(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 580 508**

(21) Número de solicitud: 201630447

(51) Int. Cl.:

A61K 31/164 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

11.04.2016

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

15.11.2017

Fecha de concesión:

05.09.2018

(45) Fecha de publicación de la concesión:

12.09.2018

(56) Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070225

(73) Titular/es:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (60.0%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (40.0%)

(72) Inventor/es:

RODRÍGUEZ DE FONSECA, Fernando;
ANTÓN VALADÉS, María y
ORIO ORTIZ, Laura

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

(54) Título: **Composiciones para la prevención y/o tratamiento de los trastornos por uso de alcohol.**

(57) Resumen:
Composiciones para la prevención y/o tratamiento de los trastornos por uso de alcohol.
Uso de aciletanolamidas en la elaboración de un medicamento o nutracéutico para la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos por uso de alcohol en general, y de la intoxicación etílica o embriaguez patológica, y el síndrome de dependencia al alcohol en particular.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 580 508 B1

DESCRIPCIÓN

Composiciones para la prevención y/o tratamiento de los trastornos por uso de alcohol.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la farmacia, y se refiere al uso de aciletanolamidas en la elaboración de un medicamento o nutracéutico para la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos por uso de alcohol en general, y de la intoxicación etílica o embriaguez patológica, y el síndrome de dependencia al alcohol en particular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La CIE-10 (acrónimo de la Clasificación internacional de enfermedades, décima versión) clasifica con el código F10 los trastornos mentales y del comportamiento debidos al uso o consumo de alcohol. El código F10 a su vez comprende los siguientes subapartados:

F10.0. Intoxicación aguda.

F10.1. Consumo perjudicial.

F10.2. Síndrome de dependencia.

F10.3. Síndrome de abstinencia.

F10.4. Síndrome de abstinencia con delirium.

F10.5. Trastorno psicótico.

F10.6. Síndrome amnésico.

F10.7. Trastorno psicótico residual y tardío.

F10.8. Otros trastornos mentales inducidos por el alcohol.

F10.9. Trastorno mental o del comportamiento sin especificar.

Los criterios clínicos para cada diagnóstico se incluyen en el correspondiente apartado dentro del capítulo.

Por ***consumo perjudicial (F10.1)*** se entiende aquél que está afectando a la salud física o mental, sin cumplir los criterios ni de dependencia ni ningún otro de los señalados dentro de F10.

Todos los estudios epidemiológicos más recientes sobre abuso y dependencia del alcohol realizados en países occidentales constatan que éste, el consumo perjudicial, es un problema creciente, cada vez más grave, y cada vez más propio de personas jóvenes, entre 15 y 30 años de edad.

La mayoría de los estudios estima que el riesgo a lo largo de la vida de padecer dependencia del alcohol es en la actualidad aproximadamente del 9-10% para los varones y del 3-5% para las mujeres; el mismo riesgo para alcanzar un consumo perjudicial sería prácticamente el doble.

La intoxicación alcohólica o etílica es un patrón de consumo de alcohol común entre algunos alcohólicos o dependientes al alcohol. Se ha propuesto que el daño cerebral y la neurodegeneración inducida por alcohol es consecuencia directa de episodios de borracheras, y hay pruebas convincentes que indican que la neuroinflamación inducida por éstos puede contribuir a los efectos neurotóxicos de la droga.

Un modelo de 4-días de intoxicación alcohólica (12 dosis intra-gástricas), el llamado modelo de intoxicación Majchrowicz, y pequeñas modificaciones del mismo, se han utilizado ampliamente para describir la neuroinflamación y las propiedades neurodegenerativas por intoxicación alcohólica.

Por ejemplo, la intoxicación alcohólica provoca la activación de la microglia, aumenta la actividad de unión del factor nuclear-κappa B (NF kappa B) al ADN, aumenta la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), e induce la lesión cerebral y neurodegeneración en la corteza cerebral y el hipocampo asociado con déficits cognitivos. Además, el modelo de intoxicación alcohólico citado induce altos niveles prolongados de etanol en sangre (BEL) similares a las documentados en los alcohólicos crónicos.

Administraciones crónicas de etanol aumentan los mediadores inflamatorios relacionados con el NF-kB y activan las rutas de señalización de los receptores tipo Toll (TLR) 4 y 3, induciendo apoptosis, lesión cerebral y neurodegeneración (Vallés et al., 2004; Alfonso-Loeches et al., 2010; Qin & Crews, 2012). La activación neuroinmune inducida por la administración crónica de alcohol podría involucrar a la molécula de señalización de alerta HMGB1 (del inglés High Mobility Group Box 1), que se une a TLR4 (Crews et al., 2013; Zou & Crews, 2014).

Se ha observado un incremento en la expresión de HMGB1 en la corteza orbitofrontal de los alcohólicos posmortem y sus niveles tenían correlación con el consumo de alcohol en vida. También se ha documentado en humanos alcohol-dependientes incrementos de las

citoquinas proinflamatorias periféricas tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y la interleucina-1 beta (IL-1β), la activación de la microglia y un aumento de la expresión cerebral de la proteína Proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1). La inflamación también se correlacionó con los síntomas depresivos y el ansia de alcohol.

El sistema endocannabinoide se ha estudiado durante años por sus propiedades anti-inflamatorias y homeostáticas. Un análogo estructural del endocannabinoide anandamida perteneciente a la familia N-aciletanolamina, el mediador lipídico oleoiletanolamida (OEA), ha surgido como una interesante molécula bioactiva con acciones antiinflamatorias y neuroprotectoras en el cerebro. OEA se descubrió primero como un factor de saciedad sin actividad en los receptores de cannabinoides tradicionales, y hay una creciente evidencia que indica que media una variedad de diferentes acciones a través de la activación del Receptor activado por proliferadores de peroxisomas, subtipo alfa (PPAR-α). Estudios recientes en modelos animales indican que la OEA puede tener propiedades neuroprotectoras putativas frente a trastornos del sistema nervioso central (SNC) tales como apoplejía, enfermedad de Parkinson, depresión o adicción.

El alcohol, específicamente el etanol, es una potente droga psicoactiva con un número elevado de efectos secundarios que puede afectar de manera grave a nuestro organismo. Son muy diversos los efectos del alcohol a medio y largo plazo, y actúan sobre múltiples órganos y sistemas tal y como se detalla a continuación.

En el cerebro y sistema nervioso**.**

- Afecta gradualmente las funciones cerebrales, en primer lugar a las emociones (cambios súbitos de humor), los procesos de pensamiento y el juicio. Si continúa la ingesta de alcohol se altera el control motor, produciendo disartria, embotamiento nervioso y pérdida del equilibrio.
- Altera la acción de los neurotransmisores, y modifica su estructura y función. Ello produce múltiples efectos: disminución de la alerta, retardo de los reflejos, cambios en la visión, pérdida de coordinación muscular, temblores y alucinaciones. Disminuye el autocontrol, afecta a la memoria, la capacidad de concentración y las funciones motoras.
- La disminución de vitamina B1 producida por el consumo crónico de alcohol puede llevar a la enfermedad de Wernicke-Korsakoff, que provoca déficits cognitivos y alteraciones de los sentimientos, pensamientos y memoria de la persona. Los afectados confunden la realidad con sus invenciones.
- Produce trastornos del sueño.

- Pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales.
- En fases avanzadas produce alteraciones mentales serias y daño cerebral irreversible, la llamada demencia alcohólica.
- Periodos de amnesia, con alteración profunda de la memoria y la conciencia de diversa duración (minutos, horas o hasta días).

En el corazón y aparato circulatorio**.**

- Aumenta la actividad cardíaca (aunque un consumo muy moderado mejora la circulación, una dosis superior produce daños).
- En dosis elevadas aumenta la presión sanguínea (hipertensión) y produce daño en el músculo cardíaco por sus efectos tóxicos.
- Debilita la musculatura cardíaca y por consiguiente, la capacidad para bombear sangre.
- Produce vasodilatación periférica, lo que genera enrojecimiento y un aumento de la temperatura superficial de la piel.

En el aparato digestivo.

Las molestias gástricas son debidas a erosiones en las mucosas producidas por el etanol. El ardor estomacal será mayor si se han mezclado diferentes bebidas o combinados, ya que la irritación gástrica se deberá a todos los componentes bebidos.

- Aumenta la producción de ácido gástrico que genera irritación e inflamación en las paredes del estómago por lo que, a largo plazo, pueden aparecer úlceras, hemorragias y perforaciones de la pared gástrica.
- El cáncer de estómago ha sido relacionado con el abuso del alcohol. También provoca cáncer de laringe, esófago, páncreas y en algunos casos de vejiga.
- Provoca esofagitis, una inflamación del esófago, varices esofágicas sangrantes y desgarros de Mallory-Weiss.
- Puede producir pancreatitis aguda, una enfermedad inflamatoria severa del páncreas, con peligro de muerte.
- Puede provocar pancreatitis crónica, que se caracteriza por un intenso dolor permanente.

- Otras alteraciones posibles son la diabetes tipo 2 y peritonitis.
- El hígado es el órgano encargado de metabolizar el alcohol, que es transformado por las enzimas del hígado primero en acetaldehído y después en acetato y otros compuestos. Este proceso es lento y no está exento de daños (el acetaldehído despolariza las proteínas, oxida los lípidos, consume vitaminas del grupo B y daña los tejidos).
- Al irritarse la célula hepática es posible que se produzca hepatitis alcohólica, debido a la destrucción celular e inflamación tisular. Con el tiempo, el hígado evoluciona (hígado graso o esteatosis) para adaptarse a la sobrecarga metabólica, pudiendo llegar a hepatitis y más tarde a la cirrosis hepática, producto de la muerte celular y la degeneración del órgano. Esta grave enfermedad puede degenerar finalmente en cáncer de hígado y producir la muerte.
- Otros signos de alteración hepática son la ictericia, un tono amarillento que adquiere la piel y la esclerótica, y los edemas, acumulación de líquido en las extremidades.
- Altera la función del riñón, reduciendo los niveles de la hormona antidiurética, provocando deshidratación y tomando agua de otros órganos como el cerebro, lo cual genera dolor de cabeza.
- El alcohol aporta abundantes calorías (7 kcal por gramo de alcohol) con escaso valor nutritivo. No nutre pero elimina el apetito, sustituye a otros alimentos más completos y a la larga puede generar desnutrición. Esto se agrava pues inhibe la absorción de algunas vitaminas y minerales.

En la sangre.

- Inhibe la producción de glóbulos blancos y rojos.
- Sin la suficiente cantidad de glóbulos rojos para transportar oxígeno, sobreviene la anemia megaloblástica.

En los sistemas inmunitario y reproductor.

- La falta de glóbulos blancos origina un fallo en el sistema inmunitario, aumentando el riesgo de infecciones bacterianas y virales.
- Disminuye la libido y la actividad sexual.

- Puede causar infertilidad y disfunción eréctil

Además, los pacientes alcohólicos suelen presentar otros síndromes psiquiátricos asociados, sobretodo de ansiedad y depresión, que con frecuencia son trastornos inducidos o agravados por el propio consumo de alcohol.

La depresión es una patología que se asocia frecuentemente al alcoholismo (el 36 % de los pacientes alcohólicos sufren de depresión concomitantemente), dicha asociación es más frecuente en la mujer que en el hombre, y tiene un efecto altamente negativo sobre la evolución de los pacientes alcohólicos aumentando las recaídas de su enfermedad y ensombreciendo el pronóstico de la misma.

Actualmente, los medicamentos que se emplean para el tratamiento del alcoholismo suelen ir dirigidos al tratamiento de la adicción, y en ocasiones, de otras enfermedades asociadas como la depresión y la ansiedad. La Tabla 1 muestra la prevalencia y la Tabla 2 muestra los principios activos y la ruta de actuación que siguen los productos que actualmente se están empleando para el tratamiento de la adicción al alcohol.

Tipo Dato	Grupo de edad	Intervención	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Prevalencia (%)	>=18 Años	Terapéutica	2.79	2.79	2.79	2.80	2.80	2.80	2.81	2.81	2.81	2.81	2.82

Tabla 1. Prevalencia (%) mundial de la adicción al alcohol, 2013-2023.

Nombre	Nombre genérico	Diana
piracetam	piracetam	Glicoproteína de la vesícula sináptica 2A (SV2A)
naltrexona ER	naltrexona	Receptor Opioide de tipo Mu (M-OR-1 o MOR-1 o Receptor Opioide Mu o MOP o OPRM1 o MOR1)
(bromazepam + sulpirida)	(bromazepam + sulpirida)	Receptor de Dopamina D(2) (Receptor D2 de Dopamina o DRD2 o D2DR); Receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (GABR)

(mecobalamina + piracetam)	(mecobalamina + piracetam)	Glicoproteína de la vesícula sináptica 2A (SV2A)
acamprosato cálcico	acamprosato cálcico	Receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (GABR)
alprazolam	alprazolam	Receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (GABR)
amitriptilina	amitriptilina [INN]	Trasportador de Noradrenalina dependiente de Sodio (Trasportador de Norepinefrina o NET o *Solute Carrier Family 6 Member 2* o SLC6A2); Trasportador de Serotonina Dependiente de Sodio (Trasportador 5HT T o 5HTT o *Solute Carrier Family 6 Member 4* o SLC6A4)
carbamida de calcio	carbamida de calcio [INN]	Aldehido Deshidrogenasa(EC 1.2.1.3)
clordiazepóxido hidrocloruro	chlordiazepoxide hydrochloride	Receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (GABR)
clorazepato dipotásico	clorazepato dipotásico	Receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (GABR)
cianamida	cianamida	Aldehido Deshidrogenasa(EC 1.2.1.3)
diazepam	diazepam	Receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (GABR)
disulfiram	disulfiram [INN]	Aldehido Deshidrogenasa(EC 1.2.1.3)
fluoxetina hidrocloruro	fluoxetina hidrocloruro	Trasportador de Serotonina Dependiente de Sodio (Trasportador 5HT T o 5HTT o *Solute Carrier Family 6 Member 4* o SLC6A4)
glutatión		
haloperidol	haloperidol	Receptor de Dopamina D(2) (Receptor D2 de Dopamina o DRD2 o D2DR);
haloperidol decanoato	haloperidol decanoato	Receptor de Dopamina D(2) (Receptor D2 de Dopamina o DRD2 o D2DR);
hidroxizina	hidroxizina [INN]	Receptor de Histamina H1 (H1R o HRH1)
clorhidrato de hidroxicina	clorhidrato de hidroxicina	Receptor de Histamina H1 (H1R o HRH1)
imipramina	imipramina [INN]	Trasportador de Noradrenalina dependiente de Sodio (Trasportador de Norepinefrina o NET o *Solute Carrier Family 6 Member 2* o SLC6A2); Trasportador de Serotonina Dependiente de Sodio (Trasportador 5HT T o 5HTT o *Solute Carrier Family 6 Member 4* o SLC6A4)
melperona	melperona [INN]	Receptor de Dopamina; Receptor de 5-Hidroxitriptamina (Serotonina)
meprobamato	meprobamato	Receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA) A (GABR)
metadoxina		
metronidazol	metronidazol	ADN

nalmefeno	nalmefeno	Receptor Opioide Tipo Delta (D-OR-1 o DOR-1 o OPRD1 o OPRD); Receptor Opioide tipo Mu (M-OR-1 o MOR-1 o Receptor Opiáceo Mu o MOP o OPRM1 o MOR1)
naltrexona hidrocloruro	naltrexona hidrocloruro	Receptor Opioide tipo Mu (M-OR-1 o MOR-1 o Receptor Opiáceo Mu o MOP o OPRM1 o MOR1)
nitrefazol	Nitrefazol [INN]	Aldehido Deshidrogenasa(EC 1.2.1.3)
piracetam	piracetam	Glicoproteína de la vesícula sináptica 2A (SV2A)
T.T.D B3 B4	disulfiram + nicotinamida + adenina	Aldehido Deshidrogenasa, Mitocondrial (ALDH Clase 2 o ALDH-E2 o ALDHI o EC 1.2.1.3); Dopamina Beta-Hidroxilasa (Dopamina Beta-Monooxigenasa o EC 1.14.17.1)
tiaprida	tiaprida [INN]	Receptor de Dopamina D(2) (Receptor D2 e Dopamina o DRD2 o D2DR)
topiramato	topiramato	Receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA) A (GABR); Receptor AMPA (GluR o GRIA); Receptor de Kainato (KAR) ; Canal de sodio regulado por Voltage (SCN)
Ulcipep	clordiazepóxido + clidinium bromide	Receptor muscarínico de acetilcolina M1 (CHRM1); Receptor muscarínico de acetilcolina M2 (CHRM2); Receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA) A (GABR)
acamprosato	acamprosato [INN]	Receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA) A (GABR)

Tabla 2. Productos comercializados para el tratamiento del alcoholismo.

Para la depresión y la adición al alcoholismo también se está empleando el (bromazepam + sulpirida), amitriptilina, fluoxetina hidrocloruro.

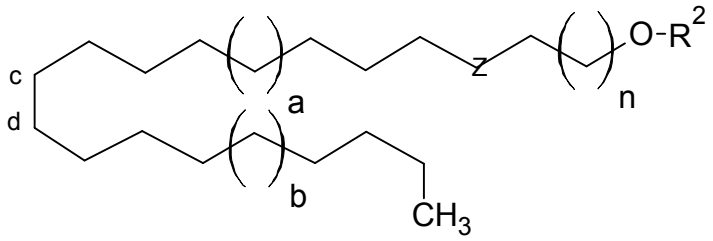
Para la ansiedad, también están indicados el (bromazepam + sulpirida), alprazolam, amitriptilina, clordiazepoxido hidrocloruro, clorazepato dipotásico, diazepam, hidroxizina, hidroxizina hidrocloruro, meprobamato, tiapride, Ulcipep (clordiazepóxido + clidinio bromuro).

Sin embargo algunos de los medicamentos anteriores tienen serios efectos secundarios, y es necesaria la administración conjunta de varios fármacos para el tratamiento de los síntomas y patologías que acompañan a la adición de alcohol. Por tanto, sería bueno desarrollar alternativas de tratamiento que tuvieran menos efectos secundarios y que ejercieran su acción sobre el mayor número posible de los efectos nocivos del alcohol en el

organismo, así como tratamientos preventivos del daño ocasionado por el consumo de alcohol a distintos niveles y en distintos órganos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un **primer aspecto** de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) (también referido como el compuesto de la invención):



(I)

donde

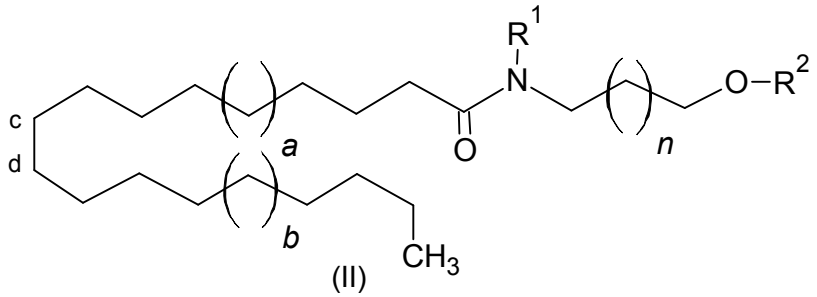
- n es un número entero que está entre 0 y 5;
- la suma de a y b puede ser de 0 a 4;
- Z es un grupo que se selecciona de entre –C(O)N(R^0)-; –(R^0)NC(O)-; -(O)CO-; O; NR^0 ; y S, y donde R^0 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un alquilo sustituido o no sustituido, hidrógeno, un alquilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, un acilo (C1–C6) sustituido o no sustituido, homoalquilo, y arilo, y donde hasta ocho átomos de hidrógeno del compuesto pueden estar sustituidos por metilo o un doble enlace, y el puente molecular que hay entre c y d puede ser saturado o insaturado;

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento o nutracéutico para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de los trastornos por uso o consumo de alcohol.

Alternativamente, se refiere al compuesto de la invención o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos,

hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de los trastornos por uso o consumo de alcohol.

En otra realización preferida de este aspecto, el compuesto tiene la fórmula (II):



(II)

donde

- n es un número entero que está entre 0 y 4;
- la suma de a y b puede ser de 1 a 3;
- R^1 y R^2 son miembros independientes que se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno (H), un alquilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, un acilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, y donde hasta ocho átomos de hidrógeno del compuesto pueden estar sustituidos por metilo o un doble enlace, y el puente molecular que hay entre c y d puede ser saturado o insaturado;

o cualquiera de sus sales, preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de invención, a = 1 y b = 1.

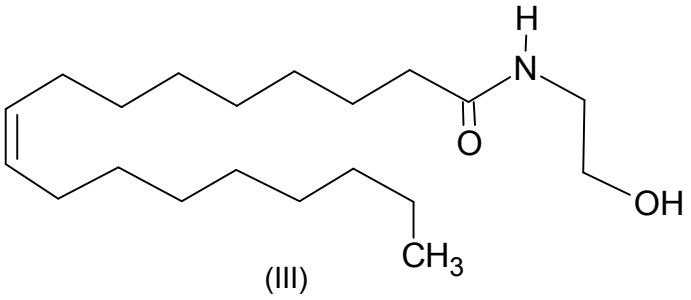
En otra realización preferida de este aspecto de invención, n = 0-1.

En otra realización preferida de este aspecto de invención, R^1 y R^2 son hidrógenos (H).

En otra realización preferida de este aspecto de invención, el puente entre el carbono c y el carbono d es un doble enlace.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el compuesto de fórmula (I) es una aciletanolamida. Más preferiblemente, la aciletanolamida se selecciona de la lista que consiste en oleoiletanolamida (OEA), palmitoiletanolamida (PEA), estearoiletanolamida

(SEA) o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente, la aciletanolamida es la oleoiletanolamida (OEA) de fórmula (III).



(III)

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, los trastornos por uso o consumo de alcohol se seleccionan de entre intoxicación etílica o embriaguez patológica, y el síndrome de dependencia al alcohol.

En otra realización más preferida el trastorno por consumo de alcohol es la intoxicación etílica o embriaguez patológica.

En otra realización aún más preferida, los trastornos por consumo de alcohol (o síntomas) se seleccionan de la lista que consiste en neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, daño hepático, veisalgia o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida el trastorno por consumo de alcohol es el síndrome de dependencia al alcohol. En otra realización aún más preferida, los trastornos por uso o consumo de alcohol (o síntomas) se seleccionan de la lista que consiste en neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, daño hepático, veisalgia, anhedonia, compulsión, tolerancia e incapacidad de controlar el consumo de alcohol, abstinencia comprendida por ansiedad y depresión, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida el trastorno por uso o consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, veisalgia y/o daño hepático, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida el trastorno por uso o consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la anhedonia.

En otra realización más preferida el trastorno por uso o consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la compulsión, tolerancia y/o incapacidad de controlar el consumo de alcohol.

En otra realización más preferida el trastorno por uso o consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la ansiedad.

En otra realización más preferida el trastorno por uso o consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la depresión.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se hace antes de la ingesta de alcohol.

En otra realización preferida de este aspecto, el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se hace durante la ingesta de alcohol.

Un **segundo aspecto** de la invención, se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende o consiste en al menos uno de los compuestos de fórmula (I), fórmula (II), y/o fórmula (III) tal y como se define en la presente invención, o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de los trastornos por uso o consumo de alcohol.

Alternativamente, el segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en al menos uno de los compuestos de fórmula (I), fórmula (II), y/o fórmula (III) tal y como se define en la presente invención, o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de los trastornos por uso o consumo de alcohol.

En una realización más preferida la composición además comprende o consiste en uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización aún más preferida la composición además comprende o consiste en otro principio activo. Preferiblemente el principio activo se selecciona de la lista que comprende o consiste en ibuprofeno, paracetamol, vitamina B12, cafeína o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención los trastornos por uso de alcohol se seleccionan de entre intoxicación etílica o embriaguez patológica, y síndrome de dependencia al alcohol.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a una composición alimentaria o bien una composición nutracéutica o bien una composición del tipo "*medical food*", de ahora en

adelante composición alimentaria de la invención, que comprende o consiste en al menos uno de los compuestos de de fórmula (I), fórmula (II), y/o fórmula (III) tal y como se define en la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones,

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso de la composición alimentaria de la invención para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento del alcoholismo o de una enfermedad o condición patológica causada por la ingesta de alcohol en un mamífero. Alternativamente, se refiere al uso de la composición alimentaria de la invención, para la prevención y/o tratamiento del alcoholismo o de una enfermedad o condición patológica causada por la ingesta de alcohol en un mamífero.

En otra realización preferida, se refiere al uso de una composición alimentaria o del tipo alimento médico (del inglés "*medical food*") que comprende o consiste en al menos uno de los compuestos de fórmula (I), fórmula (II), y/o fórmula (III) tal y como se define en la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un nutracéutico para la mejora de las funciones fisiológicas, prevención, tratamiento o mejora de la calidad de vida de los trastornos por uso de alcohol.

En una realización preferida la composición además comprende otro alimento. En una realización aún más preferida el alimento se selecciona de la lista que comprende o consiste en preparaciones basadas en electrólitos y/o bebidas isotónicas, zumos naturales, infusiones de cardo mariano, preparados con cafeína o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención los trastornos por uso de alcohol se seleccionan de entre intoxicación etílica o embriaguez patológica, y síndrome de dependencia al alcohol. En una realización más preferida los trastornos o síntomas de la intoxicación etílica o embriaguez patológica se seleccionan de la lista que consiste en neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, daño hepático y/o veisalgia, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización más preferida los trastornos o síntomas del síndrome de dependencia al alcohol se seleccionan de la lista que consiste en neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, veisalgia, daño hepático, anhedonia, compulsión, tolerancia e incapacidad de controlar el consumo de alcohol, abstinencia, especialmente ansiedad y depresión, o cualquiera de sus combinaciones.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental del estudio.

A) Protocolo experimental de consumo excesivo de alcohol. Las ratas recibieron una dosis inicial de 5 g/kg de etanol al 30% (w/v) a través de sonda oral y un máximo de 3 g/kg de etanol en dosis posteriores cada 8 h. Se recogió sangre de la vena de la cola 2h antes y 2h después de las 15:00h de la administración de etanol por sonda en los días 2 a 4 con el fin de determinar los niveles de etanol en sangre (BEL), y se trató de mantener las dosis de etanol tóxicas BEL relativamente constante (ver Tabla 3). Las dosis medias de etanol/rata fueron de 8 g/kg, 7,5 g/kg, 7,9 g/kg y 4,9 g/kg, del día 1 al 4, respectivamente, y la dosis media de etanol/rata/día (1-4) fue de 7,06 g/kg. En un primer experimento se comprobó el time-course de la neuroinflamación después de 1h, 6h y 24h desde la última alimentación forzada con etanol. En el segundo experimento, se inyectó OEA (5 mg/kg, i.p., dosis de carga de 10 mg/kg) como pre-tratamiento 10 min antes de cada alimentación forzada con etanol, y las muestras de tejido cerebral/sangre se recogieron 2-4h después de la última administración de etanol.

B) Ruta de señalización neuroinmune TLR4/MyD88/NF-kB propuesta mediada por HMGB1 tras activación por alcohol, provocando estrés oxidativo, activación de la caspasa 3 y daño celular. HMGB1 es una citocina peligrosa reclutada por el alcohol que activa la ruta de señalización inmune TLR4 dependiente de MyD88, lo que induce la traslocación de la subunidad p65 de NF-kB al núcleo y aumenta su actividad transcripcional. La cascada proinflamatoria mediada por NF-kB implica la liberación de citocinas, como TNF-α e IL-1β, que inducen una mayor activación de NF-kB y más neuroinflamación, y la quimiocina MCP-1 (que también es inducida por una alteración del estrés oxidativo), que media el reclutamiento en la microglia y aumenta la neurodegeneración. La actividad transcripcional de NF-kB induce la expresión de otros marcadores pro-inflamatorios, tales como COX-2 y iNOS, que conduce a estrés oxidativo y nitrosativo. La peroxidación lipídica, medida por la acumulación de 4-HNE, induce un estado celular redox relacionado con la activación de la caspasa 3 y la muerte celular por apoptosis mediada por la caspasa 8.

C) Diseño experimental para estudios de comportamiento durante el periodo de abstinencia aguda de etanol. Se testaron los animales en el laberinto elevado en cruz 24 horas y 12 días después del protocolo de abuso de alcohol y la prueba de natación forzada se realizó 48 horas después de la última administración de etanol. [HMGB1 (High Mobility Group Box 1): grupo de alta movilidad caja 1; TLR4 (Toll-Like Receptors 4): receptores tipo Toll 4: MD2 (Myeloid Differentation Protein 2): proteína de diferenciación mieloide 2; MyD88 (Myeloid Differentation Factor 88): factor de diferenciación mieloide 88; NF-kB (Nuclear Farctor kB): factor de transcripción nuclear kappa B (subunidad p65); IkB: proteína inhibidora IkappaB; TNF-α (Tumor Necrosis Factor α): factor de necrosis tumoral alfa; IL-1β (Interleukin

1β): interleucina-1 beta; MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1): proteína quimiotáctica de monocitos 1; iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase): óxido nítrico sintasa inducible; COX-2 (Cyclooxygenase 2): ciclooxigenasa 2; 4-HNE (4-hydroxynonenal): 4-hidroxinonenal].

Figura 2. Time-course del incremento de los mediadores proinflamatorios en la corteza frontal y de corticosterona en sangre inducido por consumo excesivo de etanol. Los parámetros se midieron 1h, 6h y 24h después de la última administración de etanol. A) Los niveles de TNF-α se sobre-expresaron en la corteza frontal 6h después del tratamiento con exceso de etanol y se infra-expresaron 24h después del tratamiento; B) Los niveles de IL-1β mostraron una tendencia a aumentar después de tratamiento con exceso de etanol, pero no fueron significativamente elevados; C) La actividad de la subunidad p65 de NFκB se aumentó y disminuyó en los extractos nucleares de la corteza frontal 6h y 24h después del exceso de etanol, respectivamente; D) Los niveles de IκBα estaban elevados en todo momento después del tratamiento con excesivo de etanol; E) La enzima COX-2 se sobre-expresó 6h después de la exposición a etanol; F) El tratamiento con exceso de etanol aumenta los niveles de corticosterona en sangre 1h, 6h y 24h después de la última alimentación forzada con etanol. Los datos representan la media ± S.E.M. (n=3-6). Diferente del grupo control: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 3. Efectos del pretratamiento con OEA en la ruta de señalización HMGB1 /TLR4 activada en la corteza frontal tras la exposición a un consumo excesivo de etanol. A) Niveles de HMGB1 medidos por ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas); B) Ratio nuclear/citoplasmático de HMGB1 analizado mediante Western blot; los datos se expresan como porcentaje de los controles en cada fracción. La expresión de HMGB1 en los animales control fue mayor en el núcleo que en el citoplasma (n/c ratio=1,3); C) Niveles relativos de mRNA de TLR4; D) Niveles de proteína TLR4; E) Niveles de proteína MD2; F) Niveles de proteína MyD88. Parámetros medidos 2-4 h después de la última administración de etanol. Los datos representan la media ± S.E.M. (n=4-10). Los niveles de mRNA se normalizaron mediante datos GAPDH y densitométricos en el análisis de Western blot, las bandas de interés se normalizaron por ß-actina (banda inferior). Diferente del grupo control: *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. Diferentes de los animales tratados con etanol: #p<0,05; ##p<0,01.

Figura 4. Liberación de TNF-α, IL-1β y MCP-1 en la corteza frontal y/o plasma después de los tratamientos farmacológicos. Datos de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado

a enzimas) de los niveles de la corteza frontal (panel izquierdo) de TNF-α (A), IL-β (C) y MCP-1 (E). ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) detectó niveles en plasma (panel derecho) de TNF-α (B) y IL-β (D). Parámetros medidos 2-4 h después de la última administración de etanol. Los datos representan la media ± S.E.M. (n=3-6). Diferente del grupo control: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Diferentes de los animales tratados con etanol: #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001.

Figura 5. Activación de NFkB en la corteza frontal inducida por la exposición a consumo excesivo de etanol y efectos del pre-tratamiento con OEA. A) Niveles relativos de mRNA de la subunidad nuclear p65 de NFkB; B) Niveles de mRNA de la proteína citosólica IκBα inhibidora de NFkB; C) Actividad nuclear de p65 medido por un kit basado en ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas); D) Niveles proteicos de IκBα en extractos citosólicos. Parámetros medidos 2-4 h después de la última administración de etanol. Los datos representan la media ± S.E.M. (n=4-10). Los datos densitométricos de IκBα se normalizaron por ß-actina (banda inferior). Diferente al grupo control: * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001. Diferentes de los animales tratados con etanol: #p<0,05; ##p<0,01.

Figura 6. Papel de OEA en la sobreexpresión de la regulación de iNOS y COX-2, peroxidación lipídica, caspasa 8 y caspasa 3 inducida por etanol y la actividad en la corteza frontal. A) Niveles relativos de mRNA de iNOS; B) Niveles relativos de mRNA de COX-2; C) Niveles relativos de 4-hidroxinonenal (4-HNE), un producto natural de la peroxidación lipídica; D) Niveles relativos de mRNA de caspasa 8, un intermediario de señalización de la activación de la caspasa 3; E) Niveles proteicos de caspasa 3; F) Actividad de caspasa 3 medido por ensayo fluorimétrico. Parámetros medidos 2-4 h después de la última administración de etanol. Los datos representan la media ± S.E.M. (n=4-10). Diferente al grupo control: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Diferentes de los animales tratados con etanol: #p <0,05; ## p<0,01.

Figura 7. Papel de la OEA en la sobreexpresión de los niveles de corticosterona en plasma inducida por el etanol y la permeabilidad del intestino al LPS. A) Niveles de corticosterona en plasma detectados por radioinmunoensayo (R.I.A.); B) Niveles plasmáticos de LPS detectados por análisis enzimático. Parámetros medidos 2-4 h después de la última administración de etanol. Los datos representan la media ± S.E.M. (n=6-9). Diferente al grupo de control: *p<0,05; **p<0,01. Diferentes a los animales tratados con etanol: #p<0,05.

Figura 8. Efectos ansiolíticos y de tipo antidepresivos de OEA en estado de abstinencia aguda por consumo excesivo de etanol. OEA se administró como pretratamiento antes de cada alimentación forzada de etanol y los animales se sometieron a la prueba de natación forzada (panel superior) y el laberinto en cruz elevado (panel inferior) 48h y 24h/12 días, respectivamente, después del protocolo de exceso de alcohol. En la prueba de natación forzada, disminuciones en los tiempos de natación (A), escalada (B) y latencia (D) y el aumento de la inmovilidad (C) son los índices de comportamiento de tipo depresivo. En el laberinto en cruz elevado, una disminución en el porcentaje de entradas en los brazos abiertos (E, G) y en el porcentaje de tiempo empleado en los brazos abiertos (F, H) se consideran medidas de ansiedad. Los datos representan la media ± S.E.M. (n=5-8). Diferente del grupo control: *p<0,05; **p<0,01. Diferentes de los animales tratados con etanol: #p <0,05.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

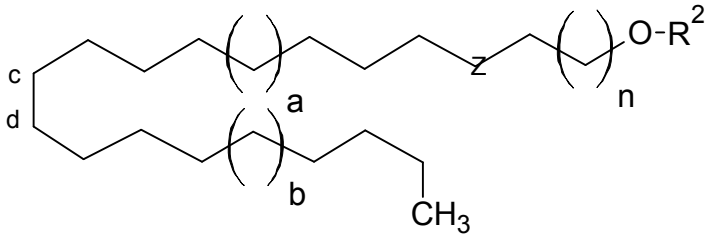
Los autores de la presente invención han caracterizado el perfil temporal de neuroinflamación en ratas expuestas a la administración intragástrica excesiva de etanol (3 veces/día x 4 días) y se ensayaron las propiedades anti-inflamatorias/neuroprotectoras de la oleoiletanolamida (OEA).

Los autores de la presente invención también han visto que la OEA, administrada en pre-tratamiento durante la intoxicación alcohólica, ejerce efectos de tipo antidepresivo durante la abstinencia aguda. En conjunto, los resultados ponen de manifiesto un perfil beneficioso de la OEA como un potente compuesto antiinflamatorio, antioxidante, neuroprotector y antidepresivo para tratar la intoxicación alcohólica o etílica y los trastornos asociados al uso o consumo de alcohol.

Se hace notar que los resultados detallados en la presente invención se podrían generalizar a etanolamidas de un ácido graso, por tanto, la invención se refiere al uso de una etanolamida de un ácido graso, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad causada por la ingesta de alcohol, y preferiblemente, de la resaca.

USO MÉDICO DEL COMPUESTO DE LA INVENCIÓN

Por lo tanto, un **primer aspecto** de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) (también referido como el compuesto de la invención):



(I)

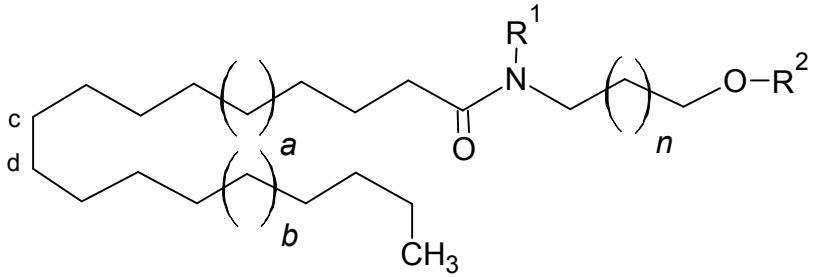
donde

- n es un número entero que está entre 0 y 5,
- la suma de a y b puede ser de 0 a 4, es decir 0 ≤ (a +b) ≥ 4,
- Z es un grupo que se selecciona de entre –C(O)N(R^0)-; –(R^0)NC(O)-; -(O)CO-; O; NR^0 ; y S, y donde R^0 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un alquilo sustituido o no sustituido, hidrógeno, un alquilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, un acilo (C1–C6) sustituido o no sustituido, homoalquilo, y arilo, y donde hasta ocho átomos de hidrógeno del compuesto pueden estar sustituidos por metilo o un doble enlace, y el puente molecular que hay entre c y d puede ser saturado o insaturado;

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, un derivado o un profármaco del mismo, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento o un nutracéutico para la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos por uso o consumo de alcohol en un mamífero.

Alternativamente, se refiere al compuesto de la invención o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, un derivado o un profármaco del mismo, o cualquiera de sus combinaciones, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos por uso o consumo de alcohol en un mamífero.

En otra realización preferida de este aspecto, el compuesto de la invención presenta la fórmula (II):



(II)

donde

- n es un número que está entre 0 y 4;
- la suma de a y b puede ser de 1 a 3, es decir 0 ≤ (a +b) ≥ 3;
- R^1 y R^2 son miembros independientes que se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno (H), un alquilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, un acilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, y donde hasta ocho átomos de hidrógeno del compuesto pueden estar sustituidos por metilo o un doble enlace, y el puente molecular que hay entre c y d puede ser saturado o insaturado;

o cualquiera de sus sales, preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones.

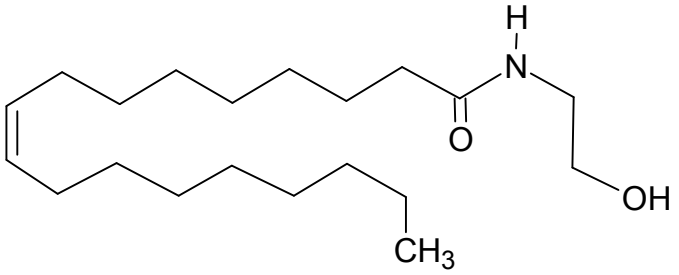
En otra realización preferida de este aspecto de invención, a = 1 y b = 1.

En otra realización preferida de este aspecto de invención, n = 0-1.

En otra realización preferida de este aspecto de invención, R^1 y R^2 son hidrógenos (H).

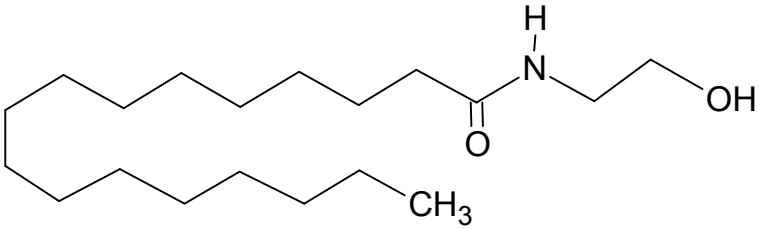
En otra realización preferida de este aspecto de invención, el puente entre el carbono c y el carbono d es un doble enlace.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el compuesto de fórmula (I) es una aciletanolamida. Más preferiblemente, la aciletanolamida se selecciona de la lista que consiste en oleoiletanolamida (OEA), palmitoiletanolamida (PEA), estearoiletanolamida (SEA) o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente, la aciletanolamida es la oleoiletanolamida (OEA) de fórmula (III).



(III)

El término "palmitoiletanolamida" se refiere al compuesto cuya estructura es



En otros aspectos, la invención se refiere a los compuestos etanolamida de ácido graso, homólogos, análogos; y sus composiciones farmacéuticas, así como a los usos.

En otras realizaciones, el resto de ácido graso de la alcanolamida de ácido graso o compuesto etanolamida, homólogo o análogo puede ser saturado o insaturado, y si insaturado puede ser monoinsaturados o poliinsaturados.

En algunas realizaciones, el resto de ácido graso del compuesto alcanolamida de ácido graso, homólogo o análogo es un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácido oleico, ácido palmítico, ácido elaídico, ácido palmitoleico, ácido linoleico, ácido α linolénico, y el ácido γ-linolénico. En ciertas realizaciones, los restos de ácido graso tienen de doce a 20 átomos de carbono.

Otras formas de realización se refieren a compuestos que se obtienen mediante la variación de la fracción de hidroxialquilamida del compuesto amida de ácido graso, de su homólogo o su análogo. Estas formas de realización incluyen la introducción de un grupo alquilo sustituido o no sustituido de uno a tres átomos de carbono (C1-C3) en el grupo hidroxilo de una alcanolamida o resto etanolamida a fin de formar el correspondiente éter de alquilo inferior. En otra realización, el grupo hidroxi del resto alcanolamida o etanolamida se une a un grupo carboxilato de un grupo alquilo de 2 a 6 átomos (C_2 a C_6) sustituido o no sustituido

de ácido carboxílico de alquilo para formar el éster correspondiente de la etanolamida de ácido graso. Tales realizaciones incluyen alcanolamida de ácidos grasos y etanolamidas de ácidos grasos en el enlace éster de ácidos carboxílicos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico y ácido butanoico. En otra realización, la alcanolamida de ácido graso es oleoilalcanolamida. En una realización adicional mucho más preferida, la alcanolamida de ácido graso es oleoiletanolamida.

En otra realización de este aspecto de la invención, el compuesto etanolamida de ácido graso, homólogo o análogo comprende, además, un grupo alquilo (-C3) sustituido o no sustituido unido covalentemente al átomo de nitrógeno de la etanolamida de ácido graso.

El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden tener opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término “alquenilo” se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo, etc. Los radicales alquenilos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), (II) o (III), pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término “prodroga” o “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye cualquier derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de

fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento o composiciones alimentarias, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término “solvato”, tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superior al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, los trastornos por uso o consumo de alcohol se seleccionan de entre intoxicación etílica o embriaguez patológica, y síndrome de dependencia al alcohol.

En una realización más preferida el trastorno por uso de alcohol es la intoxicación etílica o embriaguez patológica.

Los ejemplos de la presente invención presentan pruebas de los efectos anti-inflamatorios y neuroprotectores inducidos por OEA. Los resultados indican que OEA interfiere con la señal neuroimmune de peligro HMGB1/TLR4/MyD88 asociada con la cascada proinflamatoria mediada por NF-κB y protege contra la hiperactividad de la enzima proapoptótica caspasa-3 en la corteza frontal de rata, todo provocado por la intoxicación con etanol. Además, OEA inhibió la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) bajo exposición a intoxicación alcohólica sin alteración en el metabolismo del etanol.

En una realización aún más preferida, los trastornos o síntomas se seleccionan de la lista que consiste en neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, daño hepático, veisalgia o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización más preferida el trastorno por uso o consumo de alcohol es el síndrome de dependencia al alcohol. En una realización aún más preferida, los trastornos o síntomas se seleccionan de la lista que consiste en neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, daño hepático, veisalgia, anhedonia, compulsión, tolerancia e incapacidad de controlar el consumo de alcohol, abstinencia comprendida por ansiedad y depresión, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente el trastorno o síntoma asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, veisalgia y/o daño hepático, o cualquiera de sus combinaciones.

Aún más preferiblemente, el trastorno o síntoma por uso o consumo de alcohol es la resaca o veisalgia.

Más preferiblemente el trastorno o síntoma asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la anhedonia.

Más preferiblemente el trastorno o síntoma asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la compulsión, tolerancia y/o incapacidad de controlar el consumo de alcohol.

Más preferiblemente el trastorno o síntoma asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la ansiedad.

Más preferiblemente el trastorno síntoma asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la depresión.

Una de las principales conclusiones de los ejemplos de la presente invención ha sido que el pre-tratamiento con OEA afectó a la expresión y la señalización de los receptores de inmunidad innata TLR4 en condiciones de intoxicación alcohólica. Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se hace antes de la ingesta de alcohol.

En otra realización preferida de este aspecto, el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se hace durante la ingesta de alcohol.

Los ejemplos de la invención también muestran que la intoxicación con etanol indujo una sobreexpresión y actividad de la caspasa-3 en la corteza frontal, la cual se inhibió por el pretratamiento con OEA. Este descubrimiento revela un mecanismo no descrito hasta la fecha de que OEA puede usarse para proteger el cerebro.

Son de especial interés los datos proporcionados por los experimentos de comportamiento, los cuales indican que OEA puede regular aspectos negativos a nivel de comportamiento asociados con estados tempranos de abstinencia alcohólica. De esta forma, OEA mostró propiedades de tipo antidepresivo en la prueba de natación forzada 48h después del abuso de alcohol y tendencia a contrarrestar la ansiedad inducida por el alcohol 24 horas después de la intoxicación. El patrón de modulación de la ansiedad fue menos pronunciado 12 días después de los tratamientos.

Por tanto, otra realización preferida se refiere al uso de los compuestos de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la ansiedad inducida por alcohol en estados tempranos de abstinencia alcohólica.

Los compuestos de la invención regulan múltiples adaptaciones fisiológicas después del abuso de etanol, incluyendo la reducción de la autoingesta de etanol y la recaída, la neuroinflamación inducida por etanol y daño cerebral, o atenuación de los síntomas de abstinencia después de la ingesta de etanol. Preferiblemente los compuestos de la invención se administran antes o durante el abuso de alcohol.

En la presente invención “los trastornos por uso o consumo de alcohol” describen una amplia gama de condiciones que van desde los síntomas que provoca la intoxicación etílica o embriaguez patológica, hasta los que van asociados al síndrome de dependencia al alcohol. Todos ellos se encuentran clasificados en la CIE-10 dentro del apartado *F.10.Trastornos mentales y del comportamiento debido al uso de alcohol*, y que incluyen:

F10.0 Intoxicación aguda

F10.1 Uso nocivo o consumo perjudicial

F10.2 Síndrome de dependencia

F10.3 Estado de abstinencia

F10.4 Estado de abstinencia con delirio

F10.5 Trastorno psicótico

F10.6 Síndrome amnésico

F10.7 Trastorno psicótico residual y de comienzo tardío

F10.8 Otros trastornos mentales y del comportamiento

F10.9 Trastorno mental y del comportamiento, no especificado

La veisalgia, comúnmente conocida como resaca, es un cuadro de malestar general que se padece tras un consumo excesivo de bebidas alcohólicas, aunque no lo suficiente para llegar al coma profundo y a la subsiguiente muerte por depresión respiratoria. Se manifiesta como un conjunto de los siguientes síntomas:

- Amnesia ligera o pérdida de la memoria de lo ocurrido durante el episodio etílico.

- Alteraciones gástricas: vómitos, casi siempre, y más raramente diarrea a causa de que el alcohol provoca la erosión de la mucosa gástrica y la pérdida de la vellosidad intestinal.

- Cefalea o dolor de cabeza, el cual se produce por deshidratación de las meninges, dilatación de los vasos sanguíneos y disminución de la glucosa (azúcar en sangre).

- Ortostatismo y sed intensa, que se origina como una respuesta del cuerpo a la deshidratación causada por la degradación del alcohol.

- Dolor abdominal y muscular, lo que se traduce en sensación de debilidad.

- Posibles flatulencias.

- Embotamiento nervioso.

En esta memoria se entiende por “alcohol” principalmente, pero sin limitarse a, las bebidas alcohólicas que contienen etanol. Otros alcoholes que causen los mismos síntomas tras su ingesta también son posibles.

El compuesto o los compuestos de la invención, tal y como han sido descrito anteriormente, se pueden emplear, por tanto, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento del alcoholismo o de una enfermedad o condición patológica causada por la ingesta de alcohol en un mamífero.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad causada por la ingesta excesiva de alcohol es la intoxicación etílica aguda.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad causada por la ingesta excesiva de alcohol son trastornos mentales y de comportamiento (F.10 según la clasificación CIE-10). En otra realización más preferida, el trastorno mental y de comportamiento es un síndrome psiquiátrico asociado al alcoholismo. Aún más preferiblemente, el trastorno mental y de comportamiento es la ansiedad. En otra realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el trastorno mental y de comportamiento es la depresión.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE LA INVENCIÓN

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprenden al menos un compuesto de la invención, o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco del mismo, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos por uso o consumo de alcohol en un mamífero.

Alternativamente, se refiere una composición farmacéutica que comprenden al menos un compuesto de la invención o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, un derivado o un profármaco del mismo, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso para la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos por uso o consumo de alcohol en un mamífero. En una realización preferida de este aspecto, la composición de la invención además comprende un transportador o *carrier* farmacéuticamente aceptable, un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, los trastornos por uso o consumo de alcohol se seleccionan de entre intoxicación etílica o embriaguez patológica, y el síndrome de dependencia al alcohol.

En una realización más preferida el trastorno por uso o consumo de alcohol es la intoxicación etílica o embriaguez patológica.

En otra realización aún más preferida, los trastornos por uso o consumo de alcohol (o síntomas) se seleccionan de la lista que consiste en neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, daño hepático, veisalgia o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización más preferida el trastorno por uso o consumo de alcohol es el síndrome de dependencia al alcohol. En una realización aún más preferida, los trastornos por uso de alcohol (o síntomas) se seleccionan de la lista que consiste en neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, daño hepático, veisalgia, anhedonia, compulsión, tolerancia e incapacidad de controlar el consumo de alcohol, abstinencia comprendida por ansiedad y depresión, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente el trastorno por consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, veisalgia y/o daño hepático, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente el trastorno por consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la anhedonia.

Más preferiblemente el trastorno por consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la compulsión, tolerancia y/o incapacidad de controlar el consumo de alcohol.

Más preferiblemente el trastorno por consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la ansiedad.

Más preferiblemente el trastorno por consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la depresión.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se hace antes de la ingesta de alcohol.

En otra realización preferida de este aspecto, el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se hace durante la ingesta de alcohol.

En otra realización preferida de este aspecto, el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se realiza antes o durante la ingesta de alcohol.

La composición de la invención puede comprender como único principio activo un compuesto de la invención., En otra realización preferida, la composición farmacéutica además comprende otro principio activo.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, pro-fármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

Por tanto, en otra realización preferida, la composición farmacéutica además comprende otro principio activo. Más preferiblemente, el principio activo se selecciona de la lista que consiste en: vitamina E, vitamina C, betaína, *N*-acetilcisteína, ácido ursodesoxicólico, resveratrol, hidroxitirosol, licopeno y otros antioxidantes, nanoelectrolitos, minerales, probióticos, paracetamol, ibuprofeno, vitamina B12, cafeína o cualquiera de sus combinaciones.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "substancia o sustancia activa", "substancia o sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende el compuesto de la invención o la composición de la invención.

En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

En otra realización preferida de la presente invención, las composiciones y formas farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio. Otras formas farmacéuticas pueden ser los sistemas coloidales, dentro de los cuales se incluyen nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas poliméricas.

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

Las composiciones y formas farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

La administración de los compuestos, composiciones o formas farmacéuticas de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, tópica o parenteral. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

El compuesto o los compuestos, y las composiciones de la invención, tal y como han sido descrito anteriormente, se pueden emplear, por tanto, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento del alcoholismo o de una enfermedad o condición patológica causada por la ingesta de alcohol en un mamífero

COMPOSICIÓN ALIMENTARIA

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a una composición alimentaria o bien una composición nutracéutica o bien una composición del tipo "*medical food*", de ahora en adelante composición alimentaria de la invención, que comprende al menos uno de los compuestos de fórmula (I), de fórmula (II) o de fórmula (III).

Las composiciones alimentarias preferidas se seleccionan de la lista que consiste en: bebidas isotónicas, preparaciones basadas en electrolitos, zumos, leche, yogur, queso, leche fermentada , bebida de leche aromatizada, leche de soja, cereales precocinados, pan, pasteles, mantequilla, margarina, salsas, aceites para freír, aceites vegetales, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de semilla de algodón, condimentos, aderezos para ensaladas, zumos de frutas, jarabes, postres, glaseados y rellenos, productos congelados blandos, dulces, chicles, composiciones de cardo mariano, y alimentos intermedios. La composición alimentaria de la invención puede ser un suplemento nutricional o dietético. En otra realización preferida, el suplemento nutricional o dietético comprende una composición estéril que contiene el compuesto de la invención, preferentemente provisto de un revestimiento resistente a los ácidos gástricos, siendo una composición de liberación retardada. En otra realización preferida, la composición alimentaria, incluyendo el compuesto de la invención y/o el suplemento

nutricional o dietético, comprende "portadores" apropiados tales como diluyentes, adyuvantes, excipientes o vehículos con los que se administra el compuesto de la invención. Excipientes apropiados adecuados incluyen, pero no se limitan a almidón, glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, sulfato de calcio, gel de sílice , estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. Tales suplementos nutricionales se pueden utilizar para combatir problemas hepáticos, y ayudan a mantener la salud o un estilo de vida saludable al mamífero, preferiblemente un ser humano.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso de la composición alimentaria de la invención para la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos por uso o consumo de alcohol en un mamífero, preferiblemente humano.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, los trastornos por uso o consumo de alcohol se seleccionan de entre intoxicación etílica o embriaguez patológica, y el síndrome de dependencia al alcohol.

En otra realización más preferida el trastorno por uso o consumo de alcohol es la intoxicación etílica o embriaguez patológica.

En otra realización aún más preferida, los trastornos por uso o consumo de alcohol (o síntomas) se seleccionan de la lista que consiste en neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, daño hepático, veisalgia o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida el trastorno por consumo de alcohol es el síndrome de dependencia al alcohol. En una realización aún más preferida, los trastornos por uso de alcohol (o síntomas) se seleccionan de la lista que consiste en neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, daño hepático, veisalgia, anhedonia, compulsión, tolerancia e incapacidad de controlar el consumo de alcohol, abstinencia comprendida por ansiedad y depresión, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente el trastorno por consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal, veisalgia y/o daño hepático, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente el trastorno por consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la anhedonia.

Más preferiblemente el trastorno por consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la compulsión, tolerancia y/o incapacidad de controlar el consumo de alcohol.

Más preferiblemente el trastorno por consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la ansiedad.

Más preferiblemente el trastorno por consumo de alcohol (o síntoma) asociado al síndrome de dependencia al alcohol es la depresión.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se hace antes de la ingesta de alcohol.

En otra realización preferida de este aspecto, el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se hace durante la ingesta de alcohol.

La composición alimentaria de la invención se emplea para la mejora de las funciones fisiológicas, prevención, tratamiento o mejora de la calidad de vida de los trastornos por uso de alcohol.

El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

(i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;

(ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;

(iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

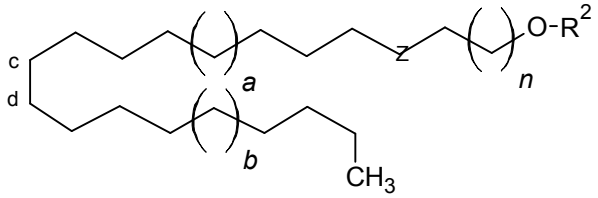
El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto(preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

Por tanto, la composición nutracéutica de la invención es útil para la prevención, alivio o tratamiento del alcoholismo o de una enfermedad o condición patológica causada por la ingesta de alcohol en un mamífero. Alternativamente, se refiere al uso de la composición alimentaria de la invención, para la prevención y/o tratamiento del alcoholismo o de una enfermedad o condición patológica causada por la ingesta de alcohol en un mamífero.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

CLAUSULAS

1.- Método de tratamiento profiláctico o preventivo de los trastornos por consumo de alcohol que comprende el uso de una composición nutracéutica o medicamentosa que comprende un compuesto de fórmula general (I)



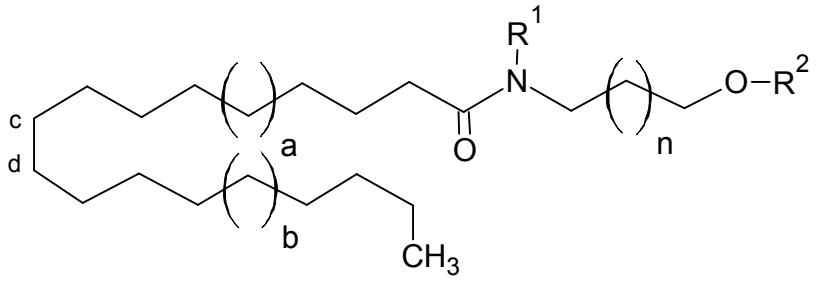
(I)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones;

donde

- n es un número entero que está entre 0 y 5;
- a y b se determinan por la siguiente formula: $0 \leq (a + b) \leq 4$; y
- Z es un grupo que se selecciona de entre –C(O)N(R^0)-; –(R^0)NC(O)-; -(O)CO-; O; NR^0 ; y S, y donde R^0 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un alquilo sustituido o no sustituido, hidrógeno, un alquilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, un acilo (C1–C6) sustituido o no sustituido, homoalquilo, y arilo, y donde hasta ocho átomos de hidrógeno del compuesto pueden estar sustituidos por metilo o un doble enlace, y el puente molecular que hay entre c y d puede ser saturado o insaturado.

2.- El método según la cláusula anterior, donde el compuesto presenta la fórmula (II),



(II)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones;

donde

- n es un número entero que está entre 0 y 4;
- a y b se determinan por la siguiente formula: $0 \leq (a + b) \leq 3$; y
- R^1 y R^2 son miembros independientes que se seleccionan del grupo que consiste en un alquilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, un acilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, y donde hasta ocho átomos de hidrógeno del compuesto pueden estar sustituidos por metilo o un doble enlace, y el puente molecular que hay entre c y d puede ser saturado o insaturado.

3.- El método según cualquiera de las cláusulas 1-2, donde a = 1 y b = 1.

4.- El método según cualquiera de las cláusulas 1-3, donde n = 0 o 1.

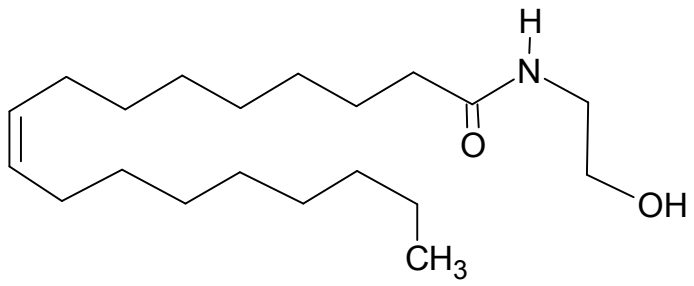
5.- El método según cualquiera de las cláusulas 2-4, donde R^1 y R^2 son hidrógenos (H).

6.- El método según cualquiera de las cláusulas 1-5, donde el puente entre el carbono c y el carbono d es un doble enlace.

7.- El método según cualquiera de las cláusulas 1-6, donde el compuesto de fórmula (I) es una aciletanolamida.

8.- El método según cualquiera de las cláusulas 1-7, donde la aciletanolamida se selecciona de la lista que consiste en oleoiletanolamida (OEA), palmitoiletanolamida (PEA), estearoiletanolamida (SEA) o cualquiera de sus combinaciones.

9.- El método según la cláusula 8, donde la aciletanolamida es la oleoiletanolamida (OEA), de fórmula (III).



(III)

10.- El método según cualquiera de las cláusulas 1-9, donde dichos trastornos por consumo de alcohol se seleccionan de la lista que consiste en: intoxicación etílica o embriaguez patológica y síndrome de dependencia al alcohol.

11.- El método según la cláusula 10, donde el trastorno por consumo de alcohol es la intoxicación etílica o embriaguez patológica.

12.- El método según cualquiera de las cláusulas 1-10, donde el trastorno por consumo de alcohol es el síndrome de dependencia al alcohol.

13.- El método según cualquiera de las clausulas 1-12, donde dicho método es profiláctico o preventivo y la administración del compuesto se realiza con carácter previo a la ingesta de alcohol.

14.- El método según cualquiera de las clausulas 1-12, donde dicho método es profiláctico o preventivo y la administración del compuesto de la invención se hace durante la ingesta de alcohol.

15.- El método de según cualquiera de las cláusulas 1 a 14, que además comprende un segundo principio activo seleccionado de la lista que consiste en ibuprofeno, paracetamol, vitamina B12 y cafeína, o cualquiera de sus combinaciones.

16.- El método según cualquiera de las clausulas 1 a 15, donde la composición es nutracéutica y se selecciona de la lista que comprende o consiste en preparaciones basadas

en electrólitos y/o bebidas isotónicas, zumos naturales, infusiones de cardo mariano, preparados con cafeína o cualquiera de sus combinaciones.

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ochenta y siete ratas Wistar machos (de Harlan, España) que pesaban 250-300 g. Los animales fueron alojados en grupos (n = 4-6) en un ciclo reverso de 12 horas de luz/oscuridad en condiciones normales de temperatura y humedad. En la jaula tenían disponibles comida estándar (A04 SAFE, Scientific Animal Food and Ensineering, Augy, France) y agua del grifo *ad libitum*. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones constantes durante 10 días antes de los experimentos.

Todos los protocolos experimentales estaban adheridos a las directrices del Comité de Protección de los Animales de la Universidad Complutense de Madrid siguiendo la legislación europea (2010/63 / UE).

Tratamiento de intoxicación con etanol

Los animales fueron tratados con etanol intragástrico (i.g.) 3 veces al día usando una cánula i.g. (aguja 16G, Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), siguiendo un protocolo basado en un paradigma estándar ligeramente modificado de 4 días de intoxicación alcohólica (Bernier et al., 2002a, b) (Figura 1A). Las dosis de etanol se administraron cada 8h durante un tiempo total de 4 días. Las ratas tratadas con etanol recibieron una dosis inicial de carga de 5 g/kg de etanol en una solución al 30% (w/v) y luego un máximo de 3 g/kg de dosis de mantenimiento, que se determinaron en base a los niveles de etanol en sangre, del inglés "*blood ethnol levels* (BEL). Este paradigma de patrón repetido de intoxicación alcohólica mantuvo relativamente constante la intoxicación BEL en un rango de sedación/ataxia (190 a 430 mg/dl, Tabla 3), de acuerdo con la escala de comportamiento por intoxicación alcohólica de 6 puntos (Majchrowicz, 1975). La dosis media de etanol/rata/día (días 1-4) fue 7,06 g/kg, similar a otros estudios (Obernier et al., 2002a, b).

TRATAMIENTO	Hora de recogida de sangre	Día 2 BEL (g/dL)	Día 3 BEL (g/dL)	Día 4 BEL (g/dL)	
Vehiculo + EtOH	13:00	193.29 ± 38.22	341.73 ± 32.48**	303.32 ± 37.17*	N=10
	17:00	274.96 ± 27.17	422.35 ± 18.00***	430.31 ± 19.72***	N=10
OEA + EtOH	13:00	217.14 ± 41.58	342.57 ± 40.25*	320.68 ± 36.63	N=9
	17:00	321.88 ± 34.08	404.17 ± 27.65	429.76 ± 29.25*	N=9

Tabla 3. Niveles de etanol en sangre. Los datos representan BEL 2 h antes y 2h después de la 15:00h de la administración de alcohol a animales en vehículo o pretratados con OEA. Hubo diferencias en BEL entre el día 2 y los días 3 ó 4 de tratamiento en ambos grupos. El pretratamiento con OEA no modificó el BEL alcanzado durante los días 2-4 de tratamiento con intoxicación de alcohol ni antes ni después de alimentación forzada de etanol. Los resultados se expresan como medias ± S.E.M. Diferente del día 2 en el mismo grupo de tratamiento: * p <0,05; ** P <0,001. [EtOH: etanol; OEA: oleoiletanolamida; BEL: niveles de etanol en sangre].

Determinación de los niveles de etanol en sangre

Para comprobar la intoxicación, se determinó BEL en muestras de sangre tomadas de la cola 120 minutos antes y después de la segunda administración i.g. de etanol del día, que se hizo a las 3 pm mediante el uso de detección electroquímica de una reacción enzimática con un analizador de alcohol AM1 (Analox Instruments, Londres, Reino Unido).

Diseño experimental, administración del fármaco y recogida de tejido/plasma

1. *Curva temporal de los principales cambios neuroinflamatorios inducidos por el protocolo de intoxicación alcohólica (Fig. 1A)*

Los animales (n=22) sometidos a 4 días de tratamiento de intoxicación alcohólica mediante alimentación por sonda (véase Fig. 1A) se sacrificaron 1h, 6h y 24h después de la última administración de etanol usando una dosis letal de pentobarbital sodico (300 mg/kg, ip, Dolethal®, España). Se separaron los cerebros del cráneo, y las meninges y los vasos sanguíneos se descartaron cuidadosamente. El córtex frontal se extirpó y congeló a -80ºC hasta el ensayo. La sangre se recogió por punción cardiaca usando citrato trisódico (3,15%

w/v) como anticoagulante. El plasma se obtuvo por centrifugación de la sangre (2000 g) 15 min a 4ºC y se almacenó a -20ºC hasta determinaciones.

Este primer experimento nos permitió observar el momento de expresión de los principales marcadores de inflamación. De acuerdo con esto, se diseñó un segundo experimento en el que se recogieron las muestras de tejido cerebral en un rango entre 2-4h después de la última intoxicación con etanol. Elegimos este intervalo de entre 1 y 6 horas para detectar tanto los primeros cambios en los parámetros inflamatorios, por ejemplo la sobreexpresión del TNF-α, como la activación de los marcadores posteriores, como la expresión de COX-2 (Fig. 2).

2. *Efectos de la administración oral repetida de OEA en las alteraciones de los marcadores neuroinflamatorios inducidos por la exposición a intoxicación alcohólica (fig. 1A).*

En este segundo experimento (n=40 animales) el objetivo era poner a prueba los efectos anti-inflamatorios/neuroprotectores de la OEA sobre la cascada de señalización TLR4 (fig. 1B) en un modelo de intoxicación por abuso de alcohol.

OEA (5 mg/kg, i.p., excepto dosis inicial de 10 mg/kg i.p.; sintetizado según descripción en Giuffrida et al., 2000) se disolvió en el vehículo (5% Tween-80 en solución salina) y se inyectó 10 minutos antes de cada una de las administraciones de etanol por sonda intragástrica. Referimos anteriormente la actividad antiinflamatoria de la OEA a 10 mg/kg por vía intraperitoneal en la corteza frontal antes de la inyección de LPS (Sayd et al., 2014). En este estudio inyectamos OEA repetidamente como un pre-tratamiento antes de cada administración de etanol. Las dosis de OEA elegida en este estudio están en el rango de dosis probado como farmacológicamente activo (5-20 mg/kg, i.p.) (Bilbao et al., 2015).

También se realizó una curva temporal(n=18) con OEA (3h, 6h y 24h) para descartar cualquier efecto en los animales control.

3. *Efectos de la administración repetida de OEA en el comportamiento de tipo depresivo y ansiedad durante la abstinencia de etanol temprana (Fig. 1C).*

En este tercer experimento (n=25) se repitió el tratamiento con intoxicación con etanol y pretratamiento con OEA aplicado en el experimento 2, y se sometió a los animales a la prueba del laberinto en cruz elevado 24h y 12 días después de la última administración forzada de etanol y a la prueba de natación forzada 48h después del protocolo de intoxicación con etanol.

Preparación de extractos nucleares y citosólicos

Los extractos proteicos nucleares y citosólicos se obtuvieron según figura en publicaciones previas (Sayd et al., 2014).

Análisis de Western blot

Las cortezas cerebrales frontales se homogeneizaron por sonicación en 400 µl de PBS (pH = 7,4) mezclado con un cóctel inhibidor de proteasas (Complete, Roche®, Madrid, España), seguido por centrifugación a 12.000 g durante 10 min a 4ºC. Homogeneizados con los niveles de proteína ajustados se mezclaron con tampón de muestra Laemmli (BioRad®, CA, EE.UU.) que contenía β-mercaptoetanol (50 µl/ml de Laemmli) y 1 mg/ml se cargaron en un gel de electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Ibérica®, España) con un sistema de transferencia semiseco (Bio-Rad®, CA, EE.UU.), se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios específicos (ver información complementaria) y revelado mediante el kit ECL™ (Amersham Ibérica®, España). La autoradiografía se cuantificó por densitometría (software NIH ImageJ®, National Biosciences, Lincoln, Nebraska EE.UU.) y se expresó como densidad óptica (D.O.). En todos los análisis de Western blot, la proteína β-actina se utilizó como control de carga.

Análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real (RT-PCR)

Se preparó el ARN citoplásmico total a partir de muestras de corteza frontal usando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU.). Las alícuotas se convirtieron en ADNc utilizando cebadores hexámeros aleatorios. Los cambios cuantitativos en los niveles de ARNm se estimaron mediante RT-PCR, llevado a cabo en presencia de la sonda verde SYBR usando una reacción 20-L en un Rotor-Gene (Corbett Research®, Mortlake, NSW, Australia). Ver la información complementaria para la descripción y detalles adicionales de la secuencia de los cebadores utilizados.

Niveles de HMGB1, citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β) y quimiocinas MCP-1

Los niveles de HMGB1, TNF-α, IL-1β y MCP-1 soluble se determinaron mediante kit de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas disponible comercialmente (ELISA) (Elabscience Biotecnología Co., Ltd., China, para HMGB-1; RayBiotech®, GA , EE.UU., para el TNF-α, IL-1β y MCP-1). La fracción HMGB1 nuclear/citosólica se determinó mediante análisis de Western blot.

Ensayo del factor de transcripción NF-κB

Los extractos nucleares fueron utilizados para la determinación de la actividad del factor de transcripción NF-kB mediante el uso de un kit basado en ELISA (Cayman Chemicals ©, Tallin, Estonia). Los extractos nucleares de la corteza frontal se incubaron con sondas específicas de elementos de respuesta a la subunidad NF-kB p65, y la unión de p65 a su sonda se detectó utilizando un anticuerpo específico contra esta subunidad. Se añadió un anticuerpo secundario marcado mediante peroxidasa de rábano picante y la unión se detectó espectrofotométricamente a 450 nm. La medición se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo es específico para la activación de p65, y no presenta reactividad cruzada con otras subunidades de NF-kB, tales como p50. Los datos se normalizaron por la cantidad de proteína total.

Peroxidación lipídica

Los peróxidos lipídicos son indicadores inestables de estrés oxidativo en las células que se descomponen para formar compuestos más complejos y reactivos, tales como 4-hidroxinonenal (4-HNE), un subproducto natural de la peroxidación lipídica. Los niveles de aductos de proteínas HNE en lisados de corteza cerebral se midieron usando un Kit de ELISA HNE aducto competitivo de 96 pocillos OxiSelect ™ (Cell Biolabs®, San Diego, CA, EE.UU.).

Medida de la actividad de la caspasa-3

La actividad de caspasa-3 se determinó usando un kit de ensayo fluorométrico (Abnova®, Taiwan) según el protocolo del fabricante. Este kit comercial permite la medición de la actividad caspasa dependiente de DEVD.

Niveles plasmáticos de corticosterona y LPS

La corticosterona y LPS se midieron en plasma mediante el uso de kits disponibles en el mercado por radioinmunoensayo (R.I.A.) (Coat-A-Count®, Siemens, LA, EE.UU.) o reacción enzimática colorimétrica (HyCult Biotech, Uden, Países Bajos), respectivamente..

Ensayo de proteínas

Los niveles de proteína se midieron usando el método Bradford basado en el principio de la proteína de unión colorante (Bradford, 1976).

Ensayos de comportamiento

Se les hizo la prueba de natación forzada a las ratas dos días después de la última alimentación forzada con etanol (véase la figura 1C para el diseño experimental), y se registraron los comportamientos específicos con una cámara de vídeo digital durante 5 minutos. Estas mismas ratas también se ensayaron mediante la prueba del laberinto en cruz elevado equipado con fotografía con luz infrarroja (Panlab, Barcelona, España) 1 y 12 días después de la última alimentación forzada con etanol, permitiendo a los animales explorar libremente el laberinto durante 5 minutos. Las pruebas se realizaron 3 h después del inicio de la fase oscura.

Análisis estadístico

Los datos en el texto y las figuras se expresan como media ± SEM. Los datos se analizaron mediante el análisis de dos vías de varianza (ANOVA), comparando los factores [alcohol/agua] frente a [OEA /vehículo], seguido de una prueba post hoc Bonferroni, y por análisis de la varianza ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc Newman-Keuls cuando sea necesario. Los datos BEL fueron analizados por medidas repetidas de análisis de la varianza ANOVA de 2 vías seguido por una prueba post hoc Bonferroni (tratamiento x determinación diaria), tanto para la determinaciones BEL pre y pos alimentación forzada por sonda. Los datos de las pruebas de comportamiento se examinaron para determinar las condiciones normales con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y después analizados por paramétrica two/one-way ANOVA de un factor seguido de pruebas *post hoc* Bonferroni / Newman-Keuls (prueba de natación forzada) o por no paramétrico Kruskal-Wallis ANOVA seguido de la prueba *post hoc* Dunn's para comparaciones múltiples (laberinto en cruz elevado) cuando sea apropiado. Un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados utilizando GraphPad Prism versión 5.04 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE.UU.)

Ejemplo 2. Curva temporal de los marcadores proinflamatorios en corteza frontal inducidos por intoxicación alcohólica e incremento de los niveles de corticoesterona plasmática

TNF-α del córtex frontal se encontraba sobre-expresado 1 hora después de la administración de etanol [55% de aumento con respecto al control (80,29 ± 17 pg /mg de proteína)] y el contenido de citocinas disminuyó 24 horas después del tratamiento (Figura 2A; $F_{(3,11)}= 9,45$; $p = 0,0002$). IL-1β mostró una tendencia a incrementarse 1h después de la exposición a etanol [29% de aumento con respecto al control (75,5 ± 6,6 pg /mg de proteína)], pero los datos no llegaron a ser estadísticamente significativos (Fig. 2B).

La expresión de la subunidad p65 de NF-kB se incrementó en los extractos nucleares de la corteza frontal 6h después del tratamiento con etanol, y disminuyó 24h después de la intoxicación con etanol, cuando se compara con el grupo control (Fig 2C;. $F_{(3,11)}$= 20,48; p <0,0001). Los niveles de la proteína inhibidora de NF-kB, IkappaB-alfa (IκBα), permaneció elevada 1h, 6h y 24h después del tratamiento con alcohol en el extracto citosólico del córtex frontal (Figura 2D; $F_{(3,13)}$= 6,73; p = 0,0056) y la enzima COX-2 mostró una sobreexpresión de 6h después de la administración de etanol (Fig.2E; $F_{(3,13)}$= 3,69; p = 0,04). Por último, la exposición a intoxicación alcohólica elevó los niveles de corticosterona en plasma 1h, 6h y 24h después de la última administración (Fig.2F;$F_{(3,15)}$=3,91;p=0,03).

Basándonos en este patrón de expresión de los principales marcadores proinflamatorios entre 1 y 6 horas tras la última administración de etanol por sonda intragástrica, elegimos extraer muestras de cerebro/plasma en un intervalo de tiempo de 2-4h después del protocolo de intoxicación para estudiar los efectos farmacológicos de la OEA.

Ejemplo 3. Niveles de etanol sanguíneo

BEL alcanzado durante el experimento estaba en el rango descrito por otros (Knapp y Crews et al., 1999;. Obernier et al, 2002a, b;. Crews et al, 2006). Se estudió si la OEA podría modificar BEL durante los días 2-4 del tratamiento con exceso de alcohol (Tabla 1). Las medidas repetidas two-way ANOVA detectaron diferencias en el BEL a lo largo de los días de protocolo de intoxicación ($F_{(2, 17)}$= 10,17; p = 0,0003; $F_{(2, 17)}$ = 15,41; p <0,0001) y demostraron que el pre-tratamiento con OEA no alteró el BEL alcanzado durante los días 2-4 de tratamiento con intoxicación con etanol, ni en la pre-alimentación forzada ($F_{(1, 17)}$ = 0,13; p = 0,72, ns) ni en la pos-alimentación ($F_{(1 , 17)}$ = 0,18; p = 0,67, ns). BEL también se determinó justo antes de la extracción del tejido (día 5), siendo 431,98 ± 34,90 g/dl para el grupo de vehículo + etanol y 445.82 ± 32.70 g/dl para el grupo OEA + etanol (Student t-test, p = 0,78, n.s.).

Ejemplo 4. Alteraciones de la ruta de señalización HMGB1/TLR4 y el efecto del pretratamiento con OEA en el consumo excesivo de etanol

Con el fin de explorar si los mediadores pro-inflamatorios como citocinas o NF-κB eran secretados por la activación de los receptores de la inmunidad innata inducidos por etanol, se comprobó la influencia de la intoxicación con etanol en la expresión de TLR4 y su activador endógeno, la citocina de señalización de peligro HMGB1. Además se comprobó el co-receptor TLR4, la proteína de diferenciación mieloide 2 (MD2), y la expresión del factor

de diferenciación mieloide 88 (MyD88), que es una proteína adaptadora de la cascada de señalización intracelular de transducción TLR4.

Hemos observado efectos principales en la exposición a etanol y el pretratamiento con OEA sobre la expresión de la HMGB1. Se previno el aumento de HMGB1 inducido por intoxicación con etanol ($F_{(1,13)}$ = 19,14, p = 0,0008) mediante el pretratamiento con OEA (Fig 3A;. F $F_{(1,13)}$= 4,58, p = 0,05). El análisis del ratio HMGB1 citoplásmico/nuclear (Fig 3B) reveló que el aumento total de la expresión HMGB1 (Fig 3A) en animales expuestos a etanol puede ser debido a un aumento de la citocina en ambos núcleo y citoplasma, manteniéndose en las ratas tratadas con etanol niveles más altos en el núcleo que en el citoplasma (relación n/c = 1,21). El pretratamiento con OEA disminuyó la expresión de HMGB1 inducida por etanol más eficientemente en la fracción citosólica (relación n/c = 1,48), indicativo de tener actividad sobre la liberación de HMGB1 del núcleo al citoplasma en lugar de a nivel de síntesis.

El tratamiento mediante intoxicación con etanol tiene un efecto principal tanto en TLR4 mRNA (Fig 3C;. $F_{(1, 17)}$= 10.08, p = 0.005) como en la expresión proteica (Fig 3D;. $F_{(1, 24)}$ = 10,04, p = 0,004), un efecto principal de OEA en TLR4 mRNA ($F_{(1, 17)}$= 6,08, p = 0,0246) y una interacción entre la exposición a etanol y OEA ($F_{(1, 24)}$= 9,67, p = 0,0048) en los niveles de la proteína TLR4. El pre-tratamiento con OEA fue capaz de reducir la sobreexpresión de TLR-4 mRNA inducida por etanol (Fig 3C;. $F_{(3, 17)}$= 5,86, p = 0,0061) y la expresión de proteínas (Fig.3D; $F_{(3,24)}$= 8,15, p = 0,0006).

La exposición a etanol por intoxicación aumenta la expresión de la proteína de MD2 (Figura 3E;. $F_{(1, 27)}$ = 6.83, p = 0,0145), pero los datos de expresión de ARNm no alcanzó significación estadística (datos no mostrados; $F_{(1, 31)}$= 3.79, p = 0.06, n.s.). El efecto principal del pre-tratamiento con OEA ($F_{(1, 27)}$= 4,24, p = 0,04) y una interacción (exposición a etanol x pre-tratamiento) ($F_{(1, 17)}$= 4,57, p = 0,0418) también se encontraron en los niveles de proteína MD2. El pre-tratamiento con OEA inhibió el incremento en MD2 inducido por etanol (Fig 3E; $F_{(3,30)}$ = 5,52, p = 0,044).

La intoxicación con etanol indujo un efecto principal en MyD88 mRNA ($F_{(1, 15)}$= 10,34, p = 0.0058; datos no mostrados) y la expresión proteica (Fig 3F;. $F_{(1, 30)}$= 9,55, p = 0,0043) y una interacción (exposición etanol x pre-tratamiento) se encontró también en los niveles de la proteína MyD88 ($F_{(1, 30)}$= 4,640, p = 0,0394). El pre-tratamiento con OEA inhibió el incremento de la expresión de la proteína MyD88 inducido por etanol (Fig 3F; $F_{(3, 32)}$ = 5,46, p = 0,042).

Ejemplo 5. Efectos de OEA sobre las citocinas proinflamatorias TNF-α y IL-1β y las quimioquinas MCP-1 en corteza frontal y plasma

El tratamiento con exceso de etanol aumentó la expresión de mRNA tanto de TNF-α como de IL-1β en la corteza frontal, aunque el pre-tratamiento con OEA no previno este efecto. Los niveles de la proteína TNF- α se incrementaron en la corteza frontal de ratas bajo el tratamiento con exceso de etanol ($F_{(1, 16)}$= 2,56, p = 0,1291) [aumento del 24% con respecto a los valores del control (95,2 ± 3,1 pg/mg de proteína)], y no se evitaron mediante la OEA (figura 4A;. $F_{(3,16)}$= 0,02, p = 0,89, ns). En el plasma, se observó un aumento contundente de los niveles de TNF- α en los animales tratados con etanol ($F_{(1,14)}$= 44,64, p <0,0001) [141% de aumento con respecto a los valores del control (113,0 ± 5,1 pg/mg de proteína)] y una interacción entre el etanol y el pre-tratamiento con OEA ($F_{(1,14)}$ = 4,85, p = 0,045). One-way ANOVA indicó que el pre-tratamiento con OEA previno parcialmente el aumento de TNF-α en plasma observado tras la intoxicación con etanol (Fig 4B;. $F_{(3,17)}$= 15,59, p <0,0001).

Los animales tratados con etanol mostraron un aumento de los niveles de proteína IL-1ß en la corteza frontal ($F_{(1,16)}$= 4,497, p=0,0499) [27% de aumento con respecto a los valores control (79,31 ± 0,29 pg/mg de proteína)], que fue prevenido por el pretratamiento con OEA (Fig. 4C; $F_{(1,16)}$ = 4,22, p=0,05). En plasma, se observó una interacción entre el pretratamiento con OEA y la administración de etanol ($F_{(1,20)}$= 18,15, p = 0,0004). El tratamiento con exceso de etanol aumentó los niveles plasmáticos de IL-1β [53% de aumento con respecto a los valores control (85,29 ± 7,8 pg/mg de proteína)], un efecto que fue prevenido por OEA (Fig. 4D; $F_{(3,20)}$= 8,20, p = 0,0009).

En cuanto a los niveles de MCP-1, hubo una interacción entre la administración de etanol y el pretratamiento con OEA ($F_{(1,33)}$ =10,06, p = 0,0033) y los principales efectos del etanol ($F_{(1,33)}$= 4,69, p=0,0377) y el pretratamiento con OEA ($F_{(1,33)}$=12.88, p=0,0011). El tratamiento con exceso de etanol aumentó los niveles de MCP-1 en la corteza front y el pretratamiento con OEA previno este efecto (Fig. 4E; $F_{(3,33)}$=9,92, p <0,0001).

Ejemplo 6. Efecto de OEA sobre la expresión de NF-κB y actividad tras exposición a intoxicación por etanol

Hemos explorado la ruta canónica pro-inflamatoria del NF-kB en extractos nucleares y citosólicos de corteza frontal después de los tratamientos farmacológicos. Hubo un efecto principal del tratamiento por intoxicación con etanol en los niveles de mRNA p65 (Fig 5A;. $F_{(1,33)}$ = 44,14, p <0,0001) y una interacción entre tratamiento con etanol y el pre-tratamiento con OEA ($F_{(1,33)}$ = 9.10, p = 0,0049). One-way ANOVA reveló que pre-administración de OEA

previno parcialmente el aumento en los niveles de ARNm de p65 inducido por etanol (Fig 5A;. $F_{(3,36)}$ = 19,87, p <0,0001). En el ensayo de actividad, se encontraban efectos principales de la exposición a alcohol ($F_{(1,16)}$ = 6,55, p = 0,021) y el pre-tratamiento con OEA ($F_{(1,16)}$= 16,66, p = 0,0009), siendo el aumento de la actividad nuclear de p65 inducida por etanol contrarrestado por el pre-tratamiento con OEA (Fig. 5C).

El tratamiento con exceso de etanol también aumentó la expresión del ARNm y la proteína IκBα (Figura 5 B & D;. $F_{(1,35)}$= 50.64, p <0,0001; $F_{(1,33)}$ = 37.69, p <0,0001) e interaccionó con el pre-tratamiento con OEA ($F_{(1,33)}$ = 8,81, p = 0,0055). Pre-tratamiento con OEA no contrarrestó el aumento en los niveles de ARNm de IκBα y la expresión proteica inducida por el etanol (Fig 5B y D;. $F_{(1,35)}$= 0,17, p = 0.6848 n.s.; $F_{(1,33)}$ = 0,17, p = 0,067, p = 0,7970, n.s., respectivamente).

Ejemplo 7. Efecto del pre-tratamiento con OEA en la expresión de mRNA de iNOS y COX-2 y peroxidación lipídica tras exposición a intoxicación por etanol

La activación de NF-κB culmina en la producción de mediadores inflamatorios tales como las enzimas inducibles iNOS y COX-2. El modelo de intoxicación por etanol utilizado en este estudio produjo un aumento contundente en la expresión de mRNA de iNOS ($F_{(1,17)}$ = 11,87, p = 0,0031) que fue completamente prevenido por el pre-tratamiento con OEA (Fig 6A;. $F_{(1,17)}$ = 8,71, p = 0,0089). La máxima expresión de la COX-2 observada tras el tratamiento con etanol en el experimento time-course se llevó a cabo 6h después del final del protocolo de intoxicación (ver de nuevo la Fig. 2F), lo que podría explicar la ausencia de un efecto significativo del etanol en la regulación del ARNm de la COX-2 en el segundo experimento, en el que se recogieron muestras de cerebro entre 2-4h después del final de la última administración de etanol (Fig 6B;. $F_{(1,32)}$ = 0,07, p = 0.7975, ns). Sin embargo, el 2-way ANOVA detectó un efecto principal del pre-tratamiento con OEA ($F_{(1,32)}$ = 7,17, p = 0,0011) y una interacción (etanol x OEA) ($F_{(1,32)}$ = 6,94, p = 0,0129). El análisis One-way ANOVA reveló que la OEA redujo los niveles de ARNm de la COX-2 con etanol, pero no en los animales tratados con vehículo (Figura 6B;. $F_{(3,32)}$ = 4,26, p = 0,0123).

Como resultado de una sobreactivación de las vías pro-inflamatorias, se pueden activar los mecanismos celulares de estrés oxidativo induciendo la formación de peróxidos lipídicos que afectarán a la viabilidad celular. Se comprobó en nuestros experimentos la formación del aducto de HNE, un compuesto reactivo formado por la descomposición de los peróxidos lipídicos. Se observó un aumento en la formación de HNE en la corteza frontal de los animales expuestos al tratamiento por intoxicación con etanol (Fig 6C;. $F_{(1,15)}$ = 14,56, p = 0,0017) y un efecto del pre-tratamiento con OEA ($F_{(1,15)}$ = 7,21, p = 0,017). OEA disminuyó la

formación de HNE, siendo el efecto significativo sólo en los animales tratados con etanol (Fig 6C;. ($F_{(3,18)}$ = 7,03, p = 0,0036).

Ejemplo 8. Efecto de la OEA sobre la caspasa-8 y la caspasa-3 proapoptótica tras el tratamiento por intoxicación con etanol

Estudiamos si la inducción de la cascada de señalización TLR4/NF-κB por etanol culminó en un daño neuronal. Comprobamos la expresión y la actividad de la enzima proapoptótica caspasa-3 en las cortezas frontales de los animales bajo los diferentes tratamientos farmacológicos, y la sobreexpresión de la caspasa-8, que actúa como una caspasa intermedia en la ruta de señalización TLR4-MyD88/caspasa-8/caspasa-3 (Liu et al., 2013).

Caspasa-8 mRNA se sobreexpresó tras intoxicación con etanol ($F_{(1,15)}$ = 13.37, p = 0,023), y el pre-tratamiento con OEA revirtió este efecto (Figura 6D;. $F_{(3,18)}$ = 6,95, p = 0,037). Caspasa-3 mRNA se sobreexpresó con alcohol, pero OEA no fue capaz de prevenir este efecto. En cuanto a los niveles de la proteína caspasa-3 (Fig. 6E), se observó una interacción entre la exposición a alcohol y el pre-tratamiento con OEA ($F_{(1,15)}$ = 7,95, p = 0,0129) y un efecto principal del etanol ($F_{(1,15)}$ = 12.30, p = 0,0032). El análisis One-way ANOVA indicó que el pre-tratamiento con OEA previno la sobreexpresión de la caspasa-3 inducida por etanol (Fig.6E; $F_{(3,18)}$ = 7,29, p = 0,0031). Además, el tratamiento con intoxicación con etanol indujo un aumento en la actividad de la caspasa-3 en la corteza frontal ($F_{(1,32)}$ = 20,98, p <0,0001), que fue revertido por el tratamiento previo con OEA (Fig 6F;. $F_{(1,32)}$ = 4,744, p = 0,0369).

Ejemplo 9. Efecto de la OEA sobre la corticosterona plasmática y los niveles de LPS

Para comprobar los efectos sobre el eje (HPA), hemos probado la influencia de la OEA en el aumento de los niveles de corticosterona inducido por etanol (Fig. 7A). Los datos revelaron un efecto significativo del tratamiento ($F_{(1,29)}$ = 5,44, p = 0,00268) y una interacción entre la intoxicación con etanol y el pre-tratamiento con OEA ($F_{(1,29)}$ = 4,77, p = 0,0373). Se observó un aumento en los niveles de corticosterona en los animales expuestos al tratamiento por intoxicación con etanol, que se previno completamente mediante el pre-tratamiento con OEA ($F_{(3,29)}$ = 4,21, p = 0,0136). OEA no modificó los niveles de corticosterona plasmáticos en los animales control (Fig. 7A).

Además, se estudió el efecto del pre-tratamiento con OEA en la permeabilidad intestinal a endotoxinas mediante la comprobación de los niveles de LPS en plasma después de los tratamientos. El tratamiento por intoxicación con etanol incrementa significativamente los niveles de LPS en plasma aproximadamente un 80% respecto al control ($F_{(1,27)}$ = 12,40, p =

0,0015). Los animales que se pretrataban con OEA y recibían etanol mostraron niveles plasmáticos de LPS más bajos (44% de aumento con respecto al control), un valor que no difieren ni con el grupo control ni con el grupo de etanol. Two-way ANOVA indicó que no había ningún efecto significativo del pretratamiento ($F_{(1,27)}$= 0,50, p = 0,4872), y que no hay interacción entre la exposición a etanol y el pretratamiento con OEA ($F_{(1,27)}$= 2,376, p = 0,01348).

Ejemplo 10. Efecto de OEA en los animales control

La curva temporal de OEA en los animales control indica que OEA no modificó significativamente los parámetros en los controles. Sin embargo, dado que se observan algunas tendencias en comparación con los niveles del control 3 h después de la inyección (es decir, TLR4 y p65), no podemos descartar por completo que la OEA pueda afectar a animales control en los estadios tempranos.

Ejemplo 11. Efecto de OEA en los síntomas de tipo depresivo y ansiedad

Con el fin de determinar los efectos de OEA en los comportamientos relacionados con el etanol durante la abstinencia alcohólica, se realizó la prueba de natación forzada y la prueba del laberinto en cruz elevado para comprobar los síntomas de tipo depresivo y ansiedad respectivamente. Nuestros resultados mostraron que la intoxicación con etanol provocaba una reducción en los tiempos de natación y escalada (figura 8A & B., $F_{(1,21)}$ = 3,281, p = 0,05; $F_{(1,21)}$ = 7.326, p = 0,0132, respectivamente) y un aumento de la inmovilidad y la latencia (figura 8C + D; $F_{(1,21)}$ = 9,53, p = 0,0056; $F_{(1,21)}$ = 9,53, p = 0,006, respectivamente) en la prueba de natación forzada. Se observó también una interacción entre el tratamiento con OEA y la intoxicación con etanol en los parámetros de inmovilidad y latencia ($F_{(1,21)}$ = 4,43, p = 0,0475; $F_{(1,21)}$ = 9,53, p = 0,006, respectivamente). El pre-tratamiento con OEA fue capaz de prevenir los síntomas de tipo depresivo inducidos por el alcohol, normalizando las medidas de natación, inmovilidad y latencia (Figura 8 A, C y D;. $F_{(3,21)}$ = 2,935, p = 0,05; $F_{(3,21)}$= 5,77, p = 0,048; $F_{(3,21)}$ = 4,17, p = 0,018, respectivamente).

En cuanto a los comportamientos de tipo ansioso, la prueba Kruskal-Wallis ANOVA indicó que había un efecto general de los tratamientos en el porcentaje de entradas (Fig 8E;. H = 8,074, p = 0,05) y en el tiempo (Fig 8F;. H = 7,702, p = 0,0526) de permanencia en los brazos abiertos del laberinto elevado 24h después de la intoxicación con etanol. Aunque hubo una clara tendencia que mostraba un claro efecto ansiolítico de OEA en los animales tratados con etanol y control, la prueba Dunn´s *post hoc* no encontró efectos significativos en múltiples comparaciones. El efecto de los tratamientos en las mismas medidas de

ansiedad, el porcentaje de entradas (Fig. 8G) y el tiempo (Fig. 8H) de permanencia en los brazos abiertos, no fue significativa 12 días después de la intoxicación con etanol (H = 6,377, p = 0,09 y H = 5.619, p = 0,13, n.s., respectivamente).

BIBLIOGRAFÏA

Adachi J, Mizoi Y, Fukunaga T, Ogawa Y, Ueno Y & Imamichi, H (1991) Degrees of alcohol intoxication in 117 hospitalized cases. *J Stud Alcohol* 52: 448-453.

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

Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I & Guerri C (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci* 30: 8285-8295.

Bilbao A, Blanco E, Luque-Rojas MJ, Suarez J, Palomino A, Vida M, Araos P, Bermudez-Silva FJ, Fernandez-Espejo E, Spanagel R & Rodriguez de Fonseca F (2013) Oleoylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPARalpha receptor-independent mechanism. *Addict Biol* 18: 78-87.

Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavón FJ, Giuffrida A, Suárez J, García-Marchena N, Baixeiras E, Gómez de Heras R, Orio L, Alén F, Ciccocioppo R, Cravatt BF, Parsons LH, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F (2015) Role of the Satiety Factor Oleoylethanolamide in Alcoholism. *Addiction Blology* (in press).

Blednov YA, Benavidez JM, Geil C, Perra S, Morikawa H & Harris RA (2011) Activation of inflammatory signaling by lipopolysaccharide produces a prolonged increase of voluntary alcohol intake in mice. *Brain Behav Immun* 25 Suppl 1: S92-S105.

Breese GR, Knapp DJ, Overstreet DH, Navarro M, Wills TA & Angel RA (2008) Repeated lipopolysaccharide (LPS) or cytokine treatments sensitize ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 33: 867-876.

Cippitelli A, Damadzic R, Hamelink C, Brunnquell M, Thorsell A, Heilig M & Eskay RL (2014) Binge-like ethanol consumption increases corticosterone levels and neurodegneration

whereas occupancy of type II glucocorticoid receptors with mifepristone is neuroprotective. *Addict Biol* 19:27-36.

Collins MA, Tajuddin N, Moon KH, Kim HY, Nixon K & Neafsey E.J (2014) Alcohol, phospholipase A2-associated neuroinflammation, and omega3 docosahexaenoic acid protection. *Mol Neurobiol* 50:239-245.

Collins MA, Zou JY & Neafsey EJ (1998) Brain damage due to episodic alcohol exposure in vivo and in vitro: furosemide neuroprotection implicates edema-based mechanism. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 12:221-230.

Crews F, Nixon K, Kim D, Joseph J, Shukitt-Hale B, Qin L & Zou J (2006) BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1938-1949.

Crews FT, Braun CJ, Hoplight B, Switzer RC, 3rd & Knapp DJ (2000) Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1712-1723.

Crews FT, Collins MA, Dlugos C, Littleton J, Wilkins L, Neafsey EJ, Pentney R, Snell LD, Tabakoff B, Zou J & Noronha A (2004) Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? *Alcohol Clin Exp Res* 28: 350-364.

Crews, F.T., Qin, L., Sheedy, D., Vetreno, R.P. & Zou, J. (2013) High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 73:602-612.

Dantzer R, O´Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9(1):46-56.

Fernandez-Lizarbe, S., Montesinos, J. & Guerri, C. (2013) Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem* 126: 261-273.

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G & Piomelli D (2003) Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature* 425: 90-93.

Gonzalez-Aparicio R, Blanco E, Serrano A, Pavon FJ, Parsons LH, Maldonado R, Robledo P, Fernandez-Espejo E & de Fonseca FR (2014) The systemic administration of oleoylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *Int J Neuropsychopharmacol* 17: 455-468.

Hamelink C, Hampson A, Wink DA, Eiden LE & Eskay RL (2005) Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 780-788.

Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B & Persidsky Y (2008) Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free radical biology & medicine* 45: 1542-1550.

He J & Crews FT (2008) Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol* 210: 349-358.

Hunt WA (1993) Are binge drinkers more at risk of developing brain damage? *Alcohol* 10: 559-561.

Jin P, Yu HL, Tian L, Zhang F & Quan ZS (2015) Antidepressant-like effects of oleoylethanolamide in a mouse model of chronic unpredictable mild stress. *Pharmacol Biochem Behav* 133: 146-154.

Knapp DJ & Crews FT (1999) Induction of cyclooxygenase-2 in brain during acute and chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 23: 633-643.

Leclercq S, Cani PD, Neyrinck AM, Starkel P, Jamar F, Mikolajczak M, Delzenne NM & de Timary P (2012) Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain Behav Immun* 26: 911-918.

Lemmers B, Salmena L, Bidère N, Su H, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Ohashi PS, Jurisicova A, Lenardo M, Hakem R, Hakem A. Essential role for caspase-8 in toll-like receptors and NfκB signaling. *The J of Biol Chem* 282:7416-7423.

Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, Kurokawa K, Hotta Y, Ishikawa N, Nakashima I. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci* 113: 635:641.

Liu JW, Zhu HT, Chen KL, Qiu C, Tang KF, Niu XL (2013) Selenium attenuates high glucose-induced ROS/TLR4 involved apoptosis of rat cardiomyocyte. *Bio Trace Elem Res* 156:262-270

Majchrowicz E (1975) Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacologia* 43: 245-254.

McClain CJ & Cohen DA (1989) Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 9: 349-351.

McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB & Deaciuc I (2004) Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G497-502.

Melis M, Pillolla G, Luchicchi A, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR & Pistis M. (2008) Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. *J Neurosci* 28: 13985-13994.

Montesinos, J., Pascual, M., Pla, A., Maldonado, C., Rodriguez-Arias, M., Minarro, J. & Guerri, C. (2015) TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain Behav Immun* 45: 233-244.

Obernier JA, Bouldin TW & Crews FT (2002a) Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcohol Clin Exp Res* 26: 547-557.

Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS & Crews FT (2002b) Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 521-532.

Pascual, M., Balino, P., Alfonso-Loeches, S., Aragon, C.M. & Guerri, C. (2011) Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav Immun* 25 Suppl 1: S80-91.

Pascual, M., Balino, P., Aragon, C.M. & Guerri, C. (2015) Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology* 89: 352-359.

Pascual, M., Pla, A., Minarro, J. & Guerri, C. (2014) Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive

dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol Alcohol* 49: 187-192.

Plaza-Zabala A, Berrendero F, Suarez J, Bermudez-Silva FJ, Fernandez-Espejo E, Serrano A, Pavon FJ, Parsons LH, De Fonseca FR, Maldonado R, Robledo P. (2010) Effects of the endogenous PPAR-alpha agonist, oleoylethanolamide on MDMA-induced cognitive deficits in mice. *Synapse* 64(5):379-89.

Qin L & Crews FT (2012) NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 9:5.

Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT (2008) Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation.* 5:10.

Ribeiro A, Pontis S, Mengatto L, Armirotti A, Chiurchiu V, Capurro V, Fiasella A, Nuzzi A, Romeo, E, Moreno-Sanz G, Maccarrone M, Reggiani A, Tarzia G, Mor M, Bertozzi F, Bandiera T & Piomelli D (2015) A Potent Systemically Active N-Acylethanolamine Acid Amidase Inhibitor that Suppresses Inflammation and Human Macrophage Activation. *ACS Chem Biol*.

Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C & Piomelli D. (2001) An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 414: 209-212.

Sayd A, Anton M, Alen F, Caso JR, Pavon J, Leza JC, Rodriguez de Fonseca F, Garcia-Bueno B & Orio L (2014) Systemic administration of oleoylethanolamide protects from neuroinflammation and anhedonia induced by LPS in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*: 18.

Smaga I, Bystrowska B, Gawkinski D, Pomierny B, Stankowicz P, Filip M (2014) Antidepressants and changes in concentration of endocannabinoids and N-acylethanolamides in rat brain structures. *Neurotox Res* 26:190-206.

Snyder H, Williams D, Zink B. & Reilly K (1992) Accuracy of blood ethanol determination using serum osmolality. *J Emerg Med* 10: 129-133.

Stahel P, Smith WR, Bruchis J, Rabb CH (2008) Peroxisome proliferator-activated receptors: "key" regulators of neuroinflammation after traumatic brain injury. *PPAR Res* 2008: 538141.

Sun Y, Alexander SP, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA & Bennett AJ (2007) Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol* 152: 734-743.

Tajuddin N, Moon KH, Marshall SA, Nixon K, Neafsey EJ, Kim HY & Collins MA (2014) Neuroinflammation and neurodegeneration in adult rat brain from binge ethanol exposure: abrogation by docosahexaenoic acid. *PLoS One* 9:e101223.

Tiwari M, Kotwal J, Kotwal A, Mishra P, Dutta V & Chopra S (2013) Correlation of haemoglobin and red cell indices with serum ferritin in Indian women in second and third trimester of pregnancy. *Medical journal, Armed Forces India* 69: 31-36.

Tiwari V & Chopra K (2012) Attenuation of oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis by curcumin prevents cognitive deficits in rats postnatally exposed to ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 224: 519-535.

Tiwari V & Chopra K (2013) Resveratrol abrogates alcohol-induced cognitive deficits by attenuating oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in the adult rat brain. *Neurochemistry international* 62:861-869.

Valles SL, Blanco AM, Pascual M & Guerri C (2004) Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol* 14:365-371.

Vetreno RP & Crews FT (2012) Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neuroscience* 226: 475-488.

Viceconte N, Burguillos MA, Herrera AJ, De Pablos RM, Joseph B, Venero JL (2015) Neuromelanin activates proinflammatory microglia through a caspase-8-dependent mechanism. *J Neuroinflammation* 12:5.

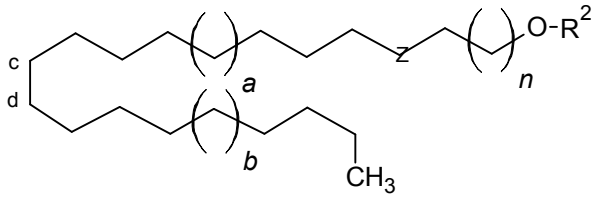
Yang, G., Meng, Y., Li, W., Yong, Y., Fan, Z., Ding, H., Wei, Y., Luo, J. & Ke, Z.J. (2011) Neuronal MCP-1 mediates microglia recruitment and neurodegeneration induced by the mild impairment of oxidative metabolism. *Brain Pathol* 21: 279-297.

Zahr, N.M., Alt, C., Mayer, D., Rohlfing, T., Manning-Bog, A., Luong, R., Sullivan, E.V. & Pfefferbaum, A. (2014) Associations between in vivo neuroimaging and postmortem brain cytokine markers in a rodent model of Wernicke's encephalopathy. *Exp Neurol* 261: 109-119.

Zou, J.Y. & Crews, F.T. (2014) Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PLoS One* 9: e87915.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un compuesto de fórmula general (I)



(I)

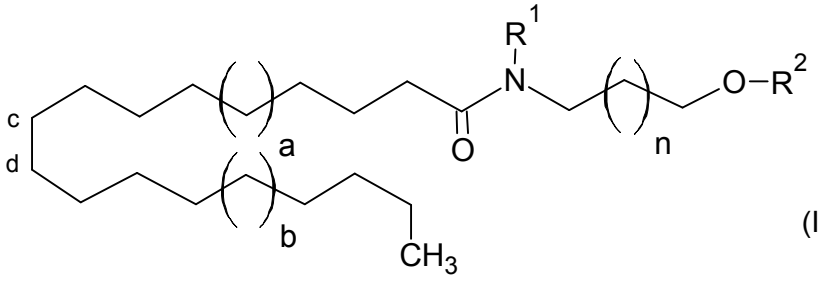
o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros o solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables,

donde:

- n es un número entero que está entre 0 y 5;
- a y b se determinan por la siguiente formula: $0 \leq (a + b) \leq 4$; y
- Z es un grupo que se selecciona de entre –C(O)N(R^0)-; –(R^0)NC(O)-; -(O)CO-; O; NR^0 ; y S, y donde R^0 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un alquilo sustituido o no sustituido, hidrógeno, un alquilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, un acilo (C1–C6) sustituido o no sustituido, homoalquilo, y arilo, y donde hasta ocho átomos de hidrógeno del compuesto pueden estar sustituidos por metilo o un doble enlace, y el puente molecular que hay entre c y d puede ser saturado o insaturado;

en la elaboración de un medicamento o un nutracéutico para la prevención, alivio y/o tratamiento preventivo o terapéutico de los trastornos por consumo de alcohol.

2.- El uso de un compuesto según la reivindicación anterior, donde el compuesto presenta la fórmula (II),



(II)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables,

donde:

- n es un número entero que está entre 0 y 4;
- a y b se determinan por la siguiente formula: $0 \leq (a + b) \leq 3$; y

- R^1 y R^2 son miembros independientes que se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno (H), un alquilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, un acilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, y donde hasta ocho átomos de hidrógeno del compuesto pueden estar sustituidos por metilo o un doble enlace, y el puente molecular que hay entre c y d puede ser saturado o insaturado.

3.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde a = 1 y b = 1.

4.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde n = 0 o 1.

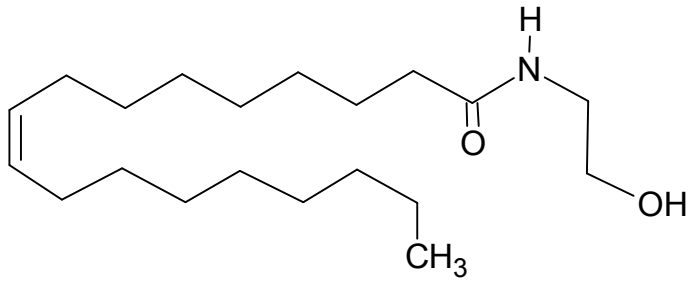
5.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde R^1 y R^2 son hidrógenos (H).

6.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el puente entre el carbono c y el carbono d es un doble enlace.

7.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el compuesto de fórmula (I) es una aciletanolamida.

8.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la aciletanolamida se selecciona de la lista que consiste en oleoiletanolamida (OEA), palmitoiletanolamida (PEA), estearoiletanolamida (SEA) o cualquier de sus combinaciones.

9.- El uso del compuesto según la reivindicación 8, donde la aciletanolamida es la oleoiletanolamida (OEA), de fórmula (III).



(III)

10.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde los trastornos por consumo de alcohol se selecciona de la lista que consiste en: intoxicación etílica o embriaguez patológica y síndrome de dependencia al alcohol.

11.- El uso del compuesto según la reivindicación 10, donde el trastorno por consumo de alcohol es la intoxicación etílica o la embriaguez patológica.

12.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el trastorno por consumo de alcohol es el síndrome de dependencia al alcohol.

13.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se realiza con carácter previo a la ingesta de alcohol.

14.- El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el uso es preventivo y la administración del compuesto de la invención se hace durante la ingesta de alcohol.

15.- El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que además comprende un segundo principio activo seleccionado de la lista que consiste en ibuprofeno, paracetamol, vitamina B12 y cafeína, o cualquiera de sus combinaciones.

16.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde la composición nutracéutica se selecciona de la lista que comprende o consiste en preparaciones basadas en electrólitos y/o bebidas isotónicas, zumos naturales, infusiones de cardo mariano, preparados con cafeína o cualquiera de sus combinaciones.

17. Composión nutracéutica que comprende un compuesto tal y como se define este en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

18. La composición nutracéutica de la reivindicación 17, donde dicha composición se selecciona de la lista que comprende o consiste en preparaciones basadas en electrólitos y/o bebidas isotónicas, zumos naturales, infusiones de cardo mariano, preparados con cafeína o cualquiera de sus combinaciones.

Fig.1

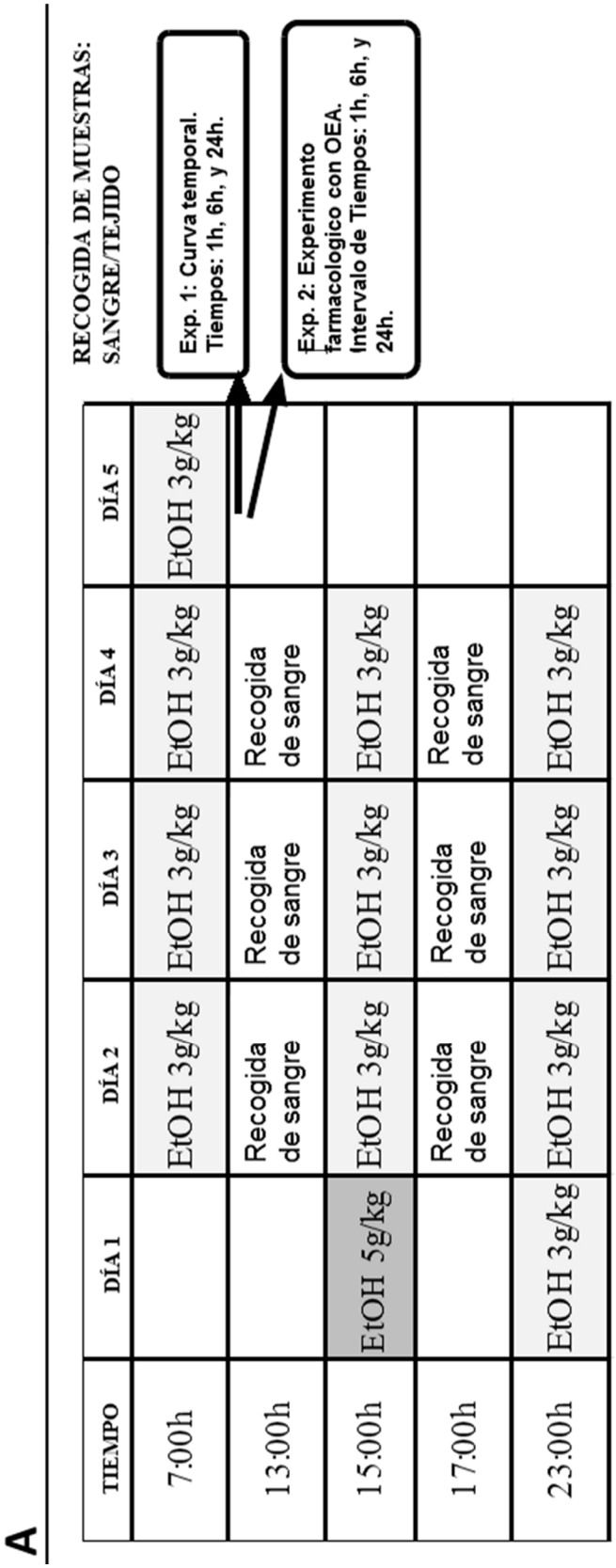

A
RECOGIDA DE MUESTRAS:
SANGRE/TEJIDO
Exp. 1: Curva temporal.
Tiempos: 1h, 6h, y 24h.
Exp. 2: Experimento
farmacologico con OEA.
Intervalo de Tiempos: 1h, 6h, y
24h.
TIEMPO
DÍA 1
DÍA 2
DÍA 3
DÍA 4
DÍA 5
7:00h
EtOH 3g/kg
EtOH 3g/kg
EtOH 3g/kg
EtOH 3g/kg
13:00h
Recogida de sangre
Recogida de sangre
Recogida de sangre
Recogida de sangre
15:00h
EtOH 5g/kg
EtOH 3g/kg
EtOH 3g/kg
EtOH 3g/kg
17:00h
Recogida de sangre
Recogida de sangre
Recogida de sangre
23:00h
EtOH 3g/kg
EtOH 3g/kg
EtOH 3g/kg
EtOH 3g/kg

Fig.1 cont.

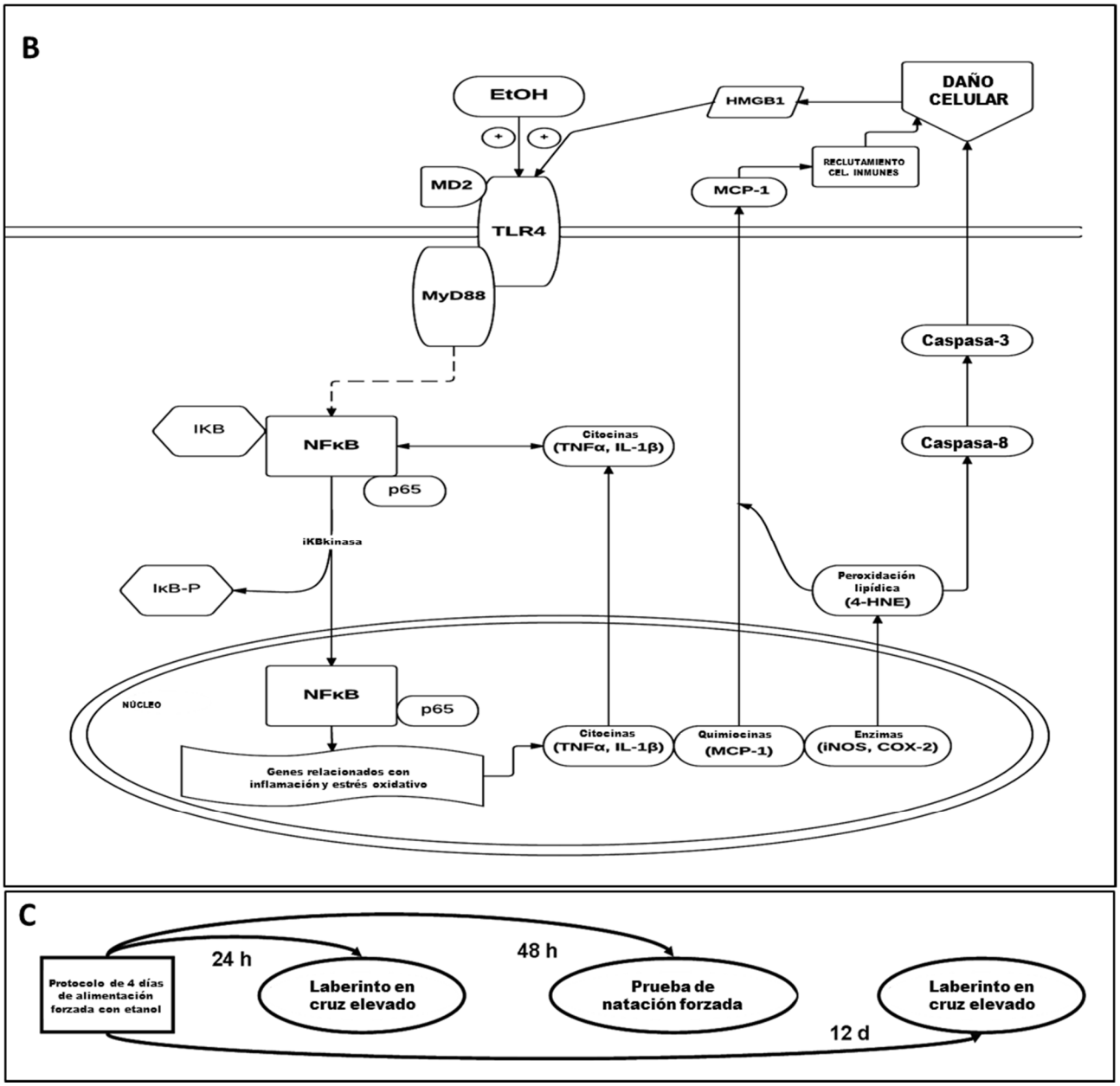

B
EtOH
HMGB1
DAÑO CELULAR
RECLUTAMIENTO CEL. INMUNES
MCP-1
MD2
TLR4
MyD88
Caspasa-3
Caspasa-8
IKB
NFκB
p65
Citocinas (TNFα, IL-1β)
iKBkinasa
IκB-P
Peroxidación lipídica (4-HNE)
NÚCLEO
NFκB
p65
Citocinas (TNFα, IL-1β)
Quimiocinas (MCP-1)
Enzimas (iNOS, COX-2)
Genes relacionados con inflamación y estrés oxidativo
C
Protocolo de 4 días de alimentación forzada con etanol
24 h
Laberinto en cruz elevado
48 h
Prueba de natación forzada
Laberinto en cruz elevado
12 d

Fig. 2

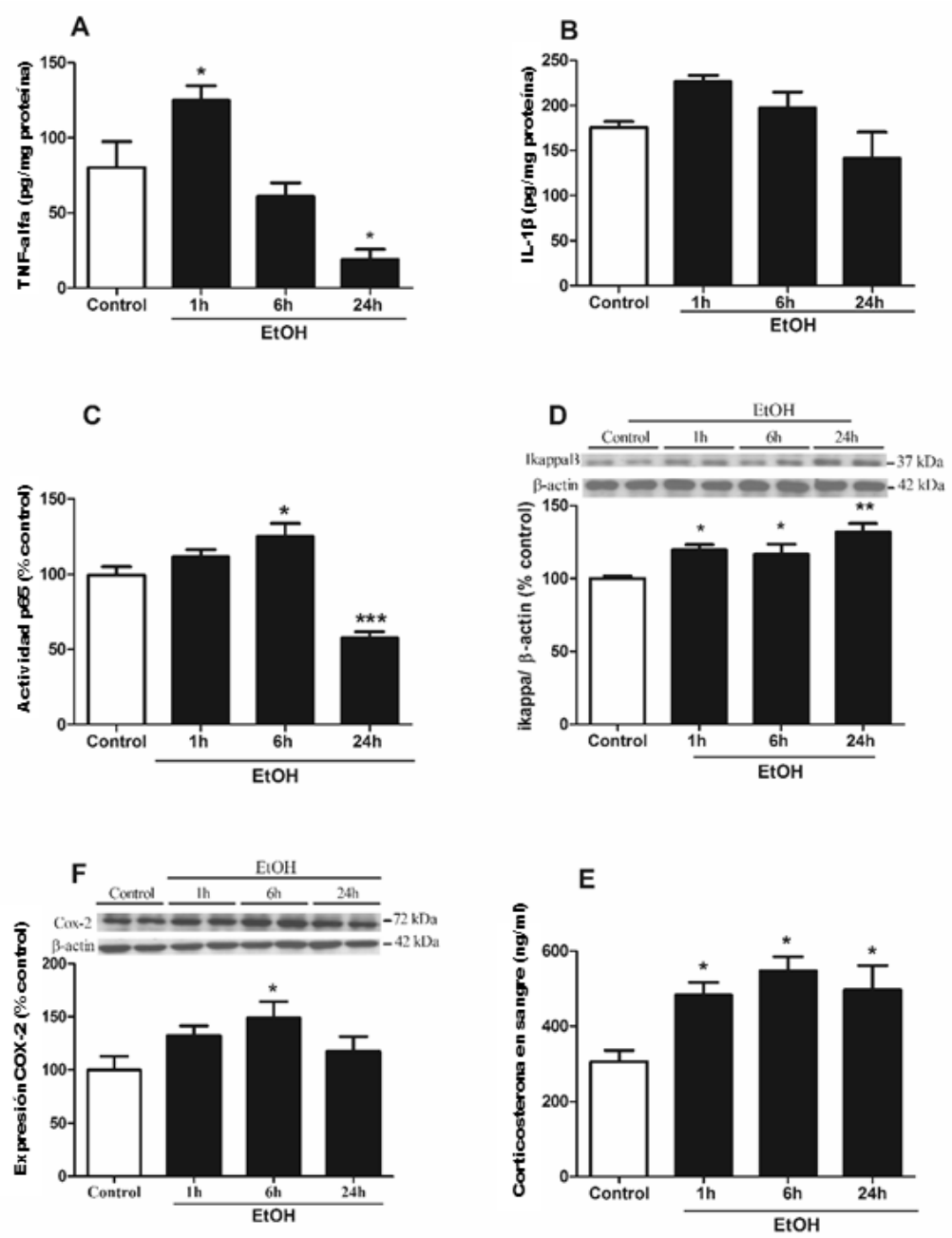

A
TNF-alfa (pg/mg proteína)
150
100
50
0
Control
1h
6h
24h
EtOH
B
IL-1β (pg/mg proteína)
250
200
150
100
50
0
Control
1h
6h
24h
EtOH
C
Actividad p65 (% control)
150
100
50
0
Control
1h
6h
24h
EtOH
D
EtOH
Control
1h
6h
24h
Ikappa13
β-actin
37 kDa
42 kDa
ikappa/ β-actin (% control)
150
100
50
0
Control
1h
6h
24h
EtOH
F
EtOH
Control
1h
6h
24h
Cox-2
β-actin
72 kDa
42 kDa
Expresión COX-2 (% control)
200
150
100
50
0
Control
1h
6h
24h
EtOH
E
Corticosterona en sangre (ng/ml)
600
400
200
0
Control
1h
6h
24h
EtOH

Fig. 3

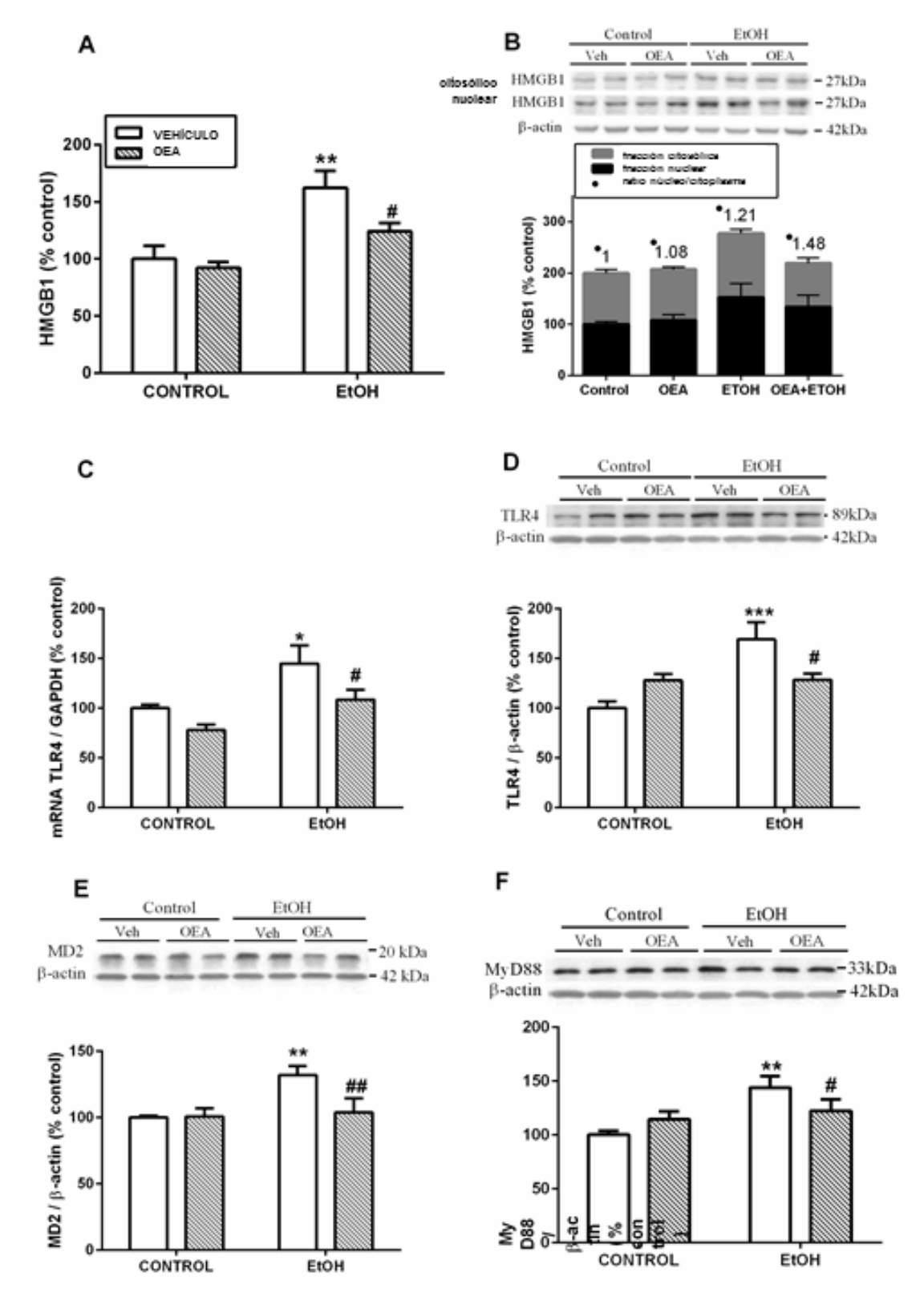

A
VEHÍCULO
OEA
HMGB1 (% control)
CONTROL
EtOH
B
Control
EtOH
Veh
OEA
HMGB1
β-actin
27kDa
42kDa
HMGB1 (% control)
Control
OEA
ETOH
OEA+ETOH
C
mRNA TLR4 / GAPDH (% control)
D
TLR4
89kDa
TLR4 / β-actin (% control)
E
MD2
20 kDa
MD2 / β-actin (% control)
F
MyD88
33kDa

Fig. 4

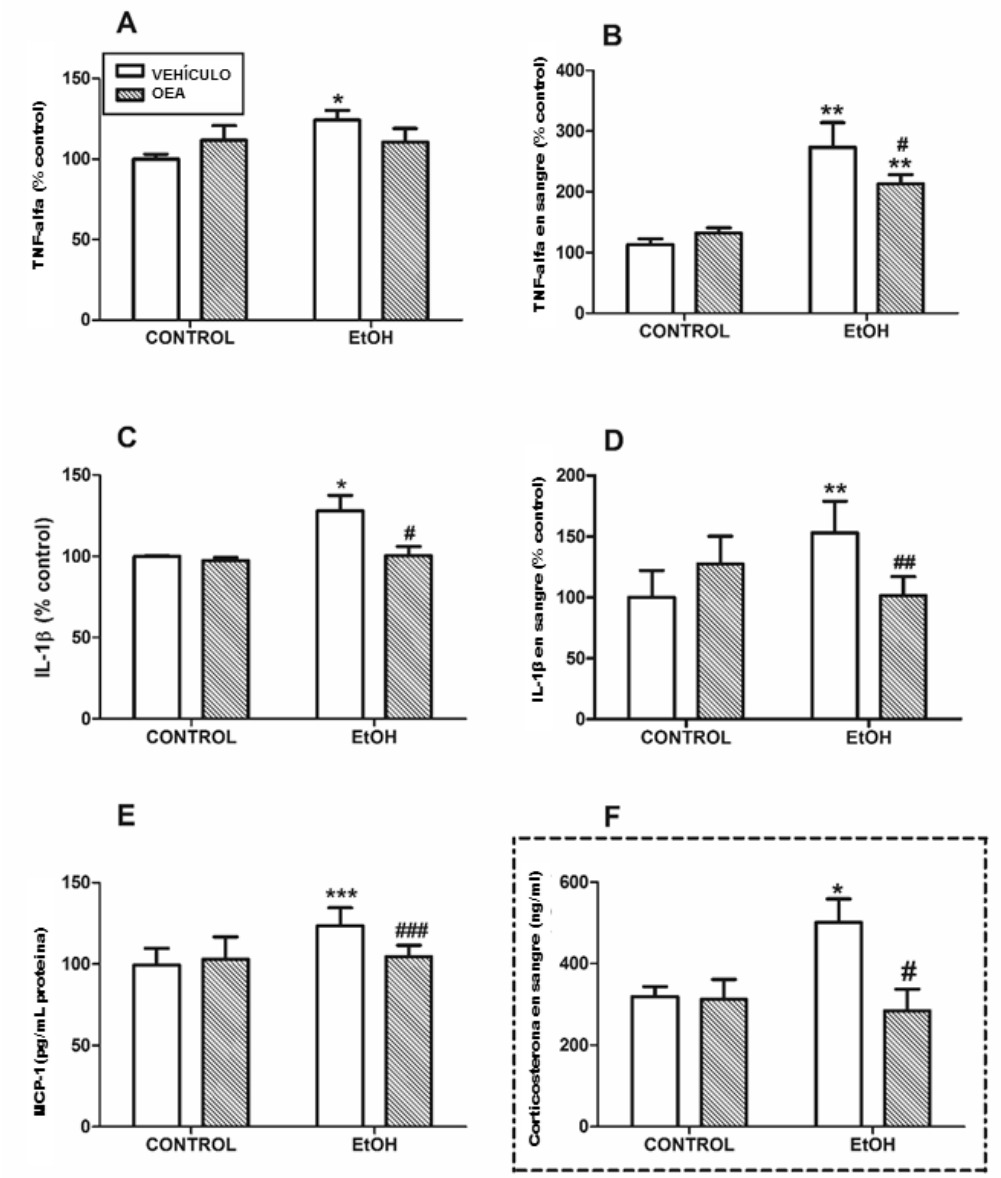

A
VEHÍCULO
OEA
TNF-alfa (% control)
150
100
50
0
*
CONTROL
EtOH
B
TNF-alfa en sangre (% control)
400
300
200
100
0
**
#
**
CONTROL
EtOH
C
IL-1β (% control)
150
100
50
0
*
#
CONTROL
EtOH
D
IL-1β en sangre (% control)
200
150
100
50
0
**
##
CONTROL
EtOH
E
MCP-1 (pg/mL proteína)
150
100
50
0
***
###
CONTROL
EtOH
F
Corticosterona en sangre (ng/ml)
600
400
200
0
*
#
CONTROL
EtOH

Fig. 5

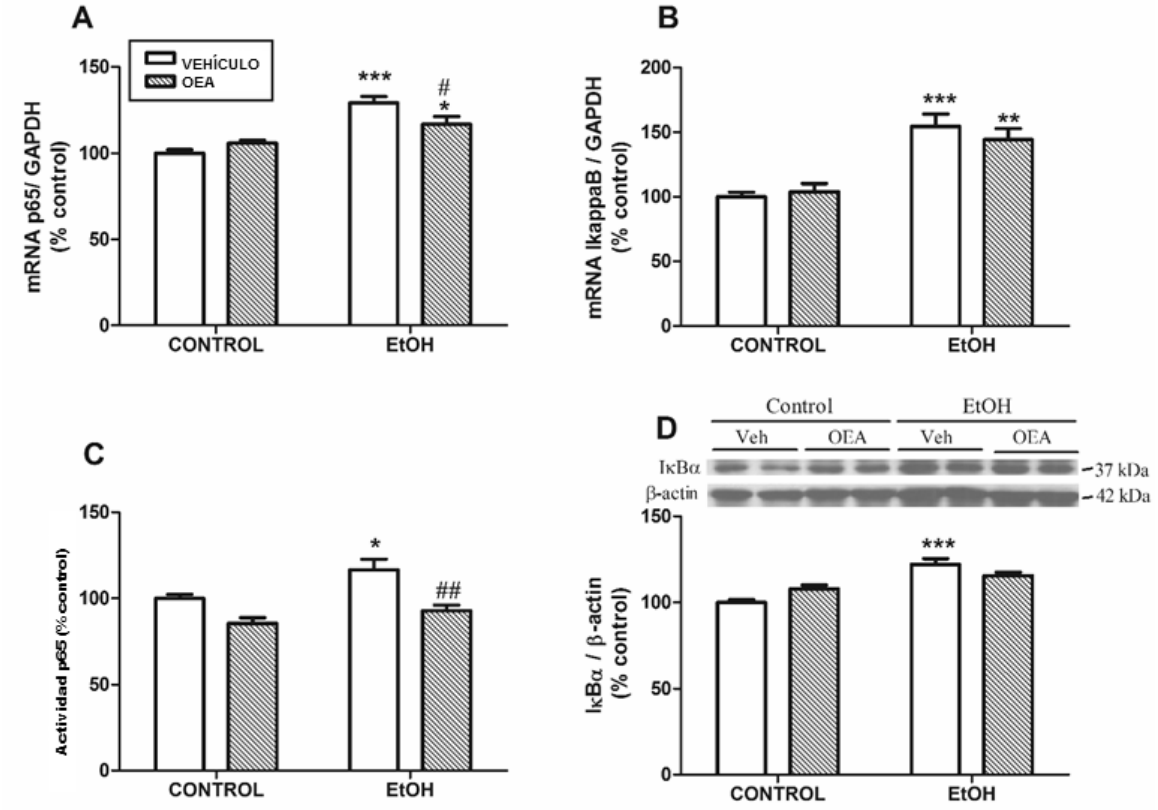

A
VEHÍCULO
OEA
mRNA p65/ GAPDH (% control)
150
100
50
0
***
#
*
CONTROL
EtOH
B
mRNA IkappaB / GAPDH (% control)
200
150
100
50
0
***
**
CONTROL
EtOH
C
Actividad p65 (% control)
150
100
50
0
*
##
CONTROL
EtOH
D
Control
EtOH
Veh
OEA
Veh
OEA
IκBα
β-actin
37 kDa
42 kDa
IκBα / β-actin (% control)
150
100
50
0
***
CONTROL
EtOH

Fig. 6

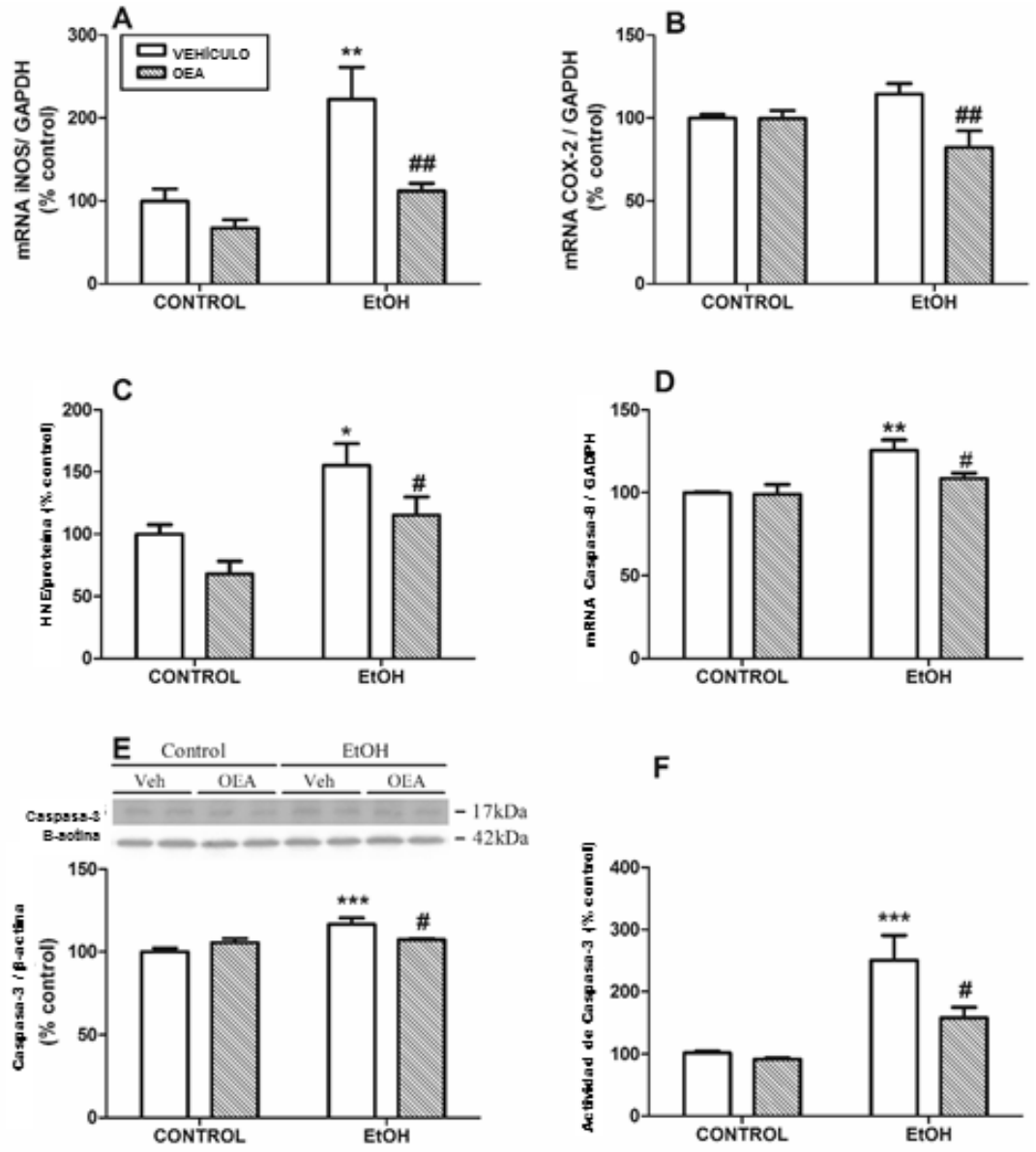

A
VEHÍCULO
OEA
mRNA iNOS/ GAPDH (% control)
300
200
100
0
**
##
CONTROL
EtOH
B
mRNA COX-2 / GAPDH (% control)
150
100
50
0
##
CONTROL
EtOH
C
HNE/proteína (% control)
200
150
100
50
0
*
#
CONTROL
EtOH
D
mRNA Caspasa-8 / GADPH
150
100
50
0
**
#
CONTROL
EtOH
E
Control
EtOH
Veh
OEA
Veh
OEA
Caspasa-3
B-actina
17kDa
42kDa
Caspasa-3 / β-actina (% control)
150
100
50
0
***
#
CONTROL
EtOH
F
Actividad de Caspasa-3 (% control)
400
300
200
100
0
***
#
CONTROL
EtOH

Fig. 7

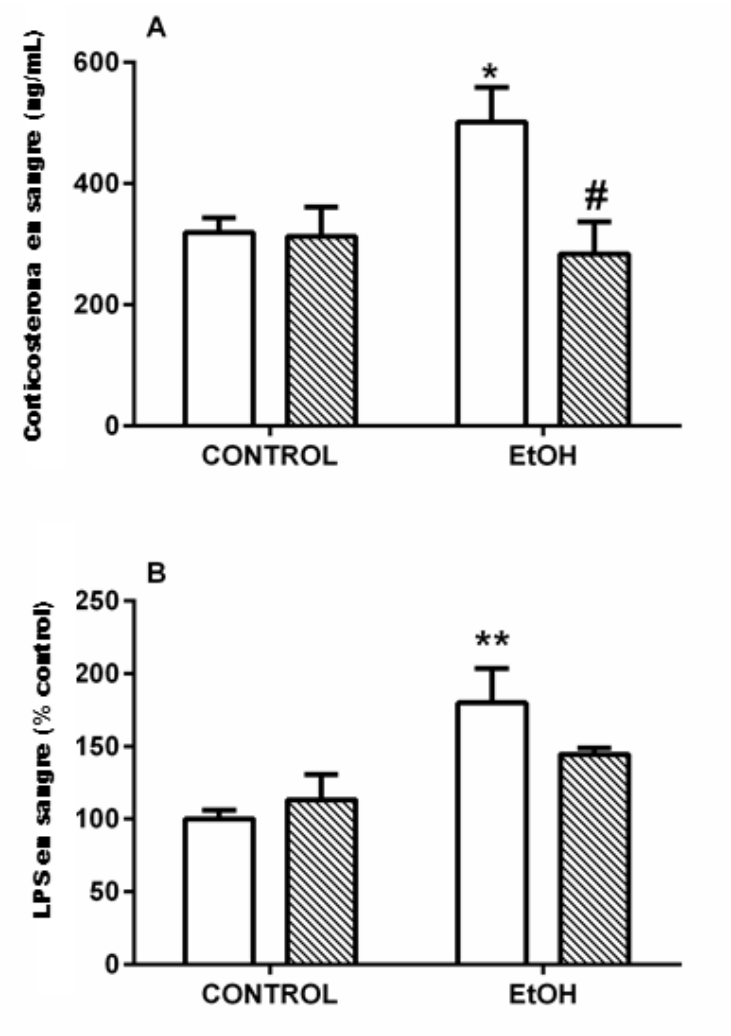
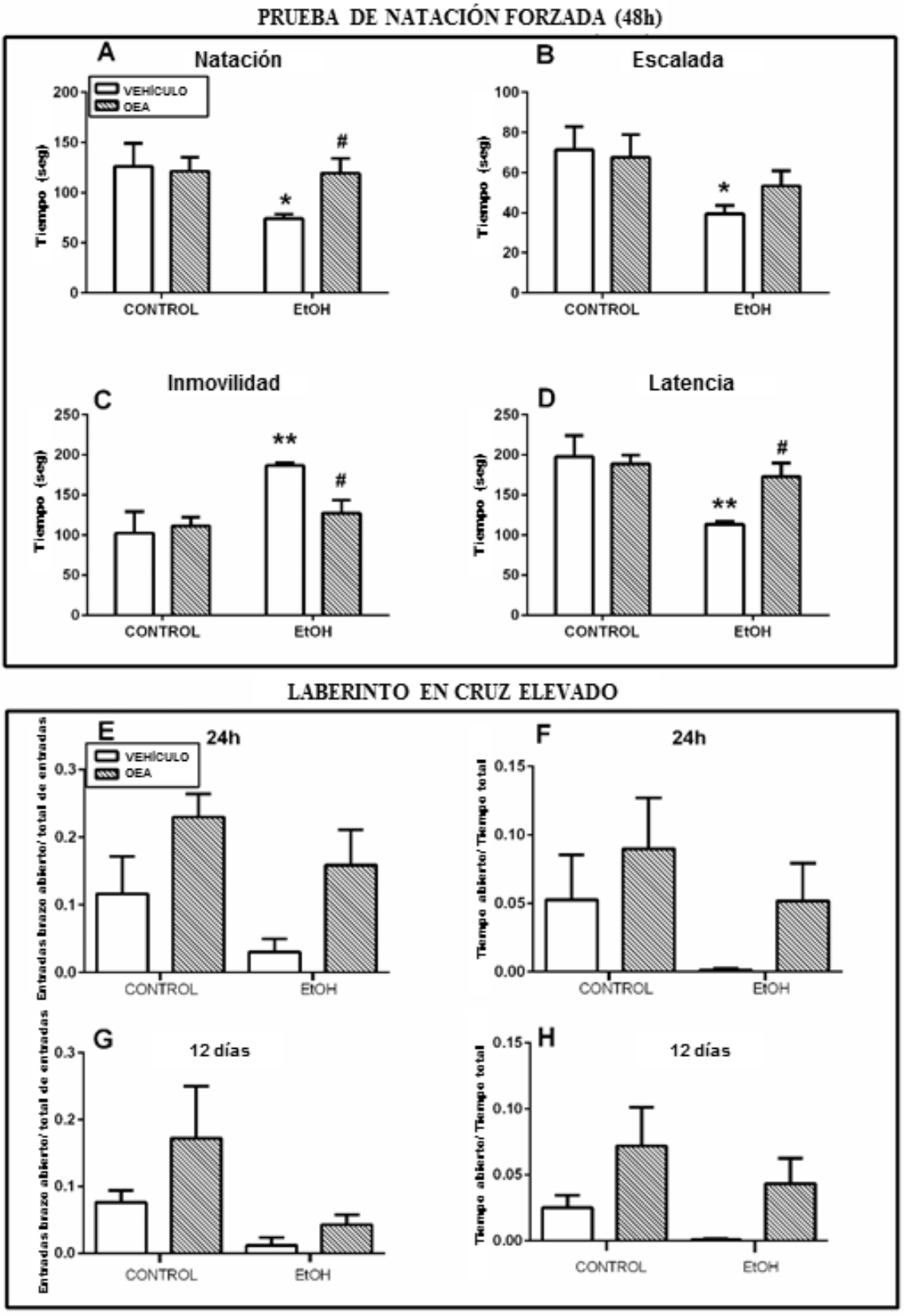

A
Corticosterona en sangre (ng/mL)
600
400
200
0
*
#
CONTROL
EtOH
B
LPS en sangre (% control)
250
200
150
100
50
0
**
CONTROL
EtOH

Fig. 8


PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA (48h)
A
Natación
VEHÍCULO
OEA
Tiempo (seg)
CONTROL
EtOH
B
Escalada
C
Inmovilidad
D
Latencia
LABERINTO EN CRUZ ELEVADO
E
24h
Entradas brazo abierto/ total de entradas
F
Tiempo abierto/ Tiempo total
G
12 días
H