and topiramate-mediated regulation of cognitive and motor impulsivity in DBA/2 mice. *Br J Pharmacol* 167:183-195.

Navarrete F, Rubio G, Manzanares J (2014) Effects of naltrexone plus topiramate on ethanol self-administration and tyrosine hydroxylase gene expression changes. *Addict Biol* 19:862-873.

Nestler EJ (2004) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* 25:210-218.

Nestler EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8:1445-1449.

Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL (1993) Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 11:995-1006.

NIAAA NIAAA (2004) NIAAA Council Approves Definition of Binge Drinking. NIAAA Newsletter, No. 3, Winter 2004. Disponible en: [https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter\\_Number3.pdf](https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter_Number3.pdf). Fecha de acceso: Mayo 2018.

Nicholson ER, Dille JE, Froehlich JC (2018) Co-Administration of Low-Dose Naltrexone and Bupropion Reduces Alcohol Drinking in Alcohol-Preferring (P) Rats. *Alcohol Clin Exp Res* 42:571-577.

Norman AB, Tabet MR, Norman MK, Fey BK, Tsibulsky VL, Millard RW (2011) The affinity of D2-like dopamine receptor antagonists determines the time to maximal effect on cocaine self-administration. *J Pharmacol Exp Ther* 338:724-728.

Nowak KL, Vinod KY, Hungund BL (2006) Pharmacological manipulation of CB1 receptor function alters development of tolerance to alcohol. *Alcohol* 41:24-32.

Nutt D (1999) Alcohol and the brain. Pharmacological insights for psychiatrists. *Br J Psychiatry* 175:114-119.

Observatorio Español de la Droga y las Adicciones MdSyASGdE (2016) Edades 2015-2016. Encuesta sobre alcohol y drogas en España. .

Ogawa SK, Cohen JY, Hwang D, Uchida N, Watabe-Uchida M (2014) Organization of monosynaptic inputs to the serotonin and dopamine neuromodulatory systems. *Cell Rep* 8:1105-1118.

Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419-427.

Oliva JM, Manzanares J (2007) Gene transcription alterations associated with decrease of ethanol intake induced by naltrexone in the brain of Wistar rats. *Neuropsychopharmacology* 32:1358-1369.



Oliva JM, Ortiz S, Palomo T, Manzanares J (2003) Behavioural and gene transcription alterations induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. *J Neurochem* 85:94-104.

Oliva JM, Ortiz S, Palomo T, Manzanares J (2004) Spontaneous cannabinoid withdrawal produces a differential time-related responsiveness in cannabinoid CB1 receptor gene expression in the mouse brain. *J Psychopharmacol* 18:59-65.

Oliva JM, Ortiz S, Perez-Rial S, Manzanares J (2008) Time dependent alterations on tyrosine hydroxylase, opioid and cannabinoid CB1 receptor gene expressions after acute ethanol administration in the rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:373-382.

Olmsted CL, Kockler DR (2008) Topiramate for alcohol dependence. *Ann Pharmacother* 42:1475-1480.

Onaivi ES, Carpio O, Ishiguro H, Schanz N, Uhl GR, Benno R (2008a) Behavioral effects of CB2 cannabinoid receptor activation and its influence on food and alcohol consumption. *Ann N Y Acad Sci* 1139:426-433.

Onaivi ES, Green MR, Martin BR (1990) Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J Pharmacol Exp Ther* 253:1002-1009.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Chirwa SS, Hope B, Lujilde J, Inada T, Iwasaki S, Macharia D, Teasenfitz L, Arinami T, Uhl GR (2008b) Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression. *Ann N Y Acad Sci* 1139:434-449.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfitz L, Uhl GR (2006) Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci* 1074:514-536.

Organización Mundial de la Salud (2014) Global status report on alcohol and health.

Ortega-Alvaro A, Aracil-Fernandez A, Garcia-Gutierrez MS, Navarrete F, Manzanares J (2011) Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology* 36:1489-1504.

Ortega-Alvaro A, Ternianov A, Aracil-Fernandez A, Navarrete F, Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J (2015) Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addict Biol* 20:43-55.

Ortiz J, Fitzgerald LW, Charlton M, Lane S, Trevisan L, Guitart X, Shoemaker W, Duman RS, Nestler EJ (1995) Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system. *Synapse* 21:289-298.

Palpacuer C, Laviolle B, Boussageon R, Reymann JM, Bellissant E, Naudet F (2015) Risks and Benefits of Nalmefene in the Treatment of Adult Alcohol Dependence: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Published and Unpublished Double-Blind Randomized Controlled Trials. *PLoS Med* 12:e1001924.

Pandolfo P, Silveirinha V, dos Santos-Rodrigues A, Venance L, Ledent C, Takahashi RN, Cunha RA, Kofalvi A (2011) Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and dopamine in the rat and mouse striatum. *Eur J Pharmacol* 655:38-45.

Parker LA, Burton P, Sorge RE, Yakiwchuk C, Mechoulam R (2004) Effect of low doses of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 175:360-366.

Pava MJ, Woodward JJ (2012) A review of the interactions between alcohol and the endocannabinoid system: implications for alcohol dependence and future directions for research. *Alcohol* 46:185-204.

- Pedraza JF, Issy AC, Gomes FV, Guimaraes FS, Del-Bel EA (2015) Cannabidiol effects in the prepulse inhibition disruption induced by amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 232:3057-3065.
- Perez M, Benitez SU, Cartarozzi LP, Del Bel E, Guimaraes FS, Oliveira AL (2013) Neuroprotection and reduction of glial reaction by cannabidiol treatment after sciatic nerve transection in neonatal rats. *Eur J Neurosci* 38:3424-3434.
- Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82:443-468.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873-884.
- Pisanti S, Malfitano AM, Ciaglia E, Lamberti A, Ranieri R, Cuomo G, Abate M, Faggiana G, Proto MC, Fiore D, Laezza C, Bifulco M (2017) Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacol Ther* 175:133-150.
- Plosker GL (2015) Acamprosate: A Review of Its Use in Alcohol Dependence. *Drugs* 75:1255-1268.
- Poddar MK, Dewey WL (1980) Effects of cannabinoids on catecholamine uptake and release in hypothalamic and striatal synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 214:63-67.
- Poncelet M, Maruani J, Calassi R, Soubrie P (2003) Overeating, alcohol and sucrose consumption decrease in CB1 receptor deleted mice. *Neurosci Lett* 343:216-218.
- Pradier B, Erxleben E, Markert A, Racz I (2015) Interaction of cannabinoid receptor 2 and social environment modulates chronic alcohol consumption. *Behav Brain Res* 287:163-171.
- Radcliffe RA, Floyd KL, Drahnak JA, Deitrich RA (2005) Genetic dissociation between ethanol sensitivity and rapid tolerance in mouse and rat strains selectively bred for differential ethanol sensitivity. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1580-1589.
- Rattan AK, Koo KL, Tejwani GA, Bhargava HN (1992) The effect of morphine tolerance dependence and abstinence on immunoreactive dynorphin (1-13) levels in discrete brain regions, spinal cord, pituitary gland and peripheral tissues of the rat. *Brain Res* 584:207-212.
- Ray LA, Heydari A, Zorick T (2010) Quetiapine for the treatment of alcoholism: scientific rationale and review of the literature. *Drug Alcohol Rev* 29:568-575.
- Rehm J, Anderson P, Barry J, Dimitrov P, Elekes Z, Feijao F, Frick U, Gual A, Gmel G, Jr., Kraus L, Marmet S, Raninen J, Rehm MX, Scafato E, Shield KD, Trapencieris M, Gmel G (2015) Prevalence of and potential influencing factors for alcohol dependence in Europe. *Eur Addict Res* 21:6-18.
- Rehm J, Kanteres F, Lachenmeier DW (2010) Unrecorded consumption, quality of alcohol and health consequences. *Drug Alcohol Rev* 29:426-436.
- Rehm J, Room R, Graham K, Monteiro M, Gmel G, Sempos CT (2003) The relationship of average volume of alcohol consumption and patterns of drinking to burden of disease: an overview. *Addiction* 98:1209-1228.
- Rehm J, Samokhvalov AV, Neuman MG, Room R, Parry C, Lonnroth K, Patra J, Poznyak V, Popova S (2009) The association between alcohol use, alcohol use disorders and tuberculosis (TB). A systematic review. *BMC Public Health* 9:450.
- Ren Y, Whittard J, Higuera-Matas A, Morris CV, Hurd YL (2009) Cannabidiol, a nonpsychotropic component of cannabis, inhibits cue-induced heroin seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. *J Neurosci* 29:14764-14769.

Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Correa FM, Guimaraes FS (2006) Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 172:294-298.

Resstel LB, Tavares RF, Lisboa SF, Joca SR, Correa FM, Guimaraes FS (2009) 5-HT<sub>1A</sub> receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol* 156:181-188.

Rhodes JS, Best K, Belknap JK, Finn DA, Crabbe JC (2005) Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 84:53-63.

Richardson-Jones JW, Craige CP, Nguyen TH, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Guiard BP, Beck SG, Hen R, Leonardo ED (2011) Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J Neurosci* 31:6008-6018.

Ripley TL, Dunworth SJ, Stephens DN (2002) Effect of CGP39551 administration on the kindling of ethanol-withdrawal seizures. *Psychopharmacology (Berl)* 163:157-165.

Roberts AJ, McArthur RA, Hull EE, Post C, Koob GF (1998) Effects of amperozide, 8-OH-DPAT, and FG 5974 on operant responding for ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 137:25-32.

Rock EM, Bolognini D, Limebeer CL, Cascio MG, Anavi-Goffer S, Fletcher PJ, Mechoulam R, Pertwee RG, Parker LA (2012) Cannabidiol, a non-psychotropic component of cannabis, attenuates vomiting and nausea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT<sub>1A</sub> somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus. *Br J Pharmacol* 165:2620-2634.

Rodriguez de Fonseca F, Carrera MR, Navarro M, Koob GF, Weiss F (1997) Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science* 276:2050-2054.

Rodriguez de Fonseca F, Roberts AJ, Bilbao A, Koob GF, Navarro M (1999) Cannabinoid receptor antagonist SR141716A decreases operant ethanol self administration in rats exposed to ethanol-vapor chambers. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 20:1109-1114.

Romp PP, Miliareisis E (1985) Pontine and mesencephalic substrates of self-stimulation. *Brain Res* 359:246-259.

Rosner S, Hackl-Herrwerth A, Leucht S, Lehert P, Vecchi S, Soyka M (2010a) Acamprosate for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev*:CD004332.

Rosner S, Hackl-Herrwerth A, Leucht S, Vecchi S, Srisurapanont M, Soyka M (2010b) Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001867.

Rubio G, Martinez-Gras I, Manzanares J (2009) Modulation of impulsivity by topiramate: implications for the treatment of alcohol dependence. *J Clin Psychopharmacol* 29:584-589.

Rubio G, Ponce G, Rodriguez-Jimenez R, Jimenez-Arriero MA, Hoenicka J, Palomo T (2005) Clinical predictors of response to naltrexone in alcoholic patients: who benefits most from treatment with naltrexone? *Alcohol Alcohol* 40:227-233.

Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT<sub>1a</sub> receptors. *Neurochem Res* 30:1037-1043.

Sagredo O, Ramos JA, Decio A, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J (2007) Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused 3-nitropropionic acid in vivo by mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A<sub>2A</sub> receptors. *Eur J Neurosci* 26:843-851.

Saitz R, O'Malley SS (1997) Pharmacotherapies for alcohol abuse. Withdrawal and treatment. *Med Clin North Am* 81:881-907.

Sales AJ, Fogaca MV, Sartim AG, Pereira VS, Wegener G, Guimaraes FS, Joca SRL (2018) Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Mol Neurobiol*.

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

Sanchez-Marin L, Pavon FJ, Decara J, Suarez J, Gavito A, Castilla-Ortega E, Rodriguez de Fonseca F, 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.

Santos NA, Martins NM, Sisti FM, Fernandes LS, Ferreira RS, Queiroz RH, Santos AC (2015) The neuroprotection of cannabidiol against MPP(+)-induced toxicity in PC12 cells involves trkA receptors, upregulation of axonal and synaptic proteins, neurogenesis, and might be relevant to Parkinson's disease. *Toxicol In Vitro* 30:231-240.

Sari Y, Johnson VR, Weedman JM (2011) Role of the serotonergic system in alcohol dependence: from animal models to clinics. *Prog Mol Biol Transl Sci* 98:401-443.

Satta R, Hilderbrand ER, Lasek AW (2018) Ovarian Hormones Contribute to High Levels of Binge-Like Drinking by Female Mice. *Alcohol Clin Exp Res* 42:286-294.

Sawicka M, Tracy DK (2017) Naltrexone efficacy in treating alcohol-use disorder in individuals with comorbid psychosis: a systematic review. *Ther Adv Psychopharmacol* 7:211-224.

Scuderi C, Steardo L, Esposito G (2014) Cannabidiol promotes amyloid precursor protein ubiquitination and reduction of beta amyloid expression in SHSY5YAPP+ cells through PPARgamma involvement. *Phytotherapy research* : PTR 28:1007-1013.

Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:278-287.

Schier AR, Ribeiro NP, Silva AC, Hallak JE, Crippa JA, Nardi AE, Zuardi AW (2012) Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an anxiolytic drug. *Rev Bras Psiquiatr* 34 Suppl 1:S104-110.

Schik G, Wedegaertner FR, Liersch J, Hoy L, Emrich HM, Schneider U (2005) Oxcarbazepine versus carbamazepine in the treatment of alcohol withdrawal. *Addict Biol* 10:283-288.

Schmued LC, Hopkins KJ (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874:123-130.

Schultz W (2001) Reward signaling by dopamine neurons. *Neuroscientist* 7:293-302.

Seeman P (2016) Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Transl Psychiatry* 6:e920.

Seevers MH, Davis VE, Walsh MJ (1970) Morphine and ethanol physical dependence: a critique of a hypothesis. *Science* 170:1113-1115.

Sellers EM, Higgins GA, Tompkins DM, Romach MK (1992) Serotonin and alcohol drinking. *NIDA Res Monogr* 119:141-145.

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

Shen RY, Chiodo LA (1993) Acute withdrawal after repeated ethanol treatment reduces the number of spontaneously active dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 622:289-293.

Shibasaki M, Kurokawa K, Mizuno K, Ohkuma S (2012) Effect of aripiprazole on anxiety associated with ethanol physical dependence and on ethanol-induced place preference. *J Pharmacol Sci* 118:215-224.

Shield KD, Parry C, Rehm J (2013) Chronic diseases and conditions related to alcohol use. *Alcohol Res* 35:155-173.

Shoval G, Shbiro L, Hershkovitz L, Hazut N, Zalsman G, Mechoulam R, Weller A (2016) Prohedonic Effect of Cannabidiol in a Rat Model of Depression. *Neuropsychobiology* 73:123-129.

Siemens AJ, Walczak D, Buckley FE (1980) Characterization of blood disappearance and tissue distribution of [3H]cannabidiol. *Biochem Pharmacol* 29:462-464.

Simon H, Le Moal M, Cardo B (1976) Intracranial self-stimulation from the dorsal raphe nucleus of the rat: effects of the injection of para-chlorophenylalanine and of alpha-methylparatyrosine. *Behav Biol* 16:353-364.

Skinner MD, Lahmek P, Pham H, Aubin HJ (2014) Disulfiram efficacy in the treatment of alcohol dependence: a meta-analysis. *PLoS One* 9:e87366.

Soler-Vila H, Galan I, Valencia-Martin JL, Leon-Munoz LM, Guallar-Castillon P, Rodriguez-Artalejo F (2014) Binge drinking in Spain, 2008-2010. *Alcohol Clin Exp Res* 38:810-819.

Soria G, Mendizabal V, Tourino C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2005) Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 30:1670-1680.

Soyka M (2014) Nalmefene for the treatment of alcohol dependence: a current update. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:675-684.

Spanagel R (2009) Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 89:649-705.

Spanagel R, Vengeliene V, Jandeleit B, Fischer WN, Grindstaff K, Zhang X, Gallop MA, Krstew EV, Lawrence AJ, Kiefer F (2014) Acamprosate produces its anti-relapse effects via calcium. *Neuropsychopharmacology* 39:783-791.

Spear LP, Brake SC (1983) Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol* 16:83-109.

Spence D (2014) Bad medicine: nalmefene in alcohol misuse. *BMJ* 348:g1531.

Srisurapanont M, Jarusuraisin N (2005a) Naltrexone for the treatment of alcoholism: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:267-280.

Srisurapanont M, Jarusuraisin N (2005b) Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001867.

Streeon C, Whelan G (2001) Naltrexone, a relapse prevention maintenance treatment of alcohol dependence: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Alcohol Alcohol* 36:544-552.

Stringer S, Rueve M, Mossman D (2008) Topiramate as treatment for alcohol dependence. *JAMA* 299:405-406; author reply 406-407.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration (2014) Results From the 2013 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings. NSDUH Series H-48, HHS Publication SMA 14-4863. Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration; 2014.

Sullivan EV, Marsh L, Mathalon DH, Lim KO, Pfefferbaum A (1995) Anterior hippocampal volume deficits in nonamnesic, aging chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 19:110-122.

Swift RM (1999) Drug therapy for alcohol dependence. *N Engl J Med* 340:1482-1490.

Syed YY, McKeage K, Scott LJ (2014) Delta-9-tetrahydrocannabinol/cannabidiol (Sativex(R)): a review of its use in patients with moderate to severe spasticity due to multiple sclerosis. *Drugs* 74:563-578.

Sylantsev S, Jensen TP, Ross RA, Rusakov DA (2013) Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:5193-5198.

Tamnes CK, Fjell AM, Ostby Y, Westlye LT, Due-Tønnessen P, Bjørnerud A, Walhovd KB (2011) The brain dynamics of intellectual development: waxing and waning white and gray matter. *Neuropsychologia* 49:3605-3611.

Thanos PK, Dimitrakakis ES, Rice O, Gifford A, Volkow ND (2005) Ethanol self-administration and ethanol conditioned place preference are reduced in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Behav Brain Res* 164:206-213.

Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG (2007) Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* 150:613-623.

Timpone JG, Wright DJ, Li N, Egorin MJ, Enama ME, Mayers J, Galetto G (1997) The safety and pharmacokinetics of single-agent and combination therapy with megestrol acetate and dronabinol for the treatment of HIV wasting syndrome. The DATRI 004 Study Group. Division of AIDS Treatment Research Initiative. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13:305-315.

Tsai G, Coyle JT (1998) The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu Rev Med* 49:173-184.

Tsai G, Gastfriend DR, Coyle JT (1995) The glutamatergic basis of human alcoholism. *Am J Psychiatry* 152:332-340.

Ulm RR, Volpicelli JR, Volpicelli LA (1995) Opiates and alcohol self-administration in animals. *J Clin Psychiatry* 56 Suppl 7:5-14.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329-332.

Vann RE, Gamage TF, Warner JA, Marshall EM, Taylor NL, Martin BR, Wiley JL (2008) Divergent effects of cannabidiol on the discriminative stimulus and place conditioning effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Drug Alcohol Depend* 94:191-198.

Vaysse PJ, Gardner EL, Zukin RS (1987) Modulation of rat brain opioid receptors by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther* 241:534-539.

Vinod KY, Sanguino E, Yalamanchili R, Manzanares J, Hungund BL (2008a) Manipulation of fatty acid amide hydrolase functional activity alters sensitivity and dependence to ethanol. *J Neurochem* 104:233-243.

Vinod KY, Yalamanchili R, Thanos PK, Vadasz C, Cooper TB, Volkow ND, Hungund BL (2008b) Genetic and pharmacological manipulations of the CB(1) receptor alter ethanol preference and dependence in ethanol preferring and nonpreferring mice. *Synapse* 62:574-581.

Virkkunen M, Rawlings R, Tokola R, Poland RE, Guidotti A, Nemeroff C, Bissette G, Kalogeras K, Karonen SL, Linnoila M (1994) CSF biochemistries, glucose metabolism, and diurnal activity rhythms in alcoholic, violent offenders, fire setters, and healthy volunteers. *Arch Gen Psychiatry* 51:20-27.

Viudez-Martinez A, Garcia-Gutierrez MS, Fraguas-Sanchez AI, Torres-Suarez AI, Manzanares J (2018a) Effects of cannabidiol plus naltrexone on motivation and ethanol consumption. *Br J Pharmacol*.

Viudez-Martinez A, Garcia-Gutierrez MS, Navarron CM, Morales-Calero MI, Navarrete F, Torres-Suarez AI, Manzanares J (2018b) Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice. *Addict Biol* 23:154-164.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2003) The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest* 111:1444-1451.

Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C (2007) Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement. *J Neurosci* 27:12700-12706.

Volpicelli JR, Alterman AI, Hayashida M, O'Brien CP (1992) Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 49:876-880.

Volpicelli JR, Rhines KC, Rhines JS, Volpicelli LA, Alterman AI, O'Brien CP (1997) Naltrexone and alcohol dependence. Role of subject compliance. *Arch Gen Psychiatry* 54:737-742.

Volpicelli JR, Volpicelli LA, O'Brien CP (1995) Medical management of alcohol dependence: clinical use and limitations of naltrexone treatment. *Alcohol Alcohol* 30:789-798.

Walsh D, Nelson KA, Mahmoud FA (2003) Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology. *Support Care Cancer* 11:137-143.

Wallace MS, Marcotte TD, Umlauf A, Gouaux B, Atkinson JH (2015) Efficacy of Inhaled Cannabis on Painful Diabetic Neuropathy. *J Pain* 16:616-627.

Wang D, Noda Y, Tsunekawa H, Zhou Y, Miyazaki M, Senzaki K, Nabeshima T (2007) Behavioural and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety. *Behav Brain Res* 178:262-273.

Weiss F, LA WG, Deness G, Kerr T, Watry D, Suto N. (2016) Transdermal CBD attenuates cocaine intake in rats with addiction-linked cocaine history. Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego (CA).

Weiss F, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF (1993) Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J Pharmacol Exp Ther* 267:250-258.

Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyttia P, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF (1996) Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J Neurosci* 16:3474-3485.

Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L (2014) Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron* 83:645-662.

Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge SA, Mackie K, Greasley PJ, Ross RA, Rogers MJ (2009) The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16511-16516.

Winton-Brown TT, Allen P, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Fusar-Poli P, Crippa JA, Seal ML, Martin-Santos R, Ffytche D, Zuardi AW, Atakan Z, McGuire PK (2011) Modulation of auditory and visual processing

by delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol: an FMRI study. *Neuropsychopharmacology* 36:1340-1348.

Wise RA (1987) The role of reward pathways in the development of drug dependence. *Pharmacol Ther* 35:227-263.

Yeo RA, Thoma RJ, Gasparovic C, Monnig M, Harlaar N, Calhoun VD, Kalyanam R, Mayer AR, Durazzo TC, Hutchison KE (2013) Neurometabolite concentration and clinical features of chronic alcohol use: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Psychiatry Res* 211:141-147.

Zalewska-Kaszubska J, Gorska D, Dyr W, Czarnecka E (2008) Voluntary alcohol consumption and plasma beta-endorphin levels in alcohol-preferring rats chronically treated with naltrexone. *Physiol Behav* 93:1005-1010.

Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR (2010) Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 159:122-128.

Zghoul T, Abarca C, Sanchis-Segura C, Albrecht U, Schumann G, Spanagel R (2007) Ethanol self-administration and reinstatement of ethanol-seeking behavior in Per1(Brdm1) mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)* 190:13-19.

Zlebnik NE, Cheer JF (2016) Beyond the CB1 Receptor: Is Cannabidiol the Answer for Disorders of Motivation? *Annu Rev Neurosci* 39:1-17.

Zuardi AW, Morais SL, Guimaraes FS, Mechoulam R (1995) Antipsychotic effect of cannabidiol. *J Clin Psychiatry* 56:485-486.

Zuardi AW, Rodrigues JA, Cunha JM (1991) Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl)* 104:260-264.

Zweifel LS, Parker JG, Lobb CJ, Rainwater A, Wall VZ, Fadok JP, Darvas M, Kim MJ, Mizumori SJ, Paladini CA, Phillips PE, Palmiter RD (2009) Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7281-7288.







**Artículo 1.** DOI: 10.1038/s41401-018-0032-8

**Title: Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior**

Running title: Cannabidiol does not exert reinforcing properties

Adrián Viudez-Martínez<sup>1</sup>, María S. García-Gutiérrez<sup>1,2</sup>, Juan Medrano-Relinque<sup>1</sup>, Carmen M. Navarrón<sup>1</sup>, Francisco Navarrete<sup>1,2</sup>, Jorge Manzanares<sup>1,2</sup>

1 Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda. de Ramón y Cajal s/n, San Juan de Alicante, 03550 Alicante, Spain and 2 Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS), Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain.

Author to whom correspondence should be addressed:

Dr. Jorge Manzanares

Instituto de Neurociencias

Universidad Miguel Hernández-CSIC

Avda. Ramón y Cajal s/n, 03550

San Juan de Alicante, Spain.

E-mail: jmanzanares@goumh.umh.es

## **Abstract**

Recent evidence suggests that cannabidiol (CBD) may be useful for the treatment of different neuropsychiatric disorders. However, some controversy regarding its profile as a drug of abuse hampers the further development of basic and clinical studies. In this study, the behavioral profile of CBD as a potential drug of abuse was evaluated in C57BL/6J mice. Reinforcing properties of CBD (15, 30 and 60 mg/kg; i.p.) were assessed using the conditioned place preference (CPP) paradigm. Spontaneous withdrawal symptoms and motor activity in the open field were examined 12 h after the last CBD administration (30 mg/kg/12 h, i.p., 6 days). CBD plasma concentrations were measured at 2, 4, 8, 12 and 24 h after the administration of CBD (30 mg/kg, i.p.). Furthermore, an oral CBD self-administration paradigm (50 mg/kg; CBD water-soluble 1.2 mg/mL) was performed to evaluate if this drug produced any effects on motivation compared to a non-reinforcing substance (water). We found that CBD failed to induce CPP, withdrawal symptoms or altered motor behavior 12 h after its administration. At that time, only traces of CBD were detected, ensuring that the lack of alterations in somatic signs and locomotor activity was not due to residual drug in plasma. Interestingly, mice displayed similar motivation and consumption of CBD and water. Taken together, these results show that CBD lacks activity as a drug of abuse and should stimulate the development of the basic and clinical studies needed to elucidate its potential therapeutic use for the treatment of neuropsychiatric and drug use disorders.

**Keywords:** cannabidiol; cannabinoid receptor; drug abuse; conditioned place preference; oral CBD self-administration; withdrawal syndrome.

## Introduction

The plant *Cannabis Sativa* contains more than 400 natural compounds, 120 of which are phytocannabinoids<sup>[1-3]</sup>. The main psychotropic constituent is delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC), isolated for the first time by Gaoni and Mechoulam in 1964<sup>[4]</sup>.  $\Delta$ 9-THC mediates the rewarding properties of cannabis through binding to specific G-protein-coupled receptors, mainly the cannabinoid type 1 receptor (CB<sub>1</sub>R)<sup>[5]</sup>. In contrast, the structure of cannabidiol (CBD), the second major ingredient of cannabis, was characterized by Mechoulam and Shvo in 1963. This compound appears to lack activity as a drug of abuse<sup>[6]</sup> due to its low affinity on CB<sub>1</sub> receptors (100-fold lower affinity than THC)<sup>[7]</sup>.

In the last two decades, a variety of research groups has examined the effects of CBD in basic and clinical studies. The results obtained suggest that CBD has beneficial effects highly relevant for the management of neurological disorders such as epilepsy<sup>[8-10]</sup>, multiple sclerosis<sup>[11, 12]</sup>, Parkinson's disease<sup>[13, 14]</sup> and Alzheimer disease<sup>[15, 16]</sup>. Moreover, there is a large body of evidence revealing that CBD improves cognition<sup>[17]</sup> and neurogenesis<sup>[18, 19]</sup> with anxiolytic<sup>[20-23]</sup>, antidepressant<sup>[24-26]</sup>, and antipsychotic-like effects<sup>[27-32]</sup>, supporting its potential usefulness for the treatment of neuropsychiatric and drug-use disorders.

The mechanisms underlying these effects are still not well understood<sup>[33]</sup> but seem to include more than 65 key targets<sup>[34, 35]</sup>. To date, the orphan G protein-coupled receptor GPR55, the intracellular vanilloid the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor appear to be crucial for the effects of CBD<sup>[9, 20, 35-37]</sup>. In addition, CBD is a putative inhibitor of anandamide reuptake and hydrolysis and the adenosine transporter, indirectly increasing the levels of this endocannabinoid and adenosine, respectively <sup>[37-39]</sup>. Although CBD appears to indirectly activate CB<sub>1</sub>R by increasing anandamide levels, several studies have also identified CBD as a negative allosteric modulator of CB<sub>1</sub>R<sup>[40]</sup>. Furthermore, there is evidence

suggesting that CBD seems to act as an inverse agonist or antagonist of the cannabinoid type 2 receptor CB<sub>2</sub>R<sup>[1, 41, 42]</sup>.

Despite the number of findings suggesting the potential therapeutic use of CBD, there is some controversy regarding its profile as a drug of abuse. CBD is currently classified as a Schedule 1 drug according to the United Nations Single Convention on Narcotic Drugs of 1961 and the Comprehensive Drug Abuse Prevention and Control Act of the United States (US)<sup>[43]</sup>. A Schedule 1 controlled substance is defined by the Controlled Substance Act (CSA) as a substance presenting “*no currently accepted medical use, a lack of accepted safety for the use under medical supervision, and a high potential for abuse*”. Furthermore, CBD is classified as a Schedule 2 drug according to the Controlled Drugs and Substances Act in Canada also inferring “*a high potential for abuse which may lead to severe psychological or physical dependence*”<sup>[44]</sup>. This fact significantly hampers the further development of basic and clinical studies, even though there is no scientific/experimental evidence supporting these considerations<sup>[40]</sup>. To date, no previous studies have been specifically designed to evaluate the potential properties of CBD as a drug of abuse, but several studies have suggested that CBD lacks potential as a drug of abuse. This assumption is based on the lack of an autonomic response (euphoria or intoxication) in patients treated with CBD<sup>[45-47]</sup> and the failure of CBD to induce conditioned place preference in two animal studies<sup>[48, 49]</sup>. However, no further behavioral assays commonly used for the evaluation of drug addiction have been performed.

To shed light on the potential properties of CBD, this study evaluated the behavioral profile of CBD as a potential drug of abuse by using widely accepted behavioral tests commonly used for the evaluation of different aspects of drug addiction: attentional bias, motivation to consume and withdrawal syndrome. Dose-response effects of CBD were tested in the conditioned place preference (CPP) test, symptoms of potential spontaneous withdrawal syndrome (motor activity

and withdrawal signs after the cessation of CBD administration) were evaluated, and oral CBD self-administration was tested in C57BL/6J mice.

## **Material and methods**

### *Animals*

Male C57BL/6J mice from Harlan (Barcelona, Spain) weighing 20–25 g were housed in groups of six per cage (40 × 25 × 22 cm) under controlled conditions (temperature, 21 ± 2°C; relative humidity, 60 ± 10 %; 12-h light/dark cycle, lights on from 8:00 AM to 8:00 PM). Behavioral analyses were initiated 1 week after acclimatization to the animal room and were performed by placement of the home cage in the operant-task room during the development of conditioning experiments. All studies were conducted in compliance with the Spanish Royal Decree 1201/2005, the Spanish Law 32/2007 and the European Union Directive of September 22<sup>nd</sup>, 2010 (2010/63/UE), regulating the care of experimental animals.

### *Drugs*

For CPP and the evaluation of CBD withdrawal syndrome, CBD was obtained from STI Pharmaceuticals (Essex, United Kingdom), dissolved in ethanol:cremophor:saline (1:1:18) and injected intraperitoneally (i.p.) at the appropriated doses (CPP: 15, 30 and 60 mg/kg; CBD withdrawal syndrome: 30 mg/kg/12 h, 6 days).

For the oral CBD self-administration procedure, water-soluble CBD (purified CBD organic plant extract, 99.9% purity (HPLC), total THC content (%) <0.01%; CBD Pur US, Hilton Head Island, SC, USA) was purchased. This formulation is a water-soluble powder with certain excipients that increase the oral bioavailability of CBD. The water-soluble CBD contains 99.9% pure CBD, arabic gum, maltodextrin and polyphosphates and is a nano-sized formulation to avoid the stickiness-related problems of CBD. CBD was immediately dissolved in distilled water (37 °C) before its use,

following the instructions of the manufacturer, at the desired concentration (50 mg/kg; CBD water-soluble solution (1.2 mg/mL)). This concentration was calculated considering the average number of active lever presses (50), the volume released in each lever's activation (25  $\mu$ L) and the weight of the mice to provide a final dose of 50 mg/kg.

#### *Dose-response effects of CBD on CPP*

CPP was performed following a protocol previously described<sup>[50]</sup>. The CPP apparatus consisted of two compartments (30  $\times$  20  $\times$  20 cm), one black with a smooth plastic floor and the other one white with a stainless-steel grid floor, separated by a sliding door. The CPP procedure consisted of three phases:

A) *Pre-conditioning phase*: on day 1, mice were placed between the two compartments and allowed free access to the entire apparatus for a period of 20 min. Mice that spent more than 75% of time in any of the two compartments were discarded from the experiment.

B) *Conditioning phase*: on days 2–11, the animals were randomized and assigned to the vehicle (VEH) or CBD groups (15, 30, 60 mg/kg; i.p.) (n = 8/group). CBD groups were counterbalanced for chamber type (context A/B) associated with VEH and CBD. Animals remained in the conditioned compartment for 15 min.

C) *Test day*: on day 12, the door was opened, and mice were placed in the center to allow free exploration of the two compartments. The time that mice spent in each compartment was recorded during the 15-min session using the SMART (*Spontaneous Motor Activity Recording and Tracking*) software system (Panlab, Barcelona, Spain).



### *Determination of plasma CBD concentrations*

Before the evaluation of the CBD withdrawal syndrome, plasma concentrations of CBD were measured to confirm that there was no significant amount of CBD remaining in the blood that could disturb the interpretation of the results.

Briefly, after a single administration of CBD (30 mg/kg; i.p.), trunk blood was collected from mice at different time points (2, 4, 8, 12 and 24 h). The extraction and analysis of plasma was performed using a method previously described with some modifications<sup>[51]</sup>. Aliquots of 0.1 mL of plasma were transferred to 12-mL glass tubes and spiked with cannabidiol-d3 (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). After dilution with 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 4.0), samples were extracted with tert-butyl methyl ether. The dry organic extracts were reconstituted in 75  $\mu$ L of a mixture of water:acetonitrile (10:90, v/v) with 0.1% formic acid (v/v). Detection of CBD in plasma was performed using an Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, CA, USA) coupled to a 6410 Triple Quadrupole LC-MS (Agilent Technologies, CA, USA) mass spectrometer with an electrospray interface. Chromatographic separation was achieved on a C18-CSH column (3.1  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu$ m particle size) (Waters Corp., Milford, MA, USA) at 40 °C. The electrospray ion source was set on the positive ionization mode. The mass spectrometry detection was done by single-reaction monitoring. Quantification was calculated with the slope (s), intercept and correlation coefficient (r) by weighting the (1/x) least-squares linear regression of the peak area ratio (analyte/IS) versus the concentration of the standard. The detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ) of the analytical procedure were 0.15 ng/mL and 0.45 ng/mL, respectively.

### *CBD withdrawal syndrome*

The analysis of the CBD withdrawal syndrome was carried out according to a protocol previously described by our group for cannabinoid spontaneous withdrawal<sup>[52, 53]</sup>. Briefly, CBD (30

mg/kg; i.p.) or VEH were administered twice a day for 6 days (n = 8/group). On day 7, 12 h after the last administration of CBD or the corresponding VEH, motor activity and behavioral withdrawal signs (rearing, grooming and rubbing) were evaluated during a 15-min period of 15 min (see schematic representation, Figure 3A).

Motor activity was recorded using SMART software, and withdrawal signs were recorded using video cameras and further analyzed by a blind observer.

#### *Oral CBD self-administration paradigm*

Oral CBD self-administration paradigm was based on a method previously described by our group with some modifications<sup>[54]</sup>. Oral CBD self-administration tests were carried out in 12 modular operant chambers (Panlab, Harvard Apparatus) equipped with a chamber light, two levers, one receptacle to receive a drop of liquid solution, one syringe pump, one stimulus light and one buzzer. Packwin software (Panlab) controlled the stimulus and fluid delivery and recorded the operant responses. Pressing one lever did not produce any action (inactive lever), whereas pressing the other lever delivered 25  $\mu$ L of fluid combined with the delivery of a 0.5-s light stimulus and a 0.5-s, 2850 Hz, 85 dB buzzer (active lever), followed by a 6-s timeout period. The experiment was divided into three phases (see schematic representation, Figure 4):

A) *Training phase*: mice were given 1-h daily saccharin (0.2%) self-administration sessions during days 1–10. During the first five days of the training phase, food was provided 1 h before the beginning of each session to increase the motivation for the active lever (postprandial). The following five days of the training phase and during the rest of the experiment, food access was provided after the end of each daily session (preprandial).

B) *Saccharin substitution phase*: during this phase, the saccharin concentration was reduced, and the CBD concentration was increased. Mice were given 1-h daily saccharin 0.15% + 50 mg/kg CBD (CBD water-solution 1.2 mg/mL) or VEH (days 11–13), saccharin 0.1% + 50 mg/kg CBD

(CBD water-solution 1.2 mg/mL) or VEH (days 14-16) and saccharin 0.05% + 50 mg/kg (CBD water-solution 1.2 mg/mL) or VEH (days 17–19) sessions. Mice that maintained a stable response with less than 30% deviation from the mean of the last 3 consecutive sessions and gave at least 75% of their responses on the active lever were selected for the following phase.

C) *CBD (50 mg/kg, 1.2 mg/mL) consumption phase*: for days 20–25, saccharin was removed from the solution, and mice were given 50 mg/kg CBD (CBD water-solution 1.2 mg/mL) or VEH for 1 h a day under a fixed ratio 1 (FR1) reinforcement schedule.

All solutions used in this paradigm were prepared daily, immediately prior to the beginning of the experimental procedure.

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures (RM) followed by the Student-Newman-Keul test to compare CBD plasma concentrations at different time points. The CPP and oral CBD self-administration paradigms data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures (RM) followed by the Student-Newman-Keul test. Motor activity and somatic withdrawal signs (rearing, grooming and rubbing) were analyzed using Student's t-test. Statistical analyses were performed with SigmaStat (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) software. Differences were considered significant if the probability of error was less than 0.05.

## **Results**

### *Conditioned place preference*

Statistical analysis revealed that CBD did not induce CPP at any of the doses evaluated (15, 30 and 60 mg/kg, i.p.). No differences were observed between the time spent in the drug-paired compartment during pre-conditioning (Pre-C) and post-conditioning (Post-C) at any of the CBD

doses tested (Figure 1) (two-way RM ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test; treatment:  $F_{(3,20)} = 0.305$ ,  $P = 0.821$ ; time:  $F_{(1,20)} = 1.104$ ,  $P = 0.306$ ; treatment  $\times$  time:  $F_{(3,20)} = 0.535$ ,  $P = 0.663$ ). No differences between the groups were observed with respect to Pre-C scores.

#### *CBD plasma concentrations*

CBD plasma concentrations were significantly reduced after its administration (30 mg/kg; i.p.). Indeed, after 8 h, CBD plasma concentrations were reduced by 90% (Figure 2) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test;  $F_{(5, 47)} = 38.532$ ,  $P < 0.001$ ).

#### *CBD withdrawal syndrome*

The cessation of CBD administration did not induce any alteration in motor activity or somatic signs. No significant differences in the distance travelled were observed between the CBD- and VEH-treated groups (Figure 3B) (Student's t-test:  $t = 1.648$ , 14 df,  $P = 0.122$ ). Furthermore, there were no differences in number of rearings (Student's t-test:  $t = 1.129$ , 14 df,  $P = 0.278$ , Figure 3C), groomings (Student's t-test:  $t = -1.026$ , 14 df,  $p = 0.322$ , Figure 3D) or rubbings (Student's t-test:  $t = -1.163$ , 14 df,  $P = 0.268$ , Figure 3E) between the CBD- and VEH-treated group.

#### *Oral CBD self-administration*

During the training phase, there were no differences in the number of effective responses (two-way RM ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test, treatment,  $F_{(1,239)} = 1.602$ ,  $p = 0.219$ ; day,  $F_{(9,239)} = 37.847$ ,  $P < 0.001$ ; treatment  $\times$  day,  $F_{(9,239)} = 0.547$ ,  $P = 0.839$ , Figure 4B) nor in the volume of fluid intake between both groups (two-way RM ANOVA, treatment,  $F_{(1,239)} = 1.561$ ,  $P = 0.225$ ; day,  $F_{(9,239)} = 38.000$ ,  $P < 0.001$ ; treatment  $\times$  day,  $F_{(9,239)} = 0.568$ ,  $P = 0.822$ , Figure 4E). Likewise, no differences were found between VEH- and CBD-treated mice during the substitution

phase in the number of effective responses (two-way RM ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test, treatment,  $F_{(1,215)} = 0.272$ ,  $P = 0.607$ ; day,  $F_{(8,215)} = 12.155$ ,  $P < 0.001$ ; treatment  $\times$  day,  $F_{(8,215)} = 1.293$ ,  $p = 0.25$ , Figure 4C) nor in the volume of fluid intake (two-way RM ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test, treatment,  $F_{(1,215)} = 1.82$ ,  $P = 0.191$ ; day,  $F_{(8,215)} = 10.204$ ,  $p < 0.001$ ; treatment  $\times$  day,  $F_{(8,215)} = 1.035$ ,  $P = 0.412$ , Figure 4F).

During FR1 stage, no differences were found in the number of effective responses (two-way RM ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test, treatment,  $F_{(1,143)} = 0.176$ ,  $p = 0.679$ ; day,  $F_{(5,143)} = 2.394$ ,  $P < 0.679$ ; treatment  $\times$  day,  $F_{(5,143)} = 0.352$ ,  $P = 0.880$ , Figure 4D) nor in the volume of fluid intake between groups (two-way RM ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test, treatment,  $F_{(1,143)} = 0.134$ ,  $P = 0.718$ ; day,  $F_{(5,143)} = 5.033$ ,  $P < 0.001$ ; treatment  $\times$  day,  $F_{(5,143)} = 0.264$ ,  $P = 0.932$ , Figure 4G).

## Discussion

The present study demonstrates that CBD does not seem to present a pharmacological profile as a drug of abuse. This assumption is supported by the following observations: 1) the administration of CBD at different doses (15, 30, 60 mg/kg) did not induce any evidence of CPP; 2) cessation of CBD administration failed to induce a withdrawal syndrome, as neither locomotor activity alterations nor somatic withdrawal signs were detected 12 h after the last administration of CBD administration (30 mg/kg, twice daily, 6 days); and 3) CBD failed to induce oral self-administration, as CBD did not increase the number of active lever presses nor the consumption during the FR1 schedule compared to water.

During the last two decades, CBD has been increasingly noted as a potential candidate for the treatment of different psychiatric and neurological disorders [9, 13, 15, 20, 24, 28]. Moreover, CBD has also shown potential utility for the treatment of drug use disorders. For example, animal studies revealed that CBD reduced the reward-facilitating effect and withdrawal signs associated

with morphine<sup>[55, 56]</sup>, heroin craving and relapse<sup>[57]</sup> and cocaine intake in rats<sup>[58]</sup>. In addition, our group demonstrated that the administration of CBD reduced ethanol consumption, motivation to drink and relapse<sup>[59]</sup>.

In humans, preliminary clinical studies have indicated that CBD induces a rapid decrease in cannabis withdrawal symptoms<sup>[60]</sup> and improves patient retention in withdrawal treatment<sup>[61]</sup>. Conversely, a different study showed that CBD failed to modify the subjective, reinforcing or cardiovascular effects induced by smoked cannabis<sup>[62]</sup>. This disagreement may be due to the short period of CBD treatment, the experimental design (authors did not evaluate the long-term effect in abstinent patients to measure the relapse rate) and/or the oral administration of CBD, which provides a low bioavailability. Nevertheless, the available preclinical and clinical data suggest a high therapeutic potential of CBD for the management of drug use disorders.

However, in some countries, CBD is still classified as a substance with abuse potential<sup>[43, 44]</sup>, which hampers the development of further basic and clinical studies and creates a misconception that does not match any scientific evidence/criteria<sup>[40]</sup>. In fact, available evidence suggests that CBD is not a drug of abuse in animals<sup>[48, 49]</sup> or humans<sup>[44-46]</sup>. Our study further supported this consideration by demonstrating that CBD did not exert drug abuse potential in any of the behavioral tests evaluated.

CPP, a well-established test used to determine whether a substance induces reinforcing properties<sup>[50, 63-65]</sup>, was not produced by CBD at any of the doses tested (15, 30 or 60 mg/kg, i.p.). These results complement previous data reported by Vann and colleagues<sup>[49]</sup> demonstrating that CBD (1 and 10 mg/kg) did not induce CPP in mice. Similarly, another study showed that CBD (5 mg/kg) did not induce CPP in rats<sup>[48]</sup>. Moreover, the present study also provides further information since higher unexplored doses of CBD (30 and 60 mg/kg, i.p.), commonly employed in other studies, were evaluated here. Taken together, these results strongly suggest that CBD

does not induce CPP at low nor high doses, indicating that CBD does not induce reinforcing properties.

To evaluate if CBD may induce a potential withdrawal syndrome, we examined locomotor activity and somatic signs after the cessation of repeated exposure to CBD, a common test used to assess withdrawal symptoms after the interruption of the administration of a drug with abuse potential <sup>[52, 66]</sup>. Neither alterations in locomotor activity nor somatic signs (rearing, grooming and rubbing) were observed 12 h after CBD cessation. The absence of CBD plasma concentrations 12 h after i.p. CBD administration confirmed that the lack of alterations in somatic signs and locomotor activity was not due to residual drug in the body.

Furthermore, this study also demonstrated that CBD failed to induce oral self-administration. The number of effective responses in FR1 phases revealed that the motivation to acquire CBD did not differ from a non-reinforcing substance (water). Notably, no differences were observed between the intake of CBD and water. Therefore, it seems plausible to discard a potential aversive effect induced by the taste of CBD that may mask the interpretation of the results. Indeed, the results provided are also in agreement with previous studies that demonstrated that the administration of CBD in an intracranial self-stimulation paradigm also reduced brain reward function, suggesting that CBD is unlikely to present abuse potential <sup>[55]</sup>.

## **Conclusions**

In summary, the present study provides further information suggesting that CBD may not present reinforcing properties since it did not exhibit drug abuse potential in any of the different behavioral assays evaluated, including conditioned place preference, spontaneous withdrawal and oral self-administration. In light of the data available, the classification of CBD by certain administrations should be reconsidered, since the categorization of CBD as a drug with abuse potential is not based on evidence and is pharmacologically unsupported.

In addition, no significant side effects have been observed in any of the preclinical or clinical studies using CBD to date. Indeed, CBD is present in nabiximols (marketed as Sativex®) currently approved for the treatment of spasticity in multiple sclerosis in several countries in Europe. Therefore, there is a large body of evidence supporting its safety and lack of side effects. Together with the established literature, the results of this study may encourage the acceleration of the development of the basic and clinical studies needed to elucidate the potential therapeutic use of CBD for the treatment of a wide variety of neuropsychiatric disorders.

### **Acknowledgments**

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by the 'Instituto de Salud Carlos III' (RETICS, RD12/0028/0019), 'Plan Nacional Sobre Drogas' (PNSD 2016/016) and 'Ministerio de Economía y Competitividad' (FIS, PI14/00438) to JM. AVM is a predoctoral fellow supported by "Plan Nacional Sobre Drogas" (PNSD 2016/016).

### **Author contribution**

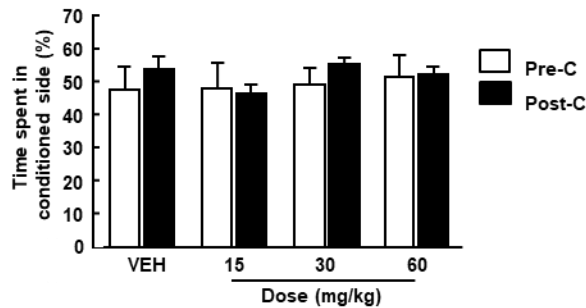
AVM, MSGG, JMR, and CMN carried out the experimental procedures, undertook the statistical analysis and took part in the interpretation of the results obtained. JMR, AVM, CMN, FN and MSGG wrote the first draft of the manuscript. MSGG and JM designed the study, wrote the protocol, interpreted the results and approved the final manuscript.

### **Declaration of conflicting interests**

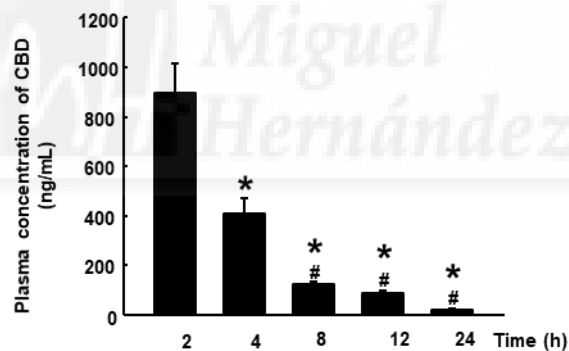
All authors state that they have no biochemical financial interests or potential conflicts of interest.



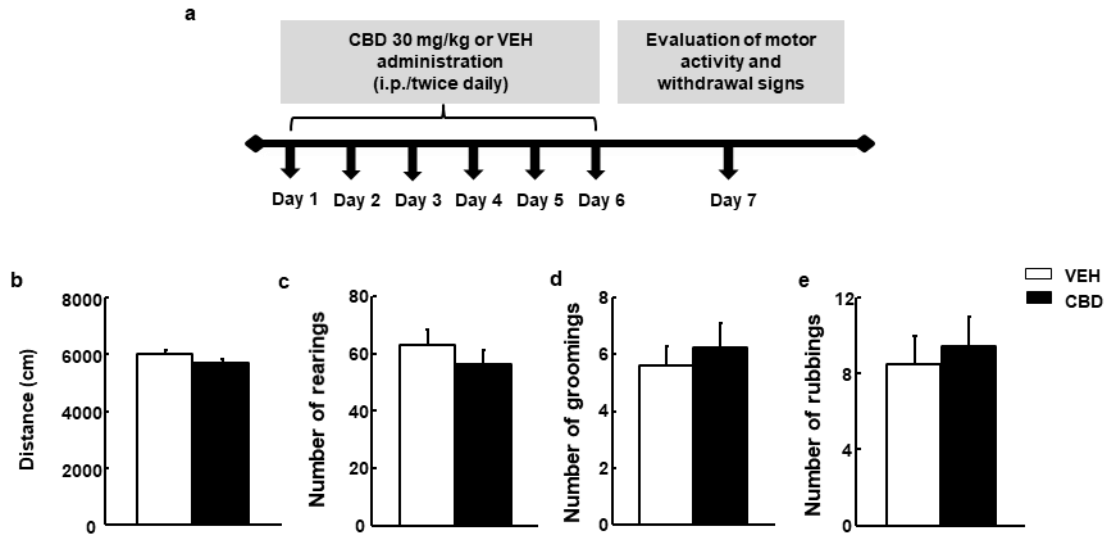
## Figures



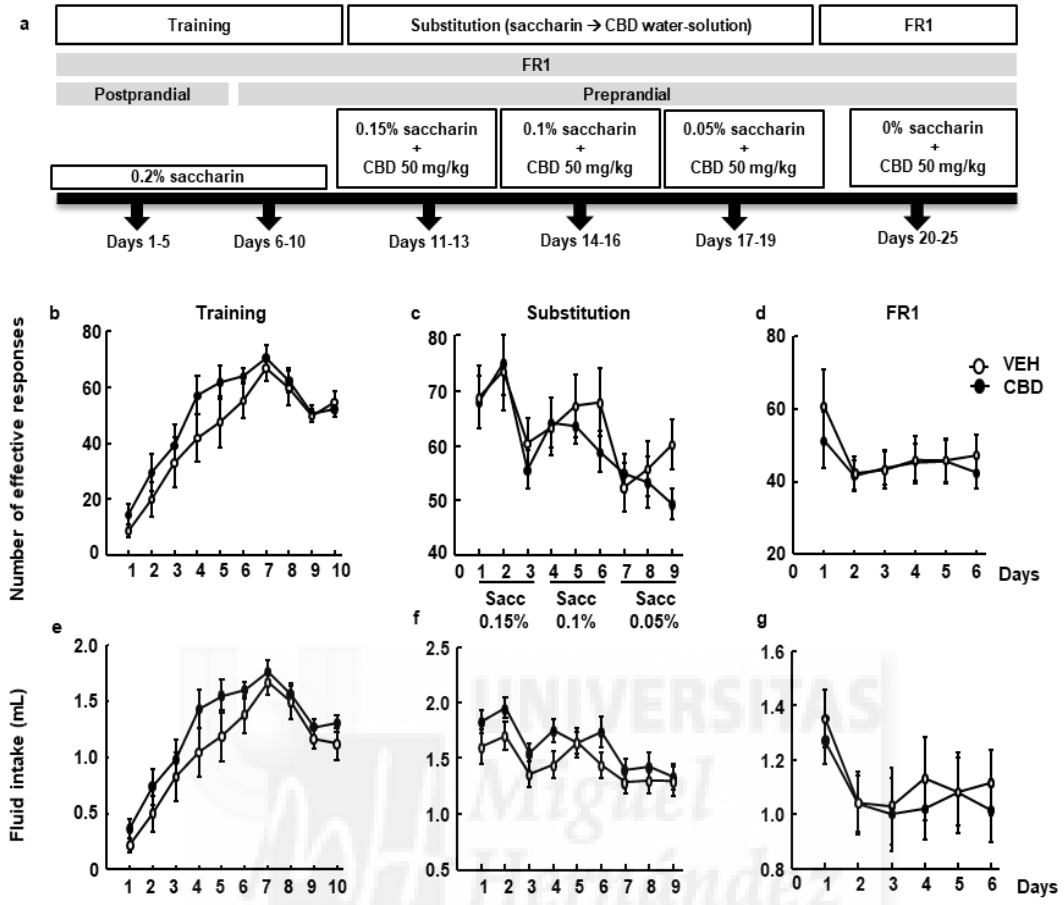
**Figure 1. Evaluation of conditioned place preference (CPP) for cannabidiol (CBD) in C57BL/6J mice.** Columns represent the percentage of total time spent in the drug-paired side for the different doses of CBD (15, 30 and 60 mg/kg, i.p.) or vehicle (VEH) groups during the pre-conditioning (Pre-C) and post-conditioning (Post-C) tests.



**Figure 2. Plasma concentration after a single administration of CBD (30 mg/kg; i.p.).** The columns represent the means  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). \* $P < 0.05$  vs. CBD plasma concentration at 2 h. # $P < 0.05$  vs. CBD plasma concentration at 4 h.



**Figure 3. Evaluation of potential CBD withdrawal signs.** (a) Schematic diagram of the protocol used to evaluate CBD withdrawal signs in C57BL/6J mice. (b) Motor activity and quantification of (c) rearing, (d) grooming and (e) rubbing in CBD-treated and vehicle (VEH)-treated mice. Data are means  $\pm$  SEM.



**Figure 4. Evaluation of CBD's effect on motivation.** Schematic diagram of oral CBD self-administration including the different experimental phases: training, substitution, and consumption under a fixed ratio 1 (FR1) schedule (a). The dots represent the means  $\pm$  SEM of the number of effective responses (b) and the fluid intake (e) during training, the number of effective responses (c) and the fluid intake (f) during substitution, and the number of effective responses (d) and the fluid intake (g) during consumption under a fixed ratio 1 (FR1) schedule.

## References

- 1 Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 199-215.
- 2 Atakan Z. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Ther Adv Psychopharmacol* 2012; 2: 241-54.
- 3 ElSohly MA, Radwan MM, Gul W, Chandra S, Galal A. Phytochemistry of Cannabis sativa L. In: Kinghorn AD, Falk H, Gibbons S, Kobayashi Ji, Editors. *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa*. (Springer International Publishing, Cham, 2017), p 1-36.
- 4 Gaoni YM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 1964; 86 (8): 1646-7.
- 5 Zhang PW, Ishiguro H, Ohtsuki T, Hess J, Carillo F, Walther D, *et al*. Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 916-31.
- 6 Mechoulam RS, Y. Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 1963; 19(12):2073-8.
- 7 Zlebnik NE, Cheer JF. Beyond the CB1 Receptor: Is Cannabidiol the Answer for Disorders of Motivation? *Annu Rev Neurosci* 2016; 39: 1-17.
- 8 Carlini EA, Cunha JM. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J Clin Pharmacol* 1981; 21: 417S-27S.
- 9 Devinsky O, Cilio MR, Cross H, Fernandez-Ruiz J, French J, Hill C, *et al*. Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia* 2014; 55: 791-802.
- 10 Devinsky O, Marsh E, Friedman D, Thiele E, Laux L, Sullivan J, *et al*. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *Lancet Neurol* 2016; 15: 270-8.
- 11 Giacoppo S, Soundara Rajan T, Galuppo M, Pollastro F, Grassi G, Bramanti P, *et al*. Purified Cannabidiol, the main non-psychotropic component of Cannabis sativa, alone, counteracts neuronal apoptosis in experimental multiple sclerosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 4906-19.
- 12 Kozela E, Lev N, Kaushansky N, Eilam R, Rimmerman N, Levy R, *et al*. Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *Br J Pharmacol* 2011; 163: 1507-19.
- 13 Chagas MH, Zuardi AW, Tumas V, Pena-Pereira MA, Sobreira ET, Bergamaschi MM, *et al*. Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. *J Psychopharmacol* 2014; 28: 1088-98.
- 14 Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Pinto JP, Chagas MH, Rodrigues GG, *et al*. Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. *J Psychopharmacol* 2009; 23: 979-83.
- 15 Cheng D, Spiro AS, Jenner AM, Garner B, Karl T. Long-term cannabidiol treatment prevents the development of social recognition memory deficits in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 2014; 42: 1383-96.
- 16 Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramirez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, *et al*. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 2011; 79: 964-73.
- 17 Osborne AL, Solowij N, Weston-Green K. A systematic review of the effect of cannabidiol on cognitive function: Relevance to schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 2016.

- 18 Liput DJ, Hammell DC, Stinchcomb AL, Nixon K. Transdermal delivery of cannabidiol attenuates binge alcohol-induced neurodegeneration in a rodent model of an alcohol use disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 2013; 111: 120-7.
- 19 Schiavon AP, Bonato JM, Milani H, Guimaraes FS, Weffort de Oliveira RM. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2016; 64: 27-34.
- 20 Blessing EM, Steenkamp MM, Manzanares J, Marmar CR. Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics* 2015; 12: 825-36.
- 21 Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 1990; 100: 558-9.
- 22 Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30: 1466-71.
- 23 Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Correa FM, Guimaraes FS. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 2006; 172: 294-8.
- 24 Sartim AG, Guimaraes FS, Joca SR. Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex-Possible involvement of 5-HT1A and CB1 receptors. *Behav Brain Res* 2016; 303: 218-27.
- 25 Linge R, Jimenez-Sanchez L, Campa L, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Pazos A, *et al.* Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology* 2016; 103: 16-26.
- 26 Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol* 2010; 159: 122-8.
- 27 Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, *et al.* Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2012; 2: e94.
- 28 Leweke FM, Mueller JK, Lange B, Rohleder C. Therapeutic Potential of Cannabinoids in Psychosis. *Biol Psychiatry* 2016; 79: 604-12.
- 29 Long LE, Malone DT, Taylor DA. Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 795-803.
- 30 Moreira FA, Guimaraes FS. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 2005; 512: 199-205.
- 31 Peres FF, Levin R, Almeida V, Zuardi AW, Hallak JE, Crippa JA, *et al.* Cannabidiol, among Other Cannabinoid Drugs, Modulates Prepulse Inhibition of Startle in the SHR Animal Model: Implications for Schizophrenia Pharmacotherapy. *Front Pharmacol* 2016; 7: 303.
- 32 Zuardi AW, Rodrigues JA, Cunha JM. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl)* 1991; 104: 260-4.
- 33 Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 515-27.
- 34 Campos AC, Fogaca MV, Sonogo AB, Guimaraes FS. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Res* 2016; 112: 119-27.
- 35 Ibeas Bih C, Chen T, Nunn AV, Bazilot M, Dallas M, Whalley BJ. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics* 2015; 12: 699-730.
- 36 Campos AC, Ferreira FR, Guimaraes FS. Cannabidiol blocks long-lasting behavioral consequences of predator threat stress: possible involvement of 5HT1A receptors. *J Psychiatr Res* 2012; 46: 1501-10.

- 37 Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, *et al.* Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 845-52.
- 38 Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 7895-900.
- 39 Massi P, Valenti M, Bolognini D, Parolaro D. Expression and function of the endocannabinoid system in glial cells. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 2289-98.
- 40 Russo EB. Cannabidiol Claims and Misconceptions: (Trends in Pharmacological Sciences 38, 198-201; 2017). *Trends Pharmacol Sci* 2017; 38: 499.
- 41 Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* 2007; 150: 613-23.
- 42 Petitet F, Jeantaud B, Reibaud M, Imperato A, Dubroeuq MC. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 1998; 63: PL1-6.
- 43 (CSA) CSA. Comprehensive drug use prevention and control act of 1970. FDA U.S. Food and Drug Administration 1970.
- 44 Canada Go. Controlled Drugs and Substances Act 2017.
- 45 Martin-Santos R, Crippa JA, Batalla A, Bhattacharyya S, Atakan Z, Borgwardt S, *et al.* Acute effects of a single, oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 4966-79.
- 46 Fusar-Poli P, Crippa JA, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Allen P, Martin-Santos R, *et al.* Distinct effects of {delta}9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. *Arch Gen Psychiatry* 2009; 66: 95-105.
- 47 Winton-Brown TT, Allen P, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Fusar-Poli P, Crippa JA, *et al.* Modulation of auditory and visual processing by delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 1340-8.
- 48 Parker LA, Burton P, Sorge RE, Yakiwchuk C, Mechoulam R. Effect of low doses of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; 175: 360-6.
- 49 Vann RE, Gamage TF, Warner JA, Marshall EM, Taylor NL, Martin BR, *et al.* Divergent effects of cannabidiol on the discriminative stimulus and place conditioning effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Drug Alcohol Depend* 2008; 94: 191-8.
- 50 Ortega-Alvaro A, Ternianov A, Aracil-Fernandez A, Navarrete F, Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J. Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addict Biol* 2015; 20: 43-55.
- 51 Pastor A, Farre M, Fito M, Fernandez-Aranda F, de la Torre R. Analysis of ECs and related compounds in plasma: artifactual isomerization and ex vivo enzymatic generation of 2-MGs. *J Lipid Res* 2014; 55: 966-77.
- 52 Aracil-Fernandez A, Almela P, Manzanares J. Pregabalin and topiramate regulate behavioural and brain gene transcription changes induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. *Addict Biol* 2011: doi: 10.1111/j.369-600.2011.00406.x.
- 53 Oliva JM, Ortiz S, Palomo T, Manzanares J. Behavioural and gene transcription alterations induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. *J Neurochem* 2003; 85: 94-104.
- 54 Navarrete F, Rubio G, Manzanares J. Effects of naltrexone plus topiramate on ethanol self-administration and tyrosine hydroxylase gene expression changes. *Addict Biol* 2013.

- 55 Katsidoni V, Anagnostou I, Panagis G. Cannabidiol inhibits the reward-facilitating effect of morphine: involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal raphe nucleus. *Addict Biol* 2013; 18: 286-96.
- 56 Bhargava HN. Effect of some cannabinoids on naloxone-precipitated abstinence in morphine-dependent mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1976; 49: 267-70.
- 57 Ren Y, Whittard J, Higuera-Matas A, Morris CV, Hurd YL. Cannabidiol, a nonpsychotropic component of cannabis, inhibits cue-induced heroin seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. *J Neurosci* 2009; 29: 14764-9.
- 58 Weiss F LA, Wagner G, Deness G, Kerr T, Watry D, Suto N. Transdermal CBD attenuates cocaine intake in rats with addiction-linked cocaine history. Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego (CA) 2016.
- 59 Viudez-Martinez A, Garcia-Gutierrez MS, Navarron CM, Morales-Calero MI, Navarrete F, Torres-Suarez AI, *et al.* Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice. *Addict Biol* 2017.
- 60 Crippa JA, Zuardi AW, Martin-Santos R, Bhattacharyya S, Atakan Z, McGuire P, *et al.* Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence. *Hum Psychopharmacol* 2009; 24: 515-23.
- 61 Allsop DJ, Copeland J, Lintzeris N, Dunlop AJ, Montebello M, Sadler C, *et al.* Nabiximols as an agonist replacement therapy during cannabis withdrawal: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry* 2014; 71: 281-91.
- 62 Haney M, Malcolm RJ, Babalonis S, Nuzzo PA, Cooper ZD, Bedi G, *et al.* Oral Cannabidiol does not Alter the Subjective, Reinforcing or Cardiovascular Effects of Smoked Cannabis. *Neuropsychopharmacology* 2016; 41: 1974-82.
- 63 Itzhak Y, Martin JL. Cocaine-induced conditioned place preference in mice: induction, extinction and reinstatement by related psychostimulants. *Neuropsychopharmacology* 2002; 26: 130-4.
- 64 Navarrete F, Rodriguez-Arias M, Martin-Garcia E, Navarro D, Garcia-Gutierrez MS, Aguilar MA, *et al.* Role of CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors in the rewarding, reinforcing, and physical effects of nicotine. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38: 2515-24.
- 65 Vezina P, Stewart J. Morphine conditioned place preference and locomotion: the effect of confinement during training. *Psychopharmacology (Berl)* 1987; 93: 257-60.
- 66 Oliva JM, Ortiz S, Palomo T, Manzanares J. Spontaneous cannabinoid withdrawal produces a differential time-related responsiveness in cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor gene expression in the mouse brain. *J Psychopharmacol* 2004; 18: 59-65.





**Artículo 2: DOI: 10.1111/adb.12495**

**Title: Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice**

Adrián Viudez-Martínez<sup>1</sup>, María S. García-Gutiérrez<sup>1,2</sup>, Carmen M. Navarrón<sup>1</sup>, María Isabel Morales-Calero<sup>3</sup>, Francisco Navarrete<sup>1,2</sup>, Ana Isabel Torres-Suárez<sup>3</sup>, Jorge Manzanares<sup>1,2</sup>

1 Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda. de Ramón y Cajal s/n, San Juan de Alicante, 03550 Alicante, Spain; 2 Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS), Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain; and 3 Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Institute of Industrial Pharmacy, Spain..

Author to whom correspondence should be addressed:

Dr. Jorge Manzanares

Instituto de Neurociencias

Universidad Miguel Hernández-CSIC

Avda. Ramón y Cajal s/n, 03550

San Juan de Alicante, Spain.

E-mail: jmanzanares@goumh.umh.es

## **Abstract**

This study evaluated the effects of cannabidiol (CBD) on ethanol reinforcement, motivation and relapse in C57BL/6 J mice. The effects of CBD (60 mg/kg, i.p.) on blood ethanol concentration, hypothermia and handling-induced convulsions associated to acute ethanol administration were evaluated. The two-bottle choice paradigm was performed to assess the effects of CBD (30, 60 and 120 mg/kg/day, i.p.) on ethanol intake and preference. In addition, an oral ethanol self-administration experiment was carried out to evaluate the effects of CBD [a single s.c. administration of a microparticle formulation providing CBD continuous controlled release (30 mg/kg/day)] on the reinforcement and motivation for ethanol. The effects of CBD (60 and 120 mg/kg/day, i.p.) on ethanol-induced relapse were also evaluated. Gene expression analyses of tyrosine hydroxylase in ventral tegmental area and  $\mu$ -opioid (Oprm1), cannabinoid (CB1r and CB2r) and GPR55 receptors in nucleus accumbens (NAcc) were carried out by real-time polymerase chain reaction. Cannabidiol reduced the ethanol-induced hypothermia and handling-induced convulsion but failed to modify blood ethanol concentration. CBD reduced ethanol consumption and preference in the two-bottle choice, significantly decreased ethanol intake and the number of effective responses in the oral ethanol self-administration, and reduced ethanol-induced relapse. Furthermore, the administration of CBD significantly reduced relative gene expression of tyrosine hydroxylase in the ventral tegmental area, Oprm1, CB1r and GPR55 in the NAcc and significantly increased CB2r in the NAcc. Taken together, these results reveal that the administration of CBD reduced the reinforcing properties, motivation and relapse for ethanol. These findings strongly suggest that CBD may result useful for the treatment of alcohol use disorders.

**Keywords:** AUD; cannabidiol; gene expression.

## INTRODUCTION

Alcohol use disorders (AUD), including alcohol dependence or alcohol abuse, represent a serious public health problem worldwide according to the World Health Organization (WHO 2011). Although patients receive pharmacological treatment and psychosocial therapies, the clinical outcome is poor, with up to 70 percent of patients resuming drinking within 1 year (Aronson 2015). Therefore, it is necessary to invest much effort and resources in identifying new therapeutic drugs to improve the efficacy of the treatment of alcoholism.

Cannabidiol (CBD) is one of the main compounds present in the plant *Cannabis sativa* that lacks psychoactive properties. Several studies showed that CBD presents anxiolytic (Guimaraes et al. 1990; Moreira et al. 2006; Resstel et al. 2006; Lemos et al. 2010; de Mello Schier et al. 2014), antidepressant (El-Alfy et al. 2010; Zanelati et al. 2010; Schiavon et al. 2016), antipsychotic (Zuardi et al. 1991; Moreira & Guimaraes 2005; Long et al. 2006; Leweke et al. 2012; Levin et al. 2014) and neuroprotective activity (Hamelink et al. 2005). Furthermore, the administration of CBD decreased defensive behaviors evoked by predator exposure, a proposed model of panic attack and post-traumatic stress disorder (Campos et al. 2012; Uribe-Marino et al. 2012). In agreement with these findings, in humans, the administration of CBD reduced anxiety and the psychotic-like symptoms induced by  $\Delta^9$ -THC (Zuardi et al. 1982; Morgan & Curran 2008).

In addition, the administration of CBD attenuated the neurodegeneration induced by a binge-drinking model of alcohol by reducing the number of Fluoro-Jade B positive cells in the entorhinal cortex, a common situation derived from ethanol intoxication (Liput et al. 2013).

Despite all the potential therapeutic uses suggested for CBD, its precise mechanism of action remains to be elucidated. Indeed, CBD may interact with more than 65 different targets, including voltage-gated sodium channel-1, voltage-gated calcium channels, cannabinoid receptors (CB1r and CB2r), G protein-coupled receptor 55 (GPR55r), vanilloid receptor 1 (TRPV), serotonergic

receptor 1A (5-HT1Ar),  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) (Bisogno et al. 2001; Russo et al. 2005; Kathmann et al. 2006; Ryberg et al. 2007; Thomas et al. 2007; Campos et al. 2012; Ibeas Bih et al. 2015).

It is also important to note that CBD presents low oral bioavailability (approximately 6 percent) and poor solubility in aqueous solutions (Agurell et al. 1981; Agurell et al. 1986). The topic administration of CBD provided more constant plasma levels of CBD because transdermal gels bypass the first pass phenomenon (Liput et al. 2013). In addition, i.p. administration of CBD presents a higher bioavailability when compared with oral administration (650 percent higher in plasma and 530 percent in brain) (Deiana et al. 2012). However, this option is limited in the daily practice. Therefore, further routes of administration for CBD deserve more exploration.

The aim of this study was to evaluate the potential efficacy of CBD in ethanol consumption, motivation and ethanol-induced relapse. To this purpose, the effects of CBD (60 and 120 mg/kg/day, i.p.) on ethanol consumption and preference for ethanol were evaluated in the two-bottle choice (TBC) paradigm. The oral ethanol self-administration (OEA) paradigm evaluated the effects of CBD (poly- $\epsilon$ -caprolactone spherical microparticles with small pores providing a continuous controlled release, a single administration lasted up to 2 weeks) (30 mg/kg/day, s.c.) on the reinforcement and motivation for ethanol. The effects of CBD (60 and 120 mg/kg/day, i.p.) on ethanol-induced relapse were also evaluated. Specific changes in the gene expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the ventral tegmental area (VTA),  $\mu$ -opioid (Oprm1), cannabinoid (CB1r and CB2r) and GPR55 receptors in the nucleus accumbens (NAcc) were measured by real-time polymerase chain reaction.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Male C57BL/6 J mice from Charles River (Lille, France) weighing 20–25 g, were housed in groups of six per cage (40 × 25 × 22 cm) under controlled conditions (temperature, 23 ± 2°C; relative humidity, 60 ± 10 percent; 12- hour light/dark cycle, lights on from 8:00 AM to 8:00 PM). Behavioral analyses were initiated 1 week after acclimatization to the animal room and were performed by placing the home cage in the operant-task room during the development of conditioning experiments. All the studies were conducted in compliance with the Spanish Royal Decree 1201/2005, the Spanish Law 32/2007 and the European Union Directive of September 22, 2010 (2010/63/UE), regulating the care of experimental animals.

### Drugs

Cannabidiol for i.p. administration was obtained from STI Pharmaceuticals (Essex, UK) and dissolved in ethanol : cremophor : saline (1:1:18) immediately before the use to obtain the required doses (30, 60 and 120 mg/kg). Poly-ε-caprolactone spherical microparticles with small pores providing a CBD continuous controlled release (30 mg/kg/day) for s.c. administration was obtained from the Pharmaceutical Technology Department (Complutense University of Madrid, Madrid, Spain) (for more details, see Supporting Information). For the oral self-administration procedures, absolute ethanol and saccharin sodium salt were dissolved in distilled water [8 percent (v/v) ethanol solution (EtOH)].

### Handling-induced convulsions test

The effects of CBD (60 mg/kg, i.p.) or vehicle (VEH) on handling-induced convulsions (HICs) associated with the acute administration of ethanol (4 g/kg, p.o.) or its saline vehicle were evaluated. To this aim, mice were divided into three experimental groups: VEH + EtOH, CBD +

EtOH and CBD + saline. CBD or VEH were administered 30 minutes before the administration of ethanol or saline. Briefly, each mouse was picked up gently by the tail and, if necessary, lightly rotated. The HIC was scored as follows: 0, no convulsion; 1, facial grimace only after a gentle spin; 2, no convulsion when lifted, but tonic convulsion elicited by a gentle spin; 3, tonic-clonic convulsion after a gentle spin; 4, tonic convulsion when lifted; 5, tonic-clonic convulsion when lifted; and 6, spontaneous tonic-clonic convulsions (Crabbe et al. 1990; Crabbe et al. 1991). The HIC score was measured hourly up to 6 hours after ethanol administration.

#### Sensitivity to acute ethanol-induced hypothermia

The effects of CBD on the hypothermia induced by the acute administration of ethanol were evaluated. To this aim, body temperature was determined in three different experimental groups (VEH + EtOH, CBD + saline and CBD + EtOH) by inserting a rectal probe of approximately 1 cm into the mice's rectum (Radcliffe et al. 2005). Briefly, CBD (60 mg/kg, i.p.) or VEH was administered 1 hour before the administration of ethanol (3 g/kg, p.o.) or saline. Body temperature was measured before and 30, 60, 120, 240 and 480 minutes after the administration of ethanol. The degree of hypothermia was expressed as the difference between the baseline temperature and the temperature measured at the times specified earlier. Only statistical differences higher than 1.1°C were considered significant.

#### Blood ethanol concentrations (BEC)

Mice were divided into three different groups (VEH + EtOH, CBD + saline and CBD + EtOH). CBD (60 mg/kg, i.p.) or VEH were administered 30 minutes before the administration of ethanol (3 g/kg, p.o.) or saline. One hour after the administration of ethanol, trunk blood was collected after rapid decapitation. Concentrations of EtOH were determined in plasma using an ethanol assay kit (Abcam, Cambridge, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

## Voluntary ethanol consumption in a two-bottle choice paradigm

Mice were evaluated in a voluntary and chronic ethanol intake following a modified protocol (Hungund et al. 2003; Ortega-Alvaro et al. 2015). One week before the beginning of the experiment, all mice were individually housed in cages equipped with two feeding bottles containing only water to be acclimated and avoid possible stress. The two-bottle free choice paradigm with ethanol and water was performed as follows: one bottle always contained water, and the other contained gradually increasing ethanol concentrations (2, 4, 6 and 8 percent per 4 days). Once the ethanol intake/consumption was stabilized, mice were administered with different doses of CBD (30, 60 and 120 mg/kg, i.p.) each one of them for 5 days (6 days for the 120 mg/kg dose) until day 16. Bottles were alternated in order to prevent any place preference bias. Food was available ad libitum, and mice were weighed every 4 days. The volume of ethanol and water consumed was carefully measured every day. The amount of ethanol consumed was calculated individually for each mouse, and the values were expressed as g/kg/ day. The ratio of ethanol preference was also determined [ethanol preference: ethanol intake/(ethanol intake + water intake)].

## Oral ethanol self-administration

### Experiment 1: effects of cannabidiol on the reinforcement and motivation for ethanol

The OEA evaluation was carried out in 12 modular operant chambers (Panlab) equipped with a chamber light, two levers, one receptacle to drop liquid solution, one syringe pump, one stimulus light and one buzzer. PACKWIN software (Panlab) controlled stimulus and fluid delivery and recorded operant responses. Pressing one lever did not have any consequence (inactive lever), whereas pressing the other lever delivered 36  $\mu$ l of fluid combined with a 0.5-second stimulus light and a 0.5-second, 2850- Hz, 85-dB buzzer beep (active lever), followed by a 6- second timeout period. The experiment was divided into four phases: training, saccharin substitution and

basal 8 percent ethanol consumption as previously described (Navarrete et al. 2014) (for more details, see Supporting Information).

Once the animals underwent fixed ratio 1 (FR1), fixed ratio 3 (FR3) and progressive ratio (PR) stages, they were selected according to the following learning criteria: (1) reaching  $\geq 70$  percent of preference for the active lever; (2)  $\geq 10$  reinforced trials by session in FR1 and FR3, and  $\geq 5$  reinforced trials in PR; (3)  $\leq 30$  percent deviation in the number of reinforced trials, all during three consecutive days (FR1 and FR3); (4) mean 8 percent ethanol consumption  $\geq 500$   $\mu\text{l}$  (1.5 g/kg) in FR1,  $\geq 300$   $\mu\text{l}$  (0.9 g/kg) in FR3 and  $\geq 117.5$   $\mu\text{l}$  (0.35 g/kg) in PR; and (5) a breaking point  $\geq 12$  in PR. Mice reaching these criteria were randomly distributed into two treatment groups: CBD or VEH. Once the ethanol intake was normalized again, mice received a single administration of CBD (microparticle formulation providing a constant release of CBD, 30 mg/kg/ day, s.c.) or VEH. Subsequently, the selected mice underwent FR1 (5 days), FR3 (5 days) and PR (1 day).

#### Experiment 2: effects of cannabidiol on the reinforcement and motivation for water

In order to discard that the pharmacological treatment with CBD could also modify the motivation of mice for natural stimulus, an oral self-administration with water was performed as previously described (Navarrete et al. 2014) (for more details, see Supporting Information).

#### Experiment 3: effects of cannabidiol on ethanol-induced relapse

In order to evaluate the effects of CBD on ethanol-induced relapse, another OEA was carried out following the previously mentioned protocol with the following exception: after training, substitution and intake stabilization (8 percent ethanol), the OEA paradigm used in the present experiment included the following consecutive experimental sessions: deprivation period 1—reintroduction 1—deprivation period 2—reintroduction 2—extinction—relapse (Supporting Information Fig. S1). The periods of deprivation consisted in 2-day suspension of ethanol self-



administration. Mice remained in their home cages and received water and food ad libitum. After this period, mice were exposed again to the operant chambers, and their responses were assessed for 5 days (re-introduction sessions). Once stable responses for ethanol after the second re-introduction were reached (5 days), an extinction period, in which responding on the active lever delivered water, was introduced. Test for reinstatement began after 5 days of extinction, once the mice reached the extinction criteria: a significant reduction in the number of active lever presses compared with the number of active lever presses during the last day of FR1. During the days of reinstatement evaluation, responding on the active lever delivered EtOH 8 percent (v/v). During the last 2 days of reinstatement evaluation, mice received CBD (60 mg/kg, i.p.) (first day) and CBD (120 mg/kg, i.p.) (second day) 90 minutes before the session.

#### Gene expression studies by real-time polymerase chain reaction

Relative gene expression analyses of TH in the VTA and  $\mu$ -opioid (Oprm1), cannabinoid (CB1r and CB2r) and GPR55 receptors in the NAcc were carried out in mice exposed to the TBC and OEA-experiment 1. Briefly, brain sections were cut (500  $\mu$ m) in a cryostat (-10°C), containing the regions of interest according to Paxinos and Franklin (Paxinos & Franklin 2001), mounted onto slides and stored at -80°C. Sections were microdissected following the method described by Palkovits (Palkovits 1983; Garcia-Gutierrez et al. 2010). Total RNA was obtained from brain micropunches with TRI Reagent extraction reagent (Applied Biosystems, Madrid, Spain). After DNase digestion, reverse transcription was carried out following the instructions of the manufacturer (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Quantitative analysis of the relative abundance of TH (Mm00447546\_m1), Oprm1 (Mm01188089\_m1), CB1r (Mm00432621\_s1), CB2r (Mm00438286\_m1) and GPR55 (Mm02621622\_s1) gene expressions was performed on the StepOne Sequence Detector System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). All reagents were obtained from Life Technologies, and the manufacturer's protocols were followed. The reference

gene used was 18S rRNA (Mm03928990\_g1), detected using Taqman ribosomal RNA control reagents. All primer-probe combinations were optimized and validated for relative quantification of gene expression. Data for each target gene were normalized to the endogenous reference gene, and the fold change in target gene expression was determined using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak & Schmittgen 2001).

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by the Student–Newman–Keuls test to compare the treatment and control groups at different time points on the TBC and OEA paradigms. HIC, BEC and the sensitivity to acute ethanol-induced hypothermia test were also analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by the Student–Newman–Keuls test. Statistical analyses of gene expression studies and progressive ratio phase in OEA were performed using the Student's t-test. Statistical analyses were performed with SIGMASTAT (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) software. Differences were considered significant if the probability of error was less than 5 percent.

## RESULTS

### Handling induced convulsions test

Handling-induced convulsion score was measured every hour, up to 6 hours after ethanol administration. A single dose of ethanol (4 g/kg, i.p.) produced significantly more signs of withdrawal in VEH + EtOH group (n = 10) than in CBD + EtOH (n = 10) and CBD + saline (n = 10) groups during the first and second hours of withdrawal (Supporting Information Fig. S2a) [two-way repeated measures (RM) ANOVA, treatment  $F_{(2,209)} = 27.630$ ;  $P < 0.001$ , time course  $F_{(6,209)} = 29.246$ ;  $P < 0.001$ , treatment  $\times$  time course  $F_{(12,209)} = 25.408$ ;  $P < 0.001$ ].

### Ethanol-induced hypothermia

After an acute administration of ethanol (3 g/kg, p.o.), VEH + EtOH (n = 10) mice reached their greatest hypothermia at 30 minutes, while CBD + saline (n = 10) and CBD + EtOH (n = 10) mice did not alter their basal temperature. The temperature in VEH + EtOH mice decreased notably at 30 minutes and then gradually increased to reach almost baseline temperature at 480 minutes (Supporting Information Fig. S2b) (two-way RM ANOVA, treatment  $F(2,149) = 0.803$ ;  $P = 0.459$ , temperature  $F(4,149) = 10.352$ ;  $P < 0.001$ , treatment  $\times$  temperature  $F(8,149) = 5.548$ ;  $P < 0.001$ ).

### Blood ethanol concentration

No significant differences were found in BEC between CBD + EtOH (n = 10) and VEH + EtOH groups (n = 10) (Supporting Information Fig. S2c) (Student's t-test,  $t = -0.00977$ , 16 d.f.,  $P = 0.992$ ).

### Voluntary ethanol consumption in a two-bottle choice paradigm

A significant reduction of ethanol consumption (Fig. 1b) (two-way RM ANOVA, treatment  $F_{(1,446)} = 41.104$ ;  $P < 0.001$ , day  $F_{(15,446)} = 8.386$ ;  $P < 0.001$ , treatment  $\times$  day  $F_{(15,446)} = 3.583$ ;  $P < 0.001$ ) and preference (Fig. 1c) (two-way RM ANOVA; treatment  $F_{(1,438)} = 56.554$ ,  $P < 0.001$ ; day  $F_{(15,438)} = 3.085$ ,  $P < 0.001$ ; treatment  $\times$  day  $F_{(15,446)} = 2.796$ ,  $P < 0.001$ ) were observed in the CBD treated group (n = 10) compared with VEH group (n = 10).

### Gene expression alterations induced by cannabidiol i.p. administration during two-bottle choice

The results showed that the administration with CBD decreased TH gene expression in the VTA (Fig. 2a) (Student's t-test:  $t = 9.865$ , 28 d.f.,  $P < 0.001$ ) and Oprm1 (Fig. 2b) (Student's t-test:  $t = 3.859$ , 15 d.f.,  $P = 0.002$ ), CB1r (Fig. 2c) (Student's t-test:  $t = 7.235$ , 28 d.f.,  $P = <0.001$ ) and

GPR55 gene expression (Fig. 2e) (Student's t-test:  $t = 5.691$ , 15 d.f.,  $P < 0.001$ ) in the NAcc. On the other hand, a significant increase of CB2r gene expression in the NAcc was observed in CBD-treated group compared with VEH treated group (Fig. 2d) (Student's t-test:  $t = -5.313$ , 28 d.f.,  $P < 0.001$ ).

#### Oral ethanol self-administration

##### Experiment 1: effects of cannabidiol on the reinforcement and motivation for ethanol

During the stabilization phase, no significant difference was observed in the number of active lever presses (Fig. 3b) (two-way RM ANOVA; group  $F_{(1,99)} = 0.05$ ,  $P = 0.826$ ; day  $F_{(4,99)} = 12.269$ ,  $P < 0.001$ ; group  $\times$  day  $F_{(4,99)} = 0.528$ ,  $P = 0.715$ ) nor in the ethanol intake (Fig. 3c) (two-way RM ANOVA; group  $F_{(1,99)} = 0.254$ ,  $P = 0.620$ ; day  $F_{(4,99)} = 12.434$ ,  $P < 0.001$ ; group  $\times$  day  $F_{(4,99)} = 0.147$ ,  $P = 0.964$ ) between mice that will be treated with CBD and those that will be treated with VEH.

The administration of the CBD-controlled release microparticle s.c. formulation (30 mg/kg/day, s.c.) significantly reduced the number of active lever presses (Fig. 3b) (two-way RM ANOVA; treatment  $F_{(1,139)} = 21.911$ ,  $P < 0.001$ ; day  $F_{(6,139)} = 1.659$ ,  $P = 0.138$ ; treatment  $\times$  day  $F_{(6,139)} = 3.236$ ,  $P = 0.006$ ) and ethanol intake (Fig. 3c) (two-way RM ANOVA; treatment  $F_{(1,139)} = 11.851$ ,  $P = 0.003$ ; day  $F_{(6,139)} = 1.861$ ,  $P = 0.094$ ; treatment  $\times$  day  $F_{(6,139)} = 3.238$ ,  $P = 0.006$ ) in FR1.

Also, CBD reduced the number of active lever pressers (Fig. 3b) (two-way RM ANOVA; treatment  $F_{(1,99)} = 70.971$ ,  $P < 0.001$ , day  $F_{(4,99)} = 6.129$ ,  $P < 0.001$ ; treatment  $\times$  day  $F_{(4,99)} = 2.745$ ,  $P = 0.035$ ) and ethanol intake (Fig. 3c) (two-way RM ANOVA; treatment  $F_{(1,99)} = 156.687$ ,  $P < 0.001$ ; day  $F_{(4,99)} = 12.765$ ,  $P < 0.001$ ; treatment  $\times$  day  $F_{(4,99)} = 2.551$ ,  $P = 0.046$ ) in FR3. Interestingly, CBD-treated mice achieved a lower breaking point compared with the VEH group (Fig. 3d) (Student's t-test,  $t = 2.368$ , 18 d.f.,  $P = 0.029$ ).

## Experiment 2: effects of cannabidiol on the reinforcement and motivation for water

The administration of the CBD-controlled release microparticle s.c. formulation (30 mg/kg/day, s.c.) did not reduce the number of active lever presses in FR1 (two-way RM ANOVA; group  $F_{(1,104)} = 0.0477$ ,  $P = 0.829$ ; day  $F_{(4,104)} = 6.958$ ,  $P < 0.001$ ; group  $\times$  day  $F_{(4,104)} = 0.877$ ,  $P = 0.482$ ) nor in FR3 (two-way RM ANOVA; group  $F_{(1,104)} = 0.0451$ ,  $P = 0.510$ ; day  $F_{(4,104)} = 1.988$ ,  $P = 0.105$ ; group  $\times$  day  $F_{(4,104)} = 0.611$ ,  $P = 0.656$ ) (Supporting Information Fig. S3a).

No reduction in the water intake was seen after the administration of CBD in FR1 (two-way RM ANOVA; group  $F_{(1,104)} = 0.0081$ ,  $P = 0.929$ ; day  $F_{(4,104)} = 6.996$ ,  $P < 0.001$ ; group  $\times$  day  $F_{(4,104)} = 0.876$ ,  $P = 0.483$ ) nor in FR3 (two-way RM ANOVA; group  $F_{(1,104)} = 0.213$ ,  $P = 0.65$ ; day  $F_{(4,104)} = 1.219$ ,  $P = 0.310$ ; group  $\times$  day  $F_{(4,104)} = 0.747$ ,  $P = 0.563$ ) (Supporting Information Fig. S3b). No difference was found between the breaking point achieved in the PR stage by the group treated with CBD and the one treated with VEH (Student's t-test,  $t = 0.257$ , 19 d.f.,  $P = 0.800$ ) (Supporting Information Fig. S3c).

Gene expression alterations induced by cannabidiol controlled release microparticle subcutaneous formulation (30 mg/kg, s.c.)

The administration of CBD significantly decreased TH gene expression (Fig. 4a) (Student t-test:  $t = 3.859$ , 15 d.f.,  $P = 0.002$ ) in the VTA and Oprm1 (Fig. 4b) (Student t-test:  $t = 3.173$ , 18 d.f.,  $P = 0.005$ ), CB1r (Fig. 4c) (Student t-test:  $t = 2.722$ , 16 d.f.,  $P < 0.05$ ) and GPR55 gene expression (Fig. 4e) (Student t-test:  $t = 5.691$ , 15 d.f.,  $P = <0.001$ ) in the NAcc. Interestingly, CBD significantly increased CB2r gene expression in NAcc (Fig. 4d) (Student t-test:  $t = -15.700$ , 14 d.f.,  $P < 0.001$ ) compared with VEH group.

### Experiment 3: effects of cannabidiol on ethanol relapse

During the normalization FR1 phase, no significant difference in the number of active lever presses (Fig. 5a) (two-way RM ANOVA; group  $F(1,543) = 0.227$ ,  $P = 0.637$ ; day  $F(15,543) = 3.037$ ,  $P < 0.001$ ; group  $\times$  day  $F(15,543) = 0.849$ ,  $P = 0.622$ ) nor in the ethanol intake (Fig. 5b) (two-way RM ANOVA group  $F(1,543) = 0.005$ ;  $P = 0.943$ , day  $F(15,543) = 2.924$ ;  $P < 0.001$  and group  $\times$  day  $F(1,543) = 1.207$ ;  $P = 0.262$ ) were observed between mice that will be treated with CBD and those that will be treated with VEH.

During the extinction period, a significant reduction in the number of active presses was observed in both groups compared with the last day of FR1 before extinction. The degree of reduction was similar in both groups: 66.29 percent in mice that will be treated with VEH and 57.94 percent in those that will be treated with CBD (Fig. 5a) (two-way RM ANOVA; group  $F(1,169) = 0.392$ ,  $P = 0.536$ ; day  $F(4,169) = 0.855$ ,  $P = 0.493$ ; group  $\times$  day  $F(4,169) = 1.850$ ,  $P = 0.123$ ).

The administration of CBD (60 mg/kg, i.p.) did not induce any modification in the number of active lever presses nor in ethanol intake. However, the administration of CBD (120 mg/kg, i.p.) significantly reduced the number of active lever presses (Fig. 5a) (two-way RM ANOVA; group  $F(1,101) = 2.472$ ,  $P = 0.126$ ; day  $F(2,101) = 4.794$ ,  $P = 0.011$ ; group  $\times$  day  $F(2,101) = 5.528$ ,  $P = 0.006$ ) and ethanol intake (Fig. 5b) (two-way RM ANOVA; group  $F(1,101) = 3.860$ ,  $P = 0.058$ ; day  $F(2,101) = 1.336$ ,  $P = 0.270$ ; group  $\times$  day  $F(2,101) = 6.927$ ,  $P = 0.002$ ) compared with its corresponding control group.

## DISCUSSION

The present study clearly demonstrated that the administration of CBD reduced the reinforcing properties, motivation and relapse for ethanol. This statement is supported by the following observations: (1) The administration of CBD (60 mg/kg, i.p.) reduced hypothermia and HICs

associated with high acute doses of ethanol. Indeed, CBD did not modify BEC. (2) CBD (30, 60 and 120 mg/kg, i.p.) significantly decreased ethanol consumption and preference in the TBC. (3) A single s.c. administration of a microparticle formulation providing CBD continuous controlled release (30 mg/kg/day) significantly reduced ethanol intake and motivation to drink ethanol in the OEA; nevertheless, CBD administration had no effect over natural stimulus such as water. (4) Furthermore, the administration of CBD (60 and 120 mg/kg, i.p.) reduced alcohol-induced relapse in the OEA. (5) These behavioral alterations were accompanied by gene expression alterations in cannabinoid (CB1r and CB2r) and GPR55 receptors and Oprm1 in the NAcc and TH in the VTA.

Recently, CBD has emerged as a promising therapeutic option for the treatment of AUD based on its anxiolytic, antidepressant, antipsychotic and neuroprotective properties (Guimaraes et al. 1990; Zuardi et al. 1991; Hamelink et al. 2005; Long et al. 2006; Moreira et al. 2006; El-Alfy et al. 2010; Zanelati et al. 2010; Leweke et al. 2012; Levin et al. 2014). In our study, several paradigms were used to evaluate the effects of CBD on ethanol reinforcement, motivation and relapse in C57BL/6 J mice.

Initially, we evaluated the effects of CBD (60 mg/kg, i. p.) on BEC, hypothermia and HICs associated to acute ethanol administration. The administration of CBD reduced the hypothermia and HICs associated with the acute administration of high doses of ethanol. Interestingly, the results demonstrated that CBD did not modify BEC. Despite further studies are needed to elucidate the exact mechanism underlying these effects, it is tempting to speculate that a pharmacodynamic interaction between CBD and ethanol may be involved.

To elucidate if CBD may modulate the reinforcing properties of ethanol, the effects of CBD were evaluated in the TBC. The results demonstrated that CBD (30, 60 and 120 mg/kg, i.p.) significantly reduced ethanol consumption and ethanol preference. These results suggest that CBD reduces the motivational properties of ethanol.

Furthermore, to evaluate the effects of CBD on motivation for ethanol consumption, an oral self-administration study was performed. As previously mentioned, one of the main limitations to study the effects of CBD is the low bioavailability associated to certain patterns of administration, such as the oral and oral-mucosal/sublingual administrations (Hawksworth & McArdle 2004). For this reason, other routes of administration, such as inhaled route, were examined. However, the specialized equipment and patient cooperation needed hampered its potential therapeutic use (Ohlsson et al. 1986). In our study, we evaluated an s.c. formulation (poly- $\epsilon$ -caprolactone spherical microparticles with small pores formulation) providing a continuous controlled release of CBD (30 mg/kg, s.c.) during 14 days (de la Ossa Hernán Pérez et al. 2012). Data analysis demonstrated that one s.c. administration of this formulation significantly reduced the motivation (number of active lever pressers) and ethanol intake during FR1 and FR3 and PR 11 days after its administration, but had no effect on the water oral self-administration paradigm.

In addition, we also evaluated if CBD may modulate the ethanol-induced relapse. Interestingly, the administration of CBD (60 and 120 mg/kg, i.p.) significantly reduced ethanol-induced relapse in the OEA. Taken together, these results demonstrated that CBD reduced the reinforcing and motivational properties of ethanol and the relapse to ethanol. These studies are in agreement with preliminary results suggesting the potential utility of CBD for the treatment of drug addiction; however, further studies of the effects of CBD in stress-induced or context-induced relapse are needed. Animal studies revealed that CBD reduced reward-facilitating effect of heroin (Katsidoni et al., 2013), withdrawal signs associated with naloxone (Bhargava, 1976) and cue-induced heroin-seeking behavior in rodents (Ren et al. 2009). In humans, a case report study revealed that CBD induced a rapid decrease of withdrawal symptoms of cannabis (Crippa et al., 2013). In addition, preliminary clinical studies suggest the potential therapeutic use of CBD for nicotine (Morgan et al., 2010) and heroin-related use disorders (Hurd et al., 2015).



Despite CBD was proposed to activate or modify the function of several receptors in the central nervous system, including CB1r, CB2r, GPR55r, TRPV, 5-HT1A,  $\mu$  and  $\delta$  receptors (Bisogno et al. 2001; Campos et al., 2012; Kathmann et al. 2006; Russo et al. 2005; Ryberg et al. 2007; Thomas et al. 2007), the exact mechanisms underlying CBD's actions remain unclear. In this study, we investigated potential alterations in key targets closely related with alcohol addiction, including Oprm-1, TH, CB1r, CB2r and GPR55 receptors by real-time polymerase chain reaction in mice exposed to TBC and OEA (Manzanares et al. 2005; Erdozain & Callado 2014; Ortega-Alvaro et al. 2015). These neurobiological studies were measured in the NAcc and VTA, critical regions for reward, goal-directed behavior and habit formation (Ikemoto & Bonci 2014; Navarrete et al. 2014). The results demonstrated that CBD significantly reduced Oprm-1, CB1r, GPR55 and TH and significantly increased CB2r gene expression in the VTA in both patterns of administration (i.p. in TBC and s.c. in OEA). Despite few data are available, these results are in agreement with some preliminary studies demonstrating a reduction CB1r in the NAcc after the administration of CBD (Ren et al. 2009). Previous studies suggested that CBD acts as a non-competitive allosteric modulator of CB1r through the alteration of anandamide hydrolysis by inhibiting its catabolic enzyme, fatty acid amide hydrolase (Bisogno et al. 2001; Laprairie et al. 2015). Based on that, it is possible to speculate that the modification of the endocannabinoid levels may be responsible (at least in part) of the neurochemical changes induced by CBD. Further studies are needed to elucidate the exact mechanism underlying these neurochemical effects.

In conclusion, the present results clearly demonstrated that CBD reduced the reinforcing and motivational properties of ethanol and prevent ethanol-induced relapse. These behavioral alterations are associated with alterations in key targets closely related with alcohol addiction (Oprm-1, TH, CB1r, CB2r and GPR55). Besides, this study points out the CBD poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres formulation as an ideal type of administration that deserves further exploration and CBD as a potential therapeutic drug for the treatment of AUD.

## **Acknowledgements**

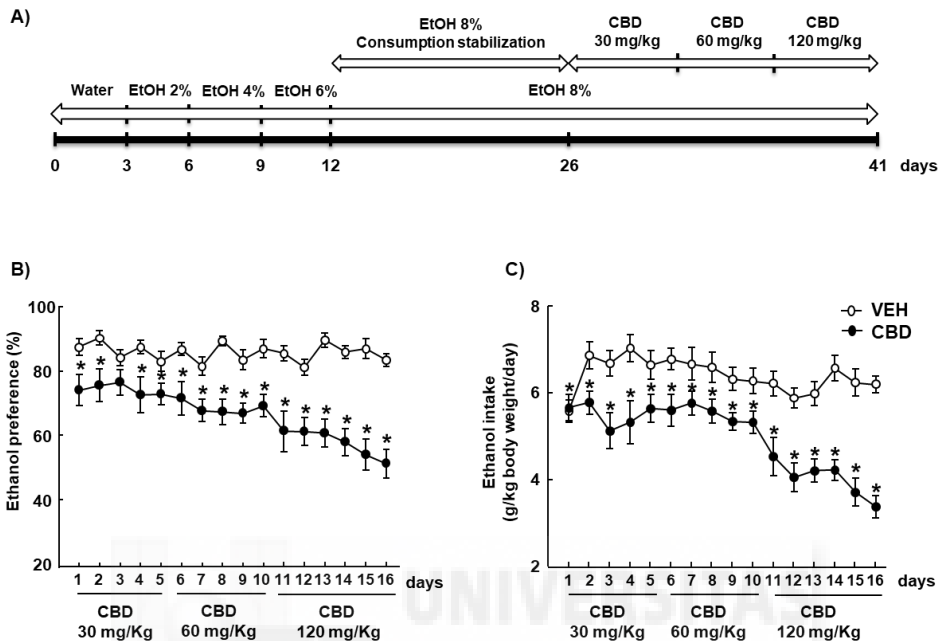
This research was supported by 'Instituto de Salud Carlos III' (RETICS, RD12/0028/0019), 'Plan Nacional Sobre Drogas' (PNSD 2016/016) and 'Ministerio de Economía y Competitividad' (FIS, PI14/00438). Adrián Viudez- Martínez is a predoctoral fellow supported by 'Plan Nacional Sobre Drogas' (PNSD 2016/016).

## **CONFLICT OF INTEREST**

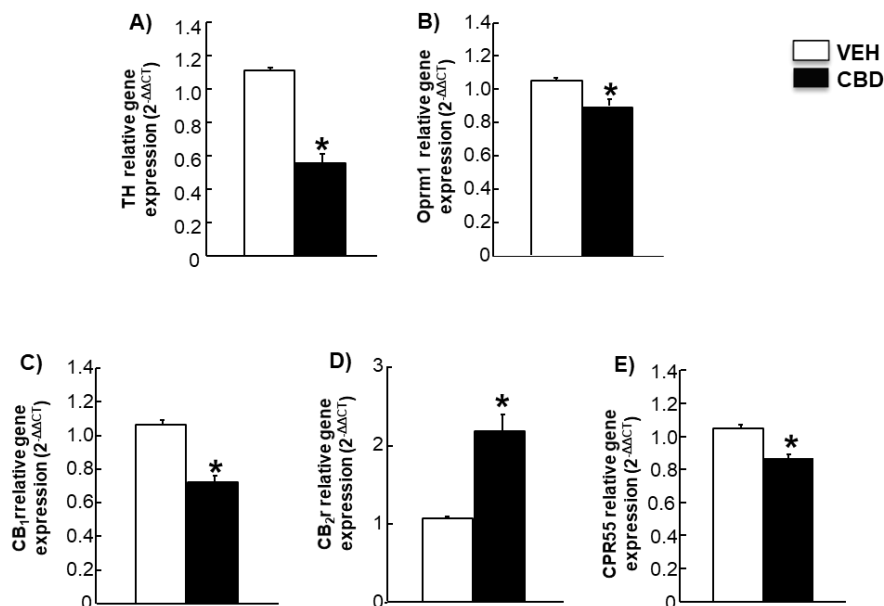
All authors state that they have no biochemical financial interest or potential conflicts of interest.



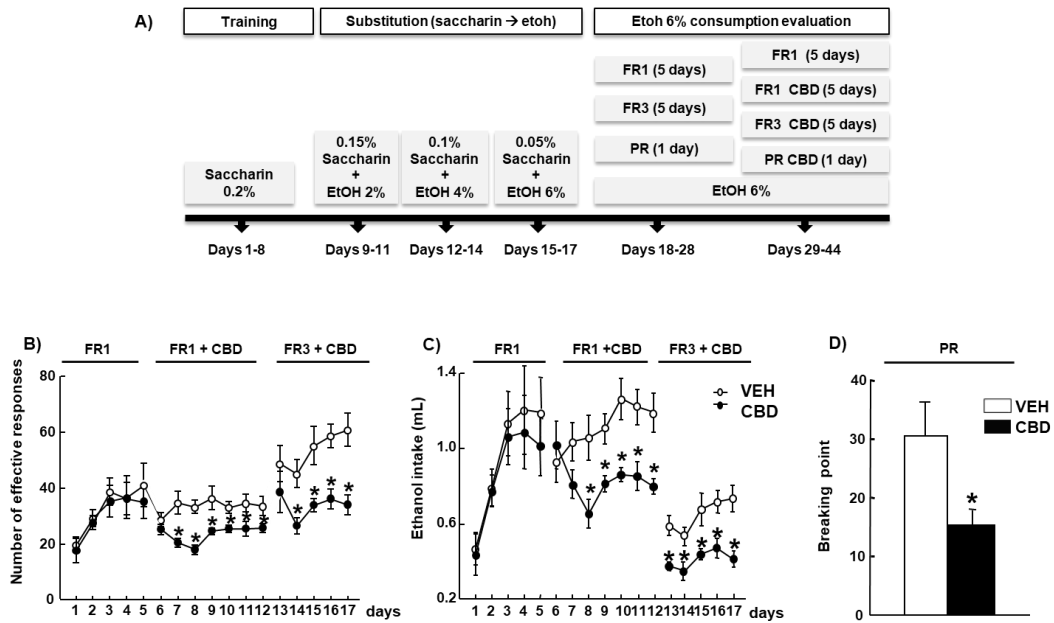
## FIGURES



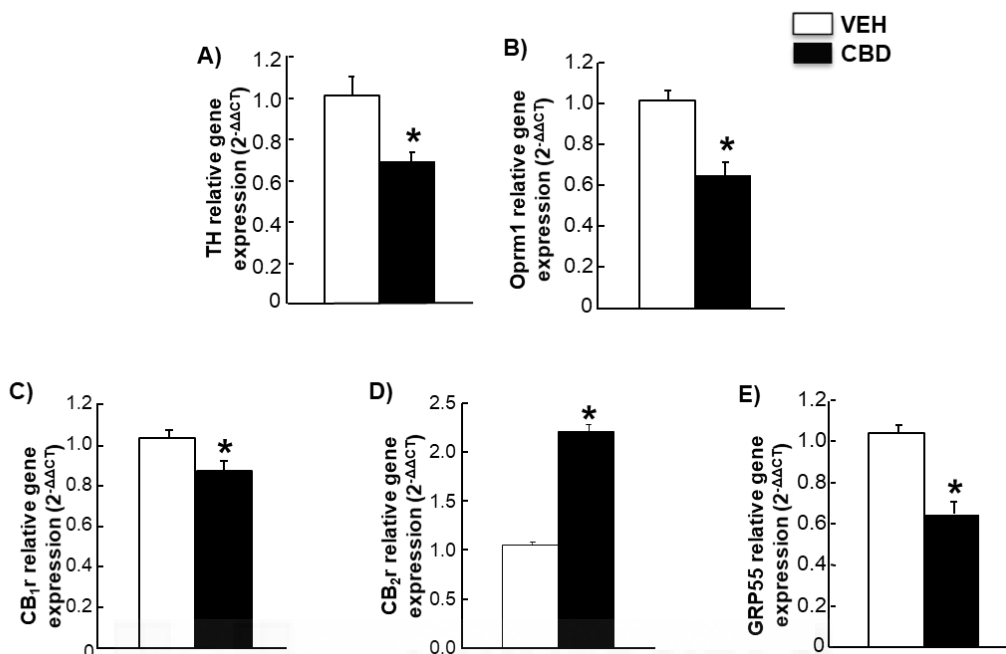
**Figure 1.** Evaluation of two-bottle choice experiment in C57BL/6 J mice treated with VEH or cannabidiol (CBD). (a) Schematic diagram of the two bottle choice paradigm. The ethanol concentration was gradually increased (2, 4, 6 and 8 percent v/v) every 4 days until ethanol 8 percent v/v was stabilized. After that, mice underwent treatment with CBD (starting dose was 30 mg/kg, and it was increased every 3 days until reaching 120 mg/kg). (b) Preference for ethanol consumption expressed as the ratio of the preference for ethanol consumption [ethanol preference = ethanol consumption/(ethanol consumption + water consumption)]. (c) The measures were taken from volume of ethanol consumed every 24 hours and expressed as g/kg/day. The dots represent the means and vertical lines  $\pm$  the standard error of the mean. \*Represents values from CBD-treated mice that are significantly different (two-way repeated measures ANOVA,  $P < 0.005$ ) (Student's t-test,  $P < 0.005$ ) from vehicle-treated group (VEH).



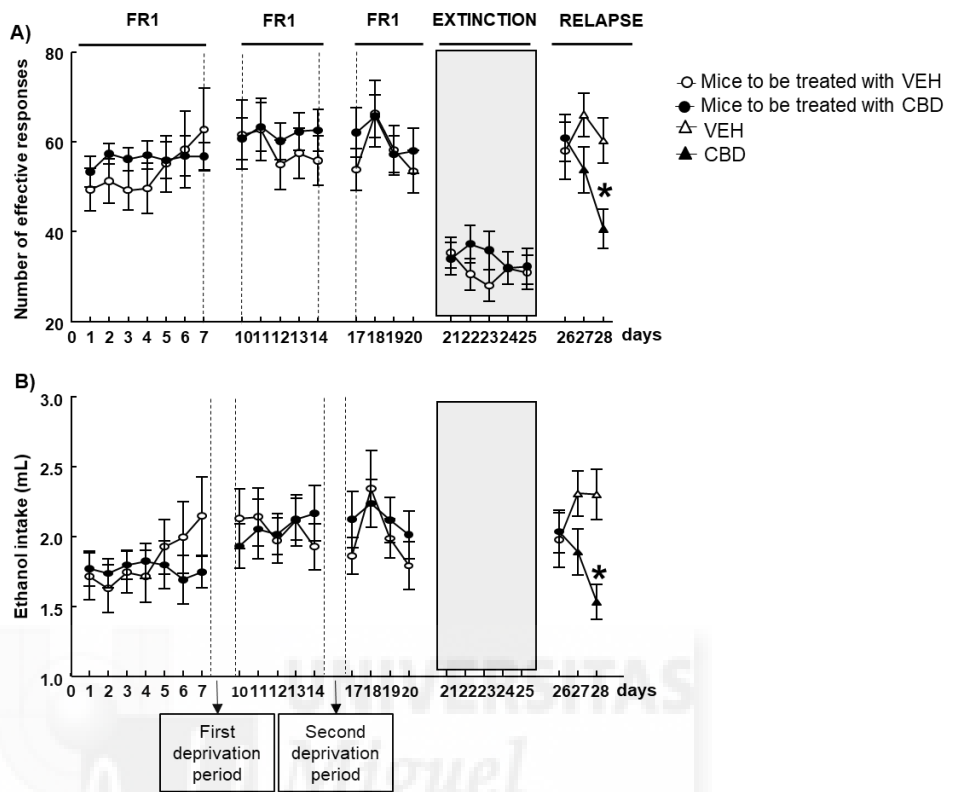
**Figure 2.** Real-time polymerase chain reaction studies of tyrosine hydroxylase (TH) in the VTA and Oprm1, CB1r, CB2r and GPR55 in the nucleus accumbens and of C57BL/6 J mice treated with increasing doses of cannabidiol (CBD) (30, 60 and 120 mg/kg) during the two-bottle choice paradigm. 2-ΔΔCT relative gene expression of (a) TH, (b) Oprm1, (c) CB1 receptor, (d) CB2 receptor and (e) GPR55. Columns represent the means and vertical lines ± the standard error of the mean. \*Represents values from CBD-treated mice that are significantly different (Student's t-test, P < 0.005) from vehicle-treated group (VEH).



**Figure 3.** Evaluation of oral ethanol self-administration in C57BL/6 J mice treated with vehicle or cannabidiol (CBD). (a) Schematic diagram including the different experimental phases of ethanol self-administration FR1, fixed ratio 1; FR3, fixed ratio 3; and PR, progressive ratio. (b) Number of effective responses of both groups (VEH and CBD) during the FR1 stabilization and FR1 + treatment and FR3 + treatment stages; (c) ethanol intake expressed as ml of both groups (VEH and CBD) during the FR1 stabilization, FR1 + treatment and FR3 + treatment; (d) breaking point achieved during progressive ratio. The dots represent the means and vertical lines  $\pm$  the standard error of the mean (SEM) and the columns represent the means and vertical lines  $\pm$  SEM of. \*Represents values from CBD-treated mice that are significantly different (Figs 3b & 3c, two-way RM ANOVA,  $P < 0.005$ ) (Fig. 3d, Student's t-test,  $P < 0.005$ ) from vehicle-treated group (VEH).



**Figure 4.** Real-time polymerase chain reaction studies of Oprm1, GPR55, CB1r and CB2r in the nucleus accumbens and tyrosine hydroxylase (TH) in the VTA of C57BL/6 J mice treated with cannabidiol (CBD) (a single administration of a microparticle formulation providing CBD continuous controlled release (30 mg/kg/day, s.c.) during the oral ethanol self-administration.  $2^{-\Delta\Delta CT}$  relative gene expression of (a) TH, (b) Oprm1, (c) CB1 receptor, (d) CB2 receptor and (e) GPR55. Columns represent the means and vertical lines  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). \*Represents values from CBD treated mice that are significantly different (Student's t-test,  $P < 0.005$ ) from vehicle-treated group (VEH).



**Figure 5.** Effects of cannabidiol (CBD) (60 and 120 mg/kg/day, i.p.) on ethanol relapse. (a) The number of effective responses of both groups (VEH and CBD) during the fixed ratio 1 (FR1), extinction and relapse phases; (b) the ethanol intake (EtOH 8 percent v/v) during FR1 and relapse phases. The dots represent the means and the vertical lines  $\pm$  the standard error of the mean. \*Represents values from CBD treated mice that are significantly different (two-way RM ANOVA,  $P < 0.005$ ).

## References

1. Agurell S, Carlsson S, Lindgren JE, Ohlsson A, Gillespie H, Hollister L (1981) Interactions of delta 1-tetrahydrocannabinol with cannabiniol and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabiniol and cannabidiol by mass fragmentography. *Experientia* 37:1090–1092.
2. Agurell S, Halldin M, Lindgren JE, Ohlsson A, Widman M, Gillespie H, et al. (1986) Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol Rev* 38:21–43.
3. Aronson M (2015). Psychosocial treatment of alcohol use disorder Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134:845–852.
4. Bhargava HN (1976) Effect of some cannabinoids on naloxoneprecipitated abstinence in morphine-dependent mice. *Psychopharmacology (Berl)* 49(3):267–270.
5. Campos AC, Moreira FA, Gomes FV, Del Bel EA, Guimaraes FS (2012) Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:3364–3378.
6. Crabbe JC, Merrill CD, Belknap JK (1991) Effects of convulsants on handling-induced convulsions in mice selected for ethanol withdrawal severity. *Brain Res* 550:1–6.
7. Crabbe JC, Merrill CM, Kim D, Belknap JK (1990) Alcohol dependence and withdrawal: a genetic animal model. *Ann Med* 22:259–263.
8. Crippa JA, Hallak JE, Machado-de-Sousa JP, Queiroz RH, Bergamaschi M, Chagas MH, et al. (2013) Cannabidiol for the treatment of cannabis withdrawal syndrome: a case report. *J Clin Pharm Ther* 38(2):162–164.
9. de Mello Schier AR, de Oliveira Ribeiro NP, Coutinho DS, Machado S, Arias-Carrion O, Crippa JA, et al. (2014) Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of cannabidiol: a chemical compound of *Cannabis sativa*. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13:953–960.
10. Deiana S, Watanabe A, Yamasaki Y, Amada N, Arthur M, Fleming S, et al. (2012) Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV),  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 219:859–873.
11. El-Alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, et al. (2010) Antidepressant-like effect of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav* 95:434–442.
12. Erdozain AM, Callado LF (2014) Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review. *Adicciones* 26:360–370.
13. Garcia-Gutierrez MS, Perez-Ortiz JM, Gutierrez-Adan A, Manzanares J (2010) Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors. *Br J Pharmacol* 160:1773–1784.
14. Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW (1990) Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 100:558–559.
15. Hamelink C, Hampson A, Wink DA, Eiden LE, Eskay RL (2005) Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 314:780–788.



16. Hawksworth G, McArdle K (2004) Metabolism and Pharmacokinetics of Cannabinoids. pp 205–228. Pharmaceutical Press: London, UK.
17. De la Ossa Hernán Pérez D, Ligresti A, Gil-Alegre ME, Aberturas MR, Molpeceres J, Di Marzo V, et al. (2012) Poly- $\epsilon$ - caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. *J Control Release* 161:927–932.
18. Hungund BL, Szakall I, Adam A, Basavarajappa BS, Vadasz C (2003) Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 84:698–704.
19. Hurd YL, Yoon M, Manini AF, Hernandez S, Olmedo R, Ostman M, et al. (2015) Early Phase in the Development of Cannabidiol as a Treatment for Addiction: Opioid Relapse Takes Initial Center Stage. *Neurotherapeutics* 12(4):807–815.
20. Ibeas Bih C, Chen T, Nunn AV, Bazelot M, Dallas M, Whalley BJ (2015) Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. *Neurotherapeutics* 12:699–730.
21. Ikemoto S, Bonci A (2014) Neurocircuitry of drug reward. *Neuropharmacology* 76: 329–341. Pt B
22. Kathmann M, Flau K, Redmer A, Trankle C, Schlicker E (2006) Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:354–361.
23. Katsidoni V, Anagnostou I, Panagis G (2013) Cannabidiol inhibits the reward-facilitating effect of morphine: involvement of 5-HT1A receptors in the dorsal raphe nucleus. *Addict Biol* 18(2):286–296.
24. Laprairie RB, Bagher AM, Kelly ME, Denovan-Wright EM (2015) Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol* 172:4790–4805.
25. Lemos JI, Resstel LB, Guimaraes FS (2010) Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 207:105–111.
26. Levin R, Peres FF, Almeida V, Calzavara MB, Zuardi AW, Hallak JE, et al. (2014) Effects of cannabinoid drugs on the deficit of prepulse inhibition of startle in an animal model of schizophrenia: the SHR strain. *Front Pharmacol* 5:10.
27. Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, et al. (2012) Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2: .e94
28. Liput DJ, Hammell DC, Stinchcomb AL, Nixon K (2013) Transdermal delivery of cannabidiol attenuates binge alcohol-induced neurodegeneration in a rodent model of an alcohol use disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 111:120–127.
29. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408.
30. Long LE, Malone DT, Taylor DA (2006) Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Neuropsychopharmacology* 31:795–803.
31. Manzanares J, Ortiz S, Oliva JM, Perez-Rial S, Palomo T (2005) Interactions between cannabinoid and opioid receptor systems in the mediation of ethanol effects. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 40:25–34.
32. Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS (2006) Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1466–1471.
33. Moreira FA, Guimaraes FS (2005) Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 512:199–205.
34. Morgan CJ, Curran HV (2008) Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis. *Br J Psychiatry* 192:306–307.

35. Morgan G, Backinger C, Lerman C, Vocci F (2010) Translational medication development for nicotine addiction. *Am J Health Behav* 34(3):267–274.
36. Navarrete F, Rubio G, Manzanares J (2014) Effects of naltrexone plus topiramate on ethanol self-administration and tyrosine hydroxylase gene expression changes. *Addict Biol* 19:862–873.
37. Ohlsson A, Lindgren JE, Andersson S, Agurell S, Gillespie H, Hollister LE (1986) Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration. *Biomed Environ Mass Spectrom* 13:77–83.
38. Ortega-Alvaro A, Ternianov A, Aracil-Fernandez A, Navarrete F, Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J (2015) Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addict Biol* 20:43–55.
39. Palkovits M (1983) Punch sampling biopsy technique. *Methods Enzymol* 103:368–376.
40. Paxinos G, Franklin, K.B.J (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.
41. Radcliffe RA, Floyd KL, Drahnak JA, Deitrich RA (2005) Genetic dissociation between ethanol sensitivity and rapid tolerance in mouse and rat strains selectively bred for differential ethanol sensitivity. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1580–1589.
42. Ren Y, Whittard J, Higuera-Matas A, Morris CV, Hurd YL (2009) Cannabidiol, a nonpsychotropic component of cannabis, inhibits cue-induced heroin seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:14764–14769.
43. Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Correa FM, Guimaraes FS (2006) Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 172:294–298.
44. Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res* 30:1037–1043.
45. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152:1092–1101.
46. Schiavon AP, Bonato JM, Milani H, Guimaraes FS, Weffort de Oliveira RM (2016) Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64:27–34.
47. Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG (2007) Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* 150:613–623.
48. Uribe-Marino A, Francisco A, Castiblanco-Urbina MA, Twardowsky A, Salgado-Rohner CJ, Crippa JA, et al. (2012) Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *Epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm. *Neuropsychopharmacology* 37:412–421.
49. WHO (2011). *Global status report on alcohol and health*
50. Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR (2010) Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol* 159:122–128.
51. Zuardi AW, Rodrigues JA, Cunha JM (1991) Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl)* 104:260–264.
52. Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E, Karniol IG (1982) Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 76:245–250.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### MATERIAL AND METHODS

#### Oral ethanol self-administration

*Experiment 1: Effects of CBD on the reinforcement and motivation for ethanol*

#### Training (8 days)

Two days before beginning the experiment, standard chow was restricted to only 1-h access per day. Before the first training session, water was deprived for 24 hs, and food was provided 1 h prior to the 1 h session to increase the motivation for lever pressing. During the subsequent four days, water was provided ad libitum except during food access for 1 h before beginning each session, in which the water bottle was removed from the cages (postprandial). The following five days and during the rest of the experiment, food access was provided for 1 h after the end of each daily session, and water was available ad libitum to avoid ethanol consumption due to thirst (preprandial). C57BL/6 mice were trained to press on the active lever to receive 36  $\mu$ l of 0.2% (w/v) saccharin reinforcement (Navarrete *et al*, 2014).

#### Substitution (9 days)

The saccharin concentration was gradually faded out as the ethanol concentration was gradually increased. Each solution combination was fixed to three consecutive sessions per combination (0.15% Sac–2.5% EtOH, 0.10% Sac–5% EtOH, 0.05% Sac–8% EtOH).

#### 8% basal EtOH consumption (11 days)

In this phase, the objective was to evaluate the number of responses on the active lever, the 8% ethanol (v/v) consumption and the motivation to drink in C57BL/6 mice without pharmacological treatment. There were three stages: (1) fixed ratio 1 (FR1): C57BL/6 mice responding on the active lever to obtain 8% ethanol and no saccharin were evaluated using an FR1 reinforcement schedule during five daily consecutive sessions; (2) fixed ratio 3 (FR3): after

FR1, C57BL/6 mice underwent five daily sessions using an FR3 reinforcement schedule (mice have to respond three times on the active lever to achieve one reinforcement); (3) progressive ratio (PR): on the day subsequent to FR3, a PR session was carried out. In this session, the response requirement to earn reinforcements escalated according to the following series: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-1000. The PR session lasted for 1 h and the 'breaking point' (the maximum number of lever presses each animal is able to perform to achieve one reinforcement) was determined in each animal.

### *Experiment 2: Effects of CBD on ethanol relapse*

#### Training (8 days)

Two days before beginning the experiment, standard chow was restricted to only 1-h access per day. Before the first training session, water was deprived for 24 h, and food allotment was provided 1 h prior to the 1 h session to increase the motivation for lever pressing. During the subsequent four days, water was provided ad libitum except during food access for 1 h before beginning each session, in which the water bottle was removed from the cages (postprandial). The following five days and during the rest of the experiment, food access was provided for 1 h after the end of each daily session, and water was available ad libitum to avoid ethanol consumption due to thirst (preprandial). C57BL/6 mice were trained to press on the active lever to receive 36  $\mu$ l of 0.2% (w/v) saccharin reinforcement.

#### Substitution (9 days)

The saccharin concentration was gradually faded out as the ethanol concentration was gradually increased. Each solution combination was fixed to three consecutive sessions per combination (0.15% Sac–2.5% EtOH, 0.10% Sac–5% EtOH, 0.05% Sac–8% EtOH).

### 8 % basal EtOH consumption (7 days)

In this phase, the objective was to evaluate the number of responses on the active lever and the 8% ethanol (v/v) consumption in C57BL/6 mice without pharmacological treatment. A FR1 was maintained during 7 days, following the consecutive experimental sessions: deprivation period 1 - reintroduction 1 - deprivation period 2 - reintroduction 2-extinction-relapse.

### **Oral water self-administration**

#### *Experiment 3: Effects of CBD on the reinforcement and motivation for water*

To discard that the pharmacological treatment could be modifying the motivation of mice for a natural stimulus, the water self-administration protocol comprehended two stages, as detailed in (Navarrete *et al*, 2014):

#### Training phase (10 days)

Two days before beginning the experiment, standard chow was restricted to only 1-hour access per day. Before the first training session, water was deprived during 24 hours, and food allotment was provided 1 hour prior to the session to increase the motivation for lever pressing. The C57BL/6 mice were trained to press on the active lever to receive 36  $\mu$ l of water reinforcement (FR1).

#### Pharmacological treatment effect on water consumption (11 days)

Once the animals underwent the training phase, all mice fulfilled the following learning task criteria: (1)  $\geq 70\%$  of preference for the active lever; (2)  $\geq 10$  reinforced trials per session; and (3)  $\leq 30\%$  deviation in the number of reinforced trials for three consecutive days. They were then randomly distributed into two groups (CBD or VEH) and underwent the FR1 (5 days), FR3 (5 days) and PR (1 day).

## **Microparticle manufacture**

### **Materials**

Cannabidiol (CBD) was obtained from THC Pharm GmbH (Frankfurt, Germany), poly-ε-caprolactone (PCL) (Mw: 42.500), polyvinyl alcohol (PVA, MW= 30.000–70.000) and Sigmacote® were from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). Methylene chloride (DCM) (HPLC grade), potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), disodium hydrogen phosphate dihydrate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), Tween®-80 and acetic acid were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Acetonitrile and methanol HPLC grade were supplied by Lab-Scan (Dublin, Ireland). All chemicals and reagents were used as received. In order to avoid cannabinoid binding to lab ware, materials were pretreated with Sigmacote®. Milli-Q® water (Millipore, Madrid, Spain) was used.

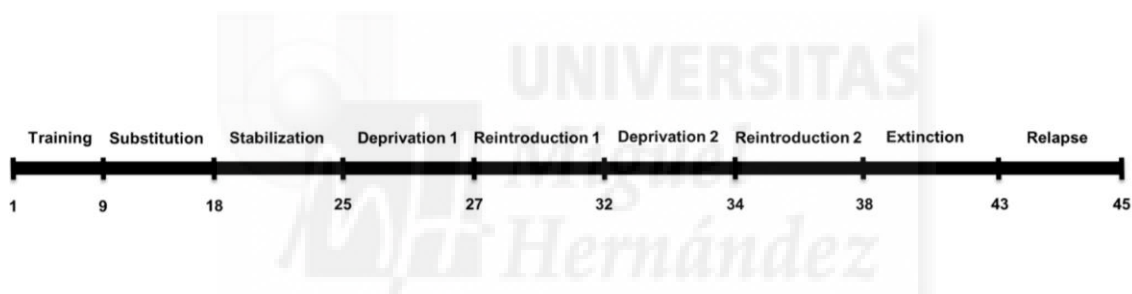
### **Microparticle preparation and characterization**

Biodegradable polymeric microparticles (MPs) were prepared by the oil-in-water emulsion solvent evaporation technique using a protocol previously described (Hernán Pérez de la Ossa, 2012). Briefly, CBD and poly-ε-caprolactone, in a ratio 1:10 were dissolved in methylene chloride (at a drug concentration of 10 mg/ml). Subsequently, the organic solution was poured onto a 0.5% PVA aqueous solution (in a volume ratio of 1:100) under stirring at 3000 rpm for 6 min (Polytron PT 3000, Kinematica® AG, Lucern, Switzerland). The resulting O/W emulsion was stirred for 3 h to evaporate the organic solvent (double-bladed propeller, IKA® Laboratory Technology, Staufen, Germany). Finally, the MPs obtained were collected by filtration through 5 µm membrane filters, washed with distilled water, and freeze-dried (Flexi-dry MP TM, FTS® Systems, USA). Blank MPs were prepared using the same procedure but without adding drug. Microparticles were characterized in terms of size (by laser diffraction-Microtrac® SRA 150 Particle Size Analyser, Leeds & Northrup Instruments, Ireland), surface characteristics (by scanning electron microscopy-Jeol-JSM-6400, Tokyo, Japan), drug content and in vitro drug release (by sampling

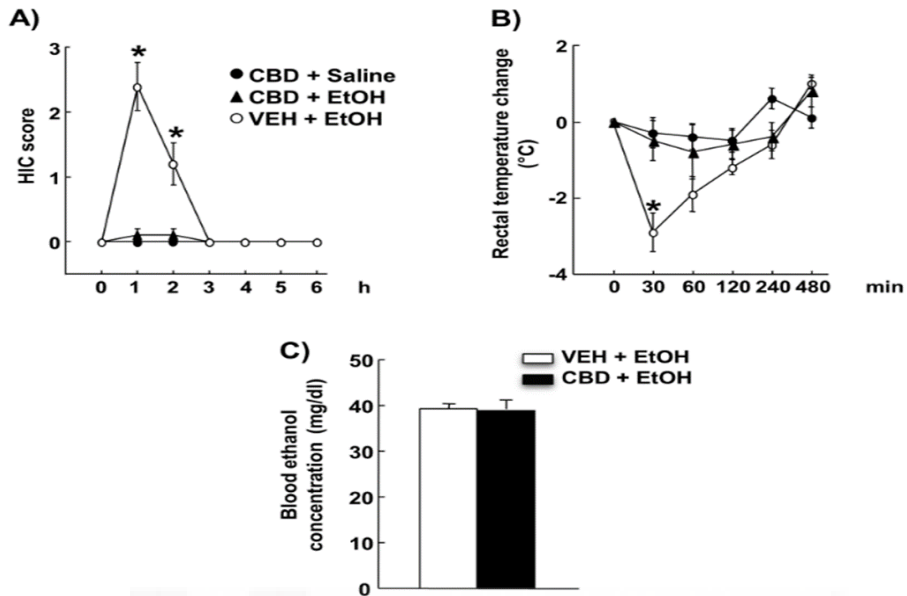
and separation method using simulated body fluid as release medium). Samples from drug content test and in vitro drug release test were analyzed by HPLC (1200 series HPLC, Agilent Technologies Spain, controlled by ChemStation software), using a method previously validated for these uses (Martin-Sabroso, 2013).

Microparticles were spherical with small pores in the surface. Their average size is  $46.8 \pm 20.3 \mu\text{m}$  and the drug loading of  $9.6 \pm 0.8\text{mg}$  of CBD/100 mg MPs. CBD was released from MPs in a continuous way for 13 days, showing a burst initial next to 30%.

## FIGURES

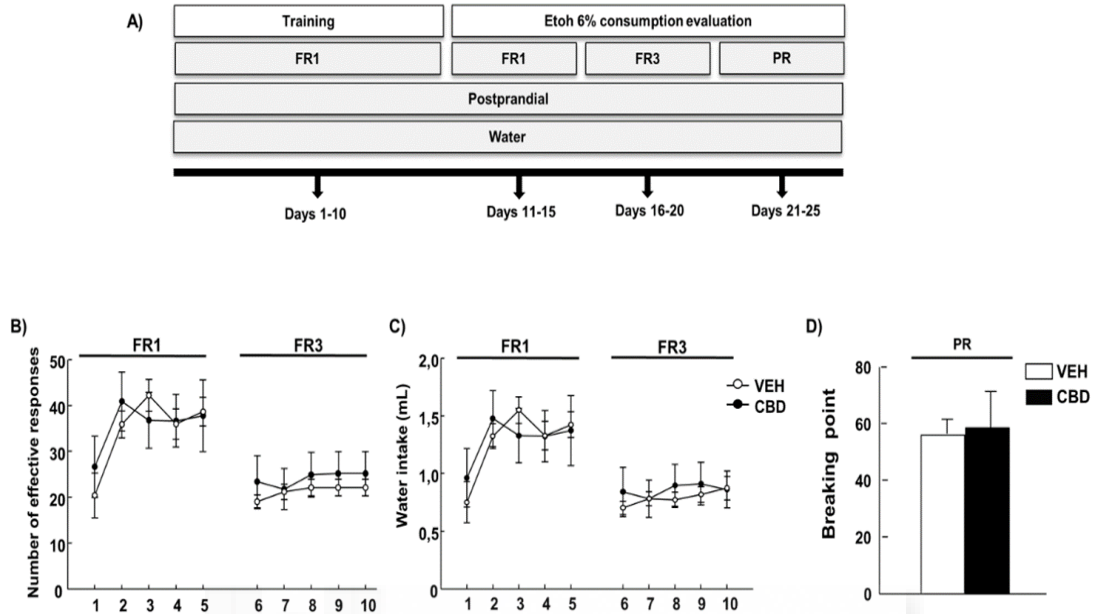


**Supplementary Figure 1 (S.1).** Schematic diagram of the oral ethanol self-administration followed in experiment 2 to evaluate the effects of CBD on relapse.



**Supplementary Figure 2 (S.2): Evaluation of physiological effects of ethanol.** The dots represent the means and vertical lines  $\pm$  the standard error of the mean (SEM) of: (A) the hourly measured HIC score of CBD + VEH, CBD + EtOH or VEH + EtOH treated mice ( $n=10$  per group) after the administration of ethanol (4 g/kg i.p.); (B) results of ethanol (3 g/kg p.o.) induced hypothermia in CBD + VEH, CBD + EtOH or VEH + EtOH treated mice ( $n=10$  per group). Columns represent the means and vertical lines  $\pm$  SEM of (C) blood ethanol concentration (BEC) (mg/dl) 1 h after the administration of ethanol (3 g/kg p.o.). \*Represents values from CBD treated mice that are significantly different (Student's t-test,  $P<0.005$ ).





**Supplementary Figure 3 (S.3): Effects of CBD on the reinforcement and motivation for water.** (A) Schematic diagram including the different experimental phases of oral water self-administration: training; FR1= fixed ratio 1; FR3= fixed ratio 3; PR= progressive ratio. (B) Number of effective responses of both groups (VEH and CBD) during FR1, FR3 and PR stages; (C) water intake expressed as mL of both groups (VEH and CBD) during FR1, FR3 and PR stages; (D) breaking point achieved during progressive ratio. The dots represent the means and vertical lines  $\pm$  the standard error of the mean (SEM) and the columns represent the means and vertical lines  $\pm$  SEM of. \*Represents values from CBD-treated mice that are significantly different (Figures 3B and 3C, two-way RM ANOVA,  $P < 0.005$ ) (Figure 3D, Student's t-test,  $P < 0.005$ ) from vehicle-treated group (VEH).

## REFERENCES

Hernán Pérez de la Ossa D, Ligresti, A., Gil-Alegre, M.E., Aberturas, M.R., Molpeceres, J., Di Marzo, V. et al. (2012). Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. *Journal of Controlled Release* **161** (3): 927–932

Martin-Sabroso C, Filipe Tavares-Fernandes, D., Espada-García, J.I., Torres-Suárez, A.I. (2013). Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: dexamethasone microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **458**: 188- 196

Navarrete F, Rubio G, Manzanares J (2014). Effects of naltrexone plus topiramate on ethanol self-administration and tyrosine hydroxylase gene expression changes. *Addict Biol* **19**(5): 862-873.



**Effects of cannabidiol plus naltrexone on motivation and ethanol consumption**

Adrián Viudez-Martínez<sup>1</sup>, María S. García-Gutiérrez<sup>1,2</sup>, Ana Isabel Fraguas-Sánchez<sup>3</sup>,  
Ana Isabel Torres-Suárez<sup>3</sup> and Jorge Manzanares<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda. de Ramón y Cajal s/n, San Juan de Alicante, 03550 Alicante, Spain and <sup>2</sup>Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS), Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Instituto de Farmacia Industrial, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Author to whom correspondence should be addressed:

Dr. Jorge Manzanares

Instituto de Neurociencias

Universidad Miguel Hernández-CSIC

Avda. Ramón y Cajal s/n

03550 San Juan de Alicante

SPAIN

Phone: +34-96-591-9248

E-mail: [jmanzanares@goumh.umh.es](mailto:jmanzanares@goumh.umh.es)

## ABSTRACT

**Background and Purpose:** The aim of this study was to explore if the administration of naltrexone (NTX) together with cannabidiol (CBD) may improve the efficacy in reducing alcohol consumption and motivation rather than any of the drugs given separately.

**Experimental Approach:** The effects of low doses of NTX (0.7 mg/kg; p.o.) and/or CBD (20 mg/kg/day; s.c.) on ethanol consumption and motivation to drink were evaluated in the oral-ethanol self-administration paradigm in C57BL/6 mice. Gene expression analyses of  $\mu$  opioid receptor (Oprm1) in the nucleus accumbens (NAc), tyrosine hydroxylase (TH) in the ventral tegmental area (VTA) and serotonin 1A receptor (5-HT<sub>1A</sub>) in the dorsal raphe nucleus (DR) were carried out by real-time polymerase chain reaction. The role of 5-HT<sub>1A</sub> on the ethanol reduction induced by the administration of CBD + NTX was analysed by using the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY100635 (0.3 mg/kg, i.p.).

**Key Results:** The administration of CBD + NTX significantly reduced motivation and ethanol intake in the oral self-administration procedure in a greater proportion than the drugs given alone. Only the combination of both drugs significantly reduced Oprm1, TH and 5-HT<sub>1A</sub> gene expressions in the NAc, VTA and DR, respectively. Interestingly, the administration of WAY100635 significantly blocked the actions of CBD + NTX but had no effects by itself.

**Conclusion and Implications:** the combination of low doses of CBD plus NTX resulted more effective to reduce ethanol consumption and motivation to drink. These effects, appears to be mediated, at least in part, by 5-HT<sub>1A</sub> receptors.

**Keywords:** cannabidiol, naltrexone, oral ethanol self-administration, tyrosine hydroxylase, mu opioid receptor, 5-HT<sub>1A</sub>.

## 1. INTRODUCTION

The limited efficacy of current pharmacological treatments for alcohol use disorders (AUD) justifies the development of alternative drugs. In this respect, cannabidiol (CBD), one of the main compounds present in the plant *Cannabis sativa*, that lacks activity as a drug of abuse (Fusar-Poli et al., 2009; Manzanares J, 2016; Martin-Santos et al., 2012; Mechoulam, Parker & Gallily, 2002; MS, 2017; Winton-Brown et al., 2011; Zlebnik & Cheer, 2016), has been pointed out as a new potential therapeutic drug for the treatment of drug use disorders due to its anxiolytic (Blessing, Steenkamp, Manzanares & Marmar, 2015; de Mello Schier et al., 2014; Guimaraes, Chiaretti, Graeff & Zuardi, 1990; Lemos, Resstel & Guimaraes, 2010; Moreira, Aguiar & Guimaraes, 2006; Resstel, Joca, Moreira, Correa & Guimaraes, 2006), antidepressant (El-Alfy et al., 2010; Zanelati, Biojone, Moreira, Guimaraes & Joca, 2010), antipsychotic (Levin et al., 2014; Leweke et al., 2012; Long, Malone & Taylor, 2006; Moreira & Guimaraes, 2005; Peres et al., 2016; Zuardi, Rodrigues & Cunha, 1991) and neuroprotective properties (Campos, Fogaca, Sonego & Guimaraes, 2016; Hamelink, Hampson, Wink, Eiden & Eskay, 2005).

Interestingly, recent evidence revealed that CBD reduces heroin craving and relapse (Ren, Whittard, Higuera-Matas, Morris & Hurd, 2009) and cocaine intake (Weiss F, 2016). Furthermore, our group has demonstrated that CBD also decreases ethanol intake and ethanol preference in the two-bottle choice paradigm in mice. In addition, a single administration of a controlled release formulation of CBD (30 mg/kg/day; s.c.), that lasted up to two weeks, significantly decreased motivation to drink and ethanol consumption in the oral ethanol self-administration paradigm. CBD also reduced ethanol-induced relapse, but had no effect over non-reinforcing substances, such as water. These behavioural effects were associated with alterations in key targets and brain regions closely related with alcohol consumption, such as tyrosine hydroxylase (TH) in the ventral tegmental area (VTA),  $\mu$ -opioid receptor (Oprm1) and cannabinoid receptors (CB<sub>1r</sub>, CB<sub>2r</sub>, GPR55) in the nucleus accumbens (NAc), both critical regions for reward, goal-directed behaviour and

habit formation (Viudez-Martinez et al., 2018). Altogether, these results supported the potential therapeutic use of CBD in the treatment of AUD.

Despite the devastating impact of AUD on society, current options for treatment are scarce and have limited efficacy (Lee & Leggio, 2014). Up to date, there are just three drug-based treatments approved for AUD by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA): naltrexone (NTX), disulfiram and acamprosate (Jarosz, Miernik, Wachal, Walczak & Krumpl, 2013; Rosner, Hackl-Herrwerth, Leucht, Lehert, Vecchi & Soyka, 2010; Skinner, Lahmek, Pham & Aubin, 2014). Other drug-based therapies are usually employed off-label, such as topiramate, an anticonvulsant drug with a broad-spectrum activity that seems effective in treating alcohol dependence (Johnson et al., 2003). Nevertheless, NTX is still the most effective drug available for the treatment of AUD since it reduces heavy drinking and ethanol craving by antagonizing the beta-endorphin-stimulated dopamine release in the NAc induced by alcohol (Nicholson, Dilley & Froehlich, 2017).

The combination of different drugs is also a commonly used procedure for the treatment of AUD to achieve a greater effect than individual drug therapies by using lower doses of each drug than the ones employed in monotherapy. This strategy also prevents certain dose-related side effects. In this respect, the combination of NTX with other drugs, such as gabapentin or serotonin reuptake inhibitors showed a greater clinical outcome in several clinical trials (Anton et al., 2011; Froehlich, Hausauer & Rasmussen, 2013) and animal studies (Froehlich, Hausauer & Rasmussen, 2013). However, no combination has been proposed as superior due to the variability among studies (Lee & Leggio, 2014).

In the present study, we further explore if CBD may improve the efficacy of NTX to reduce alcohol consumption and motivation to drink in mice. To this aim, the effects of a sub-effective dose of NTX (0.7 mg/kg; p.o.), CBD (20 mg/kg/day, s.c., poly- $\epsilon$ -caprolactone spherical microparticles with small pores providing a continuous controlled release during three weeks) or

their combination were employed. Dose selection was made according to published evidence showing that NTX (0.7 mg/kg p.o.), a lower dose than the ones commonly used in most studies, is able to reduce ethanol intake in mice (Navarrete, Rubio & Manzanares, 2014), though it is not always effective (Oliva & Manzanares, 2007). For CBD, a lower dose than the one our group previously reported as effective (Viudez-Martinez et al., 2018), were evaluated in the oral ethanol self-administration paradigm in C57BL/6 male mice. Subsequent real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) experiments were performed to analyse gene expression changes in *Oprm1* in the NAc, TH in the VTA and 5-HT<sub>1A</sub> in the DR, respectively.

Furthermore, to explore the role of 5-HT<sub>1A</sub>, one of the main targets for CBD (Blessing, Steenkamp, Manzanares & Marmar, 2015; Ibeas Bih, Chen, Nunn, Bazelot, Dallas & Whalley, 2015), in the effects of CBD plus NTX, the 5-HT<sub>1A</sub> antagonist, WAY100635 (0.3 mg/kg; i.p.), was administered previously to CBD and NTX in the oral ethanol self-administration paradigm. To this purpose, the dose of WAY100635 was chosen according to published studies showing that administration of this compound (0.5 mg/kg; i.p.) seems to prevent the reduction of ethanol intake produced by 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists, such as 8-OH-DPAT, in male C57BL/6J mice (Kelai, Hanoun, Aufrere, Beauge, Hamon & Lanfumey, 2006), but did not present effects on its own. Additionally, another group reported that the antipanic-like effects of CBD were blocked when WAY100635 (0.3 mg/kg; i.p.) was given to male Swiss mice (Twardowschy et al., 2013) and was without effects when given alone.

## **2. EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### *2.1 Mice*

One hundred and forty C57BL/6J male mice from Charles River (Lille, France), 70 for each experiment, weighing 20-25 g, were housed in groups of 6 per cage (40 X 25 X 22 cm) under controlled conditions (temperature, 23 ± 2°C; relative humidity, 60 ± 10%; 12 h light/dark cycle,

lights on from 8:00 to 20:00 h). The strain and gender of mice were selected based on the results previously reported by our group (Viudez-Martinez et al., 2018). Behavioural analyses were initiated 1 week after acclimatization to the animal room and were performed by placing the home cage in the operant-task room during the development of conditioning experiments. All the studies were conducted in compliance with the Spanish Royal Decree 1201/2005, the Spanish Law 32/2007 and the European Union Directive of the 22<sup>nd</sup> of September 2010 (2010/63/UE) regulating the care of experimental animals. In addition, animal studies are reported in compliance with the ARRIVE and BJP guidelines (Kilkenny, Browne, Cuthill, Emerson & Altman, 2010; McGrath & Lilley, 2015).

## 2.2 Drugs

Poly- $\epsilon$ -caprolactone spherical microparticles with small pores providing a CBD continuous controlled release (20 mg/kg/day, s.c.) that lasts more than two weeks and its respective vehicle (empty controlled release microparticles) were obtained from the Pharmaceutical Technology Department (Complutense University of Madrid, Madrid, Spain)(Viudez-Martinez et al., 2018), suspended in PBS 1X (pH 7.4) + 1% Pluronic F-68 (w/v) and then administered (0.4 ml). After the FR1 stabilization phase, CBD continuous controlled release or its vehicle were administered only once on the first day after the stabilization phase, half an hour after administering WAY 100635 or VEH and half an hour before administering NTX or VEH (one hour and a half before starting the experimental session).

Naltrexone (naltrexone hydrochloride, Accord Healthcare S.L.U., Barcelona, Spain) was daily dissolved in tap water to obtain the desired concentration (0.7 mg/kg, p.o., 0.3 ml). The naltrexone solution or its vehicle were administered once daily after the FR1 stabilization phase, one hour before the beginning of each session.



WAY 100635 (WAY 100635 maleate by TOCRIS, Madrid, Spain) was daily dissolved in saline 0.9% w/v to obtain the required concentration (0.3 mg/kg, i.p., 0.3 ml). The WAY 100635 solution or its vehicle were administered once daily after the FR1 stabilization phase, two hours before the beginning of each session and one-hour prior the administration of NTX or VEH.

For the oral self-administration procedure, absolute ethanol (Merck, Spain) and saccharin sodium salt were dissolved in tap water (8% (v/v) ethanol solution (EtOH)).

## 2.3 Behavioural analyses

All the experiments were analysed by observers blind to treatment.

*2.3.1 Experiment 1: to evaluate the effects of the combination of CBD plus NTX on ethanol consumption and motivation to drink*

### *2.3.1.1 Oral ethanol self-administration (OEA) paradigm:*

Our group performed the OEA following a published protocol (Navarrete, Rubio & Manzanares, 2014). The OEA was carried out in 18 modular operant chambers (Panlab) placed inside 18 noise isolation boxes equipped with a chamber light, two levers, one receptacle to drop liquid solution, one syringe pump, one stimulus light and one buzzer. Packwin software (Panlab) controlled stimulus and fluid delivery and recorded operant responses.

Pressing on one of the levers did not have any consequence (inactive lever), whereas pressing the other lever (active lever) delivered 36  $\mu$ l fluid combined with a 0.5 s bright stimulus and a 0.5 s, 2850 Hz, 85 dB buzzer beep, followed by a time-out period of 6 s, in which no fluid was delivered. After the 6 s time out, an intertrial interval (ITI) started, the duration of which depended on each subject's spontaneous waiting before an active lever press. The experiment was divided in three phases: training, saccharin substitution and ethanol 8% (v/v) consumption (see figure 1).

*Training phase (9 days):* two days before beginning the experiment, standard chow was restricted to only 1-hour access per day. Before the first training session, water access was

**Artículo 4. En revisión.**

**Gender differences in the effects of cannabidiol on ethanol binge drinking in mice**

Adrián Viudez-Martínez<sup>1</sup>, María S. García-Gutiérrez<sup>1,2</sup> and Jorge Manzanares<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda de Ramón y Cajal s/n, San Juan de Alicante, 03550 Alicante, Spain and <sup>2</sup>Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS), Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain.

Corresponding author:

Dr. Jorge Manzanares

Instituto de Neurociencias

Universidad Miguel Hernández-CSIC

Avda. Ramón y Cajal s/n

03550 San Juan de Alicante

SPAIN

Phone: +34-96-591-9248

E-mail: [jmanzanares@goumh.umh.es](mailto:jmanzanares@goumh.umh.es)

## ABSTRACT

Previous studies have shown that cannabidiol (CBD) reduces ethanol consumption, motivation to drink and relapse in mice, protecting against the neurodegenerative effects induced by ethanol intoxication. The purpose of this study was to explore the effects of CBD on binge drinking and evaluate potential gender-related differences.

Male and female C57BL/6J mice (n=40 per sex) were exposed to the drinking in the dark model (DID) for four weeks (DID-1 to DID-4). Dose-response effects of CBD (15 mg/kg, 30 mg/kg and 60 mg/kg; intraperitoneally) on the ethanol intake were tested by acute (day-4 of DID-3) or repeated administration (day-1 to 4 of DID-4). We also analyzed the effects of repeated CBD administration on the relative gene expression of tyrosine hydroxylase (*TH*) and  $\mu$ -opioid receptor (*OPRM1*) in the ventral tegmental area (VTA) and nucleus accumbens (NAc), respectively, by real time PCR.

The results revealed that females exhibited higher ethanol intake during each DID session. Interestingly, females also showed higher expression of *TH* in the VTA and *OPRM1* in the NAc. Acute CBD failed to induce any effect in either males or females. However, repeated CBD administration (30 mg/kg and 60 mg/kg) significantly reduced ethanol consumption in males without having any effect in females. Repeated administration (60 mg/kg) with CBD significantly reduced *TH* and *OPRM1* expression in males but had no effect in females.

Taken together, these findings suggest that CBD may be of interest for treating binge-drinking patterns and that gender-related differences may affect the treatment outcome.

**Keywords:** cannabidiol; drinking-in-the-dark model; gender-dependent effects; mice; RT-PCR.

## INTRODUCTION

Binge drinking, or heavy episodic drinking, has become a major public health concern in modern societies (Dir et al., 2017; Shin et al., 2009). Approximately 90% of the alcohol consumed by underage youth, and about 50% of the alcohol consumed by adults, is in the form of binge drinking (Brewer and Swahn, 2005). This high prevalence among adolescents (Adan et al., 2016; Hermens and Lagopoulos, 2018), particularly vulnerable to binge drinking effects (Dir et al., 2017), is troubling, especially considering that the onset of heavy drinking at an early age significantly increases the risk for developing alcohol use disorder (AUD) in adulthood (Hingson et al., 2006). Despite these devastating data, the available pharmacological options for binge drinking management are scarce and limited, mainly due to the dearth of studies evaluating the efficacy of drugs classically employed for AUD in patients with a binge pattern of consumption (Rolland and Naassila, 2017).

Lately, gender-related differences in binge drinking have become of great significance, primarily because women progress from bingeing to alcoholism more rapidly and are more prone than men to developing alcohol-attributable comorbid psychiatric disorders, such as depression and stress coping problems (Dir et al., 2017; Erol and Karpyak, 2015). Furthermore, the accelerated increase in alcohol-related problems registered among women (Caldwell et al., 2005; Harford et al., 2009; Holmila and Raitasalo, 2005; Kessler et al., 1997; Medina et al., 2008; van Noorden et al., 2010) and the closing gap in AUD incidence between men and women (Erol and Karpyak, 2015; Holmila and Raitasalo, 2005; Keyes et al., 2011), highlight the need to perform more studies considering gender-related differences in alcohol effects.

To date, just a few studies have described the distinct gender-neurobiological effects induced by alcohol consumption and the gender-related differences in binge drinking patterns. Some authors reported that female alcoholics exhibited significantly lower levels of N-acetylaspartate in the frontal grey matter brain, meaning that women are more susceptible to grey matter injury than

their male counterparts (Schweinsburg et al., 2003). Accordingly, Squeglia and cols. (Squeglia et al., 2012) reported that binge drinking affects brain morphometry differentially depending on gender, and Melon and cols (Melon et al., 2013) demonstrated that female C57BL/6J mice reach a high ethanol intake in a binge-drinking model quicker than males.

Together, these data highlight the need to identify new drugs to improve the therapeutic management of binge drinking and, ultimately, prevent the development of alcohol dependence, bearing in mind the potential differences between sexes. In this respect, cannabidiol (CBD), one of the main compounds present in the plant *Cannabis sativa* that lacks reinforcing properties (Fusar-Poli et al., 2009; Manzanares J, 2016; Martin-Santos et al., 2012), has been proposed as a potential therapeutic drug for the treatment of AUD. Our group demonstrated that CBD administration reduced ethanol consumption and motivation for ethanol intake, preventing ethanol-induced relapse in mice (Viudez-Martinez et al., 2018). These findings are in line with previous reports of the efficacy of CBD to reduce morphine and heroin reward-facilitating effects (Bhargava, 1976; Katsidoni et al., 2013; Ren et al., 2009), cocaine and amphetamines-induced conditioned place preference (Parker et al., 2004) and context- and stress-induced cocaine and alcohol seeking in rats (Mitjans et al., 2013).. Interestingly, CBD prevented relapse for five months from last administration, even though plasma and brain CBD levels remained detectable for only three days (Gonzalez-Cuevas et al., 2018). In addition, Liput and cols. reported that CBD showed neuroprotective effects against alcohol intoxication, since the administration of CBD significantly reduced the number of Fluoro-Jade B (FJB+) cells in the entorhinal cortex of rats exposed to a binge-drinking model (Liput et al., 2013). Taken together, these data support the potential usefulness of CBD in binge drinking patterns. In addition, there is a wide range of studies demonstrating the efficacy of CBD for diseases that commonly occur in patients with AUDs and contribute to a worse clinical outcome, such as anxiety (Blessing et al., 2015; de Mello Schier et

al., 2014; Guimaraes et al., 1990; Moreira et al., 2006), depression (El-Alfy et al., 2010; Schiavon et al., 2016; Zanelati et al., 2010) and psychosis (Long et al., 2006).

The present study aimed to evaluate the effects of CBD on ethanol intake in mice exposed to the drinking in the dark (DID) binge-drinking model and to explore potential gender-related differences. For this purpose, the dose-response effects of acute or repeated administration of CBD (15 mg/kg, 30 mg/kg and 60 mg/kg, intraperitoneally [i.p.]) were evaluated in male and female C57BL/6J mice exposed to DID paradigm. Additionally, the effects of repeated CBD administration on tyrosine hydroxylase (*TH*) and  $\mu$ -opioid receptor (*OPRM1*) relative gene expression were measured in the ventral tegmental area (VTA) and nucleus accumbens (NAc), respectively, by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

We obtained 80 four-week-old male and female C57BL/6J mice (n=40 per sex) from Charles River (Lille, France), weighing 20-25 g. They were individually housed under controlled conditions with regard to temperature ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and relative humidity ( $60 \pm 10\%$ ). Under a 12-hour inverted light/dark cycle (lights on from 8:00 pm to 8:00 am), they were placed in the operant-task room. Behavioral analyses were initiated after two weeks of acclimatization to the animal room and sipper tubes. All the studies were conducted in compliance with the Spanish Royal Decree 1201/2005, the Spanish Law 32/2007 and the European Union Directive of September 22, 2010 (2010/63/UE), regulating the care of experimental animals.

### **Drinking in the dark procedure (DID)**

For this experimental procedure, we followed a modification of a previously published protocol (Nentwig et al., 2018; Rhodes et al., 2005; Thiele et al., 2014; Thiele and Navarro, 2014). Over

the first two weeks, mice were accustomed to drinking water from sipper tubes (Figure 1a). Once mice were 6 weeks old, they were exposed to the DID model. This paradigm was performed from Monday to Thursday (day 1 to day 4) for the following four weeks (DID-1 to DID-4). Briefly, three hours into the dark cycle, the ethanol-filled sipper tubes (20% v/v) were introduced to the mice for two hours from Monday to Wednesday (11:00 am to 1:00 pm) and four hours on Thursdays (11:00 am to 3:00 pm) (see Figure 1b). While exposed to ethanol, sipper tubes containing water were removed. Once the session ended, water was provided *ad libitum* again. Ethanol intake (g/kg) was measured after the four-hour session.

## Drugs

CBD (STI Pharmaceuticals; Essex, UK) was dissolved in ethanol:cremophor:saline (1:1:18) and injected i.p. at the corresponding doses (15 mg/kg, 30 mg/kg and 60 mg/kg in 0.3 mL) 1 hour and a half before day 4 of DID-3 exposure (acute administration) or every day of DID-4 (repeated administration) (see figure 1). The group treated with vehicle was administered 0.3 mL of a solution of ethanol:cremophor:saline (1:1:18) i.p.

For the DID procedure, absolute ethanol (Merck, Spain) was dissolved in tap water (20% v/v EtOH solution).

## Gene expression studies by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Relative gene expression analyses of *TH* in the VTA and *OPRM1* in the NAc were carried out in male and female mice treated with repeated CBD or vehicle and exposed to the DID procedure. As soon as the DID experiment ended, mice were killed by cervical dislocation and brains were harvested and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Then, brain sections were cut (500  $\mu\text{m}$ ) in a cryostat ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) containing the regions of interest according to Paxinos and Franklin (Franklin, 1997), mounted onto slides and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sections were microdissected following the method described

by Palkovits (Palkovits, 1983). Total RNA was isolated from brain micropunches with TRI Reagent extraction reagent (Applied Biosystems, Madrid, Spain). After DNase digestion, reverse transcription was carried out following the instructions of the manufacturer (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Quantitative analyses of the relative abundance of *TH* (Mm00447546\_m1) and *OPRM1* (Mm01188089\_m1) gene expressions were performed on the StepOne Sequence Detector System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). All reagents were obtained from Life Technologies, and the manufacturer's protocols were followed. The reference gene used was 18S rRNA (Mm03928990\_g1), detected using Taqman ribosomal RNA control reagents. All primer-probe combinations were optimized and validated for relative quantification of gene expression. Data for each target gene were normalized to the endogenous reference gene, and the fold change in target gene expression was determined using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak and Schmittgen, 2001).

### **Blinding, randomization and group size determination**

All the experiments were analyzed by observers blinded to treatment. Mice were randomly distributed to four different groups at the beginning of the experiment. Since no differences were observed regarding ethanol intake among mice from different groups after undergoing DID-1 and DID-2, the original randomization was maintained. Group sizes were determined after performing different power calculations, which showed that to obtain a power of more than 80%, 8 to 12 subjects were needed for each group, so we decided to employ 10 subjects per group.

### **Statistical analyses**

According to the requirements of the experimental data, we performed one-way analysis of variance (ANOVA), two-way ANOVA with repeated measures (RM) and Student's t-test analyses. Post hoc tests were only applied when ANOVA (F value) indicated significance. All statistical



analyses were performed with SigmaPlot v11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) software. Differences were considered significant if the probability of error was less than 5%.

## RESULTS

### ***Female mice exposed to the DID procedure showed higher ethanol consumption than males.***

We evaluated male and female mice in the DID binge drinking model to test if there was any significant difference in ethanol intake between sexes. Binge ethanol consumption across the two-hour (days 1-3) and four-hour period (day 4) during DID-1 and DID-2 is presented in figures 2a and 2b, respectively (n=10/group). Female mice showed significantly higher ethanol intake from days 1 to 4 compared to male mice during DID-1 (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: gender  $F_{(1,79)} = 41.591$ ,  $p < 0.001$ ) and DID-2 (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: gender  $F_{(1,79)} = 62.848$ ,  $p < 0.001$ ). Furthermore, all the mice exhibited higher ethanol intake in the four-hour binge drinking sessions than in the two-hour sessions during DID-1 (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: day  $F_{(3,79)} = 22.150$ ,  $p < 0.001$ ) and DID-2 (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: day  $F_{(3,79)} = 57.796$ ,  $p < 0.001$ ).

Female mice also consumed significantly more ethanol than males during DID-3 (Fig. 2c) (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: gender  $F_{(1,59)} = 44.832$ ,  $p < 0.001$ ). Again, mice exhibited higher ethanol consumption in the four-hour binge drinking sessions than in the two-hour sessions during DID-3: day ( $F_{(1,39)} = 18.437$ ,  $p < 0.001$ ). A Student's t-test on day 4 revealed the important effect of gender, with vehicle-treated females showing greater ethanol intake than their male counterparts ( $t = 2.474$ , 18 d.f.,  $p = 0.024$ ) (Fig 2c).

Binge ethanol consumption across the two-hour periods (days 1-3) and four-hour period (day 4) during DID-4, in which mice were treated with repeated administration of vehicle, is

summarized in Fig. 2d (n=10/group). A two-way repeated measures ANOVA on days 1-4 revealed a significant higher ethanol intake by female mice treated with vehicle (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: gender  $F_{(1,79)} = 25.666$ ,  $p < 0.001$ ). Additionally, a more pronounced ethanol consumption on day 4 by both, male and female mice, was observed (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: gender  $F_{(3,79)} = 19.364$ ,  $p < 0.001$ ).

***Acute CBD administration had no effects on ethanol intake in mice exposed to the DID procedure.***

Statistical analyses of ethanol consumption on DID-3 revealed that there was no significant difference in ethanol intake among the different groups on days 1-3 in males (Fig. 3a) (two-way ANOVA RM, followed by Student-Newman-Keul's test: group  $F_{(3,119)} = 0.583$ ,  $p = 0.63$ ) or females (Fig. 3b) (two-way ANOVA RM, followed by Student-Newman-Keul's test: group  $F_{(3,119)} = 0.213$ ,  $p = 0.886$ ). Moreover, no difference was found throughout days 1-3 for males (two-way ANOVA RM, followed by Student-Newman-Keul's test: day  $F_{(2,119)} = 0.763$ ,  $p = 0.47$ ) or females (two-way ANOVA RM, followed by Student-Newman-Keul's test: day  $F_{(2,119)} = 1.556$ ,  $p = 0.218$ ). No group interaction was significant for males (two-way ANOVA RM, followed by Student-Newman-Keul's test: group x day  $F_{(6,119)} = 2.151$ ,  $p = 0.058$ ) or females (two-way ANOVA RM, followed by Student-Newman-Keul's test: group x day  $F_{(6,119)} = 0.400$ ,  $p = 0.877$ ).

A one-way ANOVA on day 4 revealed that CBD failed to modify ethanol intake at any of the doses tested in males (Fig. 3a) (one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keul's test: between groups  $F_{(3,39)} = 0.598$ ,  $p = 0.62$ ) or females (Fig. 3b) (one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keul's test: between groups  $F_{(3,39)} = 0.0975$ ,  $p = 0.961$ ).

**Repeated CBD administration reduced ethanol intake in DID procedure only in male mice.**

All the treatments were administered on days 1-4 during DID-4 (Fig. 4a and 4b for males and females, respectively). Higher ethanol intake was observed on day 4 compared to days 1-3 in vehicle-treated males (Fig. 4a) (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: day  $F_{(3,159)} = 3.908$ ,  $p < 0.05$ ) and females (Fig. 4b) (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: day  $F_{(3,159)} = 16.084$ ,  $p < 0.001$ ).

Repeated administration of CBD at intermediate (30 mg/kg) and higher doses (60 mg/kg) significantly reduced ethanol intake on day 4 in male mice (Fig. 4a) (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: treatment  $F_{(3,159)} = 5.371$ ,  $p < 0.05$ ). However, CBD administration failed to modify ethanol consumption in females at any of the doses tested (Fig. 4b) (two-way ANOVA RM followed by Student-Newman-Keul's test: treatment  $F_{(3,159)} = 0.122$ ,  $p = 0.947$ ).

**Repeated CBD administration modulated TH and OPRM1 gene expression in DID procedure only in male mice.**

Significantly higher gene expression of *TH* (Fig. 5a) (Student's t-test:  $t = 5.002$ , 18 d.f.,  $p < 0.001$ ) and *OPRM1* (Fig. 5d) (Student's t-test:  $t = 2.664$ , 18 d.f.,  $p < 0.05$ ) was observed in the VTA and NAc, respectively, in females exposed to DID compared to males.

Repeated CBD administration at high doses (60 mg/kg i.p.) was the only treatment that significantly reduced *TH* in the VTA (Fig. 5b) (one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keul's test:  $F_{(3, 39)} = 3.093$ ,  $p < 0.05$ ) and *OPRM1* in the NAc (Fig. 5e) (one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keul's test:  $F_{(3, 39)} = 5.127$ ;  $p < 0.05$ ) in male mice. On the contrary, no significant effects were observed after repeated administration of CBD in *TH* (Fig. 5c) (one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keul's test:  $F_{(3, 39)} = 1.139$ ;  $p = 0.347$ ) or *OPRM1* (Fig. 5f) (one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keul's test:  $F_{(3, 39)} = 1.354$ ;  $p = 0.273$ ) relative gene expressions in females.

## DISCUSSION

The results of the present study suggest that CBD may be a potentially useful therapy for AUD with binge drinking consumption patterns, and that gender-related differences in the effects of ethanol may affect the treatment outcome. The following findings support this statement: 1) female mice exposed to the DID paradigm showed higher ethanol intake every day of each DID exposure; 2) female mice showed higher levels of *TH* and *OPRM1* gene expression in the VTA and NAc, respectively; 3) the repeated administration of CBD at intermediate (30 mg/kg, i.p.) and high doses (60 mg/kg i.p.) significantly reduced ethanol consumption only in males, without having effects in females; 4) CBD at high doses (60 mg/kg i.p.) reduced relative gene expression of *TH* and *OPRM1* in the VTA and NAc, respectively, in males, without any effect in females.

There is evidence that females progress more rapidly and severely from binge drinking to addiction (Becker et al., 2012), and they present increased vulnerability to ethanol-induced neurotoxicity (Wilhelm et al., 2016). Moreover, girls binge drink more than boys during early adolescence (Spanish monitoring center for Drugs and Drug Addiction, 2016). Despite this devastating data, little attention has been paid to biological sex as an important variable in the acquisition of alcohol consumption habits (Roth et al., 2004). In this regard, some preclinical researchers have demonstrated that gender-related differences cause a faster acquisition of heavy alcohol self-administration in females (Melon et al., 2013) as well as higher ethanol consumption in DID models, which does not significantly vary across the oestrous cycle (Satta et al., 2018). Interestingly, these gender divergences also affect dopamine and opioid regulation, both involved in ethanol addiction, producing differences in binge-like alcohol use (Dir et al., 2017), which may affect the addiction process and the treatment outcome for pharmacological interventions targeting these systems (Becker et al., 2012).

Considering all this evidence, in this study we measured the ethanol intake of male and female C57BL/6J mice exposed to the DID procedure. Female mice exposed to the DID model exhibited

a significantly higher ethanol intake throughout the whole experiment (DID-1 to DID-4) than their male counterparts, thereby confirming gender-related differences regarding ethanol consumption previously reported by other authors (Melon et al., 2013; Satta et al., 2018). Furthermore, we analyzed the relative gene expression of *TH* in VTA and *OPRM1* in NAc, both well-established, key targets of addiction. Rewarding and reinforcing properties of ethanol are mediated mainly by dopaminergic projections from the VTA to the NAc (Koob et al., 1998; Nestler et al., 1993). Furthermore, *OPRM1* modulates dopamine transmission within the cortico-mesolimbic system (Thorsell, 2013). Thus, the results obtained here agree with previous reports showing an upregulation of *TH* gene expression in the VTA under acute (Lee et al., 2005; Ortiz et al., 1995) or chronic alcohol administration (Oliva et al., 2008) and highlight the role of *OPRM1* mediating the rewarding properties of ethanol (Bilbao et al., 2015). Concurrently, we observed that females exposed to the DID showed higher values of *TH* and *OPRM1* relative gene expression when compared to males. These results are also consistent with recent studies indicating that dopaminergic and opioidergic systems are differentially regulated in males and females (Dir et al., 2017).

One of the main problems of binge drinking is the lack of drug-based therapies. Although they may not be the first-line treatment, drugs are a common therapeutic tool employed in cases when psychotherapy fails to produce a clinical improvement or in patients with poorer overall outcomes (Rolland and Naassila, 2017). In this sense, CBD has recently emerged as a potential drug for treating AUD (Viudez-Martinez et al., 2018). Here we evaluated the potential effects of CBD in heavy use models such as DID in both males and females. After acute CBD administration (15 mg/kg, 30 mg/kg or 60 mg/kg, i.p.) on day 4 of DID-3, we observed no effects on ethanol intake in male or female mice. Nevertheless, when CBD was repeatedly administered during DID-4, high doses (30 mg/kg or 60 mg/kg) significantly reduced ethanol intake. These data agree with previous results reported by our group showing that repeated but not acute administration of CBD

(30 mg/kg) reduced ethanol preference and ethanol intake in the two bottle choice test (Viudez-Martinez et al., 2018). Surprisingly, this ethanol consumption reduction produced by CBD was only observed in male mice exposed to the DID. Considering the high rates of ethanol intake by females, it seems feasible to hypothesize that the differential effects produced by CBD could attend to the differences in ethanol consumption observed between genders. Although the selection of the dose was made according to previous published results, we believe that higher unexplored doses need to be evaluated in binge drinking to see if greater effects could be achieved increasing CBD doses, especially in females.

Complementarily, since CBD seems to modulate gene expression of *TH* in VTA and *OPRM1* in NAc after ethanol exposure (Viudez-Martinez et al., 2018), we analyzed these targets in male and female C57BL/6J mice treated with repeated administration of CBD (15 mg/kg, 30 mg/kg or 60 mg/kg) and exposed to DID. The administration of CBD tends to display *TH* and *OPRM1* modifications in a dose-dependent manner; however, only the higher dose (60 mg/kg, i.p.) significantly reduced the relative gene expression of *TH* (-28%) and *OPRM1* (-28%) in male mice. These data partially agree with results already published by our group, in which CBD reduced *TH* and *OPRM1* relative gene expression in VTA and NAc after ethanol exposure. Nevertheless, the reduction previously reported was seen when a dose of CBD 30 mg/kg was employed. It is important to highlight that the behavioral paradigms used for voluntary intake and oral ethanol self-administration were characterized by a lower ethanol intake (Viudez-Martinez et al., 2018) than the one reached in the present study using a binge-drinking model. Moreover, in the present study mice received repeated doses of CBD for 4 days, whereas in our previous study they were exposed to the treatment for at least 10 (Viudez-Martinez et al., 2018). These differences may also contribute to the heterogeneous results.

No significant effects in relative gene expression were observed in females after repeated CBD administration. The higher ethanol intake exhibited by female mice could explain, at least in

part, why no significant effects were observed in *TH* and *OPRM1* relative gene expression in females exposed to DID and treated with CBD. These different results between males and females agree with studies showing marked differences in dopamine and opioid regulation between male and females exposed to different drugs of abuse (Gillies et al., 2014) and how these gender-related discrepancies can also interfere in treatment outcomes of pharmacological interventions targeting these systems (Becker et al., 2012).

In conclusion, this study demonstrates the potential utility of CBD in the treatment of binge drinking by reducing ethanol consumption in a heavy alcohol use pattern. These behavioral effects are accompanied by a pronounced reduction of key targets closely related with alcohol addiction (*TH* and *OPRM1*). Interestingly, gender-related differences regarding ethanol consumption and the subsequent differential modulation of *TH* and *OPRM1* seem to affect the treatment outcome. Taken together, these results represent the first step regarding the potential therapeutic use of CBD as a pharmacological approach in AUD involving binge drinking consumption patterns; more studies are still required, especially to further explore its efficacy in females.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was supported by “Instituto de Salud Carlos III” (RETICS, RD12/0028/0019 and RD16/0017/0014), “Plan Nacional Sobre Drogas” (PNSD 2016/016) and “Ministerio de Economía y Competitividad” (FIS, PI14/00438) to JM. AVM is a predoctoral fellow supported by “Plan Nacional Sobre Drogas” (PNSD 2016/016).

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

JM and MSGG conceived and designed the experiments; AVM performed the experiments, analyzed the data and drafted relevant text; AVM, MSGG and JM wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of this manuscript.

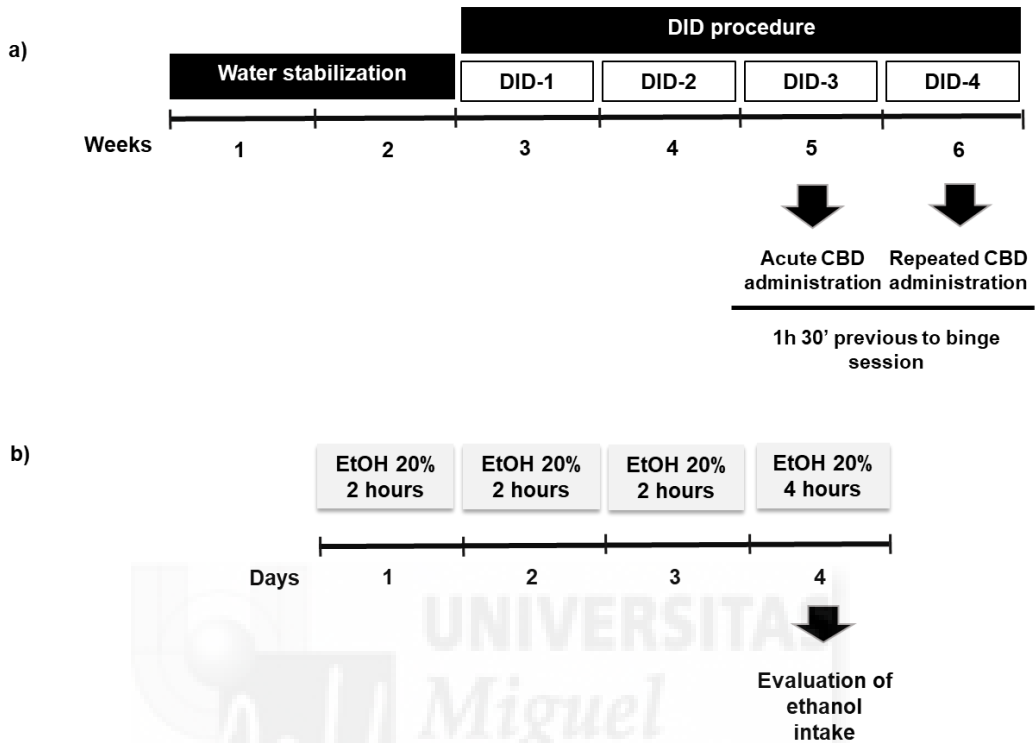
## **CONFLICT OF INTEREST**

All authors state that they have no biomedical financial interest or potential conflicts of interest.

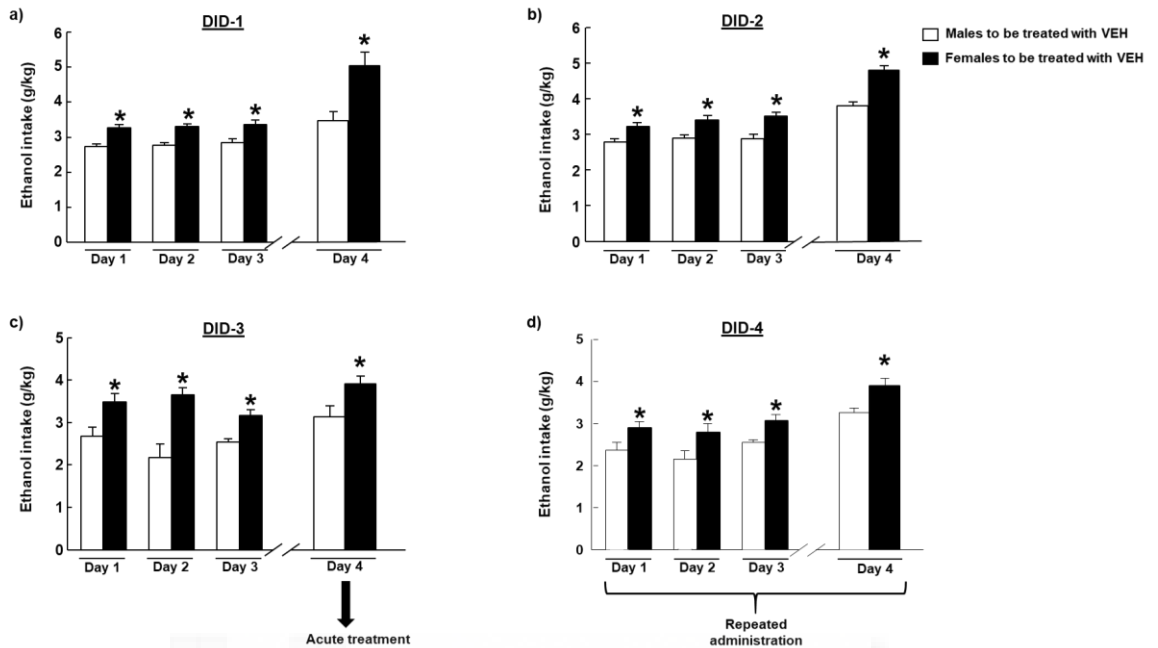




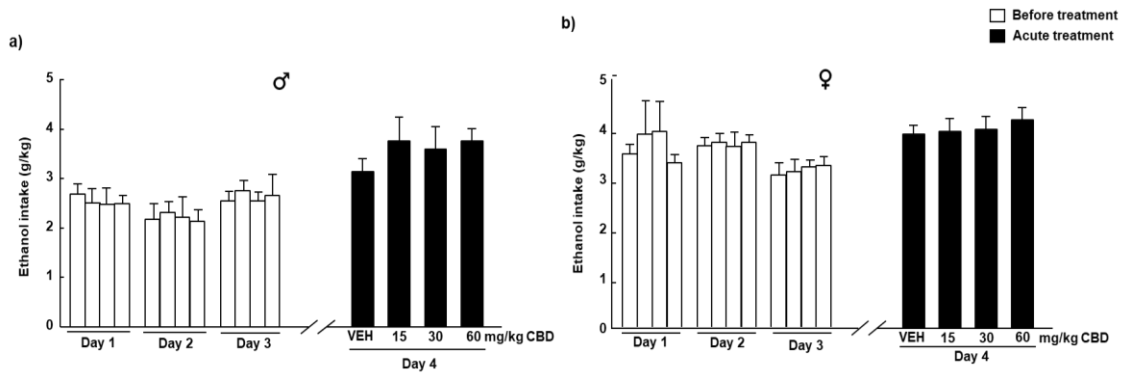
**FIGURES**



**Figure 1. Schematic diagrams of the drinking in the dark (DID) procedure.** (a) Phases layout including water stabilization (2 weeks) and the time encompassed by the DID model (4 weeks), including a graphic explanation for the CBD (15 mg/kg, 30 mg/kg or 60 mg/kg, i.p.) administration schedule (1.5 h before binge sessions) for both, acute and repeated administration during DID-3 and 4. (b) DID procedure week exemplification showing the binge session length on days 1-3 (2-hour) and on day 4 (4-hour).

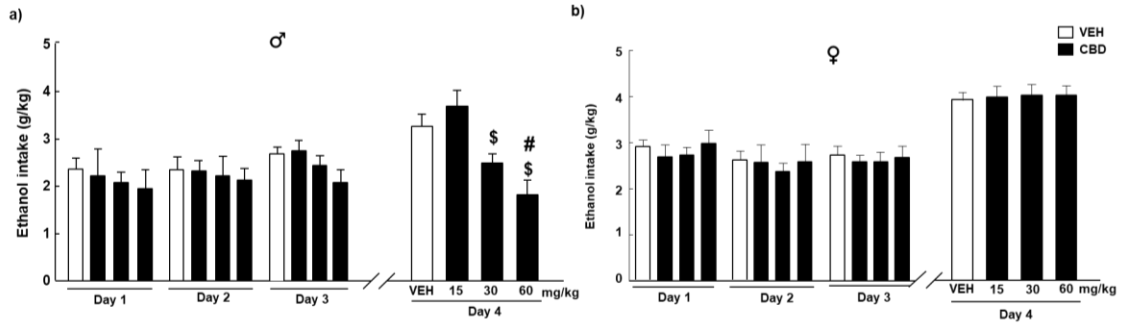


**Figure 2. Gender-related differences of ethanol intake in C57BL/6J mice exposed to the DID model.** (a-b) Ethanol intake (g/kg) during DID-1 (panel a) and DID-2 (panel b). From days 1-4, mice were exposed to a binge drinking session and received no treatment. (c) Ethanol intake (g/kg) during DID-3. From days 1-3, mice were exposed to a 2h drinking session and received no treatment. On day 4, mice were exposed to a 4h drinking session and all the subjects were administered a single administration of vehicle. (d) Ethanol intake (g/kg) during DID-4 of the drinking in the dark procedure. From days 1-3, mice were exposed to a 2-h drinking session. On day 4, mice were exposed to a 4-h drinking session. All the subjects underwent repeated administration of vehicle all days of DID-4. The columns represent the mean  $\pm$  SEM of ethanol intake (g/kg). \* represents the values from female group that are significantly different ( $p < 0.001$ ) from males ( $n = 10$  per group).

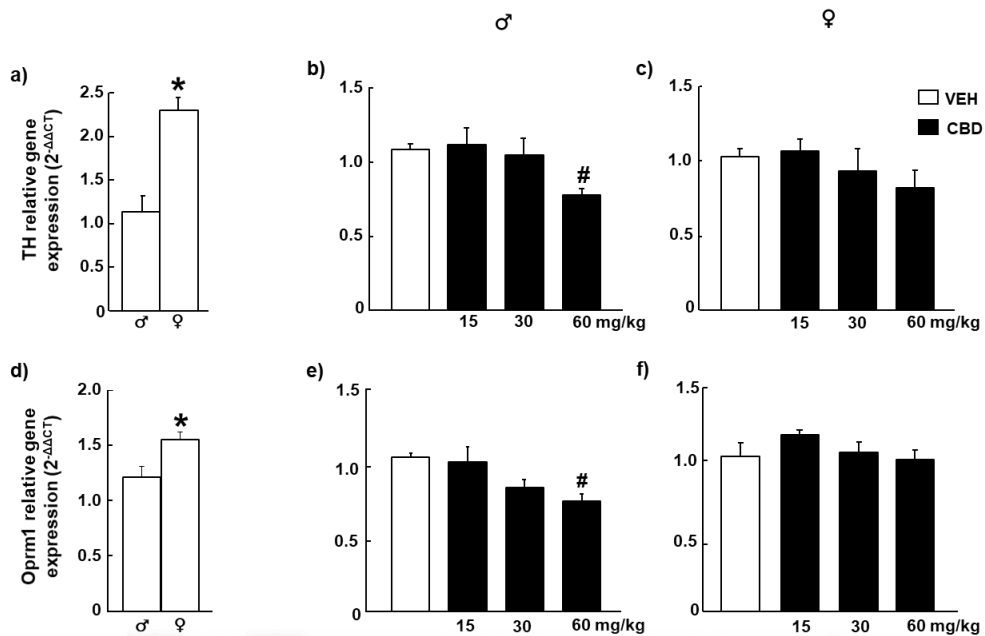


**Figure 3. Dose-response effects of acute CBD administration on male and female C57BL/6J mice exposed to the DID.** (a-b) Acute effects of CBD on ethanol intake (g/kg) in male (a) and female mice (b) during DID-3. On day 4, mice were treated with vehicle or CBD (15 mg/kg, 30 mg/kg or 60 mg/kg, i.p.) 1.5 h before exposure to the 4-h drinking session. The columns represent the mean  $\pm$  SEM of ethanol intake (g/kg) (n=10 per group).

### Repeated administration



**Figure 4. Dose-response effects of repeated CBD administration on male and female C57BL/6J mice exposed to the DID.** (a-b) Acute effects of CBD on ethanol intake (g/kg) in male (a) and female mice (b) during DID-4. From days 1-4, mice were treated with vehicle or CBD (15 mg/kg, 30 mg/kg or 60 mg/kg, i.p.) 1.5 h before exposure to the corresponding DID-session. The columns represent the mean  $\pm$  SEM of ethanol intake (g/kg). \$ represents the values from the groups that are significantly different ( $p < 0.005$ ) from vehicle and CBD 15 mg/kg. # represents the values from the groups that are significantly different ( $p < 0.005$ ) from vehicle, CBD 15 and CBD 30 mg/kg ( $n = 10$  per group).



**Figure 5. Effects of repeated CBD administration on tyrosine hydroxylase and mu opioid receptor in male and female C57BL/6J mice exposed to the DID procedure.** (a) Relative *TH* gene expression in the VTA of male and female mice exposed to the DID and treated with repeated administration of vehicle. (b-c) Relative *TH* gene expression in the VTA of male (b) and female mice (c) treated with repeated administration of CBD (15 mg/kg, 30 mg/kg or 60 mg/kg, i.p.) or its corresponding vehicle. (d) Relative *OPRM1* gene expression in the NAc of male and female mice exposed to the DID and treated with repeated administration of vehicle. (e-f) Relative *OPRM1* gene expression in the NAc of male (e) and female (f) mice treated with repeated administration of CBD (15, 30 or 60 mg/kg, i.p.) or its vehicle. Columns represent the mean  $\pm$  SEM of the corresponding relative gene expression (2<sup>-ΔΔCt</sup>). # represents the values from the groups that are significantly different ( $p < 0.005$ ) from vehicle, CBD 15 and CBD 30 mg/kg ( $n = 10$  per group).

## REFERENCES

1. Adan A, Navarro JF, Forero DA (2016) Personality profile of binge drinking in university students is modulated by sex. A study using the Alternative Five Factor Model. *Drug Alcohol Depend* 165:120-125.
2. Becker JB, Perry AN, Westenbroek C (2012) Sex differences in the neural mechanisms mediating addiction: a new synthesis and hypothesis. *Biol Sex Differ* 3:14.
3. Bhargava HN (1976) Effect of some cannabinoids on naloxone-precipitated abstinence in morphine-dependent mice. *Psychopharmacology (Berl)* 49:267-270.
4. Bilbao A, Robinson JE, Heilig M, Malanga CJ, Spanagel R, Sommer WH, Thorsell A (2015) A pharmacogenetic determinant of mu-opioid receptor antagonist effects on alcohol reward and consumption: evidence from humanized mice. *Biol Psychiatry* 77:850-858.
5. Blessing EM, Steenkamp MM, Manzanares J, Marmar CR (2015) Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics* 12:825-836.
6. Brewer RD, Swahn MH (2005) Binge drinking and violence. *JAMA* 294:616-618.
7. Caldwell LC, Schweinsburg AD, Nagel BJ, Barlett VC, Brown SA, Tapert SF (2005) Gender and adolescent alcohol use disorders on BOLD (blood oxygen level dependent) response to spatial working memory. *Alcohol Alcohol* 40:194-200.
8. de Mello Schier AR, de Oliveira Ribeiro NP, Coutinho DS, Machado S, Arias-Carrion O, Crippa JA, Zuardi AW, Nardi AE, Silva AC (2014) Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of cannabidiol: a chemical compound of *Cannabis sativa*. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13:953-960.
9. Dir AL, Bell RL, Adams ZW, Hulvershorn LA (2017) Gender Differences in Risk Factors for Adolescent Binge Drinking and Implications for Intervention and Prevention. *Front Psychiatry* 8:289.
10. El-Alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, Khan I, ElSohly M, Ross S (2010) Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav* 95:434-442.
11. Erol A, Karpyak VM (2015) Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: Contemporary knowledge and future research considerations. *Drug Alcohol Depend* 156:1-13.
12. Franklin KBJ, & Paxinos, G. (1997) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*.
13. Fusar-Poli p, Crippa JA, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Allen p, Martin-Santos R, Seal M, Surguladze SA, O'Carroll C, Atakan Z, Zuardi AW, McGuire PK (2009) Distinct effects of {delta}9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. *Arch Gen Psychiatry* 66:95-105.
14. Gillies GE, Virdee K, McArthur S, Dalley JW (2014) Sex-dependent diversity in ventral tegmental dopaminergic neurons and developmental programming: A molecular, cellular and behavioral analysis. *Neuroscience* 282:69-85.
15. Gonzalez-Cuevas G, Martin-Fardon R, Kerr TM, Stouffer DG, Parsons LH, Hammell DC, Banks SL, Stinchcomb AL, Weiss F (2018) Unique treatment potential of cannabidiol for the prevention of relapse to drug use: preclinical proof of principle. *Neuropsychopharmacology*.
16. Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW (1990) Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 100:558-559.
17. Harford TC, Yi HY, Faden VB, Chen CM (2009) The dimensionality of DSM-IV alcohol use disorders among adolescent and adult drinkers and symptom patterns by age, gender, and race/ethnicity. *Alcohol Clin Exp Res* 33:868-878.

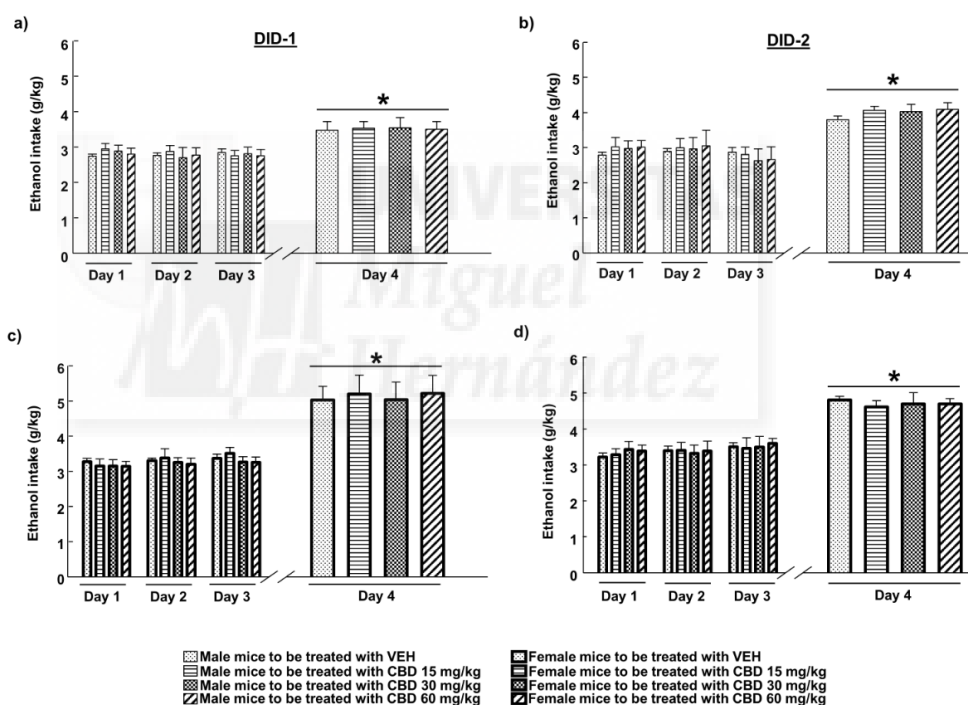
18. Hermens DF, Lagopoulos J (2018) Binge Drinking and the Young Brain: A Mini Review of the Neurobiological Underpinnings of Alcohol-Induced Blackout. *Front Psychol* 9:12.
19. Hingson RW, Heeren T, Winter MR (2006) Age of alcohol-dependence onset: associations with severity of dependence and seeking treatment. *Pediatrics* 118:e755-763.
20. Holmila M, Raitasalo K (2005) Gender differences in drinking: why do they still exist? *Addiction* 100:1763-1769.
21. Katsidoni V, Anagnostou I, Panagis G (2013) Cannabidiol inhibits the reward-facilitating effect of morphine: involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal raphe nucleus. *Addict Biol* 18:286-296.
22. Kessler RC, Crum RM, Warner LA, Nelson CB, Schulenberg J, Anthony JC (1997) Lifetime co-occurrence of DSM-III-R alcohol abuse and dependence with other psychiatric disorders in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 54:313-321.
23. Keyes KM, Li G, Hasin DS (2011) Birth cohort effects and gender differences in alcohol epidemiology: a review and synthesis. *Alcohol Clin Exp Res* 35:2101-2112.
24. Koob GF, Roberts AJ, Schulteis G, Parsons LH, Heyser CJ, Hyytia p, Merlo-Pich E, Weiss F (1998) Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 22:3-9.
25. Lee YK, Park SW, Kim YK, Kim DJ, Jeong J, Myrick H, Kim YH (2005) Effects of naltrexone on the ethanol-induced changes in the rat central dopaminergic system. *Alcohol Alcohol* 40:297-301.
26. Liput DJ, Hammell DC, Stinchcomb AL, Nixon K (2013) Transdermal delivery of cannabidiol attenuates binge alcohol-induced neurodegeneration in a rodent model of an alcohol use disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 111:120-127.
27. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
28. Long LE, Malone DT, Taylor DA (2006) Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Neuropsychopharmacology* 31:795-803.
29. Manzanares J V-MA, Navarron C, Aracil-Fernandez A, Navarrete F, Garcia-Gutierrez MS. (2016) Cannabidiol a drug lacking reinforcing activity. *Society for Neuroscience San Diego (CA, USA) 2016;7702/AAA18*
30. Martin-Santos R, Crippa JA, Batalla A, Bhattacharyya S, Atakan Z, Borgwardt S, Allen p, Seal M, Langohr K, Farre M, Zuardi AW, McGuire PK (2012) Acute effects of a single, oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. *Curr Pharm Des* 18:4966-4979.
31. Medina KL, McQueeney T, Nagel BJ, Hanson KL, Schweinsburg AD, Tapert SF (2008) Prefrontal cortex volumes in adolescents with alcohol use disorders: unique gender effects. *Alcohol Clin Exp Res* 32:386-394.
32. Melon LC, Wray KN, Moore EM, Boehm SL, 2nd (2013) Sex and age differences in heavy binge drinking and its effects on alcohol responsivity following abstinence. *Pharmacol Biochem Behav* 104:177-187.
33. Mitjans M, Serretti A, Fabbri C, Gasto C, Catalan R, Fananas L, Arias B (2013) Screening genetic variability at the CNR1 gene in both major depression etiology and clinical response to citalopram treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 227:509-519.
34. Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS (2006) Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1466-1471.
35. Nentwig TB, Wilson DE, Rhinehart EM, Grisel JE (2018) Sex differences in binge-like EtOH drinking, corticotropin-releasing hormone and corticosterone: effects of beta-endorphin. *Addict Biol*.

36. Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL (1993) Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 11:995-1006.
37. Oliva JM, Ortiz S, Perez-Rial S, Manzanares J (2008) Time dependent alterations on tyrosine hydroxylase, opioid and cannabinoid CB1 receptor gene expressions after acute ethanol administration in the rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:373-382.
38. Ortiz J, Fitzgerald LW, Charlton M, Lane S, Trevisan L, Guitart X, Shoemaker W, Duman RS, Nestler EJ (1995) Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system. *Synapse* 21:289-298.
39. Palkovits M (1983) Punch sampling biopsy technique. *Methods Enzymol* 103:368-376.
40. Parker LA, Burton p, Sorge RE, Yakiwchuk C, Mechoulam R (2004) Effect of low doses of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 175:360-366.
41. Ren Y, Whittard J, Higuera-Matas A, Morris CV, Hurd YL (2009) Cannabidiol, a nonpsychotropic component of cannabis, inhibits cue-induced heroin seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. *J Neurosci* 29:14764-14769.
42. Rhodes JS, Best K, Belknap JK, Finn DA, Crabbe JC (2005) Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 84:53-63.
43. Rolland B, Naassila M (2017) Binge Drinking: Current Diagnostic and Therapeutic Issues. *CNS Drugs* 31:181-186.
44. Roth ME, Cosgrove KP, Carroll ME (2004) Sex differences in the vulnerability to drug abuse: a review of preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 28:533-546.
45. Satta R, Hilderbrand ER, Lasek AW (2018) Ovarian Hormones Contribute to High Levels of Binge-Like Drinking by Female Mice. *Alcohol Clin Exp Res* 42:286-294.
46. Schiavon AP, Bonato JM, Milani H, Guimaraes FS, Weffort de Oliveira RM (2016) Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 64:27-34.
47. Schweinsburg BC, Alhassoon OM, Taylor MJ, Gonzalez R, Videen JS, Brown GG, Patterson TL, Grant I (2003) Effects of alcoholism and gender on brain metabolism. *Am J Psychiatry* 160:1180-1183.
48. Shin SH, Edwards EM, Heeren T (2009) Child abuse and neglect: relations to adolescent binge drinking in the national longitudinal study of Adolescent Health (AddHealth) Study. *Addict Behav* 34:277-280.
49. Spanish monitoring center for Drugs and Drug Addiction MoHSg (2016) Edades 2015-2016. Encuesta sobre alcohol y drogas en España. .
50. Squeglia LM, Sorg SF, Schweinsburg AD, Wetherill RR, Pulido C, Tapert SF (2012) Binge drinking differentially affects adolescent male and female brain morphometry. *Psychopharmacology (Berl)* 220:529-539.
51. Thiele TE, Crabbe JC, Boehm SL, 2nd (2014) "Drinking in the Dark" (DID): a simple mouse model of binge-like alcohol intake. *Curr Protoc Neurosci* 68:9 49 41-12.
52. Thiele TE, Navarro M (2014) "Drinking in the dark" (DID) procedures: a model of binge-like ethanol drinking in non-dependent mice. *Alcohol* 48:235-241.
53. Thorsell A (2013) The mu-opioid receptor and treatment response to naltrexone. *Alcohol Alcohol* 48:402-408.
54. van Noorden MS, Giltay EJ, den Hollander-Gijsman ME, van der Wee NJ, van Veen T, Zitman FG (2010) Gender differences in clinical characteristics in a naturalistic sample of depressive outpatients: the Leiden Routine Outcome Monitoring Study. *J Affect Disord* 125:116-123.



55. Viudez-Martinez A, Garcia-Gutierrez MS, Navarron CM, Morales-Calero MI, Navarrete F, Torres-Suarez AI, Manzanares J (2018) Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice. *Addict Biol* 23:154-164.
56. Wilhelm CJ, Hashimoto JG, Roberts ML, Bloom SH, Andrew MR, Wiren KM (2016) Astrocyte Dysfunction Induced by Alcohol in Females but Not Males. *Brain Pathol* 26:433-451.
57. Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR (2010) Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *British journal of pharmacology* 159:122-128.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION



**Supplementary figure 1.** Ethanol intake during DID-1 and DID-2 of both males and females.

\*represents the values of ethanol intake during day 4 that are significantly different ( $p < 0.001$ ) from days 1, 2 and 3 ( $n = 10$  per group).

