



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Omega-3en propietate
onuragarriak alkoholak
nerabezaroan eragiten dituen
kalteak berreskuratzeko C57BL6/J
sagu arretan**

*Maitane Serrano Murgia,
Leire Lekunberri Odriozola,
Amaia Mimenza Saiz,
Miquel Saumell Esnaola,
Gontzal García Del Caño,
Edgar Soria Gómez,
Garazi Ocerin Amondarain,
Itziar Bonilla Del Río,
Nagore Puente Bustinza,
Almudena Ramos Uriarte,
Inmaculada Gerrikagoitia Marina,
Izaskun Elezgarai Gabantxo,
Irantzu Rico Barrio eta
Pedro Grandes Moreno*

45-51 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.04.05>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Omega-3en propietate onuragarriak alkoholak nerabezaroan eragiten dituen kalteak berreskuratzeko C57BL6/J sagu arretan

Maitane Serrano^{1,2}, Leire Lekunberri^{1,2}, Amaia Mimenza^{1,2}, Miquel Saumell-Esnaola^{3,4}, Gontzal García del Caño^{3,4}, Edgar Soria-Gomez^{1,2,5}, Garazi Ocerin¹, Itziar Bonilla-Del Rio^{1,2}, Nagore Puente^{1,2}, Almudena Ramos-Uriarte^{1,2}, Inmaculada Gerrikagoitia^{1,2}, Izaskun Elezgarai^{1,2}, Irantzu Rico-Barrio^{1,2}, Pedro Grandes^{1,2}.

(1) Neurozientziak Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU, Leioa, Bizkaia),

(2) Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzia Parkea (UPV/EHU, Leioa, Bizkaia), (3) Bioaraba, Neurofarmakologia Zelularra eta Molekularra, (4)

Neurozientziak Saila. Farmazia Fakultatea (UPV/EHU, Gasteiz, Araba), (5) Ikerbasque, Basque Foundation for Science

maitane.serrano@ehu.eus

Laburpena

Alkohola nerabezaroan kontsumitzeak kalte anitzak dakartza, bereziki hipokanpoko endokannabinoiden sistemari eta, ondorioz, oroimenean. Omega-3 gantz-azidoek sistema endokannabinoiden bidez onurak eragiten dituzte oroimenean. Gainera, alkoholak eragiten dituen hainbat kalte berreskuratu ditzakete, izan ere, jaioaurreko alkohol esposizioak neuronen plastikotasunean eragiten dituen kalteak berreskuratzen dituzte. Azterlan honen helburua omega3-an aberastutako dietak nerabezaroan alkohola edateak oroimenean eragin dituen kalteak berreskuratzeko tratamendu aproposa den aztertzea da. Baita horren azpian ezkututzen diren hipokanpoko endokannabinoiden sistemari lotutako mekanismo molekularrak ikertzea ere.

Hitz gakoak: alkohola; hipokanpoa; omega-3; endokannabinoiden sistema.

Abstract

Alcohol consumption during adolescence impairs the endocannabinoid system of the hippocampus and, therefore, memory. Omega-3 fatty acids are polyunsaturated fatty acids (PUFAs) that improve memory by acting on the endocannabinoid system and recover neural plasticity disrupted by prenatal alcohol exposure. The aim of this investigation is to analyze 1) if an omega-3 enriched diet ameliorates the long-term memory deficits caused by adolescent alcohol intake, and 2) to study the endocannabinoid-mediated mechanisms underlying the omega-3 effects in the hippocampus.

Keywords: alcohol; hippocampus; omega-3; endocannabinoid system.

1. Sarrera eta motibazioa

Alkohola mundu mailan gehien kontsumitzen den substantzia psikoaktiboa da, izan ere, Munduko Osasun Erakundeak argitaratutako datuen arabera, 2018an, European, 15 urtetik gorako populazioaren % 59,9 alkohol-kontsumitzaile ohikoa zen. Gainera, alkoholak urtero mundu osoko heriotzen % 5,3-a eragiten du; 3 milioi hildako gutxi gorabehera (Munduko Osasun Erakunde, 2018). Euskal Autonomia Erkidegoari dagokionez, 2017. urtean 15 urtetik gorako populazioaren % 66,3rentzat ohikoa da alkohola astebururo kontsumitzea. Gainera, alkohol kontsumoa nerabezaroan hasten da, 16,8 urterekin hain zuzen ere (Eusko Jaurlaritza, 2017). Nerabezaroa hazkuntza garaia da oraindik eta, beraz, alkohol kontsumoak ondorio bereziki larriak ditu garai honetan, bai maila fisikoan, zein emozionalean eta portaeran ere bai (Munduko Osasun Erakunde, 2018). Hain zuzen ere, nerabezaroan alkohola edateak hipokanpoko neurogenesiaren murrizketaz gain, zelula heriotza handitzen du eta plastikotasun sinaptikoa kaltetzen du, oroimena kaltetuz (Broadwater et al., 2014; Drissi et al., 2019).

Endokannabinoiden sistema nerbio-sistema zentralaren garapenean, plastikotasun sinaptikoan eta kanpo- nahiz barne-inguruneko estimuluen erantzunean parte hartzen duen neuromodulazio sistema da. Endokannabinoiden sistema kannabinoiden hartzailak, endokannabinoiden eta azken horiek sortu eta degradatzeko entzimaz osatuta dago. Hartzailen kasuan, CB1-a da erdiko nerbio sistemari adierazten den hartzailerik garrantzitsua (Lu & Mackie, 2016). Alkohol kontsumoak endokannabinoiden seinalizazioan kalteak eragiten ditu, besteak beste, gure laborategian frogatu

izan da nerabezaroan alkohola edateak CB1 hartzailerak bideratzen duen plastikotasun sinaptikoa kaltetzen duela (Peñasco et al., 2020), hau da, neuronen arteko elkarrekintzak kaltetzen dituela.

Omega-3ak lipidoak osatzen dituzten gantz-azido (GA) asegabeak dira eta horien artean, azido dokosahexaenoikoa (DHA) eta azido eikosapentaenoikoa (EPA) aurkitzen dira. Aipatu beharra dago lipido horiek esentzialak direla, hau da, dietaren bidez bereganatu behar ditugula. Gaur egungo mendebaldeko dieta jarraituz nekez betetzen ditugu beharrak. DHA garunean aurkitzen den GA poliasegabe ugariena da, izan ere, funtsezko betebeharrak betetzen ditu, besteak beste, sinapsien eta neuronen sorkuntzan eta migrazioan parte hartzen du. Gainera, zelula lipidoek mintzak osatzen dituztenez horien fluidotasunean eragiten dute. Horrexegatik, omega-3ek neuronen seinale-transdukzioan eta mintzari lotutako hartzailerak, ioi-kanal eta entzimen aktibitatean eragiten dute (Gil Hernandez, 2017). Endokannabinoiden sistemak eraginez oroimena espaziala hobetzen dutela frogatu izan da (Pan et al., 2011). Hori gutxi balitz, omega-3an aberastutako dietak jaiotzeko alkohol esposizioak iraupen luze potentziazioan (ILP) eragiten dituen kalteak berreskuratzeko gai da (Patten et al., 2013).

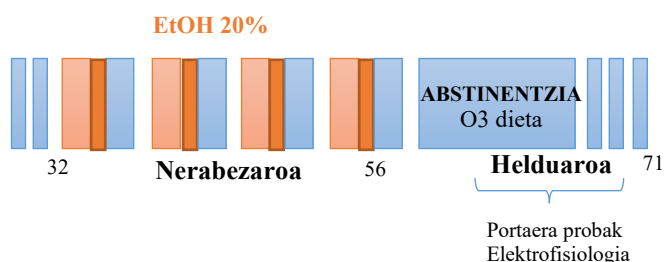
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Alkoholaren eta omega-3en arteko erlazio estua frogatu da. Izan ere, alkoholak DHA mailak jaitsiarazten ditu (Tajuddin et al., 2014), baina, era berean, omega-3ek jaiotzeko alkohol esposizioak eragindako hipokanpoko plastikotasun arazoak berreskuratzen ditu (Patten et al., 2013), hau da, neuronen moldatzeko gaitasuna. Ez hori bakarrik, omega-3 GAek endokannabinoiden aitzindariak direla frogatu da (Dyall, 2017). Gainera, EPAk endokannabinoiden hartzailerak bidez neuronen proliferazioa handitzen du (Dyall et al., 2016).

Omega-3en onura ugari frogatu diren arren, nerabezaroan alkohol esposizioak eragiten dituen kalteak emendatzeko osagarri aproposa den aztertzeke dago oraindik. Horrexegatik, ikerketa honen helburu nagusiak bi dira. Alde batetik, omega-3ek alkoholak ikasketa ahalmenean eta oroimenean eragindako kalteak berreskuratzeko gai den aztertzea. Bestalde, ikasketa eta oroimenean inplikaturik dauden hipokanpoko endokannabinoiden sistema aztertzea, omega-3 GAak dituzten eragina ikertzeko.

3. Ikerketaren muina

1. Irudia. Diseinu esperimentalaren eskema: Lau astetan zehar lau eguneko astean alkoholarekiko esposizioa jarraitzen dute eta ostean, abstinentzia aldian omega-3an aberastutako dieta.

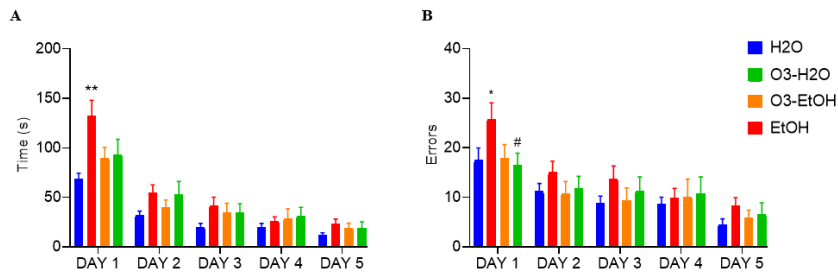


dieta ezartzen zaie (O3EtOH eta O3H2O taldeak). Abstinentzia aldi honen amaieran portaera probak eta elektrofisiologia esperimentuak burutzen dira, alkoholaren zein dietaren efektuak aztertzeke asmoarekin (1. irudia).

Ikerlan honen helburuak aztertzeke, C57BL/6J ar saguek nerabezaroan zehar alkohol/ur edateko ilunpeko protokoloan barneratzen dira. Horretan, 4 astetan zehar (jaitzeko 32. egunetik 56. egunera arte) hiru eguneko bi ordutan zehar eta laugarren eguneko lau orduko alkohol %20an (EtOH taldea) edo ura (H2O taldea) era askean edateko ipintzen zaie. Ostean, helduaro goiztiarrean (jaitzeko 57. egunetik 71. egunera arte), animalien erdiari omega-3an aberastutako

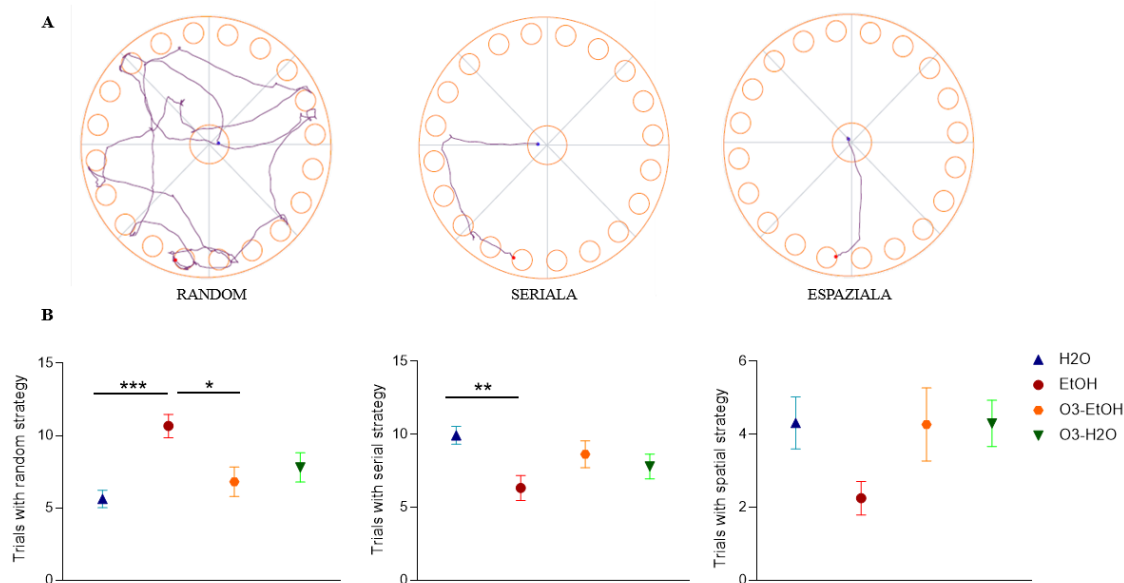
3.1 Barnes labirintoaren portaera frogatzea

2. Irudia. Barnes labirintoaren portaera proba, n=12. A) Beharreko denbora kutxa aurkitzeko B) Begiraturako zulo kopurua kutxa aurkitu aurretik. $^{*}p<0,05$; $^{}p<0,01$. Balioak bide bakarreko ANOVaren bitartez analizatu dira.**



Ikasketa ahalmena eta oroimen espaziala zein prozedimentala ebaluatzeko barnes portaera proba erabiltzen da. Portaera proba honetan, gela baten erdian 20 zulo periferiko dituen mahai bat kokatzen da, eta sagu bakoitzari zulo bat ezartzen zaio, zeinen azpian kutxa bat

3. Irudia. Barnes portaera probako estrategiak, n=12. A) Estrategien eskema B) Random estrategia erabilitako aldi kopurua C) Estrategia seriala erabilitako aldi kopurua B) Estrategia espaziala erabilitako aldi kopurua. $^{*}p<0,05$; $^{}p<0,01$; $^{***}p<0,001$. Balioak bide bakarreko ANOVaren bitartez analizatu dira.**



kokatuko den. Gainera, gelako paretetan kolore ezberdinak dituzten hainbat ikur daude, argibide bisual gisa. Horrela, 5 egunetan zehar, 4 aldiz egunean, saguek kutxa aurkitu beharko dute. Saiakera bakoitzean, 4 minutu edukiko dute gehienez. Portaera proba honetan analizatuko diren parametroak: Kutxa aurkitzeko eta denboraz gain, kutxa aurkitu aurretik bisitatutako zulo kopurua eta erabilitako estrategia izango dira. Estrategiei dagokienez, zuloa ausaz aurkitzen badute random estrategia izango da, zuloak banan-banan begiratzen badituzte estrategia seriala, oroimen prozedimentalarekin lotura estua duena, eta argibide bisualak erabiliz kutxa zuzenean aurkituz gero estrategia espaziala izango da.

Denborari dagokionez, lehenengo egunean EtOH taldeak H2O taldeak baino denbora gehiago behar du kutxa aurkitzeko eta egun horretan bertan H2O eta O3-H2O taldeak baino zulo gehiago begiratzen ditu kutxa aurkitzeko (2. irudia). Erabilitako estrategien kasuan, EtOH taldeak H2O eta O3-EtOH taldeak baino gehiago erabiltzen du random estrategia eta H2O taldeak baino gutxiago estrategia seriala. Estrategia espazialaren kasuan ezberdintasun esanguratsurik ez egon arren, EtOH taldeak estrategia mota hau beste taldeak baino gutxiago erabiltzen dutelaren tendentzia argia dago (3. irudia). Hortaz, alkoholak memoria kaltetzen duen arren, omega-3an aberastutako dietak kalte horiek berreskuratzen ditu.

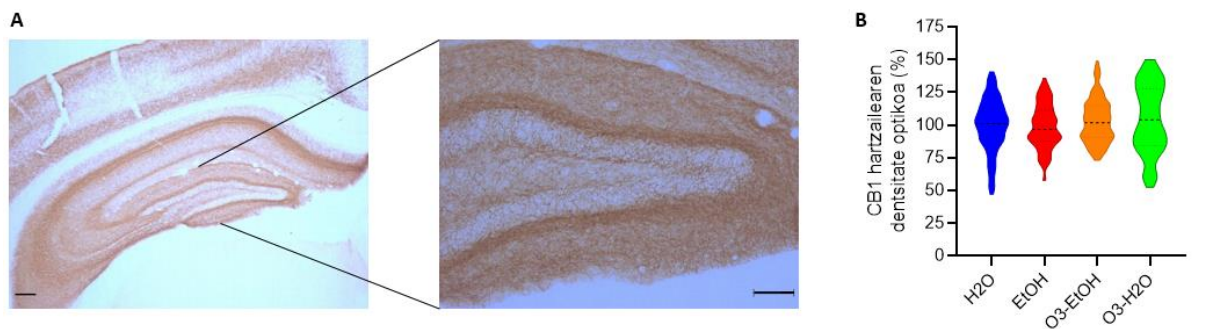
3.2 Analisi molekularra

CB1-aren dentsitate optikoaren aldaketa eza hortz-bihurgunean:

Lehenengo eta behin, animaliak anestesiatu eta garunak fixatzeko asmoarekin bihotz zeharreko perfusioa egingo da. Ondoren, bibratomoaren bidez 45 μm -ko koroa-ebaketak egiten dira. Tindaketa egiteko, talde esperimental bakoitzeko hiru sagu erabiltzen dira. Horretarako, ebaketak ordu erdiz blokeo soluzioan inkubatu eta anti-CB1 ahuntz antigorputz poliklonal primarioarekin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inkubatzen dira egun batez giro-tenperaturan. Hurrengo egunean, laginak ordu betez anti-ahuntz zaldi G-immunoglobulina sekundarioan (1:200) inkubatzen dira giro tenperaturan. Ostean, seinalea anplifikatzeko ordu betez inkubatzen dira laginak abidina-biotina konplexuarekin, eta %0,05 diaminobenzidinarekin ipintzen dira kontaktuan 3 minutuz emaitzak errebelatzeko. Gero, ebaketak gelatinizatutako portetan kokatu eta hurrengo egunean, laginak deshidratatzeko asmoarekin portak alkohol kontzentrazio gorakorretan (%50, %70, %96 eta %100) eta xilolean 5 minutuz murgildu behar dira. Azkenik, DPX erretxina akrilikoa erabiliz estalkia ipintzen zaio portari eta horrela, mikroskopioan behatu daitezke. Argazkiak hipokanpoko geruza molekularrean atera dira 10X handipenean eta horiek baliatuta CB1 hartzailearen dentsitate optikoa neurtu da. ImageJ programa erabilita, argazkiak zuri-beltzean ipini eta intereseko zonaldean hiru neurketa egin dira. Ostean, datuak kontrol taldeko balioak erreferentzia gisa erabilita normalizatzen dira.

CB1-aren dentsitate optikoki dagokionez ez dago ezberdintasun esanguratsurik 4 taldeen artean. Izan ere, kontrol taldearen dentsitate optikoa %100,0 izanda, O3-H₂O taldeak %104,6-ko dentsitatea dauka, EtOH taldeak %98,7-koa eta O3-EtOH taldeak %103,1-ekoa (4. irudia). Beraz, esan daiteke hipokanpoko geruza molekularrean CB1 hartzailearen mailan aldaketak ez daudela talde esperimentalen artean.

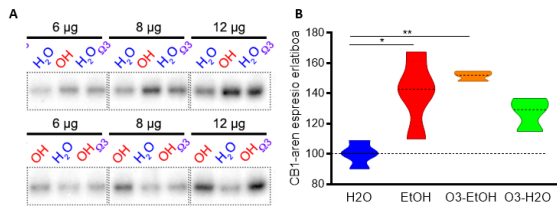
4. Irudia. Mikroskopia optikoa A) Hipokanpoko argazkiak 2,5X eta 10X handipenetan B) CB1 hartzailearen dentsitate optikoko datu normalizatuak. Balioak bide bakarreko ANOVAren bitartez analizatu dira. Scale bars: 2,5X 500 μm , 10X 100 μm .



CB1-aren iguera alkohola edan duten saguen hipokanpoko sinaptosometan:

Hasteko, animaliak dislokazio zerbikalaren bidez sakrifikatu eta garunak ateratzen dira. Ondoren, hipokanpoak disezionatu eta talde esperimental berdineko 6 animalien hipokanpoak bateratzen dira. Hipokanpoak txikitu eta fosfato soluzio batekin nahasten dira. Gero, frakzionamendua egiten da, sinaptosomak, hau da, neuronen arteko sinapsia gertatzen den mintzelularren atala banatzeko. Horretarako, zentrifugazio anitzak egiten dira, zeinetan fase ezberdinak lortuko ditugun, eta azkenik, sinaptosomak bereiziko ditugu. Behin sinaptosomak ditugula, Bradford teknika erabiltzen da talde bakoitzeko sinaptosometan daukagun proteina kantitatearen estimazioa egiteko. Horretarako, patroi-zuzen bat sortzen dugu gamma-globulina proteinaren 7 kontzentrazio gorakor kargatuz 96 putzuetako ELISA plakan. Bertan, sinaptosomen laginak estimazio bidez diluitu eta kontzentrazio gorakorretan kargatuko dira. Jarraian, Dye Reagent tindatzailea gehitu eta 4 minutuz ingurumen tenperaturan inkubatu ondoren absorbantzia neurtzen da 595nm-ko uhin-luzeran.

5. Irudia. Western Blot bidez analizatutako sinaptosomen CB1. A)WB-aren irudia. B) CB1-aren espresio erlatiboaren balioak. *p<0,05; **p<0,01. Balioak bide bakarreko ANOVaren bitartez analizatu dira.



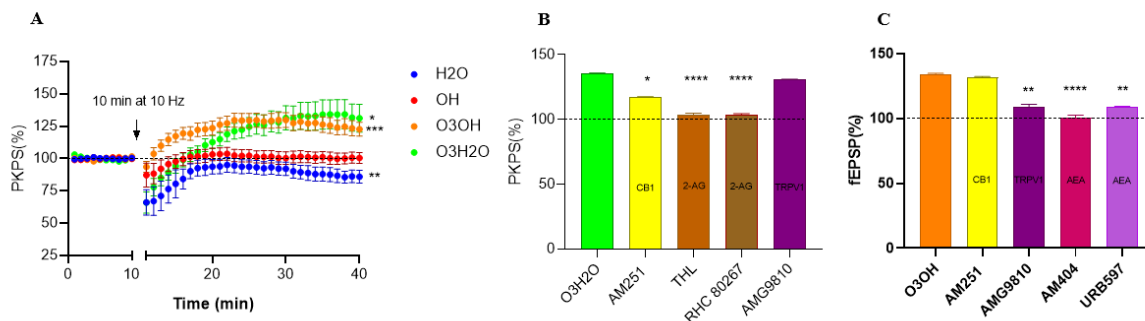
primarioarekin (1:1500) inkubatzen dira 4°C-tan gau osoan zehar. Azken egunean, mintzak errefau-peroxidasarekin (HRP) konjugatutako anti-untxi ahuntz IgG sekundarioan (1:4000) 2 orduz giro tenperaturan inkubatu eta agente kimioluminizente batekin ipintzen dira kontaktuan. Mintzak errebelaketa gailuan kokatzen dira argazkiak ateratzeko. Ondoren, argazkiak ImageJ programa erabiliz analizatu eta banden dentsitate optikoa neurtzen da. Azkenik, datuak kontrol taldeko balioak erreferentzia gisa erabilia normalizatzen dira.

Kasu honetan, 4 taldeen artean CB1-aren sinaptosomen banden dentsitatean ezberdintasun esanguratsua daude, izan ere, EtOH eta O3-EtOH taldeetan igoera esanguratsua dago H2O taldearekin alderatuta. Zehazki, kontrol taldearen balioak %100,0 izanda, O3-H2O taldeak %127-ko dentsitatea dauka, EtOH taldeak %140,8-koa eta O3-EtOH taldeak %151,7koa (5. irudia). Kasu honetan, hipokanpo osoko sinapsietan dagoen CB1-aren espresioa alkoholaren ondorioz handitu egiten da.

3.3 Elektrofisiologia bidezko analisi funtzionala

Ex-vivo elektrofisiologia esperimenduak egiteko, animalia anestesiatu eta sakrifikatu osten garuna atera eta oxigenatutako likido zefalorrakideoaren antzekoa den soluzio batean murgiltzen da, neuronak bizirik mantentzeko asmoarekin. Ondoren, bibratomoaren bidez 300 µm-ko koroa-ebaketak egiten dira. Ebaketa horiek erabilia, hipokanpoko erdialdeko bide zulatzailean neurona

6. Irudia. Elektrofisiologia esperimenduak. A) Denbora zeharreko potentzial kitzikatzaile postsinaptikoaren (PKPS) grafika B) O3-H2O taldeko plastikotasunean parte hartzen duten hartzaile eta endokannabinoideak C) O3-EtOH taldeko plastikotasunean parte hartzen duten hartzaile eta endokannabinoideak (AM251: CB1 hartzailearen antagonista; AMG9810: TRPV1-aren antagonista; THL eta RHC 80267: DAGLren inhibitzaileak; AM404: AEaren rekapzioaren inhibitzailea; URB597: AEaren degradazioa bideratzen duen entzimaren inhibitzailea). *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001****p<0,0001. Balioak bide bakarreko ANOVaren bitartez analizatu dira.**



kitzikatzaileen iraupen luzeko plastikotasuna ikertzen da, hain zuzen ere, plastikotasun mota eta zein hartzaile bidez dagoen bideratuta. Horretarako, elektrodo kitzikatzailea erdialdeko bide zulatzailearen zuntzetan kokatzen da eta erregistrokoa hortz bihurguneko geruza molekularren

barneko herenean; eta, hartzaile ezberdinen antagonistak erabilia, hartzaile ezberdinak blokeatuko ditugu, eta plastikotasuna galtzen bada, hartzaile horren parte hartzea frogatuko da. Gainera, maiztasun baxuko kitzikapen protokoloa (10minutu 10 Hz-tara) erabiliko dugu.

Aurretik, gure laborategian maiztasun baxuko kitzikapenaren protokoloa erabilia H₂O taldeko saguek 2-arakidonoilglizerol (2-AG) kannabinoidea eta CB1 hartzailearen bidezko iraupen luzeko depresioaren (ILD) plastikotasuna daukatela frogatu da. Horrez gain, alkoholak plastikotasun hori kaltetzen duela behatu izan da (Peñasco et al., 2020). Kitzikapen protokoloa berdina erabilia, O₃-H₂O nahiz O₃-EtOH taldeek ILP erakusten dute. Hala ere, horren azpian inplikaturako mekanismoak ezberdinak dira. O₃-H₂O taldean 2-AG kannabinoidea eta CB1 hartzaileak bideratzen dute ILP-a. O₃-EtOH taldearen kasuan, ordea, anandamidak (AEA) eta TRPV1-ak bideratzen dute (6. irudia).

4. Ondorioak

Alkohol kontsumoak, bereziki garapen garaian eragiten dituen kalteak argiak dira, izan ere, ikerketa anitzetan frogatu da portaeran eta oroimenean eragiten dituen epe-luzeko kalteak (Cantacorps et al., 2017; Crews et al., 2016; Drissi et al., 2019). Bestalde, in vitro nahiz in vivo omega-3 GAek, eta bereziki EPA eta DHAK, alkoholak eragiten dituen kalteak berreskuratzeko daukan gaitasuna frogatu da. Ikerketa horiek jaio aurreko alkohol esposizioak eragiten dituen kalteen berreskurapenera bideratu da batez ere, eta horietan bertan alkoholaren ondoriozko neuroendekapena zein neuronon plastikotasuna berreskuratu daitekeela ikusi da (Kusat Ol et al., 2016; Patten et al., 2013). Ikerketa honetan emaitzek ildo berdina jarraitzen dute; hain zuzen ere, nahiz eta nerabezaroako alkohol kontsumoak oroimena eta endokannabinoide sistemaren bidezko plastikotasuna kaltetu, omega-3an aberastutako dietak kalte horiek berreskuratzeko gai da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Nerabezaroa garapen garaia da oraindik, zeinean garuna oraindik ere osatzen ari den, baina garai honetan da alkohol kontsumoa hasten den garaia hain zuzen ere (Eusko Jaurlaritza, 2017). Egoera horretan, omega-3an aberastutako dietak hainbat onura eragiten dituela frogatu da alkohol kontsumoaren ondorioz epe luzera sortutako ikasketa eta oroimena arazoak hobetuz.

Beraz, omega-3an aberastutako dieta nerabezaroan alkohol kontsumoak eragiten dituen epe luzeko kalteak leheneratzeko terapia ez farmakologiko aproposa izan daiteke. Hala ere, onura horien azpian ezkututzen diren mekanismo zelularak aztertzeke dago oraindik.

6. Erreferentziak

- Broadwater, M., Liu, W., Crews, F. & Spear, L. P. (2014). Persistent loss of hippocampal neurogenesis and increased cell death following adolescent, but not adult, chronic ethanol exposure. *Developmental Neuroscience*, 36(0), 297–305. <https://doi.org/10.1159/000362874>. Persistent
- Cantacorps, L., Alfonso-Loeches, S., Moscoso-Castro, M., Cuitavi, J., Gracia-Rubio, I., López-Arnau, R., Escubedo, E., Guerri, C. & Valverde, O. (2017). Maternal alcohol binge drinking induces persistent neuroinflammation associated with myelin damage and behavioural dysfunctions in offspring mice. *Neuropharmacology*, 123, 368–384. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.05.034>
- Crews, F., Vetreno, R., Broadwater, M. & Robinson, D. (2016). Adolescent alcohol exposure persistently impact adult neurobiology and behavior. *Pharmacological Reviews*, 68(4), 1074–1109. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5050442/pdf/pr.115.012138.pdf>
- Drissi, I., Deschamps, C., Fouquet, G., Alary, R., Peineau, S., Gosset, P., Sueur, H., Marcq, I., Debuysscher, V., Naassila, M., Vilpoux, C. & Pierrefiche, O. (2019). Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. *Addiction Biology*, 25(3), 1–15. <https://doi.org/10.1111/adb.12760>
- Dyall, S. C., Mandhair, H. K., Fincham, R. E. A., Kerr, D. M., Roche, M. & Molina-Holgado, F. (2016). Distinctive effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in regulating neural stem cell fate are mediated via endocannabinoid signalling pathways. *Neuropharmacology*, 107, 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.055>
- Dyall, Simon C. (2017). Interplay Between n-3 and n-6 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and the

- Endocannabinoid System in Brain Protection and Repair. *Lipids*, 52(11), 885–900. <https://doi.org/10.1007/s11745-017-4292-8>
- Eusko Jaurlaritza. (2017). *Encuesta sobre Adicciones Comunidad Autónoma de Euskadi*.
- Gil Hernandez, A. (2017). *Tratado de Nutrición. Tomo III. Nutrición Humana en el Estado de Salud, Editorial Médica Panamericana, Madrid*.
- Kusat Ol, K., Kanbak, G., Oğlakçı İlhan, A., Burukoglu, D. & Yücel, F. (2016). The investigation of the prenatal and postnatal alcohol exposure-induced neurodegeneration in rat brain: protection by betaine and/or omega-3. *Child's Nervous System*, 32(3), 467–474. <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2990-1>
- Lu, H.-C. & Mackie, K. (2016). An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biological Psychiatry*, 79(7), 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Pan, J. P., Zhang, H. Q., Wei-Wang, Guo, Y. F., Na-Xiao, Cao, X. H. & Liu, L. J. (2011). Some subtypes of endocannabinoid/endovanilloid receptors mediate docosahexaenoic acid-induced enhanced spatial memory in rats. *Brain Research*, 1412, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.07.015>
- Patten, A. R., Sickmann, H. M., Dyer, R. A., Innis, S. M. & Christie, B. R. (2013). Omega-3 fatty acids can reverse the long-term deficits in hippocampal synaptic plasticity caused by prenatal ethanol exposure. *Neuroscience Letters*, 551, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.05.051>
- Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Fontaine, C. J., Ramos, A., Reguero, L., Gerrickagoitia, I., Rodríguez de Fonseca, F., Barrondo, S., Aretxabala, X., García del Caño, G., Elezgarai, I., Nahirney, P., Christie, B. R. & Grandes, P. (2020). Intermittent Ethanol Exposure During Adolescence Impairs Cannabinoid Type 1 Receptor- Dependent Long-Term Depression and Recognition Memory in Adult Mice. *Neuropsychopharmacology*, 45, 309–318. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0530-5>
- Tajuddin, N., Moon, K. H., Marshall, S. A., Nixon, K., Neafsey, E. J., Kim, H. Y. & Collins, M. A. (2014). Neuroinflammation and neurodegeneration in adult rat brain from binge ethanol exposure: Abrogation by docosahexaenoic acid. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101223>
- Munduko Osasun Erakundea. (2018). Global status report on alcohol and health 2018. In *Global status report on alcohol and health 2018*. <https://doi.org/10.1037/cou0000248>

7. Eskerrak eta oharrak

Hauen babes eta finantzioazoiari esker egin da lan hau: Eusko Jaurlaritza (IT1230-19); Red de Investigación en Atención Primaria de Adicciones (RIAPAd), Instituto de Salud Carlos III (ISC-III RD21/0009/0006) eta Europar Batasunaren Europako Eskualde Garapenerako Funtsa (ERDF-EU; RD16/0017/0012); eta MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad) (PGC2018-093990-AI00 MICIU/AEI/FEDER, UE); MS eta LL, Euskal Herriko Unibertsitateko doktoratu aurreko ikertzaileen kontratuak (PIF 19/164 eta PIF 18/315) eta AM-ren Eusko Jaurlaritzako doktoratu aurreko ikertzaile kontratua.