



## **FACULTAD DE FARMACIA**

Grado en Farmacia

# **Implicaciones terapéuticas de la modulación farmacológica del sistema endocannabinoide en el tratamiento del Trastorno por Uso de Alcohol**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

2 de diciembre de 2019

**Autor:** María Fernández Vergara

**Modalidad:** Revisión bibliográfica sistemática

**Tutor:** Francisco Navarrete Rueda

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
2.1. Trastorno por Uso de Alcohol (TUA): diagnóstico, neurobiología y abordaje terapéutico .....	5
2.2. Sistema endocannabinoide (eCB): implicación terapéutica en el TUA... 10	
3. OBJETIVOS.....	13
4. METODOLOGÍA .....	14
4.1. Diseño y fuente de obtención de datos .....	14
4.2. Estrategia de búsqueda .....	14
5. RESULTADOS.....	16
5.1. Implicación del rCB <sub>1</sub> en los efectos reforzantes del alcohol..... 16	
5.1.1. Estudios de manipulación genética del rCB <sub>1</sub> en modelos animales.....17	
5.1.2. Estudios de modulación farmacológica del rCB <sub>1</sub> en modelos animales .....	19
5.1.3. Ensayos clínicos con rimonabant en pacientes con TUA .....	22
5.2. Implicación del rCB <sub>2</sub> en los efectos reforzantes del alcohol..... 24	
5.2.1. Estudios de manipulación genética del rCB <sub>2</sub> en modelos animales.....26	
5.2.2. Estudios de modulación farmacológica del rCB <sub>2</sub> en modelos animales .....	28
6. DISCUSIÓN.....	34
7. CONCLUSIONES.....	37
8. BIBLIOGRAFÍA.....	38

## 1. RESUMEN

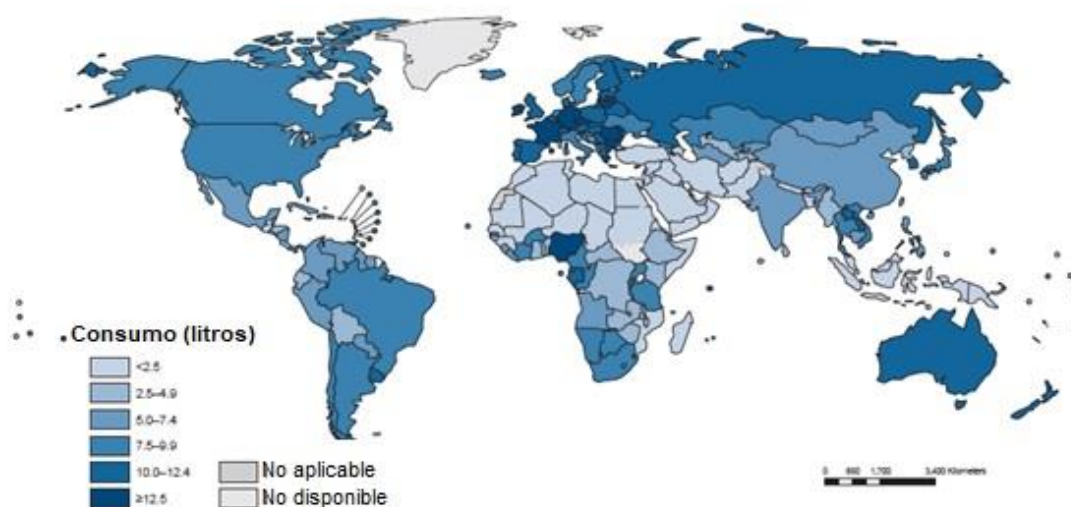
- **INTRODUCCIÓN:** El TUA supone uno de los trastornos mentales más prevalentes del mundo. El consumo nocivo de alcohol provoca alrededor del 5,3% del total de muertes al año, además de la gran cantidad de comorbilidades asociadas que suponen un 5,1% de AVAD. Una de las problemáticas actuales es la ineficacia del tratamiento farmacológico disponible y, por lo tanto, se investigan nuevas vías para su abordaje, como es el caso del sistema endocannabinoide y su implicación en el TUA.
- **OBJETIVO:** Revisión de la literatura científica relacionada con la eficacia de la manipulación genética y modulación farmacológica de los receptores cannabinoideos, CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, en el tratamiento de deshabitación del TUA.
- **METODOLOGÍA:** Se realiza un estudio de corte transversal y análisis crítico de la bibliografía mediante una revisión sistemática. La bibliografía se obtiene principalmente de la base de datos MedLine (vía PubMed), aplicando el diseño de ecuaciones por medio de palabras clave (términos MeSH) y conectores booleanos.
- **RESULTADOS:** La eliminación del receptor CB<sub>1</sub> y la modulación farmacológica con antagonistas resulta favorable en cuanto a la disminución del consumo de etanol en roedores. Desafortunadamente, no se observó efecto cuando los ensayos se trasladaron a humanos con TUA. De forma opuesta, la eliminación del receptor CB<sub>2</sub> produce un aumento del consumo, por lo que se plantea la posibilidad de que el agonismo disminuya el refuerzo y la motivación por el consumo de alcohol.
- **CONCLUSIÓN:** La modulación del sistema endocannabinoide resulta prometedora en cuanto a su utilidad como tratamiento farmacológico en la deshabitación del TUA. Son necesarios estudios adicionales que ayuden a mejorar nuestro conocimiento sobre la implicación del rCB<sub>2</sub> en este trastorno.

## 2. INTRODUCCIÓN

El alcohol, del árabe andalusí *alkuhl* (esencia o espíritu) es la droga más consumida en el mundo. El Trastorno por Uso de Alcohol (TUA) es uno de los trastornos mentales más prevalentes del mundo. Según el último *Informe Mundial sobre Alcohol y Salud* en 2018, de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el uso nocivo del alcohol provocó en 2016 3 millones de muertes (5,3% del total) en todo el mundo y 123,6 millones años de vida ajustados por discapacidad (AVAD), es decir, un 5,1% de AVAD.<sup>1, 2</sup>

Uno de los indicadores más usados para el control del consumo de alcohol es “litros de alcohol totales consumidos per capita”. El consumo total per capita de alcohol en la población mundial de más de 15 años de edad fue de 6,4 litros de alcohol puro en 2016. Los niveles más altos de consumo se producen en los países europeos, seguidos de América del Norte. Las diferencias entre varios países son el resultado de interacciones complejas de varios factores como: factores sociodemográficos, ratios de prevalencia y abstinencia, desarrollo del nivel económico, normas culturales y religiosas y preferencias de tipos de bebidas alcohólicas (véase *Figura 1*).

*Figura 1. Consumo total (litros) de alcohol per capita. Imagen extraída de "Global status report on alcohol and health 2018; Informe de la OMS" <sup>8</sup>*



En España, la prevalencia de consumo de alcohol mantiene una tendencia estable y en niveles altos desde la década de los 90. En la última

encuesta EDADES (Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España del año 2018, realizado por el Plan Nacional sobre Drogas del Ministerio de sanidad, consumo y bienestar social) se vio que el 77,6% de la población comprendida entre 15 y 65 años había consumido alcohol en los últimos 12 meses (siendo la sustancia que mayor prevalencia de consumo presenta), el 62,1% en los últimos 30 días y el 9,3% diariamente en los últimos 30 días.

En cuanto a la edad de inicio en el consumo, aquellos que han tomado bebidas alcohólicas alguna vez sitúan el primer consumo a los 14 años de media. El consumo semanal de alcohol comienza por término medio a los 15,1 años. Atendiendo al consumo de alcohol en función del sexo, la prevalencia se encuentra ligeramente más extendida entre las mujeres.

Respecto a los consumos intensivos, el consumo en atracón (*binge drinking*), a pesar de presentar una tendencia global descendente, continúa con prevalencias elevadas, asociándose a un mayor consumo de drogas ilegales. Este tipo de consumo se define por consenso, desde el ámbito de la prevención y salud pública, como la ingesta de etanol de 60 gramos o más (en hombres) y de 40 gramos o más (en mujeres) en una sesión de entre 4 y 6 horas, durante la que se mantiene una concentración de etanol en sangre igual o mayor a 0,8 g/L. Este patrón de consumo se concentra en el grupo de jóvenes que se sitúa entre los 15 y 34 años (véase *Figura 2*).<sup>3</sup>

En los últimos 20 años, diversos estudios han observado que este tipo de consumo está relacionado con un aumento de las consecuencias negativas asociadas al consumo de alcohol como: accidentes de tráfico, suicidios, violencia y delitos o enfermedades de transmisión sexual. Incluso algunas investigaciones han comprobado que esta forma de consumo se asocia con consecuencias neurocognitivas (como peor rendimiento en tareas neuropsicológicas o deficiencia en la diferenciación electrofisiológica entre información relevante e irrelevante).<sup>4</sup>

Algunos estudios demuestran que el consumo de alcohol durante la adolescencia resulta perjudicial para el desarrollo cerebral y conduce a déficits persistentes en la edad adulta. Tanto los estudios estructurales como

funcionales del cerebro sugieren que los adolescentes y jóvenes con TUA muestran una reducción significativa del volumen hipocampal, del córtex prefrontal y de la integridad de la sustancia blanca en el rostro y el istmo del cuerpo calloso, diferencias en el patrón de activación cerebral en una tarea de memoria de trabajo espacial y dificultades en tareas cognitivas que valoren memoria, atención y memoria de trabajo.<sup>5, 6</sup>

Figura 2. Prevalencia de diferentes patrones de consumo de alcohol en estudiantes de Enseñanzas Secundarias de 14-18 años (%) Imagen extraída de la encuesta EDADES 2018 (DGPNSD)<sup>7</sup>.



El TUA presenta un gran impacto socio sanitario debido a su gran tasa de morbilidad asociada. Existen comorbilidades asociadas tales como cardiopatías isquémicas, desarrollo de diabetes mellitus, distintos tipos de cáncer, enfermedad hepática (cirrosis), digestiva, y distintos tipos de enfermedades mentales asociadas. Asimismo, se observa en estos pacientes una mayor incidencia de enfermedades infecciosas como tuberculosis o VIH/SIDA y una disminución de la adherencia terapéutica a los tratamientos de estas.<sup>8</sup>

## 2.1. Trastorno por Uso de Alcohol (TUA): diagnóstico, neurobiología y abordaje terapéutico

Los dos sistemas principales de clasificación de enfermedades son: La clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas de salud (CIE, Clasificación Internacional de Enfermedades), llevada a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Manual Diagnóstico y Estadístico de los trastornos mentales (DSM), realizado por la Asociación Estadounidense de Psiquiatría (*American Psychiatric Association*).

La última y quinta revisión del DSM (DSM-V) fue publicada en EE. UU. en 2013 y presenta modificaciones respecto del DSM-IV. En concreto, para los criterios diagnósticos del TUA, en el DSM-IV permitían diferenciar entre abuso y dependencia: en caso de cumplir 1 criterio de abuso durante 12 meses, se diagnosticaba abuso de alcohol; mientras que, si se cumplían tres o más criterios de dependencia durante el mismo período, se diagnosticaba dependencia por el alcohol (DSM-IV). En el caso del DSM-V no se diferencia entre abuso y dependencia, sino que el diagnóstico de TUA se establece cuando el paciente cumple dos o más criterios diagnósticos establecidos durante un período de 12 meses (*Tabla 1*). Una de las ventajas del DSM-V es que permite establecer la gravedad basándose en el número total de criterios que cumpla el paciente, pudiendo diferenciar entre leve (2-3 criterios), moderado (4-5 criterios) o grave (6 o más criterios).<sup>9</sup>

Se han llevado a cabo multitud de investigaciones con el objetivo de acercamiento a la comprensión de la neurobiología del TUA (*Figura 3*). A grandes rasgos, se sabe que la administración aguda de alcohol produce la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> junto con la reducción de la actividad de los receptores NMDA pertenecientes al sistema glutamatérgico excitatorio. Consecuentemente, a nivel cerebral el etanol potencia los efectos inhibidores e inhibe los excitadores. Por ello, se sitúa entre las sustancias depresoras del sistema nervioso central (SNC) dentro de las drogas psicoactivas. Además, se produce un aumento de la liberación de dopamina en el sistema mesolímbico-mesocortical. Este sistema se origina en el área tegmental ventral (VTA) y se

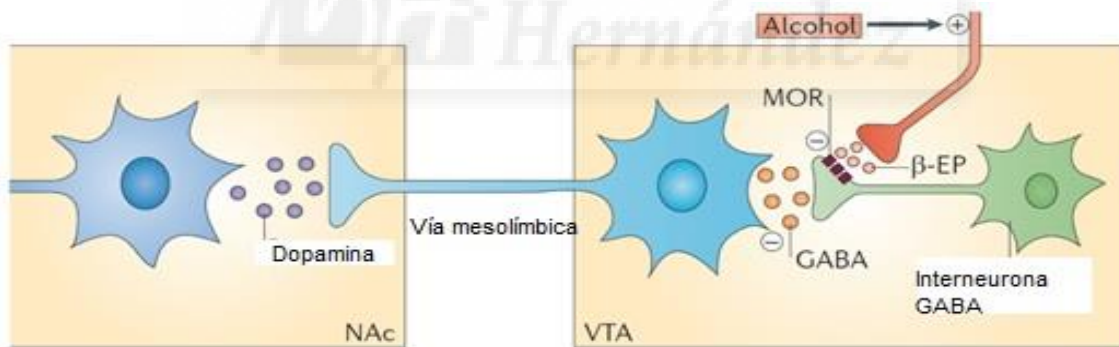
Tabla 1. Criterios diagnósticos del TUA según el DSM-V (American Psychiatric Association)<sup>10</sup>

<p><b>El TUA se define como un modelo problemático de consumo de alcohol que provoca un deterioro o malestar clínicamente significativo y que se manifiesta al menos por dos de los hechos siguientes en un plazo de 12 meses:</b></p>
1. Se consume alcohol con frecuencia en cantidades superiores o durante un tiempo más prolongado del previsto.
2. Existe un deseo persistente o esfuerzos fracasados de abandonar o controlar el consumo de alcohol.
3. Se invierte mucho tiempo en las actividades necesarias para conseguir alcohol, consumirlo o recuperarse de sus efectos.
4. Ansias o un poderoso deseo o necesidad de consumir alcohol.
5. Consumo recurrente de alcohol que lleva al incumplimiento de los deberes fundamentales en el trabajo, la escuela o el hogar.
6. Consumo continuado de alcohol a pesar de sufrir problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes, provocados o exacerbados por los efectos del alcohol.
7. El consumo de alcohol provoca el abandono o la reducción de importantes actividades sociales, profesionales o de ocio.
8. Consumo recurrente de alcohol en situaciones en las que provoca un riesgo físico.
9. Se continúa con el consumo de alcohol a pesar de saber que se sufre un problema físico o psicológico persistente o recurrente probablemente causado o exacerbado por el alcohol.
10. Tolerancia, definida por alguno de los siguientes hechos: a) Una necesidad de consumir cantidades cada vez mayores de alcohol para conseguir la intoxicación o el efecto deseado. b) Un efecto notablemente reducido tras el consumo continuado de la misma cantidad de alcohol.
11. Abstinencia, manifestada por de los siguientes hechos: a) Presencia del síndrome de abstinencia característico del alcohol (crit a y b) i) Criterio A: Cese (o reducción) de un consumo de alcohol que ha sido muy intenso y prolongado. ii) Criterio B: Aparecen dos (o más) de los signos o síntomas siguientes a las pocas horas o pocos días de cesar (o reducir) el consumo de alcohol descrito en el Criterio A: 1. Hiperactividad del sistema nervioso autónomo (p. ej. Sudoración o ritmo del pulso superior a 100 lpm) 2. Incremento del temblor de las manos 3. Insomnio 4. Náuseas o vómitos. 5. Alucinaciones o ilusiones transitorias visuales, táctiles o auditivas. 6. Agitación psicomotora. 7. Ansiedad. 8. Convulsiones tonicoclónicas generalizadas. b) Se consume alcohol (o alguna sustancia muy similar, como una benzodiacepina) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.



proyecta sobre el núcleo accumbens (NAc), la amígdala (AMY), el hipocampo (HIP) y la corteza prefrontal (PFC). Diversos estudios han demostrado que un nivel elevado de dopamina (DA) en el NAc resulta crucial en el aprendizaje de efectos de recompensa o refuerzo positivo en los casos de abuso de drogas. Además, se encuentra en conexión directa con otros sistemas de neurotransmisión, como son el sistema opioide endógeno, serotoninérgico y GABAérgico, entre otros. Se ha visto también, que en las membranas de las células gabaérgicas aferentes al VTA se encuentran receptores Mu ( $\mu$ )-opioides y que su activación inhibe la liberación de GABA en el VTA aumentando, por lo tanto, la de dopamina en el NAc. Fruto del mejor conocimiento de los mecanismos neurobiológicos implicados en los efectos reforzantes del alcohol se han desarrollado fármacos con utilidad terapéutica como los que se mencionarán más adelante.<sup>11</sup>

*Figura 3. Esquema representativo del efecto estimulante del alcohol sobre la neurotransmisión dopaminérgica en el sistema mesolímbico, a través del aumento de la liberación de péptidos opioides (beta-endorfina) y la consecuente inhibición de interneuronas GABAérgicas localizadas en el área del tegmento ventral. Imagen extraída de "Heilig y cols"<sup>11</sup>*



El abordaje terapéutico dependerá en gran parte de la motivación del paciente para realizar una adecuada valoración que nos permita situarlo en el estado cognitivo de cambio en que se encuentra. El objetivo terapéutico final será a largo plazo, no obstante, se plantean también a corto y medio plazo. Para ello se combinarán técnicas farmacológicas y psicosociales. El planteamiento terapéutico de un paciente dependiente deberá cubrir dos fases: la desintoxicación y la deshabituación. En la primera de ellas, el objetivo

principal será el tratamiento de los síntomas asociados al síndrome de abstinencia. En la fase de deshabitación se pretende mantener la abstinencia del paciente o, al menos, conseguir reducir el consumo para minimizar los daños asociados. Es aquí donde se encuentran mayores tasas de recaídas y, por lo tanto, fracaso terapéutico, siendo esta fase en la que se centra la farmacoterapia actual que se enumera a continuación.<sup>12</sup>

En primer lugar, se tendrían a los fármacos interdictores o aversivos como el **disulfiram**. El mecanismo de acción es la inhibición irreversible de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), encargada de metabolizar el acetaldehído (metabolito producido a partir del etanol mediante la enzima alcohol deshidrogenasa) provocando su acumulación en sangre tras el consumo de alcohol. La combinación de disulfiram y etanol en sangre conlleva al denominado efecto antabus, derivado de la acumulación de acetaldehído y con la consecuente aparición de efectos desagradables: aparición de rubor, dolor de cabeza, palpitaciones, náuseas, sensación de ahogo/debilidad. La intensidad de la reacción es proporcional al nivel de ingesta de etanol en presencia de disulfiram. Por lo tanto, es importante realizar una evaluación del estado clínico del paciente antes de iniciar el tratamiento y asegurar que han pasado 24 horas de abstinencia desde la última ingesta de alcohol, que el paciente lleve un riguroso seguimiento médico y que sea capaz de discernir las consecuencias de la ingesta de alcohol junto con disulfiram.

No hay evidencias en cuanto a la duración del tratamiento en la práctica, dependiendo de cada paciente puede mantenerse durante meses o incluso años. Se considera que la efectividad de disulfiram y el nivel de éxito terapéutico en el trascurso del tratamiento del TUA es mayor en personas más motivadas hacia el tratamiento, y en personas que siguen un programa estructurado de desintoxicación donde el disulfiram tan sólo es una parte de un complejo programa de tratamiento. Además, se debe tener en cuenta que puede alterar el metabolismo de otros fármacos y sustancias al modificar la actividad del citocromo P450.<sup>13</sup>

Por otro lado, los fármacos anti-deseo como la **naltrexona** o el **acamprosato**) disminuyen la intensidad de los síntomas de abstinencia condicionados a las situaciones de consumo y que incrementan el deseo de beber. El **acamprosato** presenta una estructura molecular similar a la del GABA, por lo que posee propiedades que estimulan dicho neurotransmisor. También funciona como antagonista de los aminoácidos excitatorios, en particular el glutamato. Este bloqueo impide que aparezcan las sensaciones de disforia asociadas al deseo de consumo y favorece que el paciente mantenga la abstinencia. La **naltrexona** es un antagonista competitivo de los receptores mu ( $\mu$ ) opioides. Produce una disminución de la euforia tras la ingesta etílica así como de la capacidad reforzante del alcohol, ayudando a reducir el nivel de consumo hacia la consecución de la abstinencia, e interfiriendo en este último supuesto en la recaída. Metaanálisis recientes consideran que el acamprosato es un fármaco eficaz en mantener la abstinencia en pacientes desintoxicados, pero que pierde su eficacia cuando estos inician el consumo. Por el contrario, los antagonistas opiáceos son más eficaces en evitar la transición desde un consumo inicial a una recaída. <sup>14-17</sup>

También se utilizan fármacos anti-impulsivos, como el antiepiléptico **topiramato** que, aunque están fuera de indicación específica para pacientes con TUA, presentan múltiples efectos entre los que destacamos la potenciación de la actividad gabaérgica y la inhibición de los receptores glutamatérgicos. Disminuye el efecto impulsivo relacionado con la vulnerabilidad por el consumo de sustancias de abuso como el alcohol. <sup>18</sup>

Sin embargo, todas estas líneas de abordaje terapéutico no son suficientes pues existe una gran incidencia de recaídas, dado que sólo un porcentaje de los pacientes consigue dejar de beber o reducir su consumo de forma significativa y prolongada. Por esta razón, se sigue investigando sobre las bases neurobiológicas de este trastorno para poder identificar nuevas dianas terapéuticas. En este sentido, en los últimos años se ha prestado especial atención al sistema endocannabinoide como se mostrará en el siguiente apartado. <sup>19</sup>

## **2.2. Sistema endocannabinoide (eCB): implicación terapéutica en el TUA**

Los compuestos cannabinoides constituyen un grupo de componentes psicoactivos presentes en las hojas y especialmente inflorescencias de la planta *Cannabis sativa*. La búsqueda del responsable de los efectos psicoactivos clásicos permitió que se descubriera el principio activo más potente de la planta, el delta-9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC). El estudio del mecanismo biológico/molecular por el cual estos componentes interactúan con el organismo, dio lugar al descubrimiento del sistema endocannabinoide. En concreto, ensayos detallados de relación estructura-actividad con el cannabinoide sintético CP-55940, sugirieron que estos efectos estaban mediados por receptores específicos.

Existen dos tipos de receptores cannabinoides, los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Los receptores CB<sub>1</sub> (rCB<sub>1</sub>) se encuentran principalmente en el sistema nervioso central y se concentran en los ganglios basales (relacionado con los efectos en la actividad motora), capa molecular del cerebelo y ciertas partes del hipocampo (efectos sobre el aprendizaje y la memoria, así como las propiedades anticonvulsivantes). También están presentes a nivel periférico en el bazo, amígdalas, corazón, próstata, útero, ovario y en la presinapsis de terminales nerviosos simpáticos.<sup>20, 21</sup>

Los receptores CB<sub>2</sub> (rCB<sub>2</sub>) se encuentran principalmente en los tejidos periféricos. Se concentran en el tejido linfoide, fundamentalmente en el bazo, amígdalas y en distintas células del sistema inmune (linfocitos B, linfocitos T y monocitos) donde juegan un papel relevante en la regulación de la respuesta inmunológica. Sin embargo, en el año 2005 se observó la presencia de estos receptores en el tronco central de roedores en condiciones normales (no patológicas). Más adelante también se caracterizó su distribución en el cerebelo, neuronas sensoriales, progenitores neurales y microglía perivascular. Destaca la observación de este receptor en estructuras implicadas en el sistema de recompensa mesolímbico-mesocortical comprendido desde el área tegmento ventral (VTA) hasta el núcleo accumbens (NAc), como la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal de roedores, hecho que motivó el estudio de

su posible implicación en la regulación de los efectos reforzantes de diferentes drogas de abuso como el alcohol.<sup>22</sup>

Los endocannabinoides son compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, siendo los más representativos la etanolamida del ácido araquidónico (AEA), conocida como anandamida y el 2-araquidonil glicerol (2-AG). La concentración de estos en el cerebro es baja, ya que no son almacenados en las células en su forma biológicamente activa, sino que son sintetizados en respuesta a un determinado estímulo. Las enzimas responsables de la síntesis y metabolización de AEA son la fosfolipasa D y la anandamida amidohidrolasa, respectivamente, mientras que del 2-AG son la fosfolipasa C y el monoacilglicerol lipasa. La AEA es agonista parcial sobre el rCB<sub>2</sub>, mientras que el 2-AG es agonista completo. Por esta razón, se considera que la AEA presenta una acción relativamente más predominante CB<sub>1</sub> que 2-AG.<sup>23</sup>

La distribución de la anandamida es más amplia que la del 2-AG. Se localiza en circuitos neuronales implicados en funciones como la cognición, memoria, control del estado anímico y nocicepción. Se ha descrito niveles altos de anandamida en el tronco cerebral, hipocampo, estriado y médula espinal y a nivel periférico se localiza sobre todo en el bazo, el corazón y la piel. El 2-AG presenta una distribución anatómica similar a la de la anandamida, presentando una alta concentración en la corteza, el tronco cerebral, el hipocampo y el estriado entre otros.<sup>24, 25</sup>

Los endocannabinoides actúan como moduladores de la neurotransmisión: son moléculas postsinápticas retrógradas que activan los receptores presinápticos y conducen a la inhibición presináptica de canales de calcio y/o activación de canales de potasio presinápticos, impidiendo la liberación de vesículas con neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores. Regulan la proliferación y diferenciación neuronal a través de la activación de las MAP cinasas, la actividad motora, el aprendizaje y la memoria, la antinocicepción y el control de las emociones. A nivel periférico, actúan como mediadores autocrinos y paracrinos de la actividad inmunológica, regulando la potencia defensiva de linfocitos y monocitos. También regulan la actividad inmune de la

microglía y astrocitos del sistema nervioso central, sobre todo en situaciones de patología degenerativa o isquémica. <sup>26, 27</sup>

El sistema endocannabinoide está recibiendo mucha atención en relación con la comprensión de su importancia funcional en el abuso de drogas y otros trastornos neuropsiquiátricos. Se ha comprobado que este sistema también forma parte de los diferentes mecanismos neuroadaptativos de los circuitos neuronales de recompensa y las propiedades adictivas de las drogas de abuso (cocaína, heroína, alcohol, nicotina y cannabinoides), siendo capaz de regular diversos aspectos funcionales como la liberación de otros neurotransmisores tales como dopamina, péptidos opioides, GABA, glutamato y serotonina. Entre éstos, destaca la modulación del sistema endocannabinoide en la neurotransmisión de la vía dopaminérgica mesolímbica-mesocortical, principal sistema de recompensa en el cerebro común a todas las drogas de abuso. <sup>28, 29</sup> Esta circunstancia ofrece la oportunidad de modular otras dianas pertenecientes a este sistema con el fin de desarrollar aproximaciones farmacológicas con mayor eficacia. Diversos estudios han sugerido que tanto el rCB<sub>1</sub> como el rCB<sub>2</sub> desempeñan un papel en la adicción al alcohol. Se han identificado diferentes alteraciones en elementos de este sistema de neurotransmisión en diferentes áreas cerebrales tras un consumo prolongado de alcohol. La creciente evidencia de estudios bioquímicos, genéticos, electrofisiológicos y de comportamiento realizados en las últimas dos décadas sugiere que el sistema endocannabinoide contribuye significativamente a los efectos reforzantes y motivacionales del etanol, y participa en la neuropatología subyacente que conduce al abuso de alcohol y los trastornos de dependencia.

30

### 3. OBJETIVOS

Con la información expuesta anteriormente, los objetivos de este trabajo fin de grado son:

1. Revisar la literatura científica sobre la manipulación genética de rCB<sub>1</sub> y rCB<sub>2</sub>, con el fin de averiguar su implicación en el TUA.
2. Recopilar los resultados de ensayos preclínicos y clínicos sobre la modulación farmacológica del rCB<sub>1</sub> y verificar su utilidad para el tratamiento del TUA.
3. Analizar los ensayos con modelos animales publicados hasta la fecha sobre la modulación farmacológica del rCB<sub>2</sub> como posible diana terapéutica para el abordaje del tratamiento del TUA.



## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. Diseño y fuente de obtención de datos**

El presente trabajo es un estudio de corte transversal que, junto al análisis crítico de la bibliografía recopilada, se realiza una revisión sistemática. Los datos se obtuvieron a través del acceso directo, vía Internet, de diferentes bases de datos relacionadas con las ciencias de la salud, sobre todo MedLine (vía PubMed).

### **4.2. Estrategia de búsqueda**

La estrategia de la búsqueda bibliográfica fue el diseño de ecuaciones utilizando las palabras clave, que previamente se convirtieron en términos MeSH (Encabezados de temas médicos para la obtención de una búsqueda específica y avanzada) con ayuda de la base de datos 'DeCs' (Descriptores en Ciencias de la Salud), y los conectores booleanos. La primera búsqueda fue en PubMed y la misma ecuación fue adaptada al resto de bases de datos anteriormente mencionadas. Para el cribaje de la búsqueda, los criterios de inclusión y exclusión aplicados fueron los siguientes:

- Criterios de inclusión:
  - ✓ Artículos publicados hasta octubre de 2019.
  - ✓ Unidad de estudio: animales y humanos.
  - ✓ Artículos originales de carácter preclínico o clínico, así como revisiones sistemáticas o meta-análisis.
- Criterios de exclusión:
  - ✗ Referencias científicas no escritas en lengua inglesa o española.
  - ✗ Artículos no centrados en el rCB<sub>1</sub> y/o rCB<sub>2</sub> como dianas farmacológicas para el tratamiento del TUA.
  - ✗ No tener acceso al artículo a través de internet mediante el acceso personalizado de la UMH.

A continuación, se muestran las cajas de búsqueda que se emplearon conforme a los bloques temáticos en los que se ha subdividido el apartado de



resultados del presente trabajo. Además, en la *Figura 4* se muestra el diagrama de flujo que se siguió hasta la selección de los artículos finalmente analizados.

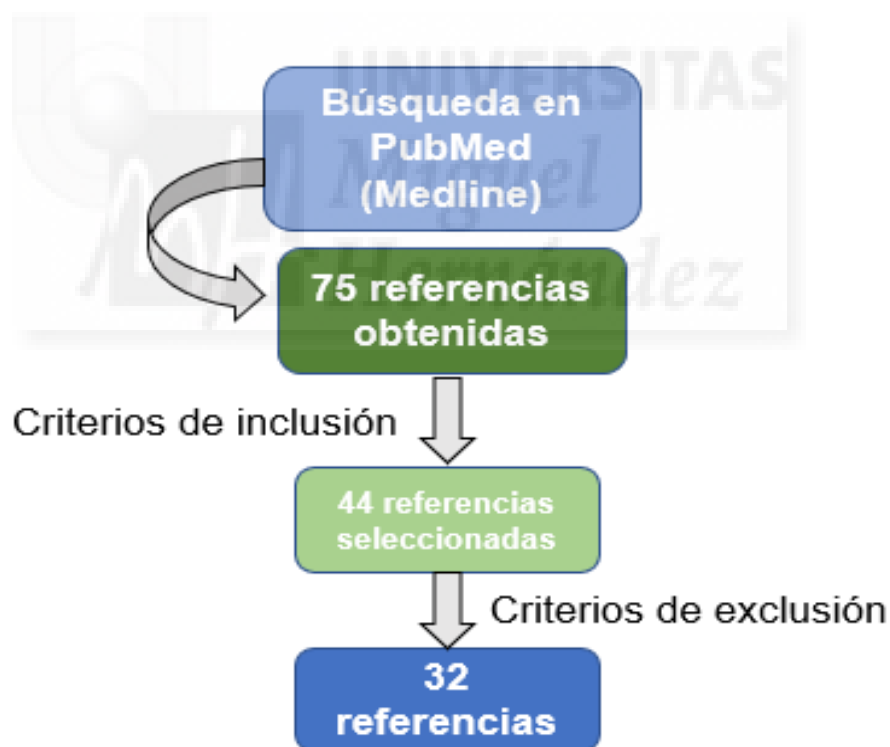
#### A) Implicación del receptor rCB<sub>1</sub> en el tratamiento del TUA

- “Receptor, Cannabinoid, CB1” AND “Alcoholism, Use Disorder, Alcohol-related disorders”

#### B) Implicación del receptor CB<sub>2</sub> en el tratamiento del TUA

- “Receptor, Cannabinoid, CB2” AND “Alcoholism, Use Disorder, Alcohol-related disorders”

*Figura 4. Representación gráfica del algoritmo que se ha seguido para el cribaje y selección de las referencias bibliográficas, tanto por una parte sobre el rCB<sub>1</sub> como del rCB<sub>2</sub>, y que finalmente se han analizado en el presente trabajo*



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Implicación del rCB<sub>1</sub> en los efectos reforzantes del alcohol

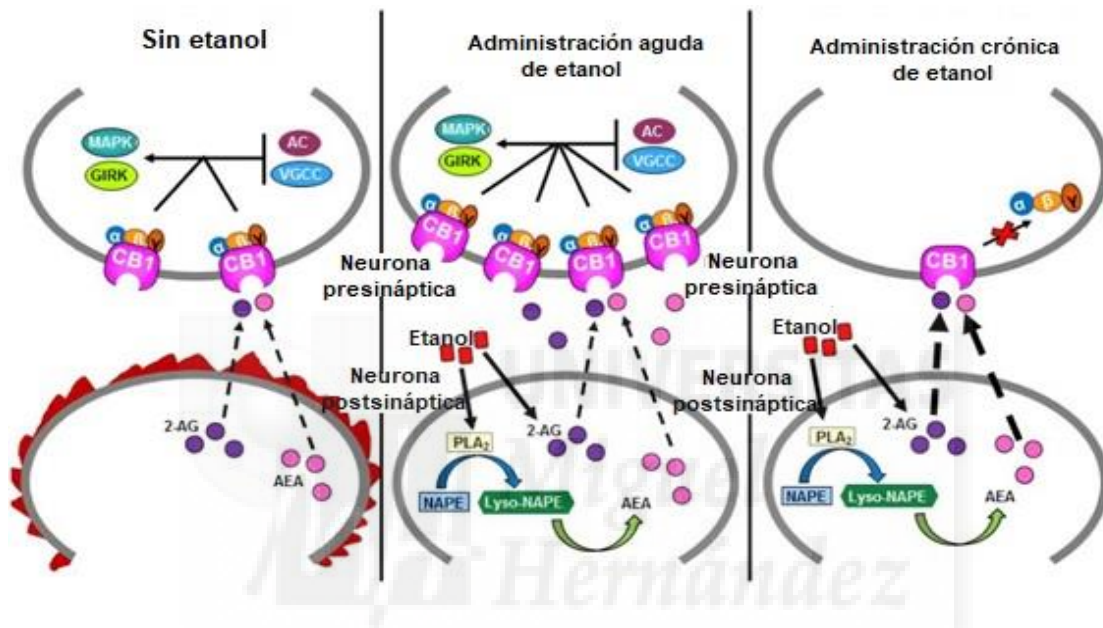
Diversas observaciones llevaron a creer que el rCB<sub>1</sub> pudiese presentar íntima relación con el sistema de recompensa y que, por lo tanto, más adelante fuese plausible la manipulación genética o farmacológica como tratamiento eficaz en el TUA. En primer lugar, se observa en ensayos con modelos animales que la exposición al alcohol modifica los niveles de endocannabinoides: implica la síntesis y liberación de AEA y 2-AG, a través de la activación de PLA2 (fosfolipasa A2) dependiente de Ca<sup>2+</sup>, una enzima involucrada en la formación de endocannabinoides en las células neuronales y el cerebro. En segundo lugar, el tratamiento agudo con etanol aumenta la transcripción del rCB<sub>1</sub> en el NAc. Esto, a su vez, implica una liberación de dopamina de forma dependiente del rCB<sub>1</sub> en el NAc, demostrando que el rCB<sub>1</sub> también regula la activación inducida por etanol de las neuronas VTA-DA y que, por lo tanto, participa en el sistema de recompensa mesolímbico-mesocortical.<sup>31</sup>

Cuando la exposición al alcohol es crónica, disminuye el número y la funcionalidad de los receptores CB<sub>1</sub> en las zonas cerebrales relacionadas con el sistema de recompensa, tanto en animales como en el tejido post mórtem humano. Estos datos proporcionan evidencia de que la tolerancia al alcohol implica la regulación negativa del rCB<sub>1</sub> y su función, posiblemente debido a la sobreestimulación de los receptores CB<sub>1</sub> a través del aumento de síntesis de agonistas endocannabinoides (*Figura 5*). Resulta interesante mencionar que los rCB<sub>1</sub> recuperan sus niveles por encima de los de control tras la retirada de alcohol a sujetos que presentan un consumo crónico.

Por otro lado, la predisposición al consumo excesivo de alcohol y el desarrollo del TUA se ha relacionado con factores genéticos. Otra de las evidencias de la participación del rCB<sub>1</sub> en el TUA deriva de las distintas observaciones en dos cepas de ratón diferenciadas por su vulnerabilidad por el consumo de alcohol. Se emplearon ratones C57BL/6 (B6) que presentan una elevada preferencia y consumo de alcohol, y ratones DBA/2 (D2) que, por el

contrario, muestran aversión al alcohol. En este estudio, se observa que los ratones C57BL/6 tienen un nivel significativamente menor de rCB<sub>1</sub> que DBA/2, así como una mayor afinidad/sensibilidad de dichos receptores a los ligandos (por ejemplo [<sup>3</sup>H] CP-55,940, agonista de gran afinidad) cuando se comparan con los ratones DBA/2.

Figura 5. Cambios bioquímicos y de expresión del rCB<sub>1</sub> ante la exposición aguda y crónica al alcohol.<sup>20</sup>

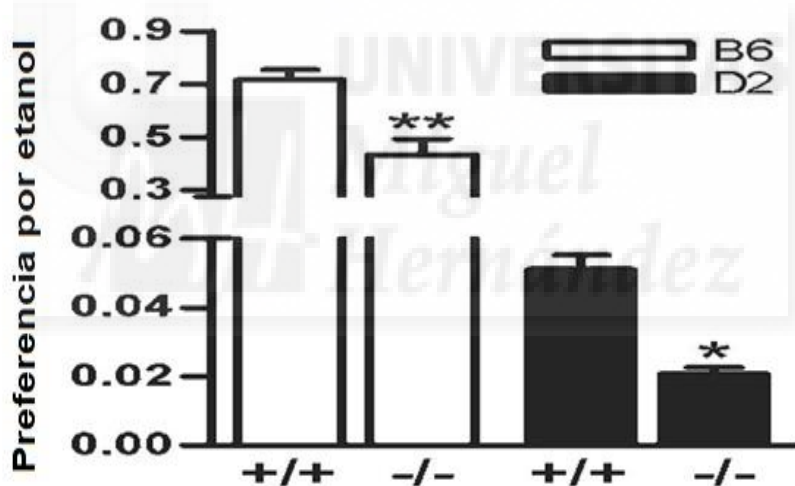


### 5.1.1. Estudios de manipulación genética del rCB<sub>1</sub> en modelos animales

Las observaciones mencionadas anteriormente sobre las modificaciones en los elementos del sistema endocannabinoide tras el consumo de alcohol y la relación de dichas modificaciones con las diferencias de conducta entre distintas cepas, incentivan el posterior desarrollo de estudios de modelos animales modificados genéticamente con el fin de contrastar las diferencias entre ratones a los que se les elimina el rCB<sub>1</sub> (CB<sub>1</sub>KO) y ratones salvajes o controles (WT, del inglés *wild type*), sin modificación genética. Todo ello con el fin de examinar si las diferencias predeterminadas en la función del rCB<sub>1</sub> del cerebro podrían explicar los cambios en las consecuencias conductuales del consumo de alcohol. Este tipo de ensayos de modificación genética se realizó en las cepas C57BL/6J (B6) y DBA/2J (D2). Se cuantificó la preferencia (consumo voluntario) por el consumo de alcohol en ambas, mediante el test de

elección de las dos botellas. Con este paradigma el roedor puede elegir, tras una fase de habituación, entre dos biberones volumétricos (uno contiene agua y el otro etanol diluido), que permiten medir la cantidad exacta de líquido ingerido. Los resultados permiten observar que la preferencia por el etanol de los ratones B6 CB<sub>1</sub>KO (-/-) fue significativamente menor que la de los B6 WT (+/+), con una P<0.001. También la preferencia por el etanol de D2 CB<sub>1</sub>KO (-/-) fue menor que sus respectivos tipo WT (+/+) (P<0.05). A su vez, como se aprecia en la *Figura 6*, los ratones B6 presentan mayor preferencia que los D2 (0,7 vs 0,04 entre los ratones WT, y 0,5 vs 0,02 en los animales KO) y esto, además, corrobora las observaciones anteriores sobre las diferencias en la preferencia por el consumo de alcohol determinadas por factores genéticos.

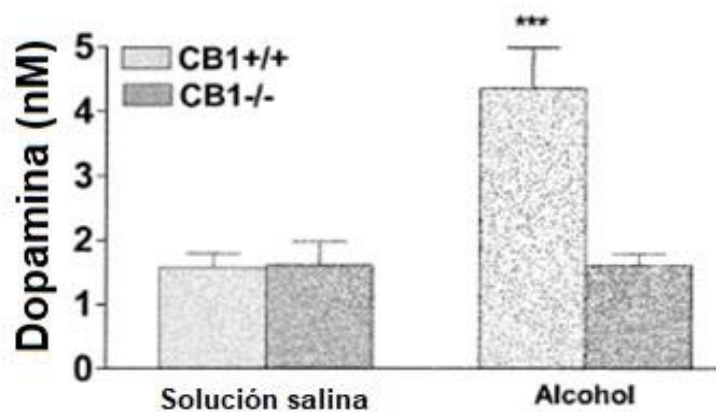
*Figura 6. Representación de la preferencia por el etanol de las cepas B6 y D2 (KO y WT) Imagen extraída de "Vinoid y cols" <sup>35</sup>*



Además, en otro estudio en el que se empleó la técnica de microdiálisis que permite medir diferentes neurotransmisores y metabolitos en líquido cefalorraquídeo y diferentes regiones cerebrales, se evidenció una reducción en la liberación de dopamina inducida por etanol en el NAc de ratones CB<sub>1</sub>KO (*Figura 7*). Esta reducción en la actividad dopaminérgica tras la administración de etanol corrobora las demostraciones anteriores en las que se observa la participación del rCB<sub>1</sub> en la regulación del sistema de recompensa mesolímbico-mesocortical. Asimismo, se puede afirmar que esta liberación de dopamina está parcialmente asociada al efecto positivo de refuerzo del alcohol,

ya que también se observan diferencias en la liberación de DA entre las cepas B6 y D2, siendo mayor en el primer caso.

Figura 7. Comparación del efecto de la administración aguda de etanol en roedores WT (+/+) y KO (-/-) sobre la liberación de dopamina dependiente de rCB<sub>1</sub> en NAc. Imagen extraída de "Hundung y cols." <sup>32</sup>



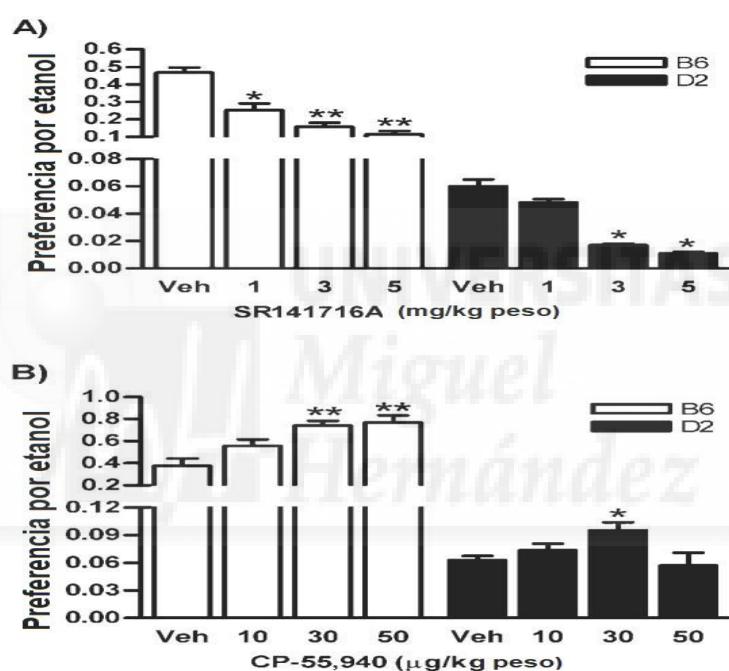
### 5.1.2. Estudios de modulación farmacológica del rCB<sub>1</sub> en modelos animales

Los estudios de manipulación genética en modelos animales apoyan la idea de que el rCB<sub>1</sub> forma parte de la regulación del sistema de recompensa. Dicho receptor participa en la liberación de dopamina estimulada por etanol en el NAc, relacionada con la preferencia por el consumo de alcohol. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el rCB<sub>1</sub> resulta una diana farmacológica interesante para el tratamiento del TUA y que su modulación con antagonistas puede reducir el consumo de alcohol.

Empleando las mismas cepas mencionadas anteriormente (C57BL/6J (B6) y DBA/2J (D2)) se llevó a cabo un primer ensayo utilizando el test de elección de las dos botellas. Las cepas fueron tratadas farmacológicamente con dosis agudas del antagonista de la función del rCB<sub>1</sub>, **SR141716A** (10, 20 y 50 microgramos/kg; intraperitoneal (i.p.)), que condujeron a una reducción significativa de la preferencia voluntaria de etanol (12% v/v) en ratones. Por el contrario, cuando se administran agonistas del rCB<sub>1</sub> como **CP-55,940** y **WIN 55,212-2** (1, 3 y 5 mg/kg; i.p.), la preferencia por el etanol aumentó. Tanto la disminución como el aumento de la preferencia por el consumo de etanol fue

más notable en la cepa B6 que en D2, como se puede observar en la *Figura 8*. Este resultado ratifica las observaciones anteriores que afirman que las cepas que presentan mayor preferencia y consumo de etanol (en este caso B6) disponen de menor cantidad de rCB<sub>1</sub> resultando, a su vez, más sensibles a los ligandos. Por otro lado, otro estudio demostró que el pretratamiento con el antagonista **SR141716A** inhibe la liberación de dopamina en ratones B6. <sup>32, 33</sup>

*Figura 8. Representación de la preferencia voluntaria por el consumo de etanol en las cepas B6 y D2, en comparación al grupo control (vehículo), cuando se administra el agonista SR141716A (A) y el antagonista CP-55,940 (B). Imagen extraída de “Vinoid y cols.” <sup>35</sup>*



Por lo tanto, estos resultados sugieren que los antagonistas del rCB<sub>1</sub> presentan gran potencial terapéutico en el tratamiento del TUA, disminuyendo los efectos reforzantes del etanol. A partir de estos resultados, se realizaron ensayos más exhaustivos para comprobar la eficacia de varios antagonistas del rCB<sub>1</sub> en diferentes paradigmas de consumo de etanol y así, poder confirmar su utilidad para bloquear los efectos reforzantes de esta droga de abuso. El principal antagonista utilizado en ensayos preclínicos es el **SR141716A** (rimonabant), no obstante existen otros tantos antagonistas que muestran resultados similares en ciertas condiciones de estudio. <sup>34, 35</sup>

Los ensayos llevados a cabo para estudiar la eficacia de rimonabant se realizaron en varias cepas de roedores. El primero de ellos fue en ratas Long Evans, con las que se midió la motivación mediante el paradigma de autoadministración operante oral de etanol. Este test sirve para medir la cantidad de veces que el roedor acciona una palanca para conseguir la liberación de una sustancia reforzante, en este caso etanol. El tratamiento agudo de rimonabant con dosis de 0,3, 1 y 3 mg/kg (i.p.) disminuyó las respuestas (accionamiento de una palanca) necesarias para el acceso a la droga, así como la cantidad de etanol consumido cuando finalmente estuvo disponible. Sin embargo, cuando se reprodujo el mismo experimento con sacarosa en lugar de etanol, no se observaron diferencias significativas lo que indicaba un efecto específico del rimonabant sobre los efectos reforzantes y motivaciones del etanol. Por lo tanto, la investigación de rimonabant sobre las propiedades motivacionales del alcohol continuó en otros modelos experimentales.<sup>36</sup>

En ratas Wistar, se observa una reducción del consumo voluntario (test de las dos botellas) utilizando dosis agudas de entre 0,3 y 3 mg/kg (i.p.). Por el contrario, cuando se administra de forma crónica rimonabant 10 mg/kg (i.p.) a estas mismas ratas durante una serie de exposiciones forzadas al etanol (por ejemplo, la inhalación de vapores de etanol) la ingesta diaria de alcohol aumenta. Esto sugiere que la historia previa de exposición al alcohol puede influir sobre el efecto de rimonabant. (o incluso sobre la dosis que lo produce).<sup>37</sup>

También se llevaron a cabo ensayos en cepas con elevada preferencia y consumo de alcohol como las sP (*Sardinian alcohol-preferring*), msP (*Marchigian Sardinian alcohol-preferring*), AA (*Alcohol preferring*), *Warsaw High-Preferring line of rats* y C57BL6/J. Se midió el efecto de rimonabant sobre las propiedades de refuerzo y motivación, así como sobre el consumo voluntario de alcohol, empleando los paradigmas de la auto-administración oral de etanol y la prueba de las dos botellas, respectivamente. A cada cepa o especie se le administró diferentes dosis, mientras que la vía de administración fue intraperitoneal en todas ellas. En general, se observa en todos los grupos una disminución de la preferencia y autoadministración del consumo de etanol.

Cabe destacar que, en el caso de la cepa AA, la microinyección de **SR141716A** en el córtex prefrontal medial redujo la auto-administración de etanol, mientras que las microinyecciones en el cuerpo estriado dorsal no cambiaron el número de respuestas (y, por lo tanto, de refuerzos conseguidos). Estos resultados revelaron la especificidad funcional del receptor dependiendo de su localización en diferentes regiones cerebrales.<sup>38-42</sup>

Asimismo, se observa actividad inhibitoria y efectividad similares después de la administración de otros antagonistas CB<sub>1</sub>. Por ejemplo, en ratas Wistar se prueba el efecto de varios antagonistas: la administración intraperitoneal aguda de **LH-21** (10 mg/kg) redujo la autoadministración de etanol un 30%, las dosis comprendidas entre 1 y 10 mg/kg del compuesto **SVL330**, vía oral, atenuaron los impulsos por la autoadministración de la droga. Las dosis de 0,3, 1 y 10 mg/kg/día (i.p.) del antagonista **SR147778** (surinabant) redujeron la preferencia durante el cese de intoxicación de etanol durante 30 días, pero no cuando se administró conjuntamente con etanol y, el antagonista dual del rCB<sub>1</sub> y agonista de PPAR $\alpha$  (receptor alfa activado por proliferación de peroxisomas), **OLHHA**, con dosis de entre 0,01 y 1,5 mg/kg (i.p.) redujo de forma transitoria la ingesta de alcohol de un 60% en las tres primeras horas, hasta desaparecer el efecto a las 24 horas. Por otro lado, en ratones NIH suizos, se administraron los análogos 27 y 30 de un metabolito monohidroxilado del cannabinoide sintético **JWH-073** y se observa una disminución de la autoadministración y del CPL (Condicionamiento de Preferencia de Lugar) inducido por alcohol. Este paradigma permite evaluar las propiedades reforzantes de una droga de abuso cuando se asocian a un contexto determinado, midiendo las respuestas de acercamiento al ambiente donde ha ocurrido un evento reforzante (compartimento en el que se administró la droga).<sup>43-47</sup>

### 5.1.3. Ensayos clínicos con rimonabant en pacientes con TUA

Todos estos ensayos preclínicos descritos anteriormente proporcionaron gran cantidad de resultados prometedores sugiriendo el uso potencial de los antagonistas del rCB<sub>1</sub> en el TUA, en concreto, del rimonabant. En un estudio



bioquímico y fisiológico se demuestra que rimonabant presenta 1.000 veces más afinidad por el rCB<sub>1</sub> que por el rCB<sub>2</sub>, además de carecer de afinidad por el resto de receptores del organismo. Los estudios sugieren que también tiene efecto sobre el control de factores de riesgo cardiovasculares como la obesidad, el síndrome metabólico y la dependencia al tabaco.

Desafortunadamente, la respuesta de los pacientes con TUA en el tratamiento con rimonabant no resultó ser tan beneficiosa. En un ensayo clínico, Fase II y doble ciego se comprobó la eficacia de rimonabant (20 mg/día) frente a la prevención de recaídas en pacientes con TUA en periodo de desintoxicación, pero los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de recaída entre el fármaco y el placebo (41,5% y 47,7%, respectivamente). Otro ensayo se llevó a cabo en pacientes bebedores que no buscan tratamiento (*heavy drinkers*). En dicho ensayo la dosis de rimonabant fue también de 20 mg/día, aplicada a lo largo de tres semanas, sin obtener, tampoco, respuesta al tratamiento.<sup>48</sup>

Se consideraron varios aspectos ante esta falta de eficacia, como una administración incorrecta y un número reducido de sujetos clínicos. Sin embargo, considerando un estudio analítico de naltrexona, utilizada con dosis de 50-150 mg/día, en el que sí se redujo significativamente el consumo de alcohol y teniendo en cuenta que tanto los cannabinoides como la naltrexona son inhibidores del sistema de recompensa dependiente de dopamina; se ha sugerido que la dosis de rimonabant de 20 mg/día sólo bloquea de forma parcial el rCB<sub>1</sub>. En contraste, las dosis más altas utilizadas en estudios con animales (3-10 mg/kg), que resultaron en una ingesta reducida de alcohol, causaron una ocupación casi completa del receptor. Por lo tanto, se sugirió que para disminuir significativamente la motivación del consumo de alcohol es necesario el bloqueo completo de la señalización asociada con el sistema de recompensa por péptidos opioides o endocannabinoides. Esta limitación también puede ser la razón principal de la efectividad diferencial de naltrexona y rimonabant para reducir la ingesta de alcohol, incluso cuando se prueba en el mismo paradigma de consumo en el laboratorio.<sup>49-51</sup>

De forma paralela, cabe destacar que el rimonabant llegó a comercializarse para el tratamiento de la obesidad, ya que otra de sus propiedades es la regulación del apetito. Es en este punto cuando se observó, a largo plazo, que el rimonabant provocaba efectos secundarios potencialmente graves en tales como los trastornos psiquiátricos, y de forma más concreta depresión, intento de suicidio y suicidio consumado. En el ámbito de ensayos clínicos se presentaron cinco casos de suicidio en pacientes que recibían rimonabant (Acomplia®), frente a un caso en un paciente recibiendo placebo, dichos ensayos con un número similar de pacientes expuestos en ambos grupos de tratamiento. Tras estos desafortunados resultados, Acomplia® fue retirado del mercado en el año 2008 y, por lo tanto, también se suspendieron los ensayos con rimonabant para el tratamiento del TUA.<sup>52, 53</sup>

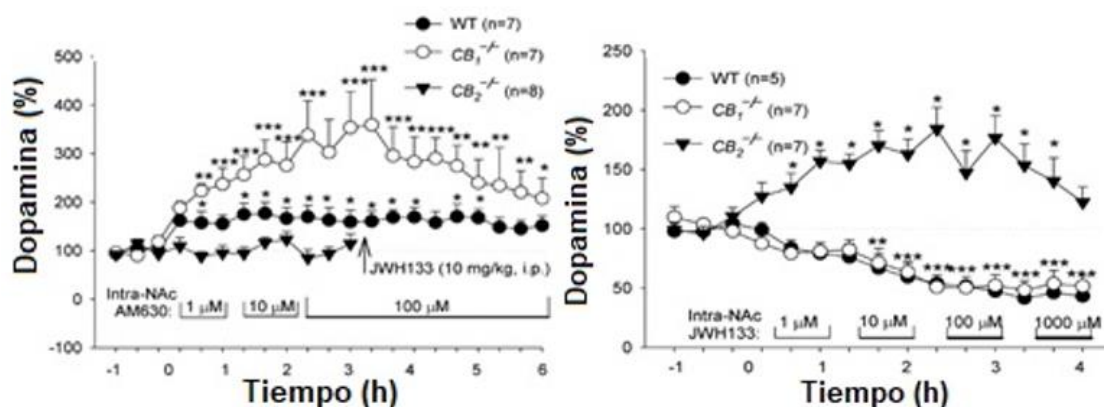
## **5.2. Implicación del rCB<sub>2</sub> en los efectos reforzantes del alcohol**

Desde que en 2005, el equipo de van Sickle y colaboradores describieran por primera vez la presencia del rCB<sub>2</sub> en el tronco cerebral de roedores, gran cantidad de investigaciones se han centrado en el estudio de la función de este receptor en el sistema nervioso central y periférico. De hecho, más adelante se demuestra mediante múltiples técnicas como *RNAscope In situ Hybridization (ISH)*, *real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)* y ensayos de Inmunohistoquímica (IHC), que el ARNm del gen CB<sub>2</sub> se expresa en neuronas VTA dopaminérgicas (VTA-DA), en el NAc, la amígdala (AMY), el hipocampo y la corteza prefrontal de roedores, principalmente en elementos post-sinápticos de los circuitos neuronales. La localización del receptor en elementos pertenecientes al sistema de recompensa mesolímbico-mesocortical, como son el VTA, el NAc y la corteza prefrontal, promueve el desarrollo de estudios que faciliten la comprensión de las funciones que este receptor puede poseer en la neurobiología de los Trastornos por Uso de Sustancias (TUS), y la posible modulación de los efectos de refuerzo y motivación.<sup>54</sup>

La excitabilidad de VTA-DA está asociada al consumo de sustancias de abuso. Para determinar si los rCB<sub>2</sub> expresados en las neuronas VTA-DA son funcionales, se utilizan métodos electrofisiológicos para estudiar la respuesta

de estas neuronas a los ligandos selectivos del rCB<sub>2</sub>. Cuando se administran dosis intracerebrales (intraNAc e intraVTA) de entre 1 y 1000  $\mu$ M del agonista del rCB<sub>2</sub> (**JWH133**), se inhibe significativamente la activación neuronal de VTA-DA, la cual produce una hiperpolarización de manera dosis-dependiente en roedores y, por lo tanto, una disminución de liberación de DA en WT y CB<sub>1</sub>KO (-/-), pero no en CB<sub>2</sub>KO (-/-) (véase *Figura 9*). También se observa que esta disminución de DA por **JWH133** intraNAc e intraVTA está asociada, a su vez, con una disminución significativa de la tendencia al consumo de cocaína. Este efecto fue imitado por **GW405833** (otro agonista selectivo del rCB<sub>2</sub> con una estructura química diferente) y revertido en ratones con dosis de 1, 10 y 100  $\mu$ M (intraNAc) del antagonista del rCB<sub>2</sub> (**AM630**), pero no con **AM251** (antagonista selectivo del rCB<sub>1</sub>). Sin embargo, se observan diferencias entre ratas y ratones cuando la administración de **JWH133** (3, 10 y 20 mg/kg) y **AM630** (10 mg/kg) es sistémica (intraperitoneal), ya que sólo se observan modificaciones de la liberación de DA y, por tanto, en la disminución del consumo de cocaína, en ratones. Estos hallazgos sugieren que los datos de unión y eficacia de ligando no pueden extrapolarse de una especie a otra y que, por lo tanto, se puede requerir agonistas o antagonistas del rCB<sub>2</sub> específicos de especie. En general, todos estos resultados proporcionan evidencia sobre la expresión de los rCB<sub>2</sub> en las neuronas VTA-DA y su papel regulador sobre la neurotransmisión dopaminérgica implicada en los sistemas de recompensa de las drogas de abuso. 55-57

*Figura 9. Porcentaje de dopamina liberado en roedores WT, CB1KO (-/-) y CB2KO (-/-) cuando la administración del antagonista (AM630) y el agonista (JWH133) es vía intracerebral (intraNAc). Imagen extraída de "Xi y cols" 56*



Por otro lado, en el año 2007, se prueba la hipótesis de que las variantes del gen CB<sub>2</sub> pueden tener efectos significativos y asociados al alcoholismo. La identificación de un polimorfismo, que predice una sustitución de glutamina (Q) por arginina (R) en la posición 63 (Q63R) en este gen, produce una mutación en el primer dominio intracelular, provocando una disminución de la respuesta celular a ligandos del rCB<sub>2</sub>. Se observan diferencias significativas a causa de este polimorfismo entre los casos y controles de una cohorte de pacientes japoneses con TUA, asociándose a una mayor vulnerabilidad por el desarrollo de este trastorno. Este hallazgo proporcionó evidencia de que la propensión genética hacia una alta preferencia y motivación por el consumo de alcohol está asociada con cambios en la función del sistema endocannabinoide. De hecho, los ratones que desarrollaron una preferencia por el etanol redujeron los niveles de expresión del rCB<sub>2</sub> en la región ventral del cerebro medio en comparación con los ratones que no. La regulación negativa del gen rCB<sub>2</sub> parece estar relacionada con el refuerzo del alcohol en estas regiones cerebrales. En humanos, los estudios de expresión génica en tejido cerebral post mortem de pacientes alcohólicos también revelaron una reducción significativa del rCB<sub>2</sub> en la corteza prefrontal dorsolateral y NAc. Por el contrario, los rCB<sub>2</sub> se encuentran sobreexpresados en ratones que presentan comportamiento ansiosos y reacciones al estrés modificadas, lo cual sugiere una estrecha relación entre la exposición a los diferentes factores ambientales y el comportamiento adictivo. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la señalización del rCB<sub>2</sub> en las neuronas dopaminérgicas mesocorticolímbicas puede ser esencial para contrarrestar las propiedades reforzantes del etanol.<sup>58-</sup>

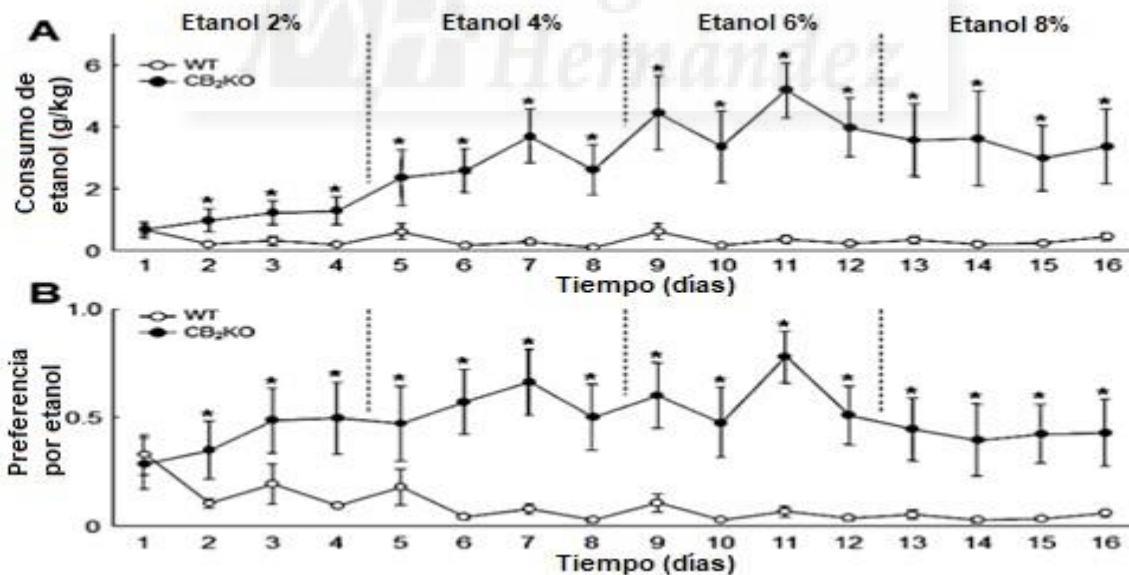
60

### **5.2.1. Estudios de manipulación genética del rCB<sub>2</sub> en modelos animales**

Otra de las aproximaciones empleadas para profundizar en el papel que desempeña el rCB<sub>2</sub> en la regulación de las propiedades reforzantes del alcohol, es el empleo de animales modificados genéticamente. Por lo tanto, se cuantificó el rol del rCB<sub>2</sub> en las acciones fisiológicas y reforzantes del etanol mediante varios ensayos sobre cepas cruzadas entre C57BL/6J que presentan elevada preferencia y consumo de alcohol y CD1, que no. El objetivo de este

cruce fue descartar que los resultados se debieran simplemente a la alta o baja vulnerabilidad al etanol de los ratones WT de cada cepa. Para ello se compara, con el sistema de dos botellas, la preferencia por el consumo de etanol en ratones WT y ratones rCB<sub>2</sub>KO, observando que la ausencia de este receptor se relaciona con un mayor consumo de etanol dosis-dependiente, así como una mayor motivación por la adquisición de esta droga con la prueba de auto-administración oral de etanol (véase *Figura 10*). Otro estudio realizado con ratones Swiss ICR CB<sub>2</sub>KO, muestra cómo la ausencia del rCB<sub>2</sub> se relaciona con una mayor preferencia por el compartimento condicionado en la prueba de CPL. Cabe destacar que estos hallazgos no son consecuencia de posibles alteraciones en la metabolización periférica del etanol, ya que no se encuentran diferencias de su concentración plasmática entre los ratones CB<sub>2</sub>KO y su correspondiente grupo control.

*Figura 10. Efecto de la manipulación genética sobre el consumo voluntario de etanol en KO y WT (P<0.05). El consumo fue calculado como g de etanol/kg peso/día y la preferencia como: consumo de etanol/consumo etanol + consumo agua. Imagen extraída de "Ortega-Álvaro y cols." 61*



También se ha descrito una regulación positiva del gen TH en el VTA bajo la administración aguda y crónica de etanol que muestra patrones diferentes en ratones CB<sub>2</sub>KO con respecto a los WT, presentando mayor expresión los ratones desprovistos del rCB<sub>2</sub>. El gen TH es el encargado de codificar la enzima Tirosina Hidroxilasa, la cual cataliza la conversión del

aminoácido L-tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA), precursor de la dopamina. Por otro lado, los análisis de expresión génica mostraron que basalmente los ratones CB<sub>2</sub>KO presentaron mayor expresión del receptor mu-opioide en el NAc en comparación con su grupo control (WT). Todos estos resultados sugieren que el genotipo resulta ser el factor determinante y que, por lo tanto, la eliminación del gen CB<sub>2</sub> aumenta la preferencia y vulnerabilidad de consumo de alcohol.<sup>61</sup>

### 5.2.2. Estudios de modulación farmacológica del rCB<sub>2</sub> en modelos animales

Con las observaciones recogidas sobre la manipulación genética del rCB<sub>2</sub> se plantea la posibilidad de que el agonismo de la función de este receptor pudiese disminuir el refuerzo y la motivación por el consumo de alcohol. En 2007 se lleva a cabo un primer ensayo de modulación farmacológica de este receptor, empleando un modelo de consumo voluntario de alcohol con el sistema de las dos botellas. En otro estudio, se evaluó el efecto de la administración sistémica del agonista rCB<sub>2</sub> (**JWH015**, 20 mg/kg; i.p.) en ratones BALB/c, observando un aumento del consumo de alcohol en aquellos que fueron expuestos a un modelo de *estrés crónico leve* (ECL), pero no en aquellos ratones no estresados. De forma paralela, también se evaluó el efecto de la administración del antagonista del rCB<sub>2</sub> (**AM630**, 3 mg/kg; i.p.), aunque los resultados no mostraron ninguna modificación sobre el consumo de etanol en ninguno de los dos grupos evaluados. Por lo tanto, estos resultados sugieren una estrecha relación entre estados de estrés y consumo de alcohol.<sup>62</sup>

En otro estudio, se evaluó el comportamiento relacionado con la recompensa del etanol en la cepa de ratón HAP2, utilizando el agonista **JWH133** (10 y 20 mg/kg) y el antagonista **AM630** (10 y 20 mg/kg). Sin embargo, desde el punto de vista farmacológico no se observó ningún efecto sobre el consumo de alcohol ni sobre el condicionamiento de preferencia de lugar. Aunque los niveles de alcohol consumidos en general fuesen bajos, no impidieron la capacidad de detectar el efecto, ya que se pudo demostrar que

rimonabant redujo significativamente la ingesta de etanol el día de la prueba ( $P < 0.001$ ). Se aprecia, sin embargo, una reducción de la ingesta entre sujetos de grupos con la dosis de 10 y 20 mg/kg de **JWH133**, respecto al vehículo, lo cual se puede deber a los efectos estresantes de la manipulación del animal para la inyección del agonista. En este mismo estudio, se llevó a cabo una réplica de este ensayo en ratones C57BL/6, donde sí que se aprecia efecto del agonista y antagonista en el consumo de alcohol, pero no en el condicionamiento de preferencia de lugar.<sup>63</sup>

Sin embargo, más adelante, se llevó a cabo la modulación farmacológica de los rCB<sub>2</sub> con el agonista completo,  **$\beta$ -cariofileno (BCP)**, en ratones machos C57BL/6. Los resultados demostraron por primera vez que la activación farmacológica del rCB<sub>2</sub> usando **BCP** se acompañaba de una disminución en el consumo y preferencia por el etanol en la prueba de consumo voluntario, inversamente proporcional a las concentraciones de etanol (2.5, 5, 10 y 20% de etanol), así como en la preferencia de lugar condicionada en comparación con el grupo control (vehículo) como se puede apreciar en la *Figura 11*. Las dosis administradas fueron de 25, 50 y 100 mg/kg (i.p.), sin embargo, la disminución del consumo preferente de alcohol es estadísticamente significativa a partir de los 50 mg/kg (*Figura 12*), es dosis-dependiente y no muestra tolerancia por la administración crónica. En este caso, las diferencias en el consumo y preferencia de alcohol tampoco se deben a una modificación en el metabolismo de alcohol. Además, los efectos de **BCP** (50 mg/kg) fueron revertidos en ratones con el pretratamiento de 3 mg/kg de **AM630**, hecho que sugería que el efecto estaba específicamente mediado por rCB<sub>2</sub><sup>64</sup>.

Figura 11. Efecto de BCP (50 mg/kg) en el consumo de etanol (A), la preferencia (B) y el promedio de consumo total de fluidos (agua + etanol). El consumo fue calculado como gramos de etanol consumidos/kg de peso corporal y la preferencia como consumo de etanol/consumo fluidos totales. Imagen extraída de “Al Mansouri y cols.”<sup>64</sup>

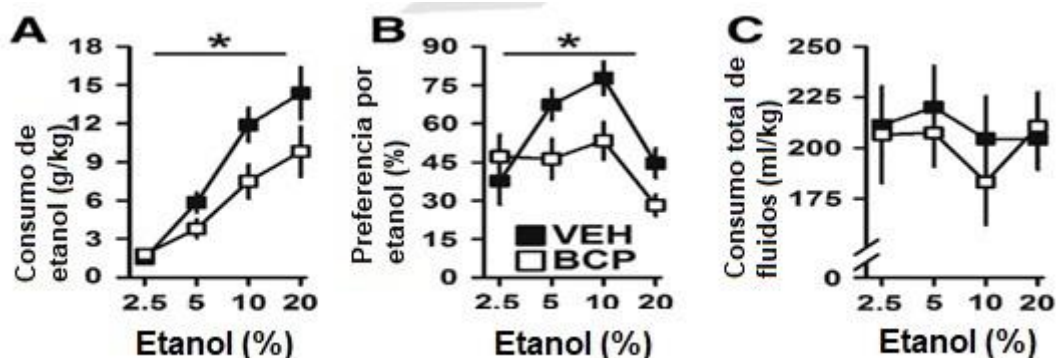
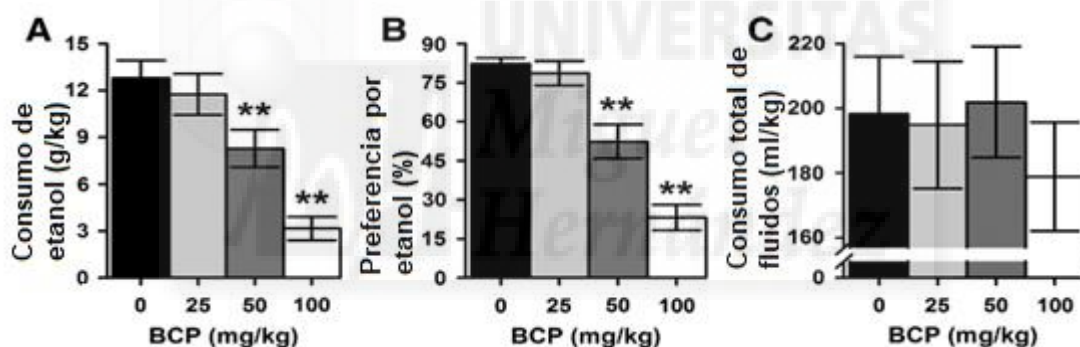


Figura 12. Efecto de BCP (25, 50 y 100 mg/kg) sobre el consumo y la preferencia de etanol (10%). El consumo y la preferencia fueron calculados de igual forma que la Figura 11. Imagen extraída de “Al Mansouri y cols.”<sup>64</sup>

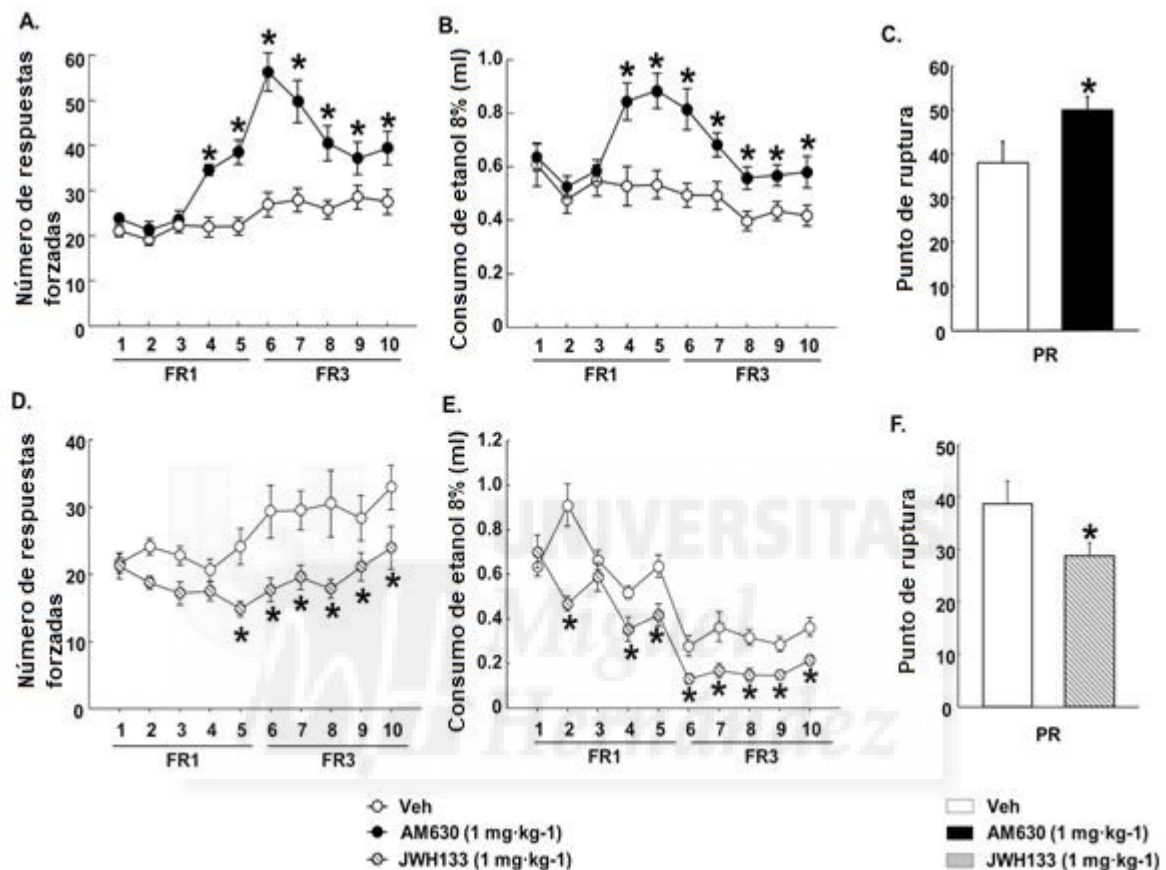


De igual forma, se evidenció con otro ensayo que la administración de **JWH133** (5 mg/kg; i.p.) bloqueó totalmente la preferencia de lugar inducida por la administración de alcohol. Estos resultados están apoyados por otros ensayos recientes que demuestran que la actividad agonista (**JWH133**, 1 mg/kg; i.p.) disminuye la motivación y consumo de etanol, y aumenta con el antagonista **AM630** (1 mg/kg; i.p.) cuando se administran en ratones C57B6/6J. Para ello se cuantificó el número de veces que el roedor accionaba la palanca para conseguir la droga, el consumo de etanol una vez adquirida y el promedio de punto de ruptura (secuencia de número de veces que el animal debe accionar la palanca para la adquisición de la droga) como se puede apreciar en la *Figura 13*. Esto se lleva a cabo mediante varios programas de refuerzo (FR1,



FR3 y PR), cada uno determinado por un número concreto de acciones a la palanca necesarias para el acceso al refuerzo (etanol).<sup>65</sup>

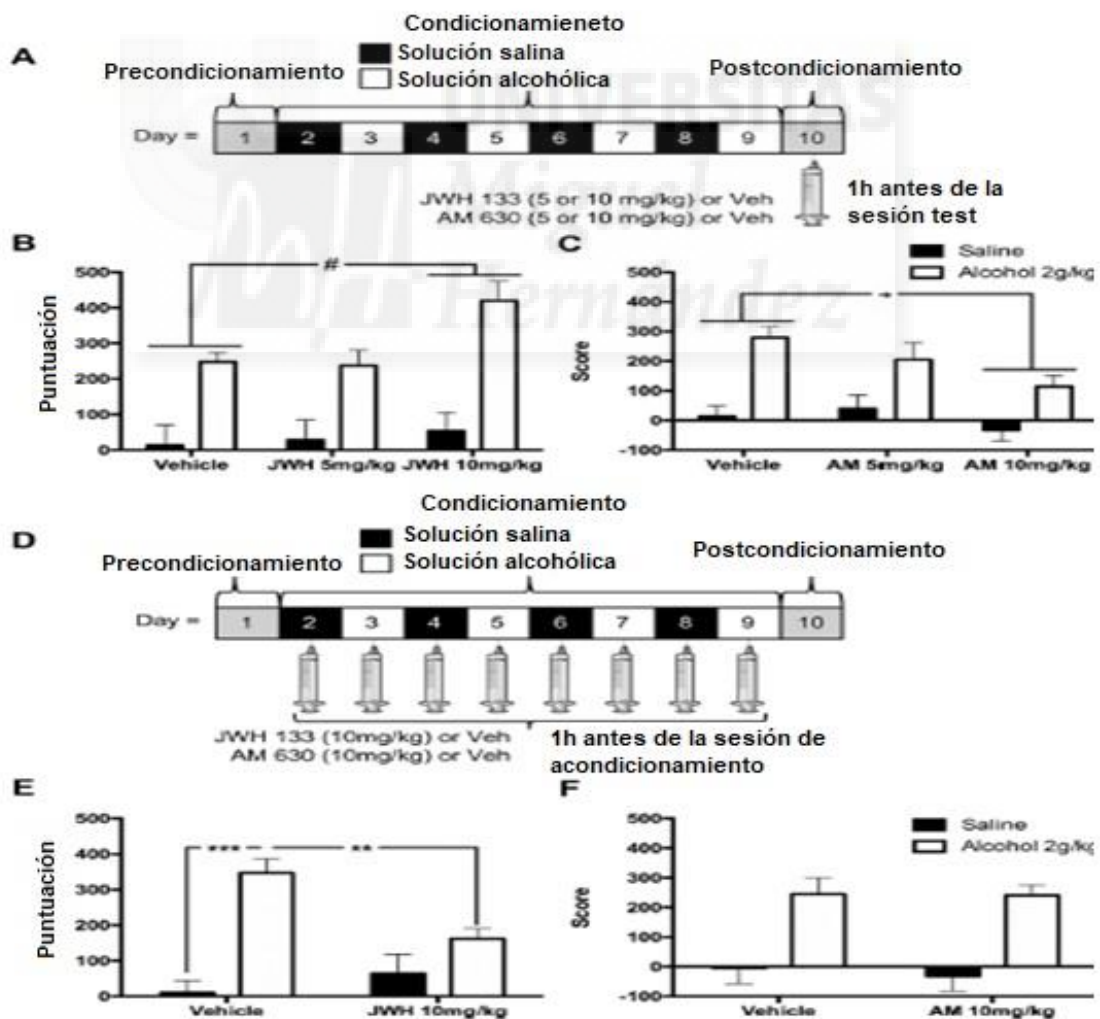
Figura 13. Efecto de la administración de AM630 (A, B, C) y JWH133 (D, E, F) sobre la motivación por el consumo de alcohol. Figura extraída de “Navarrete y cols.”<sup>65</sup>



En julio de 2019 se publicó un estudio donde se observa que los efectos del agonista **JWH133** y el antagonista **AM630** dependen del momento en que se administre durante el proceso de aprendizaje en el paradigma CPL. En el caso de **JWH133**, los efectos gratificantes del etanol no mejoran si su administración se produce en el día que se evalúa la preferencia por el comportamiento condicionado, aunque existe una tendencia hacia la diferencia significativa cuando la dosis es de 10 mg/kg (i.p.) (ver *Figura 14*, paneles A, B y C). Sin embargo, cuando la administración ocurre repetidamente una hora antes de las sesiones de condicionamiento a etanol, se observa una disminución del tiempo pasado en el comportamiento condicionado a etanol

con el **JWH133** (ver *Figura 14*, paneles D, E y F). Por el contrario, con 10 mg/kg (i.p.) de **AM630** se aprecia una disminución del tiempo pasado en el comportamiento condicionado si su administración se produce el día de evaluación del condicionamiento, mientras que no cuando se realiza durante las sesiones de condicionamiento. Estas diferencias dependientes del momento de la administración del fármaco sugieren que la manipulación farmacológica, con agonistas y antagonistas, del rCB<sub>2</sub> podría modular tanto la adquisición como la expresión de CPL incluso de forma opuesta <sup>66</sup>.

*Figura 14. Efecto de la administración de JWH133 y AM630 el día que se evalúa la preferencia por el comportamiento condicionado (A, B y C) y cuando se administra repetidamente una hora antes de las sesiones de condicionamiento a etanol (D, E y F). Imagen extraída de "Martín-Sánchez y cols" <sup>66</sup>*



Todos estos hallazgos resultan coherentes con los observados en ratones modificados genéticamente (CB<sub>2</sub>KO). La estimulación del rCB<sub>2</sub> con agonistas parece ser una posible vía para la disminución de los efectos reforzantes del alcohol y, por lo tanto, resulta factible su consideración como posible candidato para el desarrollo farmacológico terapéutico del TUA. Por otro lado, las discrepancias sobre los efectos de la regulación farmacológica del rCB<sub>2</sub> sobre la preferencia y motivación por el consumo de alcohol, observadas anteriormente en distintos ensayos con animales, se atribuyen a diversas circunstancias experimentales como: el empleo de diferentes cepas de ratón, el uso de distintos paradigmas experimentales, dosis de fármaco administradas, vías de administración e incluso pautas empleadas.



## 6. DISCUSIÓN

Los resultados recopilados corroboran la participación del sistema endocannabinoide en la regulación del sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico-mesocortical, común a todas las drogas de abuso incluido el alcohol. Esto favorece el estudio exhaustivo de los elementos que forman parte de este sistema para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que permitan mejorar el tratamiento farmacológico del TUA.

Por un lado, se observó tanto en modelos animales como en tejido post mórtem humano que, tras la exposición aguda y crónica de alcohol, se produce una disminución de la densidad y funcionalidad del rCB<sub>1</sub> en el NAc. Esto lleva al planteamiento posterior de estudios de manipulación genética con el fin de comprobar la implicación del rCB<sub>1</sub> en los efectos reforzantes y motivacionales del alcohol. Cuando se elimina dicho receptor en roedores (CB<sub>1</sub>KO), disminuye la liberación de dopamina asociada al refuerzo positivo del consumo. Este efecto se ve replicado cuando se administra un antagonista/agonista inverso del receptor CB<sub>1</sub>, siendo el SR141716A (rimonabant) el fármaco más empleado en este tipo de ensayos. El hecho de que se observen efectos contrarios sobre el refuerzo que produce el alcohol cuando se administra una agonista (CP-55,940 o WIN-55,221) o a un antagonista (rimonabant) del rCB<sub>1</sub> en ratones, revela la implicación directa de este receptor reflejada en el comportamiento de preferencia o aversión por el consumo de alcohol en roedores respectivamente. De forma conjunta, estos datos sugieren que la eliminación genética o el bloqueo farmacológico del rCB<sub>1</sub> reduce las propiedades reforzantes del alcohol.

Después de la gran cantidad de estudios con modelos animales en diversos paradigmas experimentales, resulta acertado llevar a cabo ensayos clínicos en pacientes con TUA para valorar la eficacia del rimonabant en el periodo de deshabitación. Desafortunadamente, estos ensayos no mostraron resultados favorables respecto a la eficacia del fármaco y, aunque el número de ensayos fue escaso (solo 2), se abandonó esta estrategia terapéutica a causa de la aparición de efectos adversos graves cuando el rimonabant (Acomplia®) fue empleado para el tratamiento de la obesidad.

A pesar de renunciar al empleo de antagonistas del rCB<sub>1</sub> para el tratamiento farmacológico del TUA por los motivos mencionados anteriormente, también se consideró al rCB<sub>2</sub> como una nueva diana terapéutica tras estudiar su implicación funcional en los efectos de drogas de abuso como el alcohol. El descubrimiento de la presencia del rCB<sub>2</sub> en áreas cerebrales que forman parte del sistema de recompensa, su implicación en la liberación de dopamina en el NAc, y la disminución de la expresión de este receptor en ratones (con preferencia elevada por el consumo de etanol), sustentan la hipótesis anterior. Por lo tanto, se optó por la manipulación genética y farmacológica del rCB<sub>2</sub> con el fin de conocer el papel que podría desempeñar en la regulación de diferentes rasgos conductuales relacionados con el proceso adictivo como el refuerzo, la motivación, la recaída, los efectos psicomotores y los síntomas asociados al síndrome de abstinencia.

En roedores carentes del rCB<sub>2</sub> (CB<sub>2</sub>KO) se observó una mayor vulnerabilidad por el consumo de alcohol que los WT, así como un aumento en la expresión basal de receptor mu ( $\mu$ )-opioide en el NAc y del gen TH bajo la administración aguda y crónica de etanol. De estos resultados se podría inferir que el rCB<sub>2</sub> normalmente inhibe la activación neuronal dopaminérgica en la vía mesolímbica resultando en una reducción de los efectos gratificantes asociados en respuesta al alcohol. Esta hipótesis adquirió más fuerza con la publicación de varios estudios que evaluaban de manera específica la modulación de la liberación de dopamina mediada por el rCB<sub>2</sub> mediante aproximaciones genéticas y farmacológicas. Por tanto, se sugirió que el uso de agonistas del receptor mencionado podría resultar adecuado para el tratamiento del TUA.

No obstante, existen discrepancias entre los resultados obtenidos sobre la modulación farmacológica del rCB<sub>2</sub>. Algunos ensayos con roedores afirman que el tratamiento con agonistas disminuye la motivación y consumo de etanol, mientras que los antagonistas producen el efecto contrario. Sin embargo, también existen ensayos en los que la administración de ambos no presenta efectos significativos, e incluso que la activación del rCB<sub>2</sub> puede producir efectos opuestos.

En conclusión, se puede recalcar que, a pesar de los avances logrados en los últimos años, todavía es necesario estudiar causas adicionales que ayuden a mejorar el conocimiento sobre la implicación del rCB<sub>2</sub> en el TUA. Por ejemplo, se conoce que dicho receptor está íntimamente ligado a la regulación del estrés y la ansiedad, factores que a su vez se correlacionan con una mayor tendencia a desarrollar TUA. Asimismo, se ha descrito que el efecto de la manipulación farmacológica del rCB<sub>2</sub>, con agonistas o antagonistas en modelos de consumo de alcohol estaría influido por la presencia de factores estresantes. Desde el punto de vista farmacológico, son necesarios los diseños que valoren mayores rangos de dosis, teniendo en cuenta que los efectos de los compuestos agonistas y antagonistas del rCB<sub>2</sub> disponibles actualmente pueden verse alterados dependiendo principalmente de la dosis que se administre, hecho que condiciona aspectos críticos como la selectividad, la afinidad o el tipo de efecto farmacológico. Además, sería interesante emplear otros paradigmas experimentales que evalúen el papel del rCB<sub>2</sub> de forma específica sobre rasgos asociados a la recaída, la abstinencia o la sensibilización psicomotora, dado que desde un punto de vista traslacional son aspectos clave en el tratamiento de deshabitación de un paciente con TUA. Otros aspectos interesantes que hasta el momento no se han explorado son: 1) el efecto dependiente del género, incluyendo para ello roedores hembras que tienen una mayor vulnerabilidad por el consumo de alcohol y que probablemente van a responder de forma diferente; 2) la administración concomitante de fármacos ya empleados en la clínica del TUA con el objetivo de evaluar posibles efectos sinérgicos; y 3) el diseño de moduladores alostéricos que permitan incrementar el efecto mediado por los ligandos cannabinoides endógenos, especialmente el 2-AG.

## 7. CONCLUSIONES

- Una de las limitaciones del tratamiento farmacológico disponible actualmente para el TUA es el considerado porcentaje de fracasos terapéuticos que presenta.
- El sistema endocannabinoide está totalmente involucrado en la regulación del sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico-mesocortical y, por lo tanto, su modulación farmacológica resulta prometedora en su futura aplicación en el tratamiento del TUA.
- La eliminación del receptor CB<sub>1</sub> (CB<sub>1</sub>KO) mediante manipulación genética y la modulación farmacológica del mismo con la administración de antagonistas reduce la preferencia y motivación por el consumo de etanol en roedores.
- El antagonista del receptor CB<sub>1</sub>, rimonabant, resulta ineficaz cuando se traslada a la práctica clínica en pacientes con TUA y, por lo tanto, se abandona esta estrategia terapéutica.
- El receptor CB<sub>2</sub> participa en la función reguladora del sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico-mesocortical, modulando la liberación de dopamina tras el consumo de alcohol.
- La eliminación del receptor CB<sub>2</sub>, mediante manipulación genética, produce un aumento de la liberación de dopamina tras el consumo de etanol y, en general, la activación del receptor CB<sub>2</sub> mediante el uso de agonistas reduce el consumo de etanol y la motivación por la adquisición de este en roedores.
- La modulación farmacológica del receptor CB<sub>2</sub> resulta prometedora para ser evaluada como posible estrategia terapéutica en el tratamiento de TUA. No obstante, es necesario llevar a cabo mayor cantidad y tipos de ensayos que esclarezcan el rol de dicho receptor en los efectos conductuales y neurobiológicos del alcohol.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. López, A., et al., *ORIGEN Y EVOLUCIÓN DEL TÉRMINO " ALCOHOL "*. Cuaderno de Economía, 2003: p. 81-84.
2. García Gutiérrez, E., et al., *Alcoholismo y sociedad, tendencias actuales*. Revista Cubana de Medicina Militar, 2004. **33**: p. 0-0.
3. *Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España (Resumen ejecutivo)*. 2018, Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Gobierno de España.
4. Parada, M., et al., *Definición del concepto de consumo intensivo de alcohol adolescente (binge drinking)*. 2011, 2011. **23**(1): p. 11.
5. Contreras, A., et al., *Age-Dependent Effects of Acute Alcohol Administration in the Hippocampal Phosphoproteome*. Chem Res Toxicol, 2017. **30**(12): p. 2165-2173.
6. Valero, M.J.R., *Abuso de drogas en adolescentes y jóvenes y vulnerabilidad familiar*. 2013, Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC).
7. *Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España 2018*, Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Gobierno de España.
8. *Global status report on alcohol and health 2018*. 2018, World Health Organization.
9. Association, A.P., *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* Vol. IV. 1952.
10. Association, A.P., *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Vol. V. 2013.
11. Heilig, M., et al., *Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(11): p. 670-84.
12. Saíz-Martínez P.A., G.-G.-P.M.P., Bobes-García, J., *Abordaje terapéutico de los alcoholismos* Trastornos Adictivos, 2000. **2** (3).
13. Marusi , S., V. Thaller, and N. Javornik, *Psicofarmacoterapia en el tratamiento de los trastornos relacionados con el alcohol*. The European journal of psychiatry (edición en español), 2004. **18**: p. 249-258.
14. Ponce, G., M. Jiménez-Arriero, and G. Rubio, *Tratamiento farmacológico de la dependencia alcohólica*. Trastornos Adictivos, 2003. **5**(1): p. 27-32.
15. Rosner, S., et al., *Acamprosate for alcohol dependence*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(9): p. Cd004332.
16. Walker, B.M. and G.F. Koob, *Pharmacological evidence for a motivational role of kappa-opioid systems in ethanol dependence*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(3): p. 643-52.
17. Miranda, C.P.J.J.F., *Manual de Adicciones pra Médicos especialistas en Formación*, ed. Socidroalcohol. 2018, Valencia.
18. Guglielmo, R., et al., *Topiramate in Alcohol Use Disorders: Review and Update*. CNS Drugs, 2015. **29**(5): p. 383-95.
19. Finney, J.W., A.C. Hahn, and R.H. Moos, *The effectiveness of inpatient and outpatient treatment for alcohol abuse: the need to focus on mediators and moderators of setting effects*. Addiction, 1996. **91**(12): p. 1773-96; discussion 1803-20.



20. Galiegue, S., et al., *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. Eur J Biochem, 1995. **232**(1): p. 54-61.
21. Ishac, E.J., et al., *Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves*. Br J Pharmacol, 1996. **118**(8): p. 2023-8.
22. Van Sickle, M.D., et al., *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors*. Science, 2005. **310**(5746): p. 329-32.
23. Arévalo-Martín. *Guía Básica sobre los Cannabinoides*. 2002; Available from:  
<http://www.pnsd.mscbs.gob.es/profesionales/publicaciones/catalogo/bibliotecaDigital/publicaciones/pdf/cannabinoides.pdf>.
24. Fezza, F., et al., *Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues*. FEBS Lett, 2002. **513**(2-3): p. 294-8.
25. Bisogno, T., et al., *Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(2): p. 377-80.
26. Wilson, R.I. and R.A. Nicoll, *Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses*. Nature, 2001. **410**(6828): p. 588-92.
27. León-Regal M, G.-O.L., León-Valdés A, de-Armas-García J, Urquiza-Hurtado A, Rodríguez-Caña G. , *Bases neurobiológicas de la adicción al alcohol*. Finlay, 2014. **4** (1).
28. Basavarajappa, B.S., T.B. Cooper, and B.L. Hungund, *Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane*. Brain Res, 1998. **793**(1-2): p. 212-8.
29. Pineda-Ortiz, J. and M. Torrecilla-Sesma, *Mecanismos neurobiológicos de la adicción a drogas*. Trastornos Adictivos, 1999. **1**(1): p. 13-21.
30. Pava, M.J. and J.J. Woodward, *A review of the interactions between alcohol and the endocannabinoid system: implications for alcohol dependence and future directions for research*. Alcohol, 2012. **46**(3): p. 185-204.
31. Basavarajappa, B.S., *Endocannabinoid System and Alcohol Abuse Disorders*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1162**: p. 89-127.
32. Hungund, B.L. and B.S. Basavarajappa, *Role of endocannabinoids and cannabinoid CB1 receptors in alcohol-related behaviors*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1025**: p. 515-27.
33. Henderson-Redmond, A.N., J. Guindon, and D.J. Morgan, *Roles for the endocannabinoid system in ethanol-motivated behavior*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2016. **65**: p. 330-9.
34. Javier Milara, M.B., Enrique Soler, Raúl Ferrando, *Rimonabant: una nueva perspectiva en el tratamiento de las conductas adictivas*. Revista Española de Drogodependencias, 2006. **31** (1): p. 67-68.
35. Vinod, K.Y., et al., *Genetic and pharmacological manipulations of the CB(1) receptor alter ethanol preference and dependence in ethanol preferring and nonpreferring mice*. Synapse, 2008. **62**(8): p. 574-81.

36. Freedland, C.S., et al., *Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration*. Alcohol Clin Exp Res, 2001. **25**(2): p. 277-82.
37. Colombo, G., et al., *The cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant, as a promising pharmacotherapy for alcohol dependence: preclinical evidence*. Mol Neurobiol, 2007. **36**(1): p. 102-12.
38. Hansson, A.C., et al., *Genetic impairment of frontocortical endocannabinoid degradation and high alcohol preference*. Neuropsychopharmacology, 2007. **32**(1): p. 117-26.
39. Cippitelli, A., et al., *Cannabinoid CB1 receptor antagonism reduces conditioned reinstatement of ethanol-seeking behavior in rats*. Eur J Neurosci, 2005. **21**(8): p. 2243-51.
40. Colombo, G., et al., *Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR-141716*. Alcohol Alcohol, 1998. **33**(2): p. 126-30.
41. Serra, S., et al., *Blockade by the cannabinoid CB(1) receptor antagonist, SR 141716, of alcohol deprivation effect in alcohol-preferring rats*. Eur J Pharmacol, 2002. **443**(1-3): p. 95-7.
42. Dyr, W., J. Ligieza, and W. Kostowski, *The effect of cannabinoid CB(1) receptor antagonist rimonabant (SR-141716) on ethanol drinking in high-preferring rats*. Alcohol, 2008. **42**(6): p. 509-12.
43. Pavon, F.J., et al., *Antiobesity effects of the novel in vivo neutral cannabinoid receptor antagonist 5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-hexyl-1H-1,2,4-triazole--LH 21*. Neuropharmacology, 2006. **51**(2): p. 358-66.
44. de Bruin, N.M., et al., *SLV330, a cannabinoid CB(1) receptor antagonist, attenuates ethanol and nicotine seeking and improves inhibitory response control in rats*. Behav Brain Res, 2011. **217**(2): p. 408-15.
45. Lallemand, F. and P. De Witte, *SR147778, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, suppresses ethanol preference in chronically alcoholized Wistar rats*. Alcohol, 2006. **39**(3): p. 125-34.
46. Vasiljevik, T., et al., *Design, synthesis, and biological evaluation of aminoalkylindole derivatives as cannabinoid receptor ligands with potential for treatment of alcohol abuse*. J Med Chem, 2013. **56**(11): p. 4537-50.
47. Alen, F., et al., *PPARalpha/CB1 receptor dual ligands as a novel therapy for alcohol use disorder: Evaluation of a novel oleic acid conjugate in preclinical rat models*. Biochem Pharmacol, 2018. **157**: p. 235-243.
48. George, D.T., et al., *Rimonabant (SR141716) has no effect on alcohol self-administration or endocrine measures in nontreatment-seeking heavy alcohol drinkers*. Psychopharmacology (Berl), 2010. **208**(1): p. 37-44.
49. Erdozain, A.M., J.J. Meana, and L.F. Callado, *Implicación del sistema cannabinoide endógeno en el alcoholismo*. Trastornos Adictivos, 2009. **11**(2): p. 85-95.
50. Maccioni, P., G. Colombo, and M.A. Carai, *Blockade of the cannabinoid CB1 receptor and alcohol dependence: preclinical evidence and preliminary clinical data*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2010. **9**(1): p. 55-9.

51. Erdozain, A.M. and L.F. Callado, *Involvement of the endocannabinoid system in alcohol dependence: the biochemical, behavioral and genetic evidence*. Drug Alcohol Depend, 2011. **117**(2-3): p. 102-10.
52. Kleczkowska, P., et al., *Cannabinoid Ligands and Alcohol Addiction: A Promising Therapeutic Tool or a Humbug?* Neurotox Res, 2016. **29**(1): p. 173-96.
53. *Ficha técnica Antabus 250 mg comprimidos*. Available from: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/12723/12723\\_ft.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/12723/12723_ft.pdf).
54. Manzanares, J., et al., *Role of the endocannabinoid system in drug addiction*. Biochem Pharmacol, 2018. **157**: p. 108-121.
55. Zhang, H.Y., et al., *Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(46): p. E5007-15.
56. Xi, Z.X., et al., *Brain cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors modulate cocaine's actions in mice*. Nat Neurosci, 2011. **14**(9): p. 1160-6.
57. Zhang, H.Y., et al., *Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats*. Addict Biol, 2017. **22**(3): p. 752-765.
58. Onaivi, E.S., et al., *Behavioral effects of CB2 cannabinoid receptor activation and its influence on food and alcohol consumption*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 426-33.
59. Onaivi, E.S., et al., *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, 2008. **1139**: p. 434-49.
60. Sanchez-Marin, L., et al., *Effects of Intermittent Alcohol Exposure on Emotion and Cognition: A Potential Role for the Endogenous Cannabinoid System and Neuroinflammation*. Front Behav Neurosci, 2017. **11**: p. 15.
61. Ortega-Alvaro, A., et al., *Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol*. Addict Biol, 2015. **20**(1): p. 43-55.
62. Ishiguro, H., et al., *Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans*. Pharmacogenomics J, 2007. **7**(6): p. 380-5.
63. Powers, M.S., K.R. Breit, and J.A. Chester, *Genetic Versus Pharmacological Assessment of the Role of Cannabinoid Type 2 Receptors in Alcohol Reward-Related Behaviors*. Alcohol Clin Exp Res, 2015. **39**(12): p. 2438-46.
64. Al Mansouri, S., et al., *The cannabinoid receptor 2 agonist, beta-caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice*. Pharmacol Biochem Behav, 2014. **124**: p. 260-8.
65. Navarrete, F., M.S. Garcia-Gutierrez, and J. Manzanares, *Pharmacological regulation of cannabinoid CB2 receptor modulates the reinforcing and motivational actions of ethanol*. Biochem Pharmacol, 2018. **157**: p. 227-234.
66. Martin-Sanchez, A., et al., *Alcohol-induced conditioned place preference is modulated by CB2 cannabinoid receptors and modifies levels of endocannabinoids in the mesocorticolimbic system*. Pharmacol Biochem Behav, 2019. **183**: p. 22-31.

