



EFFECTOS DEL CANNABIDIOL EN UN NUEVO MODELO ANIMAL DE TRASTORNO DE ESTRÉS POSTRAUMÁTICO

Tesis Doctoral presentada por

Ani Gasparyan

- 2021 -

Director de tesis:

DR. JORGE MANZANARES ROBLES

Codirector de tesis:

DR. FRANCISCO NAVARRETE RUEDA

Programa de Doctorado en Neurociencias

Instituto de Neurociencias

Universidad Miguel Hernández-CSIC



Sant Joan d'Alacant, 10 de mayo de 2021

La presente Tesis Doctoral, titulada “**Efectos del cannabidiol en un nuevo modelo animal de Trastorno de estrés postraumático**” se presenta bajo la modalidad de tesis por compendio de publicaciones con el siguiente indicio de calidad:

Artículo: The administration of sertraline plus naltrexone reduces ethanol consumption and motivation in a long-lasting animal model of post-traumatic stress disorder.

Neuropharmacology. Aceptado.

Cuartil: Q1 **Rank:** 43/271 Pharmacology & Pharmacy **Factor de impacto:** 4,43



Sant Joan d'Alacant, 10 de mayo de 2021

D. Jorge Manzanares Robles, Catedrático de Farmacología de la Universidad Miguel Hernández

AUTORIZO la presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Efectos del cannabidiol en un nuevo modelo animal de Trastorno de estrés postraumático**” y realizada por D^a. Ani Gasparyan bajo mi inmediata dirección y supervisión como director de su Tesis Doctoral en el Instituto de Neurociencias (UMH-CSIC) y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dr. Jorge Manzanares Robles



Sant Joan d'Alacant, 10 de mayo de 2021

D. Francisco Navarrete Rueda, Profesor Contratado Doctor en la Universidad Miguel Hernández

AUTORIZO la presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Efectos del cannabidiol en un nuevo modelo animal de Trastorno de estrés postraumático**” y realizada por D^a. Ani Gasparyan bajo mi codirección y supervisión como codirector de su Tesis Doctoral en el Instituto de Neurociencias (UMH-CSIC) y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dr. Francisco Navarrete Rueda



Sant Joan d'Alacant, 10 de mayo de 2021

D^a. Elvira María de la Peña García, Profesora Titular y Coordinadora del programa de Doctorado en Neurociencias del Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICO:

Que la Tesis Doctoral titulada "***Efectos del cannabidiol en un nuevo modelo animal de Trastorno de estrés postraumático***" ha sido realizada por D^a. Ani Gasparyan, bajo la dirección de D. Jorge Manzanares Robles como director y D. Francisco Navarrete Rueda como codirector, y doy mi conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dra. Elvira María de la Peña García

E-mail :
elvirap@umh.es
www.in.umh.es

Tel: +34 965 919367

Av. Ramón y Cajal s/n
Campus de Sant Joan03550 Sant
Joan d'Alacant
Alicante, España

AGRADECIMIENTOS

A Jorge, por haberme brindado esta increíble oportunidad de aprender y de formarme. Por apostar por mí, enseñarme a afrontar las adversidades y crecer como persona. Por demostrarme que el esfuerzo siempre tiene su recompensa, aunque tarde en llegar, y que, a la hora de la verdad, lo único que nos limita somos nosotros mismos.

A Fran, por estar siempre dispuesto a ayudar. Por enseñarme y contar conmigo. Por animarme en los momentos de incertidumbre. Gracias.

A Salu, por estar siempre ahí, escucharme y confiar en mí. Por ser una persona increíble.

A Pep, por toda la ayuda que me ha prestado a lo largo de estos años, y sobre todo cuando más la necesitaba. A todo el servicio de SEA de San Juan. Especialmente, a José Antonio Pérez de Gracia, por su paciencia y ayuda hasta en los días más inoportunos, cuando le contactaba, preocupada, por el estado de los ratones. A todas las personas con las que he compartido buenos momentos a lo largo de estos años; a Esther, Adrián, Abraham, Belén...

A Ilde y Anishia, por todos los buenos momentos que hemos compartido, y porque realmente sois maravillosos.

A José Antonio y Lola, por haberme apoyado, por estar siempre ahí, formar parte de nuestra familia y demostrarnos que podemos contar con ellos.

A mis padres, Anahit y Hovhannes. Por ser como sois, luchadores, valientes, generosos, cariñosos. Por estar dispuestos a ayudarnos siempre, de manera incondicional y apoyarme en todas las decisiones de vida. A mi hermano, Aram, por su apoyo, valentía y generosidad. Por demostrarme que siempre puedo contar con él, a pesar de la distancia. No sabéis lo afortunada que me siento por teneros.

A Álvaro, mi compañero. Por estar siempre a mi lado, darme apoyo y serenidad en los momentos más difíciles. A mi niño, mi David, que con tan solo 7 años me abrazaba y me animaba, diciendo: "mamá, no estés triste, seguro que alguien se quiere leer tu artículo...". Eres absolutamente increíble y maravilloso. Os quiero.

Իմ ծնողներին, Յովհաննեսին եւ Անահիտին, եւ իմ եղբայր Արամին՝ միշտ իմ կողքին լինելու եւ ձեր օգնությունն ու ջերմությունն ինձ տալու համար: Իմ հարազատներին, հորաքույրներին, Անուշիկին եւ Լիլիթին, հորեղբայրներին, Սպարտակին եւ Ներսեսին, եւ իմ Սամվել քեռիին, որովհետեւ միշտ իմ կողքին եք եղել, ինձ աջակցել եք եւ ուրախացել եք իմ հաղթանակներով:

Իմ տատիկներին եւ պապիկներին: Իմ հայ ազգին:



*El individuo ha luchado siempre para no ser absorbido por la tribu.
Pero ningún precio es demasiado alto por el privilegio de ser uno mismo.*

Friedrich Nietzsche

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN	9
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN.....	17
1. EL TRASTORNO DE ESTRÉS POSTRAUMÁTICO	19
2. ABORDAJE FARMACOLÓGICO DEL TRASTORNO DE ESTRÉS POSTRAUMÁTICO Y DE SU COMORBILIDAD CON EL TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL.....	33
3. MODELIZACIÓN ANIMAL DE TRASTORNO DE ESTRÉS POSTRAUMÁTICO Y TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL (TEPT-TUA).....	71
HIPÓTESIS DE TRABAJO	81
OBJETIVOS	85
MATERIALES Y METODOS: RESUMEN GLOBAL.....	91
RESULTADOS: RESUMEN GLOBAL	107
DISCUSIÓN	115
CONCLUSIONES.....	123
REFERENCIAS.....	127
ANEXO I. ARTÍCULOS.....	161
Artículo 1	163
Artículo 2	205

5HT2A	Receptor serotoninérgico 2A
5HT2C	Receptor serotoninérgico 2C
5HTT	Transportador de serotonina
5HTT	Transportador serotoninérgico
2-AG	2-araquidonilglicerol
AAO	Autoadministración oral de etanol
AEA	Anandamida
AMY	Amígdala
ANOVA	Análisis de la varianza
ARC	Núcleo arqueado
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
rCB1	Receptor cannabinoide 1
rCB2	Receptor cannabinoide 2
CAPS	Clinician Administered PTSD Scale
CBD	Cannabidiol
CCO	Caja clara y oscura
CM	Condicionamiento al miedo
CNR1	Gen que codifica para el receptor cannabinoide 1
CNR2	Gen que codifica para el receptor cannabinoide 2
CRF	Hormona liberadora de corticotropina
CV	Consumo voluntario o paradigma de las dos botellas
DR	Núcleo del rafe dorsal
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of mental Disorders
SCE	Sistema cannabinoide endógeno
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENIGMA	Enhancing Neuro Imaging Genetics through Meta-Analysis
FAAH	Amidohidrolasa de ácidos grasos
FDA	Food and Drug Administration
FKBP5	Proteína de unión al FK506 5
fMRI	Resonancia magnética funcional
FR1	Razón fija 1
FR3	Razón fija 3
FXT	Fluoxetina
rGC	Receptor glucocorticoide
HHA	Hipotálamo-hipófisis-adrenal
HIPP	Hipocampo
ICD	International Classification of Diseases
IIN	Ingesta inhibida por la novedad
IMAO	Inhibidores de la monoaminoxidasa
i.p.	Administración intraperitoneal
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina
LEC	Laberinto elevado en cruz
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
mARN	Ácido ribonucleico mensajero

MDMA	3,4-metilendioximetamfetamina
MRI	Resonancia magnética
NAcc	Núcleo accumbens
NMDA	N-metil-D-aspartato
NTX	Naltrexona
OEA	Oleoiletanolamida
OMS	Organización Mundial de la Salud
Opmr1	Gen que codifica para el receptor mu-opioide
PFC	Corteza Prefrontal
p.o.	Administración oral
POMC	Proopiomelanocortina
PR	Razón progresiva
PVN	Núcleo paraventricular
PXT	Paroxetina
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
REM	<i>Rapid eye movement</i>
s.c.	Administración subcutánea
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de un nucleótido
SPS	<i>Single prolonged stress</i>
STR	Sertralina
TEP	Terapia de exposición prolongada
TEPT	Trastorno de estrés postraumático
TH	Tirosina hidroxilasa
THC	Delta-9-tetrahidrocanabinol
TUA	Trastorno por uso de alcohol
VTA	Área del tegmento ventral

En esta tesis doctoral se ha desarrollado un nuevo modelo animal de trastorno de estrés postraumático (TEPT) que induce cambios pronunciados sobre el condicionamiento al miedo y la ansiedad, que se mantienen hasta 9 semanas después de haber finalizado la fase de inducción (**Artículo 1**). Estas modificaciones se acompañan de alteraciones en la expresión génica de la hormona liberadora de corticotropina (CRF), receptores cannabinoides 1 (CNR1) y 2 (CNR2) y transportador de serotonina (5HTT) en distintos núcleos cerebrales. Debido a la larga duración de las características conductuales y de cambios funcionales cerebrales, el modelo ha permitido la evaluación de tratamientos farmacológicos de varias semanas de duración. Se ha observado que la administración de cannabidiol (CBD) o sertralina (STR) regula las alteraciones producidas por el modelo, si bien se consigue un efecto sinérgico o aditivo con la combinación de ambos fármacos (**Artículo 1**).

Por otra parte, la larga duración de las alteraciones inducidas por el modelo ha permitido su combinación con los procedimientos experimentales del consumo voluntario (CV) y autoadministración oral de etanol (AAO). Los roedores expuestos al modelo animal de TEPT presentan una mayor vulnerabilidad por los efectos reforzantes y motivacionales del alcohol, simulando de esta manera el consumo problemático de alcohol en pacientes con TEPT. Estas conductas se acompañan de alteraciones en la expresión génica de la tirosina hidroxilasa (TH), receptor mu-opioide (Oprm1) y 5HTT en distintos núcleos cerebrales, indicando la implicación de los sistemas dopaminérgico, opioide y serotoninérgico en el desarrollo de la conducta. La administración de STR y naltrexona (NTX) reduce el consumo y la

motivación por obtener alcohol en ratones expuestos al modelo animal de TEPT y regula los cambios en la expresión génica de las distintas dianas evaluadas **(Artículo 2)**.

En conjunto, los datos obtenidos en la presente tesis doctoral ponen de manifiesto que: i) el nuevo modelo animal crónico de TEPT desarrollado produce alteraciones en la respuesta emocional que se mantienen a largo plazo, incluyendo un mayor rasgo de ansiedad, problemas en la extinción de memorias aversivas (miedo), y una elevada vulnerabilidad por la acción reforzante y motivacional del alcohol, así como cambios significativos en la expresión génica de distintas dianas, ii) la combinación farmacológica de CBD y STR puede resultar un tratamiento eficaz en pacientes con TEPT, iii) la combinación de la STR con una dosis subefectiva de NTX podría ser una herramienta a tener en cuenta en el tratamiento del trastorno dual TEPT y trastornos por uso de alcohol (TUA).

In the present doctoral thesis, a new animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD) has been developed, inducing pronounced changes in fear conditioning and anxiety-like behaviors that are maintained up to 9 weeks after the end of the induction phase (**Article 1**). These behavioral changes are accompanied by alterations in the gene expression of corticotropin releasing factor (CRF), cannabinoid receptors 1 (CNR1) and 2 (CNR2) and serotonin transporter (5HTT) in different brain nuclei. Given the long duration of the behavioral features and functional brain changes, the model has allowed the evaluation of chronic pharmacological treatments of several weeks of duration. It has been observed that the administration of cannabidiol (CBD) or sertraline (STR) regulates the alterations produced by the model. Interestingly, a synergistic or additive effect is achieved with the combination of both drugs (**Article 1**).

In addition, the long-lasting duration of the alterations induced by the model has also allowed its combination with the experimental procedures of voluntary ethanol consumption and oral ethanol self-administration. Rodents exposed to the animal model of PTSD show an increased vulnerability to the reinforcing and motivational effects of alcohol, simulating the problematic alcohol consumption in patients with PTSD. These behaviors have been accompanied by alterations in the gene expression of tyrosine hydroxylase (TH), mu-opioid receptor (Oprm1) and 5HTT in different brain nuclei, indicating the involvement of the dopaminergic, opioid and serotonergic systems in the development of these behaviors. The administration of STR and naltrexone (NTX) reduces the consumption and the motivation to obtain

alcohol in mice exposed to the animal model of PTSD and regulates changes in gene expression of the different targets evaluated (**Article 2**).

Taken together, the data obtained in the present doctoral thesis show that: (i) the new chronic animal model of PTSD induces emotional long-term alterations including increased anxiety-like behavior, fear extinction problems, as well as a high vulnerability for the reinforcing and motivational actions of alcohol, accompanied by changes in the gene expression of different brain targets, (ii) the pharmacological combination of CBD and STR can be an effective treatment in patients with PTSD, (iii) the combination of STR with a sub-effective dose of NTX could be considered as a potential therapeutic tool in the treatment of the dual disorder PTSD and alcohol use disorders (AUD).

1. EL TRASTORNO DE ESTRÉS POSTRAUMÁTICO

1.1 Epidemiología y diagnóstico del Trastorno de estrés postraumático

El Trastorno de estrés postraumático (TEPT) es la enfermedad neuropsiquiátrica más prevalente que puede desarrollarse tras una exposición a un acontecimiento traumático y altamente estresante. Su prevalencia en la población general es muy variada y relativamente baja (cerca del 1,1%), sobre todo si se tiene en cuenta la elevada frecuencia de exposiciones que se producen a nivel mundial a distintas situaciones traumáticas (cerca del 70%) [1, 2].

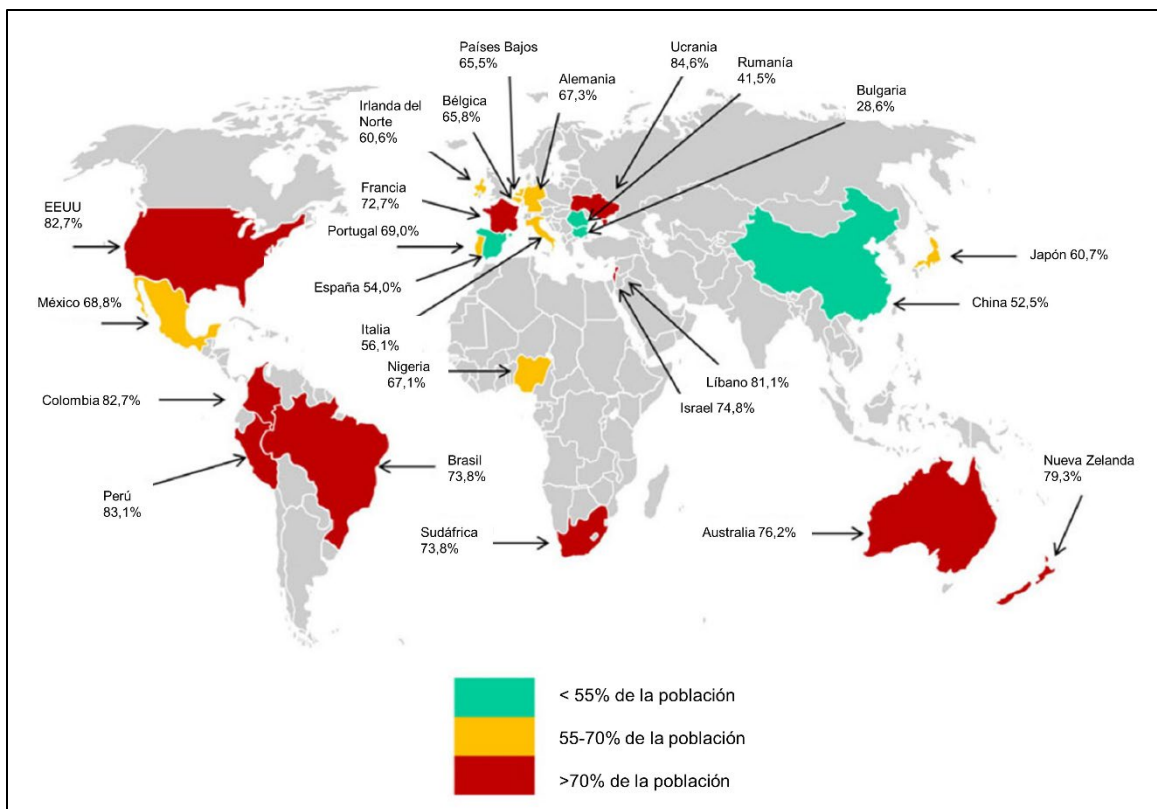


Figura 1. Prevalencia de exposición a algún evento traumático a nivel mundial. Figura extraída y adaptada de *The epidemiology of traumatic event exposure worldwide: results from the World Mental Health Survey Consortium* [2].

Uno de los factores de riesgo con más peso en el desarrollo del TEPT es la exposición a situaciones traumáticas en edades muy tempranas, que predispone al desarrollo de distintas enfermedades neuropsiquiátricas en la edad adulta [3]. La exposición al abuso, maltrato infantil o al abandono en esa etapa tan vulnerable induce una serie de cambios epigenéticos que repercuten en el correcto desarrollo cerebral, actuando como un factor de predisposición para el desarrollo de estas enfermedades [3-5]. Además, el desarrollo de TEPT tras una exposición a un evento traumático está condicionado por otros factores adicionales a la edad de la exposición, como son el tipo de suceso, su intensidad y el sexo [3, 6]. En este sentido, los hombres presentan una mayor probabilidad de experimentar una situación traumática, aunque las mujeres son más vulnerables a desarrollar TEPT tras una exposición. De hecho, se estima que las mujeres presentan una probabilidad dos veces superior a los hombres de desarrollar TEPT tras exponerse a un acontecimiento traumático (20,5% de las mujeres frente al 8,2% de los hombres) [7, 8]. En mujeres, el desarrollo de esta enfermedad está principalmente relacionado con la exposición a abuso sexual o violación, mientras que en los hombres suele estar relacionado con la exposición a conflictos bélicos [7, 9]. En este ámbito, la prevalencia de la enfermedad (cerca del 30%) supera con creces la que presenta la población general [10, 11], y suele ser más grave debido a la complejidad de los síntomas y la cronicidad de esta. Se estima que más del 10% de los veteranos de guerra sigue padeciendo TEPT incluso más de 10 años después de su diagnóstico, con consecuencias negativas no solamente a nivel socioeconómico sino también a nivel personal y familiar [12].

La exposición a un evento traumático es uno de los criterios cruciales para el diagnóstico del TEPT [13]; sin embargo, lo más habitual en la práctica clínica es encontrarse con pacientes que se han expuesto a cuatro o más eventos traumáticos a lo largo de su vida [2]. Dichos pacientes suelen presentar una sintomatología más grave con una mayor afectación laboral, familiar, personal y social que los pacientes expuestos a un único suceso traumático [1, 3]. Además, suelen presentar una edad más temprana de inicio de los síntomas y mayor duración de la enfermedad que los expuestos a 3 o menos eventos traumáticos [1]. Por ello, tras una exposición a una situación traumática, los factores de riesgo biológicos y ambientales tienen un gran peso sobre el inicio del TEPT, la gravedad de los síntomas y su cronicidad [3]. En este sentido, un correcto diagnóstico de la enfermedad es uno de los factores clave para llevar a cabo un adecuado abordaje clínico.

Los criterios para el diagnóstico del TEPT se incorporan por primera vez en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, DSM por sus siglas en inglés) en su tercera edición (DSM-III) publicado en el año 1980 [14]. En esta edición del manual, el TEPT se clasifica dentro de la categoría de los “Trastornos de Ansiedad”. Sin embargo, los mismos autores reconocen que dicha clasificación es un tanto controvertida, ya que no se trata solamente de un trastorno de ansiedad sino de una enfermedad mucho más compleja, con una serie de síntomas específicos no presentes en otros trastornos incluidos dentro de esta categoría [14]. Dicha clasificación persiste en la cuarta edición del manual, experimentando un cambio radical en la quinta y última edición del DSM (DSM-V). En este caso, el TEPT se excluye de la categoría de los “Trastornos de Ansiedad”, incluyéndose dentro de la categoría denominada

“Trastornos relacionados con traumas y factores de estrés” [13]. Además, el DSM-V engloba los criterios de diagnóstico del TEPT en adultos dentro de 5 categorías principales que incluyen la exposición a un evento traumático, la presencia de síntomas de intrusión, así como de evitación de cualquier estímulo asociado al suceso traumático, las alteraciones negativas a nivel cognitivo y del estado de ánimo, y las alteraciones del estado de alerta y de reactividad. Para el diagnóstico del TEPT dichos síntomas deben presentar una duración superior a un mes causando un malestar significativo en el paciente, y no deben ser atribuibles a los efectos de una sustancia o una condición médica determinada [13].

De manera paralela, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su última edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades (*International Classification of Diseases 11th Revision, ICD-11* por sus siglas en inglés) propone unos criterios de diagnóstico de TEPT un tanto diferentes a los criterios expuestos en el DSM-V (Tabla 1) incluyendo además el diagnóstico del TEPT complejo.

DSM-V	ICD-11
<p>A. Exposición a muerte o amenaza de muerte, lesiones graves o violencia sexual en una (o más) de las siguientes formas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Experimentar directamente el evento traumático, 2. Presenciar personalmente cómo otra persona se expone al evento(s) traumático(s), 3. Descubrir cómo un miembro cercano de la familia o un amigo cercano se ha expuesto al evento(s) traumático(s). En el caso de fallecimiento o amenaza de muerte, el evento(s) deben haber sido violento o accidental, 4. Experimental una exposición repetida o extrema a detalles desagradables 	<p>Exposición a un evento o grupo de eventos extremadamente amenazantes u horriblos.</p>

<p>del evento(s) traumático(s) (p.ej. las primeras personas en responder recogiendo restos humanos, agentes de policía expuestos repetidamente a detalles de abuso infantil).</p>	
<p>B. Presencia de uno de varios de los siguientes síntomas de intrusión, asociados con el evento traumático:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Recuerdo recurrente, involuntario e intrusivo del evento(s) traumático(s), 2. Presencia de sueños estresantes recurrentes con un contenido relacionado o afectado por el evento(s) traumático(s), 3. Reacciones disociativas (p.ej. flashbacks) donde el individuo actúa o se siente similar a cuando se expuso al evento(s) traumático(s), 4. Distrés psicológico intenso o prolongado por la exposición a factores internos o externos que simbolizan o recuerden algún aspecto del evento(s) traumático(s), 5. Reacciones fisiológicas intensas a factores internos o externos que simbolizan o recuerden algún aspecto del evento(s) traumático(s). 	<p>Síntomas de intrusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Revivir el evento o eventos traumáticos en el momento presente en forma de recuerdos vívidos intrusivos, flashbacks o pesadillas. - La reexperimentación se acompaña de emociones fuertes y abrumadoras como el miedo o el horror, y fuertes sensaciones físicas, o sentimientos de estar abrumado o inmerso en las mismas emociones intensas que se experimentaron durante el evento traumático.
<p>C. Evasión persistente a cualquier estímulo asociado al evento traumático, presentando uno o ambos de los siguientes síntomas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Evitar o hacer un esfuerzo por evitar recuerdos, pensamientos o sentimientos acerca de o estrechamente relacionados con el evento(s) traumático(s), 2. Evitar o hacer un esfuerzo por evitar cualquier recuerdo externo (personas, lugares, actividades, objetos, situaciones) que cause un recuerdo, pensamiento o sentimiento acerca de o estrechamente relacionado con el evento(s) traumático(s). 	<p>Evasión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evitar los pensamientos y recuerdos del evento(s). - Evitar actividades, situaciones o personas que recuerden el evento(s).

<p>D. Alteraciones negativas en la cognición y el ánimo relacionadas con el evento(s) traumático(s), evidenciadas por dos o varios de los siguientes síntomas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Incapacidad para recordar un aspecto importante del evento(s) traumático(s) (debido, normalmente, a la amnesia disociativa y no a otros factores), 2. Creencias o expectativas negativas persistentes y exageradas sobre uno mismo, el resto de las personas o el mundo, 3. Conocimiento persistente y distorsionado sobre las causas o consecuencias del evento(s) traumático(s) que hace que el individuo se culpe a sí mismo o a otros, 4. Estado emocional negativo persistente, 5. Reducido interés o participación en actividades significativas, 6. Sentimiento de desapego o alejamiento de los demás, 7. Incapacidad persistente de experimentar emociones positivas. 	
<p>E. Alteraciones significativas en la estimulación y reactividad, asociados con el evento(s) traumático(s), empezando o empeorando después de la exposición:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Comportamiento irritable y arrebatos de ira (con poca o ninguna provocación), expresándose normalmente en forma de una agresión física o verbal hacia personas u objetos, 2. Comportamiento imprudente o autodestructivo, 3. Hipervigilancia, 4. Respuesta exagerada de sobresalto, 5. Problemas de concentración, 6. Alteraciones del sueño (p.ej. dificultad para conciliar el sueño o permanecer dormido o sueño agitado). 	<p>Percepciones persistentes de una amenaza inmediata:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hipervigilancia, - Elevada respuesta de sobresalto ante ruidos inesperados.

F. Una duración de las alteraciones (Criterios B, C, D y E) superior a un mes.	Los síntomas deben persistir por lo menos durante varias semanas.
G. Las alteraciones deben causar un distrés o empeoramiento clínicamente significativo a nivel social, ocupacional o de otras áreas funcionales.	Los síntomas deben causar un deterioro significativo a nivel personal, familiar, social, educativo, ocupacional o en otras importantes áreas de funcionamiento.
H. Las alteraciones no se pueden atribuir a la acción fisiológica de alguna sustancia (p.ej. algún medicamento o alcohol) o a otra condición médica.	

Tabla 1. Tabla comparativa de los criterios de diagnóstico del TEPT según el DSM-V y el ICD-11.

A pesar de esas pequeñas diferencias, el eje central de ambos manuales de diagnóstico sigue siendo la exposición a un evento traumático y la cronicidad de la sintomatología [15, 16]. De esta manera, teniendo en cuenta los diferentes criterios existiría un subgrupo de pacientes que podría diagnosticarse del TEPT empleando cualquiera de los dos manuales descritos. Sin embargo, otras subpoblaciones solamente cumplirían los criterios recogidos en uno de los dos [17]. Así, el empleo de ambos manuales en la práctica clínica podría permitir el correcto diagnóstico de una mayor proporción de pacientes con TEPT, un reto difícil de conseguir con cada manual por separado [15].

De manera adicional a los manuales de diagnóstico que se utilizan ampliamente en la práctica clínica, existen otras herramientas que permiten perfilar aún más el diagnóstico de los pacientes persiguiendo un abordaje psico-farmacológico óptimo. Dentro de esas herramientas cabe señalar el empleo de las escalas de evaluación,

siendo una de las escalas más empleadas la *Clinician Administered PTSD-scale* (CAPS, por sus siglas en inglés). Se trata de un cuestionario validado y ampliamente utilizado que permite valorar el estado del paciente, así como la gravedad de los síntomas. Fue descrito por primera vez en el año 1995 [18] con una serie de preguntas adaptadas al *DSM-III*, vigente en el momento del desarrollo del cuestionario. A lo largo del tiempo, el cuestionario ha ido actualizándose y adaptándose a las distintas versiones del *DSM* para permitir la evaluación tanto de la intensidad como de la frecuencia de aparición de cada uno de los síntomas descritos en los manuales de diagnóstico [19].

1.2 Complicaciones clínicas del TEPT

A pesar de los avances de las últimas décadas, encaminados a optimizar el correcto diagnóstico del TEPT, el manejo de estos pacientes sigue siendo todo un reto a nivel clínico y no solamente por la propia complejidad de la patología. Más de la mitad de los pacientes con diagnóstico de TEPT presentan otras complicaciones o comorbilidades que agravan significativamente su situación clínica y, por lo tanto, su manejo terapéutico [6]. Los estudios epidemiológicos han señalado la elevada prevalencia de trastornos del estado de ánimo, siendo la depresión mayor y los trastornos de ansiedad los más frecuentes [20]. Adicionalmente, los pacientes diagnosticados de TEPT suelen presentar elevadas tasas de consumo de sustancias depresoras del sistema nervioso central (SNC), probablemente con el objetivo de paliar su sintomatología [21]. Algunos estudios han señalado que la prevalencia de trastornos por uso de sustancias es dos veces más elevada en estos pacientes que en la población general, siendo el alcohol la droga de abuso más

consumida [22, 23]. En estos casos los pacientes desarrollan la patología dual TEPT y Trastorno por Uso de alcohol (TUA), de mucho más difícil manejo clínico que cada uno de esos trastornos por separado. Efectivamente, los pacientes diagnosticados con TEPT-TUA suelen presentar síntomas de TEPT más graves, así como mayor consumo y riesgo de recaída en el consumo de alcohol, en comparación con los pacientes que presentan TEPT o TUA de forma aislada [24].

El TUA implica un patrón de consumo problemático de alcohol con un empeoramiento clínico significativo [13]. Los pacientes con diagnóstico de TUA presentan síntomas físicos y conductuales difíciles de manejar farmacológicamente, como son el desarrollo de tolerancia, abstinencia, la búsqueda incesante de la droga y la recaída en el consumo [13]. Este hecho, junto con la evidencia de un consumo creciente de alcohol en la sociedad actual pone de manifiesto la dificultad real a la hora de conseguir un correcto manejo terapéutico de estos trastornos [13, 25]. Además, una elevada proporción de pacientes diagnosticados de TUA presentan también otras comorbilidades psiquiátricas. Los estudios epidemiológicos han señalado la correlación positiva entre el TUA y la depresión, el trastorno bipolar, así como el TEPT [25]. En este aspecto, a pesar de que la relación temporal del desarrollo de la comorbilidad TEPT-TUA no está del todo clara [26], es evidente que los pacientes diagnosticados de TEPT y que además llegan a desarrollar criterios de diagnóstico de TUA son mucho más difíciles de manejar farmacológicamente. A las incógnitas en el manejo del TEPT se añade la dificultad de manejo del TUA. Por lo tanto, es importante y necesario profundizar en la comprensión de las alteraciones que se relacionan tanto con el TEPT como con la comorbilidad TEPT-TUA, para

identificar nuevos tratamientos que permitan mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

1.3 Biomarcadores de TEPT

Un biomarcador es una característica biológica definida y medible, que actúa como un indicador de procesos biológicos normales, patológicos o de respuesta ante una exposición o una intervención. En los últimos años se está realizando un esfuerzo importante por parte de la comunidad científica para identificar biomarcadores que permitan mejorar la prevención, el diagnóstico, la monitorización de la respuesta a un fármaco y el desarrollo de nuevos fármacos. Sin embargo, las enfermedades psiquiátricas presentan una serie de dificultades que entorpecen el avance en esa dirección. Por una parte, los pacientes suelen presentar un conjunto de síntomas heterogéneos, que a su vez puede dificultar su correcto diagnóstico. Además, a la complejidad de la sintomatología se le suma el conocimiento incompleto que poseemos hoy en día de las alteraciones neuroquímicas relacionadas con las enfermedades mentales, limitando la eficacia de los abordajes farmacológicos existentes [27]. En el caso del TEPT, existe un esfuerzo creciente centrado en identificar biomarcadores tanto centrales como periféricos que permitan un adecuado diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes, algunos de los cuáles se detallan a continuación.

1.3.1 *Biomarcadores centrales*

El desarrollo de las técnicas de imagen ha permitido obtener una información muy valiosa acerca de los cambios estructurales y de conectividad entre distintas

regiones cerebrales de una forma no invasiva para los pacientes diagnosticados de TEPT. Una gran parte de los estudios de neuroimagen se ha centrado en la evaluación de las alteraciones en regiones cerebrales estrechamente relacionadas con la respuesta emocional, la atención y la memoria, como son la corteza prefrontal (PFC, por sus siglas en inglés), el hipocampo (HIPP, por sus siglas en inglés) y la amígdala (AMY, por sus siglas en inglés).

La resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés) ha sido una de las técnicas más empleadas que ha permitido identificar algunas de las alteraciones cerebrales que se relacionan con el TEPT. Uno de los estudios de neuroimagen más extensos en este campo fue el realizado por el Consorcio ENIGMA y el Consorcio de Genética Psiquiátrica, analizando tanto los cambios estructurales como los parámetros clínicos en un total de 1868 sujetos, siendo 794 pacientes diagnosticados de TEPT. Los autores encontraron que los veteranos de guerra con diagnóstico de TEPT presentaban volúmenes significativamente reducidos de HIPP y AMY en comparación con los veteranos de guerra expuestos a situaciones traumáticas, pero sin diagnóstico de TEPT [28]. Se encontraron diferencias importantes principalmente en las áreas CA3 y el giro dentado del HIPP [29]. Dichos hallazgos se han confirmado en varios estudios posteriores, donde se han encontrado diferencias en el volumen de distintas estructuras cerebrales, incluido el HIPP, la AMY, la PFC y la corteza cingular, relacionando dichos cambios con la sintomatología y la gravedad del estrés postraumático [30-32]. Curiosamente, el tratamiento con paroxetina (un antidepresivo perteneciente a la familia de los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS)) conseguía producir un aumento en el volumen del HIPP en pacientes con diagnóstico de TEPT, sugiriendo

la existencia de una correlación entre la sintomatología de TEPT y el volumen de esta región cerebral [33].

Además de los cambios estructurales, se han identificado cambios en la funcionalidad de las áreas implicadas en la regulación emocional empleando la técnica de la resonancia magnética funcional (fMRI, por sus siglas en inglés). La expresión de miedo, uno de los síntomas características del TEPT, está relacionada con la actividad y conectividad funcional de la AMY [34]. Los estudios de neuroimagen funcional han identificado una elevada conexión funcional entre la AMY y la ínsula, y una reducida conexión en la corteza prefrontal lateral, la región parahipocampal y la corteza visual en veteranos de guerra diagnosticados de TEPT [35]. La activación de las conexiones funcionales de la AMY también se ha puesto de manifiesto al exponer a estos pacientes a estímulos positivos [36], pero también en presencia de estímulos aversivos cuando se trata de pacientes con diagnóstico de TEPT resistentes al tratamiento en comparación con los que responden adecuadamente [37]. Así, las alteraciones estructurales y funcionales observadas en las distintas regiones cerebrales mediante técnicas de neuroimagen han permitido valorar la implicación de estas regiones en el desarrollo y pronóstico del TEPT. Adicionalmente, estos cambios son un reflejo de las alteraciones producidas en los sistemas de neurotransmisión, que a su vez permitirían explicar parte de la sintomatología que presentan los pacientes con diagnóstico de TEPT.

1.3.2 Biomarcadores periféricos

Los sistemas noradrenérgico, serotoninérgico, dopaminérgico y cannabinoide endógenos, así como el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), son cinco de los

principales sistemas implicados en la regulación de la respuesta emocional. Se ha propuesto su implicación en el desarrollo del TEPT tras observar que las alteraciones en estos sistemas tienen relación con la vulnerabilidad a desarrollar TEPT tras una exposición a un evento traumático. El eje HHA es uno de los principales sistemas que regula la respuesta al estrés y, por lo tanto, desempeña un papel crucial en fisiopatología del TEPT [38]. Estudios realizados con veteranos de guerra diagnosticados de TEPT han puesto de manifiesto una alteración de la correcta funcionalidad del eje HHA: mayor retroalimentación negativa por glucocorticoides y una mayor inhibición del eje [39]. También se han identificado concentraciones elevadas de cortisol y de la hormona liberadora de corticotropina (CRF, por sus siglas en inglés) en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con diagnóstico de TEPT [40]. Los análisis de patrones genéticos han permitido detectar la correlación existente entre una reducida expresión génica del FKBP5 (co-chaperona del receptor glucocorticoide, implicada en la regulación del eje HHA) y el TEPT [41]. Así, polimorfismos genéticos del gen del FKBP5 podrían estar relacionados con distintos tipos de alteraciones del eje HHA y con el desarrollo de este trastorno [42].

El eje del estrés está estrechamente conectado con la activación del sistema noradrenérgico, cuya hiperactivación podría explicar algunos de los síntomas que presentan los pacientes con diagnóstico de TEPT, como son la elevada presión arterial y frecuencia cardiaca con un mayor riesgo de diagnóstico de patologías cardiovasculares como la hipertensión arterial [43-45].

El sistema serotoninérgico ha resultado ser muy relevante en la regulación del estrés. Su modulación farmacológica produce acciones ansiolíticas y antidepresivas

[46, 47]. En esa modulación están implicadas las proyecciones serotoninérgicas del núcleo del rafe hacia la AMY y el HIPP, que participan en la regulación de la respuesta emocional [48, 49]. Diversos estudios clínicos han evaluado los efectos de un polimorfismo del transportador de serotonina (5HTTLPR) en el desarrollo de TEPT tras un evento traumático. Más concretamente, se ha detectado que los veteranos de guerra que presentan dicho polimorfismo presentan un mayor riesgo de experimentar problemas de adaptación tras finalizar su servicio militar [50]. Por otra parte, el transportador dopaminérgico también se ha visto implicado en el desarrollo de esta enfermedad. Los pacientes que presentan el polimorfismo de 9 repeticiones (9R) de un alelo del transportador tienen mayor riesgo de desarrollar TEPT tras una exposición que las personas que presentan el alelo 10R [51].

La implicación del sistema cannabinoide endógeno (SCE) se ha evaluado mediante el estudio de polimorfismos y de cuantificación de ligandos cannabinoides endógenos en muestras periféricas de pacientes con diagnóstico de TEPT. Por una parte, se ha encontrado una correlación entre un polimorfismo del gen que codifica para el receptor cannabinoide 1 (CB1), CNR1, y la sintomatología de TEPT relacionada con la mayor expresión de miedo [52]. Los estudios de cuantificación de ligandos cannabinoides endógenos en muestras capilares de pacientes con diagnóstico de TEPT han identificado una concentración significativamente reducida de uno de los ligandos más abundantes de este sistema, la OEA (oleoiletanolamida), en comparación con el grupo control, relacionando dicho resultado con la gravedad de los síntomas del TEPT [53]. La implicación del SCE en el TEPT ha quedado patente también en los estudios clínicos farmacológicos, poniendo de manifiesto que la administración del dronabinol (delta-9-

tetrahidrocanabinol (THC) sintético) consigue modular la sintomatología de los pacientes con diagnóstico de TEPT aumentando la extinción de la conducta de miedo [54, 55].

Así, a pesar de que son muchos los sistemas y las estructuras cerebrales implicadas en el TEPT, algunos de ellos se pueden considerar elementos clave para comprender las alteraciones de la enfermedad, explicar la sintomatología más característica del trastorno, permitiendo al mismo tiempo la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos para su tratamiento.

2. ABORDAJE FARMACOLÓGICO DEL TRASTORNO DE ESTRÉS POSTRAUMÁTICO Y DE SU COMORBILIDAD CON EL TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL

2.1 Abordaje farmacológico del TEPT

El tratamiento del TEPT comprende un conjunto de herramientas psicológicas y tratamientos farmacológicos para mejorar la sintomatología de los pacientes. En los últimos años, varias organizaciones internacionales han publicado guías clínicas señalando los tratamientos farmacológicos más eficaces, a pesar de presentar un beneficio terapéutico limitado [56]. Dada la complejidad de este trastorno, el abordaje farmacológico es variado, seleccionando los fármacos que tengan un perfil más adecuado de acuerdo con la sintomatología que presente el paciente, a pesar de que son muy pocos los que están aprobados para su uso en el TEPT.

2.1.1 Fármacos antidepresivos

Los fármacos más empleados en la práctica clínica para el abordaje del TEPT son los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS), que actúan bloqueando el transportador de serotonina y aumentan la disponibilidad sináptica de ese neurotransmisor en distintos núcleos cerebrales [57]. Tras observar la eficacia de estos fármacos en el tratamiento de los trastornos depresivos y algunos trastornos de ansiedad, surgió el interés de evaluar también su capacidad para modular la sintomatología de los pacientes diagnosticados de TEPT. La utilidad terapéutica de dos de los ISRS que más se emplean en la clínica, paroxetina (PXT) y sertralina (STR), se demostró en algunos ensayos clínicos permitiendo la aprobación de ambos fármacos para su empleo en el manejo del TEPT por parte de la Administración de Medicamentos y Alimentos (*Food and Drug Administration*, FDA por sus siglas en inglés) [58-60]. A pesar de ello, los estudios realizados posteriormente han planteado dudas acerca de la eficacia real de estos fármacos.

La utilidad terapéutica de la **PXT** se ha evaluado en varios ensayos clínicos, obteniéndose resultados contradictorios (Tabla 2). En la mayoría de los estudios que han empleado dosis de PXT de 20 y 40 mg/día se han encontrado mejoras significativas en la sintomatología de un 80-84% de los pacientes diagnosticados de TEPT [60-62]. Sin embargo, el tratamiento con PXT no parece predecir una menor probabilidad de reinstauración de los síntomas, dado que algunos estudios señalan una reducción en la tasa de aparición de la sintomatología refractaria solamente en un 24% de los casos [63]. A pesar de ello, si se compara la eficacia de la PXT con el placebo a la hora de reducir la sintomatología refractaria, la diferencia es claramente significativa. Un estudio realizado por Tucker y cols. muestra que los

pacientes con TEPT crónico tratados con PXT durante 12 semanas presentan una mayor reducción de los síntomas del TEPT a partir de la cuarta semana de tratamiento, así como una mejor respuesta al tratamiento que los pacientes tratados con placebo [64]. Efectos similares, observados en mujeres con diagnóstico de TEPT, van acompañados de cambios en la respuesta al estrés. Cuando las pacientes se exponen a un desafío o situación estresante, a pesar de presentar la misma percepción del estrés que antes del tratamiento, se observa una reducción de un 26,5% del cortisol liberado en la saliva [65].

La PXT también se ha empleado como tratamiento coadyuvante en combinación con la psicoterapia de larga exposición centrada en el trauma [66-68]. Sin embargo, tras finalizar la fase de exposición centrada en el trauma y durante las 12 semanas siguientes de tratamiento con PXT o placebo, la administración de la PXT no ha resultado ventajosa frente al placebo, poniendo de manifiesto las limitaciones del uso de este fármaco en pacientes con TEPT [67].

En el caso de los veteranos de guerra con TEPT, la eficacia de la PTX es mucho menor ya que su administración no parece influir positivamente ni en la remisión de los síntomas ni en la aparición de la sintomatología refractaria. En este sentido, Hamner y cols. llevaron a cabo un estudio clínico para valorar la eficacia del tratamiento con STR o PXT en veteranos de guerra diagnosticados de TEPT. En la primera fase del estudio y tras un tratamiento de 8 semanas con uno de los dos fármacos, el 63% de los pacientes tuvo que pasar a la siguiente fase por no responder al tratamiento y no presentar remisión de los síntomas [69]. En los refugiados de guerra con TEPT y síntomas depresivos, a pesar de observar mejoría

en los síntomas tras 6 semanas de tratamiento, los pacientes seguían presentando criterios de diagnóstico de TEPT [70].

PAROXETINA				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
20 mg/día y 40mg/día	12 semanas	N (placebo) = 186 N (20) = 183 N (40) = 182	Reducción de los síntomas de re-experiencia, evitación e hiperreactividad.	[60]
hasta 60 mg/día	10 semanas	N (placebo) =27 N = 25	Reducción de la escala CAPS, de los síntomas disociativos y los problemas interpersonales.	[61]
20 - 40 mg/día	52 semanas	N = 52	Mejora en la escala CAPS.	[62]
20 mg/día y 40 mg/día	6 meses	N = 30	- Mejora objetiva en 84% - Mejora subjetiva en 80% - Reducción de la reinstauración de los síntomas en 24%	[63]
20 – 50 mg/día	12 semanas	N (placebo) = 156 N = 151	Reducción en la escala CAPS. Mayor respuesta y remisión de los síntomas. Mejora en las áreas familiar, laboral y social.	[64]
20 – 50 mg/día	12 meses	N = 13	Reducción en la escala CAPS y de los niveles de cortisol en saliva, a pesar de presentar la misma percepción de estrés.	[65]

20 mg/día	12 semanas	N (TEP) = 114 N (paroxetina) = 57 N (TEP+paroxetina) = 57	Mayor remisión de los síntomas con la TEP que la paroxetina.	[66]
12,5 – 50 mg/día	10 semanas	N (TEP+paroxetina) = 19 N (TEP+placebo) = 18	Mejora sintomatología al combinar la TEP con la paroxetina que con el placebo.	[67]
	12 semanas adicionales	N (solo paroxetina) = 19 N (solo placebo) = 18	Sin diferencias entre ambos grupos.	
-	4 – 6 semanas	N (TEP) = 44	Mejora significativa de los síntomas.	[68]
12,5 – 62 5 mg/día	10 semanas adicionales	N (TEP+paroxetina o placebo) = 23	La adición de paroxetina no aporta mejora adicional.	
Paroxetina 20 – 60 mg/día	8 semanas	N = 38	Mejora sintomatológica en 16 pacientes. Resto → fase 2.	[69]
Sertralina 50 – 200 mg/día	8 semanas adicionales	N (+antipsicótico) = 9 N (+placebo) = 15	Sin cambios en la escala CAPS.	
Paroxetina 20 mg/día Sertralina 50 – 100 mg/día Venlafaxina 75 – 150 mg/día	6 semanas	N (Paroxetina) = 12 N (Sertralina) = 15 N (Venlafaxina) = 5	Sin cambios en la situación clínica de los pacientes.	[70]
ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN				
Dosis	Duración del tratamiento	Especie	Resultados	Ref.
8 mg/kg/día i.p.	7 días	Ratones Swiss	Reducción del tiempo de congelación, de los rasgos de ansiedad y de la conducta de evitación en roedores expuestos a la descarga eléctrica.	[71]
8 mg/kg/día i.p.	7 días	Ratones Swiss	El tratamiento previene la reinstauración de los síntomas tras un periodo de extinción en	[72]

			roedores expuestos a la descarga eléctrica.	
5 mg/kg/día i.p.	14 días	Ratas Sprague-Dawley	Reducción de los rasgos de ansiedad en el paradigma del LEC, pero no en la conducta de enterramiento o de exploración.	[73]
2,5; 5 y 10 mg/kg/12 h p.o.	15 días	Ratas Sprague-Dawley	La administración crónica de la paroxetina, y no la aguda, mejora el condicionamiento al miedo en roedores expuestos al modelo de SPS.	[74]
10 mg/kg/día p.o.	7 días	Ratones C57BL/6J	La administración del fármaco reduce el tiempo de congelación en el paradigma del condicionamiento al miedo en ratones expuestos al modelo de SPS.	[75]

***Tabla 2.** Tabla resumen de los estudios, clínicos y preclínicos, realizados para evaluar la eficacia de la PXT en TEPT. TEP, terapia de exposición prolongada; CAPS, Clinician Administered PTSD Scale; LEC, laberinto elevado en cruz; SPS, Single Prolonged Stress; i.p., administración intraperitoneal; p.o., administración oral.*

Se han encontrado resultados similares en la evaluación de la utilidad terapéutica de la **STR** en el tratamiento del TEPT (Tabla 3). La aprobación de la STR por las distintas agencias nacionales e internacionales se basó en estudios clínicos realizados en los años 2000 y 2001. En estos ensayos se demostraba que los pacientes tratados con dosis variables de STR (50-200 mg/ día) presentaban una mejora significativa en la sintomatología relacionada con el TEPT (hipervigilancia, hiperreactividad emocional y re-experiencia del evento traumático causante del trastorno) en comparación con los pacientes tratados con placebo, alcanzando en

algunos casos la remisión completa de los síntomas [58, 59, 76, 77]. La mejora de los síntomas podría producirse a partir de la primera semana de tratamiento con STR con una reducción significativa, principalmente, en la agresividad y rabia asociadas al TEPT [78]. En algunos estudios la STR ha demostrado la misma eficacia que la terapia de exposición, la combinación de ambos o la terapia de exposición junto con placebo en cuanto a la mejoría de los síntomas de TEPT [79, 80]. Sin embargo, otros estudios señalan que su empleo en monoterapia, tras un periodo de tratamiento con la combinación de la terapia de exposición y STR, no tendría efectos beneficiosos adicionales [81].

SERTRALINA				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
50 – 200 mg/día	12 semanas	N = 94 N (placebo) = 93	Reducción en la escala CAPS. Mayores niveles de remisión con sertralina (53%) que con el placebo (32%).	[58]
50 – 200 mg/día	28 semanas	N = 46 N (placebo) = 50	Menores niveles de reinstauración de los síntomas con la sertralina que con el placebo. Reducción en la escala CAPS.	[59]
50 – 200 mg/día	12 semanas	N = 100 N (placebo) = 108	Reducción de la puntuación en la escala CAPS. Mayor ratio de respuesta con la sertralina que con el placebo.	[76]
50 – 200 mg/día	12 semanas	N = 190 N (placebo) = 194	Mayores tasas de remisión con la sertralina que con el placebo.	[77]

50 – 200 mg/día	12 semanas	N = 191 N (placebo) = 194	Mejora significativa en signos de anhedonia, distanciamiento, evasión de actividades, ira e hipervigilancia.	[78]
50 – 200 mg/día	24 semanas	N (Sertralina) = 74 N (Sertralina+TEP) = 75 N (placebo+TEP) = 75	Mejora sintomatología en todos los grupos, sin ninguna diferencia entre ellos.	[79]
12,5 – 360 mg/día	10 semanas	N (Sertralina) = 84 N (TEP) = 111	Efecto beneficioso en ambos grupos, siendo la TEP más ventajosa en algunos aspectos.	[80]
25 – 200 mg/día	10 semanas	N (Sertralina) = 31 N (Sertralina +TEP) = 34	Mejoras a largo plazo con la combinación Sertralina +TEP que con la Sertralina sola.	[81]
25 – 200 mg/día	12 semanas	N = 86 N (placebo) = 83	No se encuentran diferencias entre ambos grupos.	[82]
50 – 150 mg/día	3 meses	N = 19	↓ disforia, ↓ irritabilidad y ↓ rabia en 12 de los 19 pacientes.	[83]
12,5 – 150 mg/día	10 meses de media	N = 122	Mejora de la gravedad de los síntomas en 65,5% de los pacientes.	[84]
ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN				
Dosis	Duración del tratamiento	Especie	Resultados	Ref.
10 mg/kg/día i.p.	7 días	Ratas Sprague-Dawley	El tratamiento normaliza los niveles de serotonina, pero aumenta los de noradrenalina en roedores expuestos a un modelo animal que combina la exposición a un depredador con el estrés psicosocial.	[85]

10 mg/kg/día p.o.	7 días	Ratones C57BL/6J	La administración de la sertralina no reduce la respuesta de sobresalto en roedores expuestos a un depredador natural.	[86]
10 mg/kg/día i.p.	7 días	Ratas Sprague-Dawley	La administración de la sertralina inmediatamente después de la exposición a un depredador reduce los rasgos de ansiedad y la respuesta de sobresalto.	[87]

Tabla 3. Tabla resumen de los estudios, clínicos y preclínicos, realizados para evaluar la eficacia de la PXT en TEPT. TEP, terapia de exposición prolongada; CAPS, Clinician Administered PTSD Scale; i.p., administración intraperitoneal; p.o., administración oral.

A parte de estos resultados, que puedan parecer algo contradictorios en relación con la eficacia de la STR en el manejo terapéutico del TEPT, otro estudio llevado a cabo por Friedman y cols. con veteranos de guerra diagnosticados de TEPT muestra que la STR no presenta ninguna ventaja frente al placebo en ninguno de los parámetros evaluados relacionados con la sintomatología del TEPT [82]. En veteranos de guerra diagnosticados de TEPT y depresión, el tratamiento con STR solamente conseguiría mejorar la sintomatología relacionada con la disforia, irritabilidad y la rabia en un 63% de los pacientes [83]. Así, a pesar de la evidencia científica sobre la posible eficacia de la STR en el manejo terapéutico del TEPT, su empleo sigue relacionándose con bajas tasas de remisión de la enfermedad [77]. Algunos autores sugieren que estas bajas tasas de remisión podrían estar

relacionadas con el tipo de evento traumático causante de la enfermedad, que actuaría como un factor de peso en la respuesta al tratamiento [84].

Otro ISRS, evaluado en varios estudios clínicos y que presenta una prevalencia de uso mucho menor que los comentados previamente es la **fluoxetina** (FXT). A diferencia de la STR y la PXT, el empleo de la FXT no está avalado por las agencias nacionales e internacionales para el manejo terapéutico del TEPT. Sin embargo, considerando la limitada eficacia de los fármacos aprobados para tal uso, se han realizado varios estudios para evaluar su potencial utilidad terapéutica obteniendo resultados contradictorios (Tabla 4). Los estudios comparativos de FXT frente al placebo han mostrado que la FXT presenta una mayor eficacia para modular la sintomatología relacionada con el TEPT [88-90] y reducir la reinstauración de la sintomatología [91, 92]. Sin embargo, a pesar de que dichos estudios incluyen tanto civiles diagnosticados de TEPT como veteranos de guerra, algunos autores han señalado que la respuesta a la FXT es peor en los veteranos de guerra con diagnóstico de TEPT que en la población general [93]. Otros estudios clínicos han informado que la FXT no presentaría ninguna ventaja frente al placebo en relación con la modulación de los síntomas del TEPT [94, 95].

FLUOXETINA				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
10 – 60 mg/día	12 semanas	N = 27 N (placebo) = 26	Mejora superior de los síntomas con la fluoxetina que con el placebo.	[88, 89]
20 – 80 mg/día	12 semanas	N = 226 N (placebo) = 75	Reducción en la escala CAPS. Mejora de los síntomas	[90]

			intrusivos y de hiperreactividad.	
20 – 80 mg/día	12 semanas	N = 69 N (placebo) = 62	Menor riesgo de reinstauración de síntomas con la fluoxetina que con el placebo 6 meses después del tratamiento.	[91]
20 – 80 mg/día	12 semanas	N = 110 N (placebo) = 34	Durante el tratamiento: mejores resultados con fluoxetina, que no se mantienen a largo plazo.	[92]
-	5 semanas	N = 33 N (placebo) = 31	Mejora significativa con fluoxetina, principalmente en los síntomas de evitación y adormecimiento.	[93]
20 y 40 mg/día	12 semanas	N (20) = 163 N (40) = 160 N (placebo) = 88	La fluoxetina a ambas dosis evaluadas no presenta ninguna ventaja frente al placebo.	[94]
10 – 60 mg/día	12 semanas	N = 6 N (placebo) = 6	La fluoxetina no muestra ninguna ventaja frente al placebo en el control de los síntomas del TEPT.	[95]
ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN				
Dosis	Duración del tratamiento	Especie	Resultados	Ref.
10 mg/kg/día p.o.	30 días	Ratas Sprague-Dawley	El tratamiento con la fluoxetina en edades tempranas mejora los índices de ansiedad en roedores expuestos a un protocolo de estrés temprano de 3 días de duración.	[96]
10 mg/kg/día p.o.	30 días	Ratas Wistar	El tratamiento mejora los signos de ansiedad, condicionamiento al miedo y la extinción en roedores expuestos al modelo de SPS.	[97]

Tabla 4. Tabla resumen de los estudios, clínicos y preclínicos, realizados para evaluar la eficacia de la FXT en TEPT. SPS, Single Prolonged Stress; CAPS, Clinician Administered PTSD Scale; p.o., administración oral.

Cuando la respuesta al tratamiento instaurado con algún ISRS es limitada o el/la paciente presenta síntomas depresivos que no remiten con el tratamiento, lo habitual en la práctica clínica es sustituir ese tratamiento por otro antidepresivo perteneciente a otros grupos terapéuticos. En estos casos, se puede optar por un inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina, algún antidepresivo tricíclico, tetracíclico o atípico [98]. En este sentido, se han llevado a cabo algunos estudios para valorar la eficacia de la **mirtazapina**, un antidepresivo tetracíclico con un mecanismo de acción mixto (antagonista de los receptores adrenérgicos alfa2 y de los serotoninérgicos 5HT2A y 5HT2C), para el abordaje del TEPT (Tabla 5).

MIRTAZAPINA				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
≈30 mg/día	8 semanas	N = 15	Mejora significativa en comparación con la sintomatología inicial.	[99]
15 – 45 mg/día	8 semanas	N = 17 N (placebo) = 9	Respuesta al tratamiento mayor con la mirtazapina que con el placebo.	[100]
≈30 mg/día	24 semanas	N = 12	Mejora significativa en sintomatología del TEPT.	[101]
45 mg/día	8 semanas	N = 6	Mejora sintomatológica en la mitad de los pacientes.	[102]
Mirtazapina ≈34 mg/día Sertralina ≈100mg/día	6 semanas	N (Mirtazapina) = 51 N (Sertralina) = 49	Mayor respuesta al tratamiento a las 6 semanas con la mirtazapina que con la sertralina.	[103]

Mirtazapina 15 – 45 mg/día Sertralina 25 – 200 mg/día	6 semanas	N (Sertralina + Mirtazapina) = 18 N (Sertralina +placebo) = 18	Mayores tasas de remisión y mejora de síntomas depresivos con la combinación sertralina + mirtazapina que sertralina + placebo.	[104]
--	-----------	---	---	-------

Tabla 5. Tabla resumen de los estudios clínicos realizados para evaluar la eficacia de la mirtazapina en TEPT.

Su administración a pacientes coreanos con TEPT ha resultado ser eficaz para mejorar su situación clínica general, a corto (8 semanas de tratamiento) y a largo plazo (24 semanas de tratamiento) [99-101]. Estos resultados van en la misma dirección que los obtenidos por el grupo de Connor y cols., en un estudio realizado con un número muy reducido de pacientes (6 pacientes con TEPT). En este caso, los autores señalan que 3 de esos 6 pacientes presentaron una mejora significativa de su situación clínica tras un tratamiento con mirtazapina de 8 semanas de duración [102]. En un estudio comparativo realizado con un total de 100 pacientes con TEPT la mirtazapina resultó ser más eficaz que la sertralina para controlar la sintomatología general de los pacientes [103]. Sin embargo, la administración concomitante de ambos fármacos no resultó ser más eficaz que la combinación de la sertralina con el placebo para mejorar la gravedad del TEPT [104], poniendo en duda los resultados positivos obtenidos hasta ese momento.

También se ha evaluado la eficacia de algunos inhibidores (reversibles o irreversibles) de la monoaminoxidasa (IMAO) en el manejo farmacológico del TEPT pero con escasa eficacia [105]. Los fármacos pertenecientes a este grupo terapéutico, como la fenelzina o la brofaromina, rara vez se prescriben a los pacientes con TEPT dada su limitada eficacia y su elevada incidencia de reacciones adversas [105, 106]. Los fármacos antidepresivos pertenecientes a otros grupos

terapéuticos, como la venlafaxina y el bupropión, se han evaluado en ensayos clínicos pequeños y difíciles de interpretar, mostrando una ligera mejora de la sintomatología del TEPT [107].

La eficacia de algunos de los fármacos antidepresivos se ha evaluado en distintos modelos animales que simulan algunos rasgos del estrés postraumático, como son la ansiedad o la presencia de recuerdos del evento traumático (memoria aversiva). En este ámbito, varios autores han demostrado cómo la administración subcrónica o crónica (entre 5 y 30 días) de STR, PXT o FXT consigue modular los rasgos de ansiedad, el condicionamiento al miedo, la respuesta de sobresalto, así como la reinstauración de la memoria aversiva en roedores expuestos a distintos modelos animales de TEPT [71, 72, 75, 97]. Dichos efectos beneficiosos parecen ser más notables cuando la administración se produce inmediatamente después del evento traumático [87] o en edades tempranas [96], y no se observan tras una única administración aguda [74]. Por otra parte, algunos autores han mostrado que la administración de los antidepresivos ISRS no sería beneficioso para tratar los síntomas de ansiedad y de condicionamiento al miedo inducidos en los roedores tras su exposición a distintos modelos animales de TEPT [73, 86].

Actualmente, a pesar de la heterogeneidad de los resultados obtenidos en distintos estudios clínicos y preclínicos, los ISRS se consideran la primera línea de tratamiento farmacológico del TEPT con una eficacia mayor en el manejo de la irritabilidad que de otros síntomas que presentan estos pacientes (p. ej. alteraciones del sueño) [78]. La mejora de los síntomas tras la administración de un ISRS es variable dependiendo, sobre todo, del tipo de acontecimiento traumático, del sexo, así como de la presencia de exposiciones previas.

2.1.2 Fármacos antipsicóticos

Los fármacos antipsicóticos suelen acompañar al tratamiento de primera línea como coadyuvante tanto en pacientes civiles con TEPT como en veteranos de guerra. Su empleo está dirigido principalmente a pacientes que presentan comorbilidades psiquiátricas, síntomas refractarios o alteraciones de sueño.

Los fármacos que se han estudiado para el abordaje del TEPT en monoterapia y también como adyuvantes a un tratamiento farmacológico de base pertenecen al grupo de los antipsicóticos atípicos o de segunda generación. Este grupo de fármacos ha despertado interés por su posible utilidad en el manejo de algunos de los síntomas específicos del TEPT, como la presencia de síntomas psicóticos, síntomas refractarios o alteraciones de sueño [108]. Dentro de este grupo terapéutico, el fármaco más estudiado ha sido la **risperidona**, cuya utilidad se ha evaluado tanto en monoterapia como de forma adyuvante al tratamiento antidepresivo de primera línea (Tabla 6).

RISPERIDONA				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
2 – 4 mg/día	6 semanas	N = 26	Mejora de los síntomas psicóticos a las 3 y 6 semanas.	[109]
≈2,62 mg/día	12 semanas	N = 11 N (placebo) = 9	Mayor eficacia en el tratamiento del TEPT con la risperidona que con el placebo.	[110]
0,5 – 8 mg/día	8 semanas	N = 12 N (placebo) = 9	Reducción de la puntuación en la escala CAPS, y de los síntomas intrusivos y de hiperreactividad.	[111]

1 – 6 mg/día	5 semanas	N = 19 N (placebo) = 18	Mejora de los síntomas psicóticos con risperidona sin cambios en la escala CAPS.	[112]
1 – 3 mg/día	16 semanas	N = 22 N (placebo) = 26	La adición de la risperidona a la medicación habitual mejora los síntomas psicóticos.	[113]
0,5 – 2 mg/día	6 semanas	N = 7 N (placebo) = 8	Dosis bajas de risperidona reducen la irritabilidad y los síntomas intrusivos.	[114]
Sertralina	8 semanas	N (sertralina) = 34	25 de estos pacientes pasan a la fase dos por no mostrar mejora con el tratamiento.	[115]
Risperidona	8 semanas	N (sertralina+risperidona o placebo) = 25	No se encuentran diferencias en la sintomatología general del TEPT. Mejora de los índices de sueño con la adición de risperidona.	
1 – 4 mg/día	24 semanas	N = 296	Ligera mejora de la calidad de sueño con la adición de risperidona al tratamiento habitual.	[116]
1 – 4 mg/día	24 semanas	N (risperidona o placebo) = 247	No se encuentran diferencias en la escala CAPS entre ambos grupos.	[117]
ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN				
Dosis	Duración del tratamiento	Especie	Resultados	Ref.
0,01; 0,1 y 1 mg/kg/día p.o.	24 días	Ratas Charles Foster	La risperidona reduce los rasgos de ansiedad, de depresión y de deterioro cognitivo en roedores expuestos a un modelo de estrés-re-estrés.	[118, 119]

Tabla 6. Tabla resumen de los estudios, clínicos y preclínicos, realizados para evaluar la eficacia de la risperidona en TEPT. CAPS, Clinician Administered PTSD Scale; p.o., administración oral.

La administración de risperidona en monoterapia ha demostrado ser más eficaz que el placebo para reducir los síntomas psicóticos asociados al TEPT en veteranos de guerra [109] y para mejorar la sintomatología general del TEPT [110]. A dosis bajas, ha reducido significativamente los síntomas intrusivos y la hiperreactividad en mujeres con TEPT crónico desarrollado por haberse expuesto a una situación de abuso infantil [111]. Sin embargo, estos estudios se han realizado en una población muy reducida de pacientes (20-26/grupo) lo que pone en duda la representatividad de los resultados obtenidos.

Varios ensayos clínicos han demostrado la utilidad de la risperidona como tratamiento coadyuvante a la farmacología de primera línea en veteranos de guerra con TEPT crónico, principalmente para reducir los síntomas de re-experiencia, síntomas psicóticos [112, 113], la irritabilidad y la agresión asociadas al TEPT, así como las alteraciones de sueño [114-116]. Sin embargo, la adición de la risperidona a un tratamiento antidepresivo de primera línea no parece afectar positivamente a la sintomatología general del TEPT, a pesar de mejorar esos síntomas específicos [115, 117].

La **quetiapina** es otro fármaco perteneciente a la familia de los antipsicóticos de segunda generación, que se ha evaluado en algunos estudios con pacientes diagnosticados de TEPT (Tabla 7).

QUETIAPINA				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
50 – 800 mg/día	12 semanas	N (quetiapina) = 29 N (placebo) = 18	Mayor reducción de la puntuación CAPS con la quetiapina en comparación con el placebo.	[120]
25 – 400 mg/día	8 semanas	N = 53	Mejora de los síntomas psicóticos.	[121]
Prazosina 1 – 25 mg/día Quetiapina 25 – 600 mg/día	6 meses	N (quetiapina) = 175 N (prazosina) = 62	A corto plazo presentan la misma eficacia para tratar los síntomas nocturnos. A largo plazo la prazosina presenta mayor eficacia que la quetiapina.	[122]
25 – 400 mg/día	8 semanas	N = 15	Mejora de la sintomatología en la mitad de los pacientes tras la adición de la quetiapina al tratamiento antidepresivo habitual.	[123]
25 – 300 mg/día	6 semanas	N = 18	Reducción no significativa de la puntuación CAPS.	[112]
ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN				
Dosis	Duración del tratamiento	Especie	Resultados	Ref.
10 mg/kg/día (en agua de bebida)	14 días	Ratas Sprague-Dawley	La quetiapina reduce los rasgos de ansiedad y de depresión en roedores expuestos a un modelo modificado de SPS.	[124]

Tabla 7. Tabla resumen de los estudios, clínicos y preclínicos, realizados para evaluar la eficacia de la quetiapina en TEPT. CAPS, Clinician Administered PTSD Scale; SPS, Single Prolonged Stress.

Los pocos estudios publicados demuestran su eficacia para reducir los síntomas psicóticos que presentan los veteranos de guerra con diagnóstico de TEPT, así como los síntomas nocturnos, de re-experiencia, hiperreactividad y evitación, tanto en monoterapia como en combinación con la farmacoterapia de primera línea [120-123, 125]. Sin embargo, un tratamiento prolongado con este fármaco se relaciona con una mayor tasa de abandono por la aparición de reacciones adversas (aumento de peso, estreñimiento, cefaleas, astenia, entre otras), limitando así su empleo [122].

En los últimos años, algunos autores han evaluado la posible eficacia terapéutica del antipsicótico atípico **aripiprazol** para modular la sintomatología asociada al TEPT (Tabla 8). En monoterapia ha mostrado resultados prometedores en dos estudios clínicos. Sin embargo, el reducido número de pacientes incluidos, la alta tasa de abandono del tratamiento, y la ausencia de un grupo placebo han planteado dudas sobre los resultados obtenidos [126, 127].

ARIPIPRAZOL				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
5 – 30 mg/día	12 semanas	N = 8	Mejora significativa de la sintomatología del TEPT.	[126]
≈9,6 mg/día	16 semanas	N = 23	Mejora de la sintomatología del TEPT.	[127]
5 – 20 mg/día	10 semanas	N (aripiprazol) = 5 N (placebo) = 7	No se detectan cambios significativos en la escala CAPS con la adición del fármaco.	[128]

Aripiprazol -			Mejora sintomatológica de la depresión mayor tras la adición del aripiprazol, en comparación con el bupropión.	[129]
Bupropion -	12 semanas	N (total) = 717		
≈13,06 mg/día	12 semanas	N = 17	La adición del aripiprazol mejora los síntomas de TEPT.	[130]
ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN				
Dosis	Duración del tratamiento	Especie	Resultados	Ref.
0,1; 1 y 5 mg/kg/día i.p.	14 días	Ratas Sprague-Dawley	A dosis altas, el aripiprazol bloquea la reinstauración del condicionamiento al miedo en roedores expuestos al modelo animal de SPS.	[131]

Tabla 8. Tabla resumen de los estudios, clínicos y preclínicos, realizados para evaluar la eficacia del aripiprazol en TEPT. CAPS, Clinician Administered PTSD Scale; SPS, Single Prolonged Stress; i.p., administración intraperitoneal.

Por otra parte, como tratamiento coadyuvante ha mostrado resultados menos prometedores en comparación con otros antipsicóticos de la misma familia. Los estudios realizados con veteranos de guerra con diagnóstico de TEPT han demostrado que la adición del aripiprazol a la farmacoterapia de base no presentaría ninguna ventaja frente al placebo a la hora de reducir la sintomatología general del TEPT, presentando, además, una tasa de respuesta muy baja (cerca del 50%) [128-130].

La eficacia de estos fármacos antipsicóticos se ha evaluado en muy pocos modelos animales de estrés postraumático. En algunos estudios, estos fármacos han mostrado eficacia para modular la conducta de tipo depresiva, ansiosa y los

cambios cognitivos producidos como consecuencia de la exposición a los modelos animales [118, 119, 124]. Además, su administración subcrónica mejora el condicionamiento al miedo en roedores expuestos a una descarga eléctrica para inducir rasgos similares al estrés postraumático [131].

Los estudios realizados plantean resultados contradictorios en cuanto a la eficacia de los antipsicóticos en el manejo general del TEPT. Sin embargo, a pesar de estar asociados a una serie de limitaciones (prolongación del intervalo QT, alteraciones cardiovasculares en pacientes con alguna enfermedad cardiovascular, aumento de peso, astenia, entre otras) su empleo en la práctica clínica es habitual de manera coadyuvante a la farmacoterapia de primera línea para controlar algunos de los síntomas específicos de este trastorno [108, 113, 132].

2.1.3 Fármacos antiepilépticos

El uso de antiepilépticos en el TEPT está relacionado con la necesidad de tratar algunas comorbilidades complejas, como es el trastorno bipolar o el comportamiento impulsivo. Estas comorbilidades están presentes en una elevada proporción de pacientes diagnosticados de TEPT y su adecuado manejo terapéutico permitiría mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Algunos antiepilépticos se han evaluado en ensayos clínicos para valorar su posible eficacia a la hora de controlar algunos síntomas de los pacientes diagnosticados de TEPT. Los fármacos más estudiados han sido el topiramato y el ácido valproico. El **topiramato** actúa modulando los canales de sodio dependientes del voltaje, aumenta la transmisión GABAérgica y bloquea los receptores glutamatérgicos AMPA/kainato [133-138]. Su utilidad se ha estudiado tanto en

monoterapia como de forma coadyuvante a los tratamientos de primera línea, con resultados contradictorios en cuanto a su eficacia en este grupo de pacientes (Tabla 9). Los estudios han mostrado su eficacia para reducir los síntomas de re-experiencia (flashbacks, recuerdos intrusivos, pesadillas) [139, 140] y de evitación [140], sin afectar de manera significativa a la sintomatología general de los pacientes civiles con TEPT [139]. Estudios adicionales han sugerido que la eficacia del topiramato sería la misma en monoterapia que en combinación con un tratamiento de base. En ambos grupos de tratamiento, los pacientes experimentan mejoras en los síntomas de re-experiencia, evitación e hiperreactividad [141, 142]. Además, su uso en monoterapia o su adición al tratamiento de primera línea no parece predecir una mayor reducción de la sintomatología del TEPT [141, 142]. De manera similar, tampoco se ha observado una mejora significativa tras su adición al tratamiento de primera línea frente al placebo, además de producir una mayor incidencia de reacciones adversas [143].

TOPIRAMATO				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
50 – 400 mg/día	22 meses	N = 18 N (placebo) = 18	Mejora de los síntomas de re-experiencia, sin cambios significativos en la escala CAPS.	[139]
≈102,94 mg/día	12 semanas	N = 35	Mejora de los síntomas de re-experiencia, de evitación, aislamiento social y adormecimiento emocional.	[140]
12,5 – 500 mg/día	4 semanas	N (total) = 35	Reducción de los síntomas de re-experiencia.	[141]
12,5 – 200 mg/día	4 semanas	N (total) = 30	Mejora de los síntomas de re-experiencia, evitación e hiperreactividad.	[142]

25 – 200 mg/día	7 semanas	N (total) = 40	No se encuentran diferencias entre la adición de topiramato y de placebo al tratamiento habitual.	[143]
ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN				
Dosis	Duración del tratamiento	Especie	Resultados	Ref.
10 y 30 mg/kg/12 h p.o.	7 días	Ratas Sprague-Dawley	El topiramato reduce la respuesta de sobresalto en roedores expuestos al modelo de SPS.	[144]

Tabla 9. Tabla resumen de los estudios, clínicos y preclínicos, realizados para evaluar la eficacia del topiramato en TEPT. CAPS, Clinician Administered PTSD Scale; SPS, Single Prolonged Stress; p.o., administración oral.

El **ácido valproico** (o su precursor divalproex) también presenta un mecanismo de acción complejo, potenciando la respuesta GABAérgica, atenuando la respuesta neuronal mediada por los receptores glutamatérgicos NMDA y bloqueando los canales de sodio dependientes del voltaje. Su utilidad en el manejo de la sintomatología del TEPT también se ha estudiado en varios ensayos clínicos, obteniendo unos resultados todavía menos esperanzadores en comparación con los obtenidos con el topiramato (Tabla 10). Su utilidad se ha evaluado en monoterapia tanto en civiles como en veteranos de guerra con diagnóstico de TEPT. Sin embargo, su administración no ha resultado ser más eficaz que el placebo para mejorar la sintomatología general del TEPT, mostrando solamente una leve reducción en los síntomas de evitación [145], de intrusión, de hiperreactividad [146, 147] y problemas de conducta en varones jóvenes con TEPT [148]. Su administración a veteranos de guerra con TEPT crónico no ha resultado eficaz frente al placebo en ninguno de los parámetros evaluados [149].

ÁCIDO VALPROICO				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
-	-	N = 16 N (placebo) = 13	No se observan diferencias significativas en la escala CAPS.	[145]
10 – 20 mg/kg/día	8 semanas	N = 16	Reducción de los síntomas de hiperreactividad e intrusión, sin observar cambios en los síntomas de evitación.	[146]
¿?	¿?	N = 16	Mejora de los síntomas de hiperreactividad.	[147]
Dosis alta 500 – 1500 mg/día Dosis baja <250 mg/día	7 semanas	N (dosis alta) = 6 N (dosis baja) = 6	Mejora significativa de los síntomas de intrusión y de evitación con la dosis alta del divalproex.	[148]
500 – 3000 mg/día	8 semanas	N (total) = 85	No se encuentran mejoras con el tratamiento con divalproex frente al placebo.	[149]
ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN				
Dosis	Duración del tratamiento	Especie	Resultados	Ref.
100 – 400 mg/kg/día i.p.	26 días	Ratones ICR	El ácido valproico normaliza los rasgos de ansiedad en roedores expuestos a la descarga eléctrica, consiguiendo una ligera reducción en el tiempo de congelación.	[150]
-	30 días	Ratas Sprague-Dawley	Se observa una reducción de los rasgos de ansiedad en los roedores expuestos a un modelo animal de TEPT que consiste en combinar la exposición a un depredador y el estrés psicosocial.	[151]

Tabla 10. Tabla resumen de los estudios, clínicos y preclínicos, realizados para evaluar la eficacia del ácido valproico en TEPT. CAPS, Clinician Administered PTSD Scale; i.p., administración intraperitoneal.

Algunos autores han estudiado la utilidad que puedan tener otros fármacos antiepilépticos en el manejo del TEPT. La administración de **tiagabina** no ha resultado eficaz para regular la sintomatología del TEPT [152], ni para reducir la probabilidad de reinstauración de los síntomas [153] en comparación con el placebo. Se han realizado ensayos clínicos para valorar la eficacia de la pregabalina [154], fenitoína [155], levetiracetam [156], rivastigmina [157], nefazodona [158], lamotrigina [159] y gabapentina [160], obteniendo resultados en algunos casos prometedores, pero aun así muy limitados [155, 156, 158, 160].

En modelos animales de estrés postraumático se ha evaluado la eficacia de unos pocos fármacos antiepilépticos, con resultados prometedores en cuanto a su capacidad de modular distintos tipos de alteraciones inducidos por la exposición a los factores estresantes. La administración subcrónica o crónica de algunos antiepilépticos, como el topiramato o el ácido valproico, ha demostrado su eficacia para modular la respuesta de sobresalto [144], el condicionamiento al miedo y los rasgos de ansiedad [150, 151].

De esta manera, a pesar de la heterogeneidad de los resultados obtenidos [152, 161, 162] y la necesidad de realizar ensayos clínicos para determinar su utilidad terapéutica, los antiepilépticos suelen acompañar a la farmacología de base con el objetivo de controlar algunos síntomas del TEPT (inestabilidad emocional, conducta social) y el trastorno bipolar que en ocasiones va asociado al TEPT [149, 163].

2.1.4 Bloqueantes adrenérgicos

En los últimos años ha crecido el interés en estos fármacos y su posible utilidad terapéutica en el manejo de la sintomatología del TEPT. Los estudios realizados se han centrado principalmente sobre el tratamiento de las pesadillas y las alteraciones del sueño, dos de los síntomas más incapacitantes de esta enfermedad [164]. Algunos estudios han puesto de manifiesto que la **prazosina** (bloqueante alfa-adrenérgico) podría ser un fármaco útil en pacientes con diagnóstico de TEPT [165] (Tabla 11).

PRAZOSINA				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
1 – 15 mg/día	8 semanas	N (total) = 32	La Prazosina no reduce los síntomas diurnos de re-experiencia ni las pesadillas.	[165]
2 – 6 mg/día	7 semanas	N (total) = 13	Mejora de las pesadillas y de la calidad de sueño con la prazosina frente al placebo.	[166]
Prazosina 1 – 15 mg/día	8 semanas	N (prazosina) = 33 N (hidroxicina) = 34 N (placebo) = 33	Mejora de los trastornos de sueño y pesadillas con la administración de la prazosina.	[167]
2 – 4 mg/día	8 semanas	N = 9	Mejora de la sintomatología general y las pesadillas en 8 de 9 pacientes.	[168]
1 – 5 mg/12h	2 semanas	N (total) = 10	La administración adicional de prazosina por las mañanas reduce el estrés psicológico frente a estímulos relacionados con el evento traumático.	[169]
≈13 mg/día	8 semanas	N = 34	Eficaz para tratar las pesadillas y las alteraciones de sueño.	[170]

≈9,5 mg/día	20 semanas	N = 10	Eficaz para reducir las pesadillas y tratar las alteraciones de sueño.	[171]
≈9,6 mg/día	8 semanas	N = 36	Mejora de la calidad de sueño y de la sintomatología general de los pacientes.	[172]
1 – 6 mg/día	8 semanas	N = 23	Reducción significativa de las pesadillas y mejora general de la sintomatología del estrés postraumático.	[173]
1 – 20 mg/día	26 semanas	N (prazosina) = 152 N (placebo) = 152	No se encuentran mejoras significativas en la sintomatología general y las alteraciones de sueño en los pacientes tratados con la prazosina.	[174]
1 – 20 mg/día	8 semanas	N = 20	Mejora de la sintomatología general en el grupo tratado con la prazosina, pero poco pronunciado en el caso de los síntomas nocturnos.	[175]
ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN				
Dosis	Duración del tratamiento	Especie	Resultados	Ref.
0,25; 0,1 y 0,5 mg/kg/día i.p.	3 días (30 min antes de la exposición al estrés)	Ratas Sprague-Dawley	Reducción de la respuesta de sobresalto en roedores expuestos a la descarga eléctrica.	[176]

Tabla 11. Tabla resumen de los estudios, clínicos y preclínicos, realizados para evaluar la eficacia de la prazosina en TEPT. i.p., administración intraperitoneal.

Su empleo en pacientes civiles con diagnóstico de estrés postraumático ha mostrado una eficacia superior al placebo para aumentar el tiempo de sueño, la fase *REM* (*rapid eye movement*) y la calidad del sueño, mejorando así la sintomatología del TEPT [166-168]. Algunos autores indican que la administración de la prazosina, además de mejorar los síntomas nocturnos también permitiría aliviar el distrés causado por el recuerdo del evento traumático a lo largo del día, reduciendo la

gravedad del TEPT [169]. Sin embargo, la administración de este fármaco en los veteranos de guerra diagnosticados de TEPT ha producido resultados contradictorios. Algunos autores señalan que podría ser eficaz para reducir las pesadillas y otros síntomas nocturnos del trastorno, mejorando la calidad de vida de los pacientes y su situación clínica general [170-172]. Además, también podría resultar útil para reducir las pesadillas y el distrés nocturno [173]. Sin embargo, un estudio multicéntrico reciente ha concluido que la administración de la prazosina no supondría ninguna ventaja frente al placebo en lo que se refiere a la calidad del sueño y la presencia de pesadillas en una población bastante amplia de veteranos de guerra [174]. De la misma manera, tampoco sería eficaz para reducir las pesadillas y otros síntomas nocturnos en pacientes que además presentan ideación suicida [175].

En los últimos años también se ha evaluado la eficacia que podría presentar el **propranolol** (beta-bloqueante) en el manejo del TEPT, tanto para su tratamiento como para su prevención tras una exposición traumática (Tabla 12).

PROPRANOLOL				
ENSAYOS CLÍNICOS				
Dosis	Duración del tratamiento	Número de pacientes	Resultados	Ref.
40 mg + 60 mg (tras 2 horas)	Administración aguda	N = 9 N (placebo) = 10	Una semana después de la administración del fármaco, los signos fisiológicos ante las sesiones de reactivación fueron más leves en comparación con el placebo.	[177]

0,67 mg/kg + 1 mg/kg (tras 2 horas) /semana	6 semanas	N = 30 N (placebo) = 30	Reducción mayor en la escala CAPS en pacientes tratados con el propranolol antes de las sesiones de reactivación.	[178]
1 mg/kg	Administración aguda	N = 21 N (placebo) = 20	Mejora de las funciones cognitivas en pacientes tratados con la dosis aguda del propranolol.	[179]
40 mg/8 h	7 días	N (propranolol) = 11 N (no propranolol) = 8	La administración preventiva del propranolol tras una exposición traumática reduce la prevalencia del TEPT en la población estudiada.	[180]
<240 mg/día	19 días	N (total) = 41	La administración del propranolol tras una exposición traumática aguda no reduce la prevalencia del TEPT en la población evaluada ni la gravedad de los síntomas, aunque sí parece mejorar la respuesta fisiológica en una sesión de reactivación.	[181]

ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Dosis	Duración del tratamiento	Especie	Resultados	Ref.
10 o 15 mg/kg s.c.	Una única administración (1 hora después de la exposición)	Ratas Sprague-Dawley	El tratamiento no mejora la respuesta de sobresalto ni los rasgos de ansiedad en los roedores expuestos al lecho de un depredador natural.	[182]
2; 5 y 10 mg/kg s.c. o 1,25; 5; 10 o 15 µg administration intrahippocampal	Una única administración inmediatamente después de la exposición.	Ratas Sprague-Dawley	Se observa una reducción del tiempo de congelación tras el tratamiento en los roedores expuestos a la descarga eléctrica.	[183]

Tabla 12. Tabla resumen de los estudios, clínicos y preclínicos, realizados para evaluar la eficacia del propranolol en TEPT. CAPS, Clinician Administered PTSD Scale; s.c., administración subcutánea.

En algunos estudios la administración del propranolol se ha realizado inmediatamente antes de exponer a los pacientes a una sesión de reactivación de memoria, obteniendo resultados prometedores para reducir el impacto del recuerdo traumático sobre la situación clínica de los pacientes [177, 178] y mejorar significativamente su función cognitiva [179]. Por otra parte, también se ha evaluado su eficacia para prevenir el desarrollo del TEPT tras una exposición a un evento traumático. Sin embargo, los resultados obtenidos en este aspecto son heterogéneos. Algunos autores señalan que la administración de este fármaco podría resultar útil para prevenir el desarrollo del TEPT y la gravedad del trastorno, si se llega a desarrollar [180]. Otros estudios, sin embargo, sugieren que la administración del propranolol no presentaría ninguna ventaja frente al placebo para prevenir el desarrollo de este trastorno psiquiátrico [181].

La utilidad de estos fármacos se ha evaluado en varios estudios con modelos animales, centrandó la atención en su capacidad para prevenir el desarrollo de TEPT tras una determinada exposición traumática y altamente estresante. En el caso de la prazosina, se ha evaluado su utilidad preventiva en un modelo animal de TEPT para evitar la elevada respuesta de sobresalto en roedores expuestos a este modelo animal. En este estudio, la prevalencia de una mayor respuesta de sobresalto era menor en el grupo tratado con el fármaco que en el grupo no tratado [176]. Sin embargo, el tratamiento con algún bloqueante adrenérgico

inmediatamente después del evento traumático no presentaba la misma eficacia a la hora de modular las alteraciones en rasgos de ansiedad, de respuesta de sobresalto o de condicionamiento al miedo [182], pudiendo, en algunos casos, llegar a inducir rasgos de alteraciones cognitivas similares a las que se producen en sujetos que desarrollan TEPT [183]. Así pues, a pesar de los resultados interesantes en los estudios clínicos sobre la eficacia de los bloqueantes adrenérgicos en el manejo del TEPT, estos datos no se han podido contrastar en modelos animales de este trastorno psiquiátrico.

2.1.5 Benzodiazepinas

El uso de benzodiazepinas se asocia principalmente con la necesidad de tratar los síntomas de ansiedad y con la dificultad para conciliar y mantener un adecuado estado de sueño [184]. Sin embargo, la elevada prevalencia de los trastornos por uso de sustancias en pacientes con diagnóstico de TEPT limita su uso para evitar situaciones de abuso o desarrollo de conductas violentas y fuera de control [185]. Se ha evaluado la utilidad real que presentan las benzodiazepinas para regular los síntomas nocturnos de los pacientes con diagnóstico de TEPT, especialmente las pesadillas y la dificultad para conciliar y mantener un estado adecuado de sueño. En uno de los estudios, los autores combinaban la administración del alprazolam (o placebo) con la exposición a la terapia de la realidad virtual. Las conclusiones pusieron de manifiesto que el alprazolam resultaría beneficioso para los pacientes diagnosticados de TEPT [186]. Resultados similares se han descrito con la administración del clonazepam para paliar la sintomatología nocturna de los

veteranos de guerra con diagnóstico de TEPT [187]. También se ha evaluado la posible eficacia de las benzodiazepinas en la prevención del TEPT en una pequeña población de sujetos expuestos a un evento traumático. En el seguimiento realizado a estos pacientes a lo largo de 6 meses ni el alprazolam ni el clonazepam mostraron eficacia para prevenir el desarrollo de esta enfermedad [188].

Estos resultados se han corroborado en estudios con modelos animales de estrés postraumático, con resultados poco concluyentes en cuanto a la eficacia terapéutica o preventiva de las benzodiazepinas en el TEPT. Su administración durante el periodo de exposición a los factores estresantes sí ha demostrado reducir los rasgos de ansiedad y el condicionamiento al miedo en benzodiazepinas de semivida prolongada [189, 190]. Sin embargo, la administración de pequeñas dosis del alprazolam, inmediatamente después de la exposición al evento traumático, se ha asociado con una peor respuesta ante situaciones estresantes adicionales [191].

Así, a pesar de que los datos tanto clínicos como preclínicos son poco concluyentes en cuanto al empleo de las benzodiazepinas para mejorar la sintomatología asociada al TEPT, hay varios ensayos clínicos que actualmente están analizando la utilidad de estos fármacos en pacientes diagnosticados de estrés postraumático crónico y en la profilaxis de este trastorno [186, 192].

2.1.6 Otros agentes farmacológicos para el manejo del TEPT: drogas psicodélicas

La 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA), conocida como éxtasis, es una de las drogas psicodélicas más consumidas a nivel mundial. Actúa estimulando la liberación de la serotonina, noradrenalina y dopamina, con un efecto mayor sobre el sistema serotoninérgico [193]. La limitada eficacia de los tratamientos

habitualmente empleados para el TEPT ha impulsado la evaluación de la MDMA en pacientes con TEPT crónico y resistente a los tratamientos convencionales. En todos ellos, la MDMA se administró a una dosis efectiva (75-125 mg) o subefectiva (30-40 mg) y como tratamiento coadyuvante a la psicoterapia. Su empleo tanto en pacientes con TEPT crónico [194-197], como en pacientes con diagnóstico de TEPT resistentes al tratamiento habitual instaurado [198, 199] ha mostrado resultados prometedores en cuanto a la mejora de la sintomatología. Además, sería interesante destacar la baja incidencia de reacciones adversas limitantes en la población seleccionada, salvo que el paciente presente historia clínica de consumo de drogas de abuso. Por lo tanto, se tendrían que realizar más estudios para determinar con claridad la eficacia real de la MDMA en esta población de pacientes, excluyendo a los que presenten alguna comorbilidad relacionada con el consumo de sustancias.

2.1.7 Nuevos agentes farmacológicos en el manejo del TEPT: modulación del sistema endocannabinoide

Los pacientes con TEPT suelen estar polimedicados con distintas combinaciones de fármacos. A pesar de ello, el porcentaje de pacientes con diagnóstico de TEPT que consigue una remisión completa de sus síntomas es muy bajo lo que justifica la necesidad urgente de búsqueda de nuevos agentes farmacológicos más eficaces y seguros [200]. En este sentido, la modulación del sistema endocannabinoide podría resultar una alternativa interesante en el tratamiento del TEPT.

El sistema cannabinoide endógeno es un sistema que consta de una serie de ligandos de naturaleza lipídica, enzimas encargadas de su síntesis y degradación, y receptores cannabinoide transmembrana acoplados a proteínas G [201, 202].

Los endocannabinoides más representativos son la N-araquidoniletanolamina (anandamida o AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), que ejercen su acción uniéndose a los receptores cannabinoides CB1 y CB2. Tanto la AEA como el 2-AG se sintetizan y liberan por neuronas y células gliales, y una vez ejercida su acción, se metabolizan por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y por la monoacilglicerol lipasa (MAGL), respectivamente [203-206]. La modulación del sistema cannabinoide puede llevarse a cabo tanto a través de los cannabinoides endógenos como a través de los fitocannabinoides. En este sentido, en los últimos años ha surgido un interés creciente en la modulación de este sistema por parte del cannabidiol (CBD), un fitocannabinoide que forma parte de la planta *Cannabis sativa* y que carece de propiedades como droga de abuso [207]. De hecho, diversos estudios han propuesto su acción ansiolítica, antidepresiva, neuroprotectora y antipsicótica, que podrían ser de utilidad en el manejo del estrés postraumático [208]. En este sentido, se han llevado a cabo algunos estudios piloto para valorar la eficacia del CBD en estos pacientes. Recientemente se ha publicado un estudio retrospectivo de una serie de casos clínicos que evalúan el uso de una dosis flexible de CBD en 11 pacientes adultos con diagnóstico de TEPT [209]. Los autores concluyen que la adición del CBD al tratamiento rutinario de los pacientes, tanto farmacológico como psicoterapéutico, podría resultar útil para reducir la gravedad de los síntomas. Sin embargo, sería necesario realizar estudios adicionales para determinar su eficacia en esta población de pacientes [209]. En cuanto a la población infantil con estrés postraumático, un caso clínico ha reportado la eficacia del CBD para mejorar la memoria aversiva [210], la calidad del sueño y reducir la ansiedad, logrando una mejora significativa de su sintomatología [211].

De forma paralela, dada la posible eficacia del CBD en los pacientes con estrés postraumático, se han llevado a cabo algunos estudios preclínicos con la intención de valorar su utilidad en los modelos animales de este trastorno psiquiátrico. A pesar de que las acciones ansiolíticas del CBD se han demostrado en un elevado número de estudios [212], han sido muy pocos los que han evaluado su potencial utilidad en modelos animales de estrés postraumático. Con todo ello, los resultados de esos estudios son prometedores en cuanto a la eficacia del CBD en modular no sólo los rasgos de ansiedad, sino también el condicionamiento al miedo en roedores expuestos a modelos animales de TEPT [213, 214].

Estos resultados prometedores tanto en el área de los estudios clínicos como los estudios realizados en animales de experimentación han motivado la realización de varios ensayos clínicos para evaluar el beneficio terapéutico del CBD en pacientes con TEPT. Uno de los estudios, que actualmente está en fase de reclutamiento valorará la utilidad del aceite de CBD en esta población ([NCT04197102](#)), mientras que el otro (cuyo inicio se ha autorizado hace pocos meses) evaluará la utilidad del medicamento Nabiximols® (Sativex®, una combinación del delta-9-tetrahydrocannabinol y CBD) a la hora de mejorar la sintomatología de los pacientes con TEPT ([NCT04592159](#)). Los resultados de ambos estudios se esperan conocer en el mes de mayo de 2024 y de 2023, respectivamente.

2.2 Abordaje farmacológico del trastorno dual: Trastorno de estrés postraumático y Trastorno por uso de alcohol

A pesar del grave impacto sociosanitario de los trastornos por uso de alcohol existen pocos abordajes farmacológicos realmente eficaces para modular las

distintas fases del proceso de la adicción al alcohol. Actualmente hay tres fármacos aprobados por la FDA y la Agencia Europea de Medicamentos: la naltrexona (NTX), el disulfiram y el acamprosato. Cada uno de estos fármacos presenta un mecanismo de acción distinto que permite su empleo en distintas fases del tratamiento con mayor o menor eficacia a la hora de lograr un éxito farmacológico [215-218].

El **disulfiram** actúa inhibiendo la enzima aldehído-deshidrogenasa, bloqueando de esta manera la transformación de acetaldehído (derivado de la deshidrogenación del alcohol) en acetato. Cuando el paciente ingiere alcohol estando en tratamiento con este fármaco, la acumulación del acetaldehído induce una serie de reacciones muy desagradables como vasodilatación, taquicardia, mareo, dolor precordial, náuseas, vómitos e hiperventilación. El grado de afectación depende de la dosis de disulfiram y de la cantidad de alcohol ingerido, llegando a producir en los casos más extremos pérdida de conciencia, convulsiones e incluso la muerte [219]. Su empleo está principalmente dirigido a pacientes que tengan motivación real por dejar de consumir alcohol ya que requiere un abandono completo del consumo, sobre todo teniendo en cuenta los efectos perjudiciales del uso concomitante del alcohol junto con el fármaco. En el caso contrario, si el paciente no tiene una motivación por abandonar el consumo, habrá una peor adherencia terapéutica al tratamiento para evitar los síntomas citados.

El **acamprosato** es otro fármaco aprobado por las distintas agencias internacionales para el tratamiento del TUA. Su efecto modulador de la neurotransmisión glutamatérgica podría estar relacionado con su eficacia para reducir el consumo de alcohol. Sin embargo, su uso no parece predecir un menor consumo de alcohol a lo largo de la vida de los pacientes. Además, recientemente

se ha propuesto que el acamprosato no tendría un efecto *per se*, sino que su utilidad terapéutica residiría en sal cálcica que se emplea para su formulación [220].

De manera alternativa al disulfiram y el acamprosato se pueden emplear también los fármacos denominados anti-deseo o anti-*craving*, entre los que cabe destacar la **NTX**, que actúa bloqueando los receptores opioides μ , y con menor afinidad también los δ y κ . Su utilidad terapéutica en el manejo de los TUA se debe a su acción antagonista sobre los receptores μ opioides, inhibiendo de esta manera la estimulación de las neuronas dopaminérgicas por las β -endorfinas liberadas tras la ingesta de alcohol. Así, la NTX reduce tanto el consumo como el riesgo de recaída. Su empleo para el abordaje de los TUA se apoya en muchos ensayos clínicos, a pesar de que la eficacia real de este fármaco está condicionada por distintas variables, entre las que podemos señalar la variabilidad interindividual que pueda existir. Parte de dicha variabilidad interindividual podría estar relacionada con algunas características genéticas de los pacientes. Se ha observado que un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) en el receptor opioide μ causaría una sustitución del aminoácido asparagina por un aspartato (Asn40Asp) que a su vez daría lugar a 3 genotipos distintos de este receptor (AA, AG y GG). La afinidad de las β -endorfinas es tres veces superior por la variante mutada (AG) que por la común (AA), haciendo que la eficacia de la NTX sea mayor en pacientes que presentan las formas mutadas AG o GG [221, 222].

En los pacientes con TEPT-TUA, a la dificultad del tratamiento del TEPT se le suma la complejidad del abordaje farmacológico del TUA. A lo largo de las últimas décadas se han realizado varios estudios clínicos para valorar la utilidad de algunos fármacos aprobados para el tratamiento del TEPT o de los TUA en el manejo de la

comorbilidad TEPT-TUA, con resultados muy heterogéneos. La utilidad terapéutica de la NTX se ha estudiado en varios ensayos clínicos con pacientes diagnosticados con TEPT-TUA. En estos estudios se ha valorado la eficacia de este fármaco solo o combinado con la terapia de exposición para reducir los síntomas del TEPT y el consumo de alcohol. En uno de los estudios, de 12 semanas de duración, la NTX presentó la misma eficacia que el disulfiram para reducir el consumo de etanol en pacientes con el trastorno dual TEPT-TUA, con una mejora general en la sintomatología del TEPT en todos los grupos [223]. Sin embargo, la combinación de la NTX con la terapia de exposición no consiguió regular la sintomatología del TEPT-TUA en otro estudio realizado de 24 semanas de duración [224] ni reducir los días de consumo [225]. Además, su combinación con fármacos que se emplean habitualmente para el abordaje del TEPT (paroxetina) tampoco fue eficaz para mejorar la sintomatología del TEPT y reducir los días de consumo en la población con diagnóstico dual de TEPT-TUA [226].

Otro posible abordaje farmacológico del TEPT-TUA es el empleo de fármacos que se utilizan habitualmente para tratar el estrés postraumático, a pesar de su limitada eficacia en este trastorno. En este sentido, algunos autores han evaluado la eficacia de la sertralina para regular la sintomatología del trastorno dual TEPT-TUA con resultados heterogéneos. En un estudio clínico realizado con 9 pacientes, la administración de la STR consiguió modular la sintomatología del TEPT y reducir el consumo de alcohol [227]. Sin embargo, su administración junto con la terapia cognitivo-conductual no resultó más eficaz que el placebo para reducir la sintomatología del TEPT o el consumo de alcohol [228].

Tras observar esta heterogeneidad en los resultados, algunos autores han señalado que la eficacia de la STR podría estar condicionada por el nivel de consumo de alcohol y la cronicidad del TEPT [229]. A pesar de ello, los datos disponibles no permiten concluir el beneficio terapéutico real de estos fármacos en el abordaje del trastorno dual TEPT-TUA [225, 226, 229, 230].

La valoración de fármacos ya aprobados o empleados para el TEPT y el trastorno dual TEPT-TUA, así como la búsqueda de nuevas sustancias que permitan un adecuado manejo de estas enfermedades, requiere de la modelización animal como una herramienta esencial. El desarrollo de un modelo animal adecuado que reproduzca algunas de las características principales de ambos trastornos psiquiátricos permitiría evaluar la eficacia de estos fármacos y profundizar en las alteraciones neurobiológicas asociadas. De esta manera, aumentando nuestro conocimiento sobre la neuropatología implicada en el desarrollo del TEPT y del TEPT-TUA, se podría profundizar en la búsqueda de biomarcadores que faciliten un diagnóstico, tratamiento y pronóstico adecuados.

3. MODELIZACIÓN ANIMAL DE TRASTORNO DE ESTRÉS POSTRAUMÁTICO Y TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL (TEPT-TUA)

3.1 Modelos animales del Trastorno de estrés posttraumático

En los últimos años ha surgido un interés creciente en la comunidad científica por el desarrollo de un modelo animal de TEPT adecuado y válido que permita estudiar las alteraciones neuroquímicas relacionadas con este trastorno y buscar

nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento. Dicho modelo animal debería cumplir una serie de requisitos que garanticen su validez de constructo, aparente y predictiva [231]. La validez de constructo hace referencia a la similitud en las causas o en el procedimiento empleado para desarrollar el modelo animal. En el caso de los modelos animales de TEPT, esta validez se consigue exponiendo a los animales de experimentación a distintas situaciones traumáticas que simulen la exposición traumática producida en los pacientes con diagnóstico de TEPT. La validez aparente hace referencia a la similitud entre la conducta desarrollada por los roedores expuestos al modelo animal y la conducta humana, con relación al desarrollo de los rasgos de ansiedad, la presencia de memoria aversiva y deficiencias en la extinción del miedo. En cuanto a la validez predictiva, consiste en la posibilidad de predecir la respuesta terapéutica a un determinado fármaco en pacientes con diagnóstico de TEPT en base a la observación de sus efectos en roedores expuestos al modelo animal de estrés postraumático.

Teniendo en cuenta dichos criterios, para poder modelizar el TEPT desde un punto de vista traslacional, la estrategia más empleada es la exposición de los animales de experimentación a distintos factores estresantes. Estos estímulos estresantes pueden ser de naturaleza física (aplicación de descargas eléctricas, natación forzada o restricción de movimiento), psicosocial (inestabilidad en las condiciones de estabulación, derrota o aislamientos sociales) o psicogénica (exposición a un depredador o a su olor). Además, se pueden aplicar en un momento determinado de la vida del animal de experimentación (exposición aguda) o a lo largo de un periodo más o menos prolongado de tiempo (exposición crónica), pudiendo ser una exposición única al estímulo o varias exposiciones repetidas en el

tiempo [232]. Este último aspecto permite distinguir entre modelos animales agudos y crónicos, simulando cada uno de ellos un tipo de estrés postraumático diferente desarrollado tras una exposición aguda o crónica a uno o varios acontecimientos traumáticos.

3.1.1 Modelos animales agudos de Trastorno de estrés postraumático

La finalidad de estos modelos animales es simular el estrés postraumático desarrollado tras una exposición única a un estímulo estresante que puede ser de naturaleza física, psicogénica o psicosocial. Los estímulos más empleados son la restricción de movimiento [233, 234], la aplicación de una descarga eléctrica [71, 73, 235-238] o la exposición a un depredador natural o a su orina [87, 239, 240]. A pesar de ser una exposición única, el tiempo de aplicación del estímulo estresante puede variar en función del protocolo empleado desde unos pocos minutos hasta varias horas. En estos estudios, las alteraciones conductuales inducidas suelen ser relativamente leves a corto plazo [87, 236, 240, 241] y en algunos aspectos (condicionamiento al miedo) incluso no se producen [241]. Algunos de estos modelos se han empleado para valorar la utilidad terapéutica de distintos fármacos. Los fármacos de referencia han sido principalmente la STR y la PXT, por ser los únicos aprobados por las distintas agencias nacionales e internacionales para su empleo en el TEPT [71, 73, 87, 237]. Aunque en estos modelos es posible detectar modificaciones conductuales como la presencia de rasgos de depresión, ansiedad y también alteraciones en la actividad del eje del estrés [240], muy pocos estudios evalúan la repercusión de la exposición al estímulo estresante sobre estas alteraciones a largo plazo. En el caso concreto de la descarga eléctrica, su

aplicación aguda parece que empeora la calidad del sueño de los roedores hasta varias semanas después de la exposición, simulando uno de los síntomas característicos del estrés postraumático relacionado con la pérdida de calidad de sueño [242]. Sin embargo, en los estudios donde se evaluaron las alteraciones a largo plazo tras la aplicación de la descarga eléctrica, se observó una disminución del impacto sobre la conducta a lo largo del tiempo. Estos datos sugieren que los roedores expuestos a estos modelos agudos no presentarían problemas de extinción de miedo, siendo la dificultad para extinguir la memoria del evento traumático (causante del trastorno) uno de los rasgos principales del estrés postraumático [243].

De esta manera, los modelos agudos permiten simular algunos rasgos del TEPT, principalmente los rasgos de ansiedad, de depresión y la memoria aversiva del evento traumático que presentan los pacientes con TEPT. Sin embargo, también presentan importantes limitaciones relacionadas con la duración de las alteraciones inducidas y la posibilidad de realizar estudios farmacológicos crónicos. Para abordar dichas limitaciones, en los últimos años se han desarrollado algunos modelos crónicos o de exposición repetida que intentan simular con mayor precisión determinados rasgos conductuales y alteraciones neurobiológicas que se producen en pacientes con TEPT.

3.1.2 Modelos animales crónicos de Trastorno de estrés postraumático

Los modelos animales crónicos de TEPT se han desarrollado para tratar de simular mejor el tipo de estrés postraumático que se produce tras múltiples exposiciones a varias situaciones traumáticas de distinta naturaleza e intensidad.

Estos modelos se pueden desarrollar exponiendo a los roedores a distintos estímulos estresantes de manera crónica y/o repetitiva en el tiempo. Esta secuencia de estímulos permitiría inducir cambios prolongados en el tiempo, simulando con más fiabilidad algunas de las alteraciones conductuales y neurobiológicas que se detectan en determinadas condiciones clínicas de estrés postraumático.

El modelo desarrollado por Zoladz y cols. trata de modelizar el TEPT mediante la exposición de ratas al lecho de un depredador natural (gato) combinada con la inestabilidad social dentro de su jaula de estabulación a lo largo de un periodo total de 31 días [244]. Los sujetos expuestos a este modelo de TEPT muestran mayores rasgos de ansiedad y deterioro cognitivo a lo largo de los cinco días siguientes a la finalización de la fase de exposición a los factores estresantes, en comparación con las ratas controles. Sin embargo, la administración de la sertralina durante 7 días consecutivos tras la finalización de la fase de exposición al modelo no consigue modificar la ansiedad inducida por la exposición a este modelo de TEPT [85].

Otra posibilidad es exponer los roedores a distintos eventos traumáticos durante su etapa adolescente (por ser una etapa muy vulnerable a la influencia de cualquier factor ambiental) y valorar el desarrollo de alteraciones conductuales en la edad adulta. Este modelo de exposición temprana ha demostrado inducir rasgos de evitación detectados hasta dos semanas después de la exposición [245], y de ansiedad dos meses después de la aplicación de los estímulos estresantes [96]. En este último estudio, los autores indican que el tratamiento con FXT tras la exposición a los eventos traumáticos en la etapa adolescente podría prevenir el desarrollo del TEPT en la edad adulta. Sin embargo, el tratamiento con la FXT no resulta efectivo en la etapa adulta de los roedores [96].

El modelo animal más empleado en los últimos años para simular los rasgos más característicos del estrés postraumático es el denominado “estrés simple prolongado” o *Single Prolonged Stress* (SPS, por sus siglas en inglés) que consiste en exponer a los roedores a una serie de estímulos estresantes de manera consecutiva durante siete días y, en algunos casos, varias veces al día [75, 246]. Como consecuencia de la exposición a este modelo animal, los roedores desarrollan rasgos de deterioro cognitivo que se manifiestan por una falta de flexibilidad ante la toma de decisiones [247], condicionamiento al miedo [75, 248], alteraciones en la regulación del eje del estrés [75, 246], rasgos de ansiedad y de depresión, presencia de una conducta de evitación del estímulo relacionado con el factor estresante [249], así como alteraciones en los sistemas de neurotransmisión serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico [248]. Con todo ello, las alteraciones inducidas por este modelo se van atenuando con el tiempo, de manera que dos semanas después de haber finalizado la exposición, los efectos son mínimos sobre el condicionamiento al miedo y los rasgos de ansiedad [250]. Una manera de intentar solventar esta carencia ha sido el desarrollo de un modelo de SPS modificado, combinándolo con la aplicación de la descarga eléctrica para conseguir una mayor duración de las alteraciones inducidas, que aun así no llegan a sobrepasar las 2 semanas [251, 252]. A pesar de ello, tanto el modelo de SPS como su versión modificada se han empleado para realizar estudios farmacológicos de corta duración (administración aguda o subcrónica de 7-14 días) con la PXT. En estos estudios farmacológicos, la administración aguda de la PXT consigue regular el condicionamiento al miedo en roedores expuestos tanto al modelo de SPS como al modelo SPS modificado [74, 251, 252]. Sin embargo, no parece reducir los rasgos

de ansiedad de los roedores expuestos al modelo de SPS modificado que solo se consigue con su administración subcrónica [251, 252].

El modelo de SPS y sus posteriores modificaciones permiten simular algunos de los rasgos más destacables del estrés postraumático, como es el condicionamiento al miedo, la presencia de rasgos de ansiedad y depresión, rasgos de evitación, así como alteraciones en el eje del estrés. Sin embargo, estos modelos carecen de una de las características principales del TEPT que es la duración de las alteraciones inducidas y deficiencias en la extinción de la memoria del evento traumático. Estas alteraciones no se mantienen el tiempo suficiente para simular la cronicidad de este trastorno y para realizar estudios farmacológicos con tratamientos prolongados. Tampoco permiten su combinación con otros paradigmas empleados para modelizar los trastornos por uso de sustancias para desarrollar modelos animales de la patología dual TEPT y trastorno por uso de sustancias.

Por ese motivo, uno de los objetivos de este trabajo ha sido el desarrollo, la caracterización y la validación de un nuevo modelo animal de TEPT que permita inducir alteraciones conductuales y neurobiológicas duraderas en el tiempo para poder realizar estudios farmacológicos crónicos con fármacos ya aprobados o con nuevos posibles agentes que puedan ser eficaces para el tratamiento del TEPT. Se ha diseñado un nuevo modelo animal que combina estímulos físicos con psicogénicos, además de presentar algunas peculiaridades que lo distinguen del resto de los modelos animales de TEPT y también de los modelos de estrés crónico. Por una parte, los factores estresantes empleados en este modelo animal se aplican durante un periodo total de 5 semanas, alternando periodos de exposición (semanas 1, 3 y 5) con periodos de descanso (semanas 2 y 4). Adicionalmente, la intensidad

de los estímulos estresantes va aumentando progresivamente a lo largo de las tres semanas de exposición mediante la adición de nuevos estresores. Por último, la exposición al modelo animal se realiza durante la etapa adolescente de los ratones, que es un periodo de mayor vulnerabilidad a distintos factores ambientales. Todas estas características garantizan una elevada afectación de los roedores y una mayor duración de dichas alteraciones conductuales y neurobiológicas, permitiendo la realización de estudios farmacológicos crónicos. El desarrollo de este modelo ha permitido un avance importante en la investigación básica del estrés postraumático, permitiendo aumentar nuestros conocimientos sobre las alteraciones neurobiológicas asociadas a este trastorno, valorando la utilidad terapéutica de la administración crónica de los fármacos STR y/o CBD sobre los cambios conductuales y neurobiológicos que siguen presentes hasta 9 semanas después de haber finalizado la fase de exposición.

3.2 Modelos animales de la patología dual Trastorno de estrés postraumático y Trastorno por uso de alcohol

Una elevada proporción de pacientes con estrés postraumático desarrolla un consumo problemático de alcohol, dando lugar a un trastorno dual de estrés postraumático y TUA. La complejidad de este trastorno dificulta aún más la identificación de las alteraciones neurobiológicas implicadas y hace mucho más compleja la elección de un abordaje farmacológico seguro y eficaz. Algunos autores han propuesto diseños de modelos animales que reproduzcan ciertos rasgos característicos de esta condición clínica dual. Uno de los factores que debe considerarse es el desarrollo temporal de ambos trastornos. Lo más habitual es que

el diagnóstico del TUA sea posterior al diagnóstico de TEPT. Sin embargo, esta evolución temporal sólo se ha conseguido reproducir en algunos de los modelos desarrollados [253]. Otros, en cambio, han evaluado el consumo de alcohol en roedores con historia previa de consumo elevado de alcohol y cómo influye la aplicación de un estímulo estresante sobre dicho consumo [254, 255]. Otra limitación de estos modelos es que el elevado consumo de etanol que se produce tras la exposición a un estímulo estresante se mantiene durante relativamente un corto periodo de tiempo. Por lo tanto, los diseños experimentales utilizados hasta la fecha no permiten realizar estudios a largo plazo sobre los cambios que puedan estar ocurriendo a nivel cerebral, ni llevar a cabo estudios farmacológicos de larga duración.

Contrariamente a lo observado en los pacientes con TEPT-TUA, en algunos estudios se ha obtenido un menor consumo de etanol en los roedores expuestos al estrés psicosocial (exposición crónica a un depredador natural) que no reproduciría el elevado consumo de etanol observado en pacientes con estrés postraumático, alejándose de esta manera de la modelización del trastorno dual estrés postraumático y TUA [256]. Algo similar ocurre con el modelo desarrollado por Meyer y cols., donde inmediatamente después de la exposición a la situación traumática no se produciría un mayor consumo de alcohol, que sólo se observaría tras exponer a esos roedores a un periodo de abstinencia [257].

Considerando la ausencia de modelos animales adecuados que simulen el consumo problemático de alcohol en los pacientes con diagnóstico de TEPT, otro de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido emplear el nuevo modelo animal de TEPT para estudiar la vulnerabilidad por los efectos reforzantes y motivacionales de

alcohol en roedores expuestos a ese modelo, con el fin de desarrollar un modelo dual del este trastorno TEPT-TUA que simule los rasgos más característicos de la enfermedad. Para ello, el modelo animal de estrés postraumático se ha combinado con dos paradigmas experimentales que se emplean habitualmente para evaluar el consumo y la motivación por el etanol en roedores: el consumo voluntario (CV, paradigma de las dos botellas) [258, 259] y la autoadministración oral operante de alcohol (AAO) [259, 260].

De esta manera, se ha podido desarrollar un modelo animal de la patología dual TEPT y TUA, que ha permitido inducir un elevado consumo de etanol en los roedores expuestos al modelo animal de TEPT hasta 6 semanas después de haber finalizado la inducción del modelo, así como una elevada motivación por conseguir esa droga. Esto ha permitido simular algunos de los rasgos más característicos de los pacientes con el diagnóstico dual TEPT-TUA no descritos hasta la fecha. Además, este nuevo modelo animal se ha empleado para valorar la utilidad terapéutica de la combinación farmacológica de la STR y la NTX (a dosis subefectivas), fármacos aprobados y empleados en la práctica clínica para el tratamiento del TEPT y del TUA, respectivamente.

La aplicación de estímulos estresantes/traumáticos a los ratones durante su etapa adolescente producirá en la edad adulta un perfil conductual que simule algunos rasgos característicos del TEPT. Estas alteraciones incluirán principalmente la modificación de la respuesta emocional ante estímulos ansiogénicos y una mayor respuesta aversiva ante la reexposición al ambiente en el que se aplicó la descarga eléctrica (memoria emocional).

Desde el punto de vista neurobiológico, los cambios en la conducta inducidos por el modelo de TEPT se asociarán con una gran variedad de alteraciones en dianas del eje del estrés, del sistema cannabinoide endógeno y del sistema serotoninérgico que se relacionarán con el consumo de etanol.

La evaluación de las propiedades reforzantes y motivacionales del etanol mediante los paradigmas del CV y la AAO mostrarán una mayor vulnerabilidad hacia los efectos reforzantes y motivacionales del etanol en aquellos ratones expuestos al modelo de TEPT en comparación con sus respectivos controles.

El estudio de las alteraciones neurobiológicas en diferentes estructuras cerebrales, junto con la respuesta en el modelo de autoadministración de etanol en ratón, resultarán extremadamente útiles en el diseño de estrategias farmacológicas para el tratamiento del TEPT y de los problemas por uso de etanol asociados al TEPT.

OBJETIVOS

Objetivos generales

1. Identificar las alteraciones conductuales (respuesta emocional, grado de ansiedad y condicionamiento al miedo) y neurobiológicas (eje del estrés, sistema cannabinoide endógeno, sistema serotoninérgico) en ratones adultos inducidas por la aplicación de estímulos estresantes/traumáticos durante la adolescencia (modelo animal del trastorno de estrés postraumático (TEPT)).
2. Evaluar la utilidad terapéutica de nuevas estrategias sobre las alteraciones conductuales y neurobiológicas inducidas por la aplicación de estímulos estresantes/traumáticos durante la adolescencia.
3. Estudiar el efecto de la aplicación de estímulos estresantes/traumáticos durante la adolescencia sobre la vulnerabilidad por el consumo de etanol y las alteraciones neurobiológicas asociadas (sistema de recompensa, sistema serotoninérgico) en ratones adultos.
4. Evaluar la utilidad terapéutica de nuevas estrategias sobre la vulnerabilidad por el consumo de etanol en ratones adultos inducida por la aplicación de estímulos estresantes/traumáticos durante la adolescencia.

Objetivos específicos

1. Estudiar la conducta de ratones adultos que fueron expuestos durante su adolescencia a estímulos estresantes/traumáticos: caja clara-oscura y laberinto elevado en cruz (rasgos de ansiedad), ingesta inhibida por la novedad (rasgos de ansiedad y depresión), y condicionamiento al miedo (memoria emocional).

2. Identificar las alteraciones neurobiológicas inducidas por el modelo de estrés postraumático:
 - Alteraciones en el eje de estrés (expresión génica mediante PCR a tiempo real (rt-PCR)): CRF en núcleo paraventricular (PVN), receptor de glucocorticoides (rGC) en hipocampo (HIPP), y proopiomelanocortina (POMC) en núcleo arqueado (ARQ). Evaluación de la corticosterona acumulada en pelo de ratón como un indicador periférico de la actividad del eje del estrés (cuantificación proteica mediante la técnica de ELISA).
 - Alteraciones en el sistema cannabinoide endógeno (rt-PCR): rCB1 y rCB2 en la amígdala (AMY).
 - Alteraciones en el sistema serotoninérgico (rt-PCR): 5HTT en el núcleo del rafe dorsal (DR).
3. Estudiar el efecto de la administración de los fármacos CBD, STR o de la combinación de ambos sobre las alteraciones conductuales y neurobiológicas inducidas por el modelo de TEPT.
4. Estudiar las modificaciones sobre el consumo y preferencia por el etanol mediante el paradigma del CV inducidas por la exposición al modelo animal de TEPT.
5. Estudiar las modificaciones sobre el consumo y motivación por el etanol mediante el paradigma de la AAO, así como las alteraciones neurobiológicas asociadas, como consecuencia de la exposición al modelo de TEPT en la etapa adolescente de los ratones:
 - Alteraciones del sistema de recompensa (rt-PCR): TH en área de tegmento ventral (VTA), y Oprm1 en núcleo accumbens (NAcc).

- Alteraciones del sistema serotoninérgico (rt-PCR): 5HTT en DR.
6. Estudiar el efecto de la administración de los fármacos STR, NTX o de la combinación de ambos sobre el consumo y la motivación por el etanol en el paradigma de la AAO y las alteraciones neurobiológicas asociadas en ratones expuestos al modelo animal de TEPT.

A continuación, se expone la metodología empleada para los estudios incluidos en la presente tesis doctoral, diferenciando entre el **Artículo 1** y el **Artículo 2**.

1. Animales

Para el desarrollo del nuevo modelo animal de TEPT se han empleado ratones C57BL/6J machos procedentes de Charles River (Lille, Francia) de 4 semanas de edad. Los ratones se han estabulado en condiciones ambientales controladas de temperatura (23 ± 2 °C), humedad relativa (60 ± 10 %) y de ciclo luz-oscuridad (luces encendidas de 08:00 a 20:00 h) con un acceso *ad libitum* al agua y a la comida, salvo cuando la evaluación conductual haya requerido su restricción. Una vez estabulados, se ha dejado un periodo de aclimatación de 1 semana antes de empezar con el desarrollo del modelo animal. Todos los estudios se han realizado en el animalario de San Juan de Alicante, de la Universidad Miguel Hernández (UMH), y han contado con la aprobación del Órgano de Investigación Responsable de la UMH.

2. Fármacos

El cannabidiol (CBD) (**Artículo 1**) se ha adquirido de THC Pharm (Alemania) y se ha disuelto en etanol:cremofor:salino en una proporción 1:1:18 para obtener la dosis requerida de 20 mg/kg de peso de ratón para su administración intraperitoneal (i.p.). La sertralina (STR) (**Artículos 1 y 2**) se ha adquirido de los laboratorios Pfizer (Madrid, España) y se ha disuelto en agua para obtener la dosis requerida de 10 mg/kg de peso de ratón, para su administración oral (p.o.). La naltrexona (NTX) (**Artículo 2**), se ha obtenido de los laboratorios Accord Healthcare S.L.U (Barcelona,

España) y se ha disuelto en suero fisiológico (0,9 %) para obtener la dosis de 0,7 mg/kg de peso de ratón para su administración oral (p.o.). Todos los fármacos se han preparado diariamente, inmediatamente antes de su administración, a un volumen final de 10 ml/kg de peso.

3. Desarrollo del modelo animal de TEPT

Para el desarrollo del modelo animal los ratones se han expuesto a varios estímulos estresantes:

- Orina de zorro: los roedores se colocan en una jaula que contiene en su centro un tubo de plástico con una gasa impregnada con orina de zorro sintética (Code Blue, Fox Urine Cover Scent, Referencia OA1105, 3 ml) o con salino (en el caso de los controles) durante 15 minutos.
- Descarga eléctrica: los ratones se colocan en una jaula de metacrilato (50 x 25 x 25 cm) con barras electrificadas. Tras un periodo de aclimatación de 30 segundos, se les aplica una descarga de 1mA de 10 segundos de duración, seguida de un periodo de descanso de 20 segundos adicionales. En el caso de los controles, no se les aplica ninguna descarga.
- Restricción de movimiento: los ratones se introducen dentro de unos tubos de plástico perforados durante un periodo de 15 minutos, o se mantienen inalterados en el caso de los controles.
- Jaula inclinada: durante el ciclo de oscuridad (12-14 h), las jaulas de los roedores se inclinan unos 30° o se mantienen inalterados en el caso de los controles.

- Lecho húmedo: durante su ciclo de oscuridad y por un periodo de 12-14 h los roedores se exponen a una jaula con el lecho completamente húmedo o se dejan inalterados (controles).
- Restricción de comida: durante su ciclo de oscuridad y por un periodo de 12-14 h, se restringe el acceso a la comida o no (controles).

Estos estímulos estresantes se aplican durante un periodo total de 5 semanas, alternando periodos de exposición (semanas 1, 3 y 5) con periodos de descanso (semanas 2 y 4) para evitar que los roedores se habitúen a los estímulos y añadir un factor de impredecibilidad y reexposición a los estresores. Además, la intensidad de los estresores va en aumento entre una semana y otra de exposición, mediante la adición de nuevos estímulos estresantes, tal y como se muestra en la (**Artículo 1, Figura 1**).

4. Evaluación de las alteraciones basales inducidas por la exposición al modelo animal de TEPT

Tras finalizar el periodo de exposición al modelo animal, a lo largo de las semanas 6 y 7 se llevan a cabo estudios para valorar las alteraciones que se producen en los roedores (**Artículo 1, Figura 1**).

4.1 Estudios conductuales (Artículos 1 y 2)

Tras la fase de exposición al modelo animal de TEPT (semanas 1-5), las alteraciones conductuales se evalúan durante las semanas 6 y 7 mediante los paradigmas conductuales del condicionamiento al miedo, la ingesta inhibida por la novedad y la respuesta de sobresalto (**Artículo 1, Figura 1**).

- **Condicionamiento al miedo (CM)**

En este paradigma conductual se evalúa la retención de la memoria aversiva basada en el condicionamiento Pavloviano [261]. Consiste en exponer a los roedores a la misma jaula de metacrilato en la que han recibido la descarga eléctrica en la fase de inducción del modelo animal, sin que reciban ninguna descarga en esta ocasión. Durante un periodo de 5 minutos se evalúa la conducta de congelación (*freezing*), que consiste en la ausencia total de los movimientos excepto los de la respiración. Dicha conducta de congelación se relaciona directamente con la presencia de recuerdos aversivos del evento traumático (en este caso, la aplicación de la descarga eléctrica).

- **Respuesta de sobresalto (RS)**

Se emplea un protocolo descrito previamente para valorar la respuesta de sobresalto de los roedores expuestos al modelo animal de TEPT [262]. Aquí, los ratones se colocan en cámaras insonorizadas equipadas con altavoces controlados por el software STARTLE (Laboratorios Panlab, Barcelona, España), que permite medir el movimiento de los roedores convirtiéndolo en una señal digital. Los ratones se aclimatan durante los 3 días previos a la realización de la prueba conductual, colocándolos diariamente y durante un periodo de 5 minutos dentro de las cámaras insonorizadas. El día de la evaluación se exponen a 10 estímulos acústicos de sobresalto de 120 dB (40 ms, 8000 Hz) aplicados cada 44 s, registrándose el máximo de amplitud de sobresalto durante una ventana temporal de 400 ms.

- **Ingesta inhibida por la novedad (IIN)**

Este paradigma conductual permite evaluar la hiponeofagia inducida por un ambiente novedoso para el roedor, que consiste en la inhibición de la ingesta de alimentos o de la aproximación a la comida en un ambiente ansiogénico [263, 264]. Tras 24 horas de deprivación de comida, los ratones se colocan en una caja de metacrilato (40 x 40 x 50 cm) con un pellet de comida colocado en su centro sobre una plataforma de papel. En esta prueba se mide el tiempo de latencia, que es el tiempo que tarda el roedor en acercarse al pellet y empezar a comer, así como la cantidad de alimento que ingiere en un periodo total de 5 minutos.

4.2 Estudios de expresión génica (**Artículo 1**)

Tras la exposición al modelo animal y la evaluación conductual basal, un grupo de roedores del **Artículo 1** (8 controles y 8 expuestos al modelo animal de TEPT) se sacrifican por dislocación cervical extrayéndose los cerebros para llevar a cabo estudios de expresión génica relativa mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (rt-PCR), de varias dianas cerebrales: CRF en el PVN, POMC en el ARC, rGC en el HIPPO, CNR1 y CNR2 en la AMY y 5HTT en el DR.

Los cerebros extraídos de los roedores se congelan a -80°C para su posterior análisis. A partir de esos cerebros se obtienen cortes coronales de 500 µm en el criostato que contengan las regiones de interés, siguiendo el atlas de Paxinos y Franklin [265]. Dichos cortes se emplean para realizar microdisecciones de núcleos cerebrales específicos siguiendo el protocolo descrito por Palkovits y posteriormente modificado por nuestro grupo [266, 267]. A partir de esas microdisecciones, se extrae el ácido ribonucleico mensajero (mARN), que se

retrotranscribe a cadenas de ácido desoxirribonucleico complementario (cADN) para el estudio de la expresión génica relativa de los genes detallados. Como gen de referencia se emplea aquel que codifica para la subunidad 18S ribosomal, normalizando los valores de cada diana a los valores del gen de referencia. El cambio global en la expresión génica de las dianas seleccionadas se determina utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak y Schmittgen [268].

4.3 Cuantificación de la corticosterona acumulada en pelo (Artículo 1)

Se toman muestras capilares de la zona dorsal de los ratones para cuantificar la corticosterona acumulada en el pelo, que actúa como un indicador periférico de la activación del eje del estrés. La cuantificación de la corticosterona acumulada se realiza siguiendo el protocolo descrito por Erickson y cols. [269]. Brevemente, tras el sacrificio de los roedores (detallado previamente) se obtienen muestras capilares de la zona dorsal que pasan por un proceso de lavado con metanol, seguido de su secado en un ambiente protegido. Las muestras, una vez secas, se transfieren a tubos que contienen granos de acero inoxidable de 2,8 mm de diámetro, para introducirlos en una mezcladora y pulverizarlos hasta obtener un polvo. Posteriormente, las muestras obtenidas se incuban con metanol durante 24 h para extraer la corticosterona. Una vez pasado ese tiempo, el sobrenadante se seca en un ambiente protegido. Para la cuantificación de la corticosterona acumulada se emplea el kit de la técnica de inmunoensayo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), EIA-CORT (Invitrogen, Madrid, España), siguiendo las indicaciones del fabricante.

5. Evaluación de la eficacia de los fármacos CBD y/o STR sobre las alteraciones a largo plazo inducidas por el modelo animal de TEPT (Artículo 1)

Tras la valoración basal en las semanas 6 y 7, un grupo de los roedores del Artículo 1 (39 controles y 39 expuestos al modelo animal de TEPT) se mantiene inalterado hasta la semana 11. Entre las semanas 11 y 14 los ratones se exponen a los paradigmas conductuales encaminados a valorar la respuesta de congelación en el CM (semanas 11 y 14), así como la conducta de tipo ansiosa mediante la caja clara y oscura (semana 12) y el laberinto elevado en cruz (semana 13) cuyo procedimiento se detalla en el siguiente apartado. Adicionalmente, dichas pruebas de conducta se han empleado para evaluar la eficacia de los fármacos CBD (20 mg/kg, i.p.) y/o STR (10 mg/kg, p.o.) en la modulación de las alteraciones conductuales inducidas por la exposición al modelo de TEPT (**Artículo 1, Figura 1**).

5.1 Estudios conductuales

- Condicionamiento al miedo (CM, semanas 11 y 14)

Se sigue el protocolo descrito previamente para evaluar el condicionamiento al miedo que presentan los roedores en las semanas 11 y 14. La evaluación de la semana 11 coincide con la administración aguda de ambos fármacos (CBD y/o STR), mientras que la evaluación en la semana 14 permite valorar los efectos de la administración crónica de dichos fármacos, solos o en combinación.

- **Caja clara y oscura (CCO, semana 12)**

Es uno de los paradigmas más empleados para valorar los rasgos de ansiedad en animales de experimentación [270]. Se realiza en una caja de metacrilato dividida en dos compartimentos (20 x 20 x 15 cm), uno transparente y claro, y otro opaco y oscuro, unidos por un pasillo opaco. El compartimento claro, además, se ilumina con una lámpara (60W) que se coloca a una distancia de 25 cm sobre el compartimento. Una vez que se coloca el roedor en la caja, se mide el tiempo que pasa en el compartimento iluminado, así como el número de transiciones entre ambos compartimentos durante un periodo de 5 minutos.

- **Laberinto elevado en cruz (LEC, semana 13)**

Es otro método empleado con mucha frecuencia en la experimentación animal para valorar los rasgos de ansiedad [271]. El aparato consiste en cuatro brazos (dos cerrados y dos abiertos) colocados en forma de cruz a una distancia de 50 cm sobre el suelo. En la unión de los 4 brazos hay una plataforma cuadrada (5 x 5 cm) donde se coloca el roedor al inicio de la prueba. Durante un periodo de 5 minutos se cuantifica el tiempo que pasa el roedor en los brazos abiertos y el número de transiciones entre los brazos abiertos y los cerrados.

5.2 Estudios de expresión génica

Al finalizar la última valoración conductual (CM, semana 14), los roedores se sacrifican por dislocación cervical extrayéndose los cerebros para el análisis de expresión génica mediante la técnica de la rt-PCR (Apartado 4.2 de la Metodología)

de distintas dianas relacionadas con el eje del estrés, así como con el sistema cannabinoide endógeno y el serotoninérgico:

- Eje del estrés: CRF en el PVN, POMC en el ARC y GCr en el HIPP,
- Sistema cannabinoide endógeno: CNR1 y CNR2 en la AMY,
- Sistema serotoninérgico: 5HTT en el DR.

6. Evaluación de la eficacia de los fármacos STR y/o NTX sobre el consumo y la motivación por el etanol y los cambios de expresión génica asociados (Artículo 2)

Tras el desarrollo del modelo animal y la valoración conductual basal en las semanas 6 y 7, los roedores se exponen a paradigmas experimentales encaminados a valorar el consumo de etanol y la preferencia por esta droga (consumo voluntario), y la motivación por conseguir la droga en un paradigma de condicionamiento operante (autoadministración oral de alcohol). El objetivo final en este punto es caracterizar un modelo animal de la patología dual TEPT y TUA. Adicionalmente, una vez caracterizado el nuevo modelo dual TEPT-TUA, se valora la eficacia de la administración de la STR y la NTX sobre la modulación de las propiedades reforzantes y motivacionales del alcohol (**Artículo 2, Figura 1**).

6.1 Estudios conductuales

- Consumo voluntario (CV)

Tras la exposición al nuevo modelo animal de TEPT y la valoración conductual basal, un grupo de roedores (11 controles y 15 expuestos al modelo animal de TEPT) se evalúa mediante el paradigma del CV o de las dos botellas, tal y como se

muestra en la **Figura 3A del Artículo 2**, siguiendo el protocolo descrito previamente por Ortega-Álvaro y cols. [258]. Para ello, los roedores se estabulan en jaulas individuales equipados con dos biberones volumétricos que contienen agua durante una semana, para facilitar su aclimatación a las nuevas condiciones de estabulación. Inmediatamente después, en uno de los biberones volumétricos el agua se sustituye por una solución hidroalcohólica cuya composición en etanol incrementa de manera progresiva (2, 4, 6 y 8 % v/v, cada 3 días), mientras que el otro siempre contiene agua. Tras alcanzar la concentración de 8% de etanol durante 3 días, el nivel de consumo y la preferencia por el biberón que contiene dicha solución se evalúan durante un periodo adicional de 2 semanas hasta alcanzar valores estables en ambos parámetros. Los biberones se van alternando diariamente de sitio para evitar cualquier sesgo de posición, y el contenido (agua o solución hidroalcohólica) se renueva cada día a última hora de la tarde, midiendo el volumen consumido de cada solución. Los ratones se pesan cada 4 días, permitiendo el cálculo de los gramos de etanol consumido por kg de peso. Adicionalmente, se determina la preferencia del roedor por la botella que contiene la solución hidroalcohólica (preferencia por el etanol = volumen de etanol ingerido/volumen total ingerido).

- **Evaluación de la acción de los fármacos STR y/o NTX en el paradigma experimental de la autoadministración oral de alcohol (AAO)**

Tras la inducción del modelo animal de TEPT y la valoración conductual de las alteraciones inducidas en las semanas 6 y 7, otro grupo de roedores (11 controles y 44 expuestos al modelo animal de TEPT) se expone al paradigma experimental

de la AAO, empleando 18 cajas operantes (Panlab, Barcelona, España) que están equipadas de luz ambiental, dos palancas, un receptáculo donde se libera la solución, una bomba de inyección, un estímulo luminoso y uno acústico (**Artículo 2, Figura 4**). El software PACKWIN (Panlab, Barcelona, España) controla la aplicación de los estímulos, la liberación de la solución y registra las respuestas operantes que lleva a cabo el roedor (número de accionamientos de las palancas). Cuando el ratón acciona una de las palancas, no se produce ninguna respuesta (palanca inactiva). Sin embargo, cuando el ratón acciona la otra palanca, se liberan 36 µl de la solución junto con la activación del estímulo luminoso (0,5 s) y acústico (0,5 s, 2850 Hz y 85 dB) (palanca activa), seguido de un periodo de latencia de 6 s.

El experimento se divide en 4 fases:

- 1. Fase de entrenamiento:** cuando el roedor acciona la palanca activa una vez, se liberan 36 µl de una solución de sacarina al 0,2%.
- 2. Fase de sustitución:** donde cada 3 días y durante un periodo total de 9 días, se va reduciendo progresivamente la concentración de sacarina y aumentando la de alcohol.
- 3. Fase de evaluación de consumo y motivación:** esta fase se subdivide en 3 etapas que permiten evaluar tanto el consumo como la motivación por conseguir etanol al 8% (v/v):
 - Razón fija 1 (FR1): 5 días con sesiones diarias de 1 hora de duración, donde un accionamiento de la palanca activa libera un volumen de la solución hidroalcohólica (un único refuerzo).

- Razón fija 3 (FR3): 5 días con sesiones diarias de 1 hora de duración, donde para la obtención de un único refuerzo el roedor tiene que accionar la palanca activa 3 veces consecutivas.
- Razón progresiva (PR): una única sesión de 2 horas de duración donde el número de accionamientos de la palanca activa para conseguir un único refuerzo va aumentando progresivamente de acuerdo con la siguiente serie: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-1000. Durante esta sesión se obtiene el punto de corte (del inglés *breaking point*) que corresponde al número máximo de accionamientos de la palanca activa que el roedor es capaz de realizar para conseguir un único refuerzo.

Al finalizar esta fase, los roedores se seleccionan de acuerdo a unos criterios de aprendizaje que se detallan a continuación:

- Presentar una preferencia $\geq 70\%$ por la palanca activa,
- ≥ 10 accionamientos durante las sesiones FR1 y FR3, y ≥ 5 en la sesión PR,
- $\leq 30\%$ de desviación estándar en el número de accionamientos de la palanca activa durante 3 días consecutivos (en FR1 y FR3),
- consumo medio de etanol 8% $\geq 500 \mu\text{l}$ (1,5 g/kg) en FR1, $\geq 300 \mu\text{l}$ (0,9 g/kg) en FR3 y $\geq 117,5 \mu\text{l}$ (0,35 g/kg) en PR,
- Punto de corte ≥ 12 en PR.

Así, los ratones que cumplan con estos requisitos pasarán a la Fase 4 de la AAO:

4. Fase de evaluación del tratamiento con STR y/o NTX sobre el consumo de etanol y la motivación por conseguir esta droga. Aquí se sigue un protocolo similar al descrito por Viudez-Martínez y cols. [272]. Los roedores se distribuyen en cuatro grupos de tratamiento (VEH, STR, NTX y STR+NTX)

garantizando unos niveles homogéneos de consumo y motivación por el etanol. Tras un periodo de estabilización de consumo en fase FR1 (5 días), se exponen al tratamiento farmacológico seleccionado, administrando ambos fármacos una hora antes de la sesión correspondiente. La eficacia de los fármacos se evalúa durante sesiones de FR1 (8 días), FR3 (5 días) y PR (1 día) adicionales.

6.2 Estudios de expresión génica

Tras finalizar la fase de PR (con tratamiento), los roedores se sacrifican por dislocación cervical, extrayéndose los cerebros para el análisis de expresión génica de distintas dianas de interés mediante la técnica de rt-PCR:

- Sistema dopaminérgico: TH en el VTA,
- Sistema opioide: Oprm1 en el NAcc,
- Sistema serotoninérgico: 5HTT en el DR.

7. Análisis estadístico de los resultados (Artículos 1 y 2)

El análisis estadístico se ha realizado empleando: i) *t-test* de Student, para comparar dos grupos experimentales; ii) ANOVA de dos vías seguido del test *post hoc* Student-Newman-Keuls para comparar varios grupos de tratamiento entre sí en un momento temporal determinado; y iii) ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del test *post hoc* Student-Newman-Keuls para comparar la evolución de varios grupos de tratamiento entre sí a lo largo de un periodo determinado.

RESULTADOS: RESUMEN GLOBAL

En el presente estudio se detalla la caracterización y la validación de un nuevo modelo animal de TEPT, que permite el desarrollo de un modelo de la patología dual TEPT-TUA no descrito hasta la fecha, haciendo hincapié, en ambos casos, en las dianas cerebrales implicadas, así como en los posibles abordajes farmacológicos. Para ello, los roedores se exponen a una serie de estímulos estresantes a lo largo de un periodo total de 5 semanas, alternando periodos de descanso con periodos de exposición, además de introducir los factores de impredecibilidad y de aumento de la intensidad de los estímulos a aplicar de una semana a otra de la exposición (ver Apartado 3 de Metodología). Todos estos aspectos han contribuido a que las alteraciones conductuales inducidas por el modelo se mantengan a largo plazo permitiendo: i) llevar a cabo estudios farmacológicos de larga duración, y ii) combinar el modelo animal de TEPT con modelos habitualmente empleados en la experimentación básica para valorar los efectos reforzantes y motivacionales del etanol.

En primer lugar y tras la fase de inducción del modelo animal de TEPT, los roedores exhiben un tiempo de congelación significativamente superior al de los controles en el paradigma del CM (semana 6), así como rasgos de ansiedad con un mayor tiempo de latencia y menor cantidad de alimento ingerido en el paradigma de la IIN, y un mayor sobresalto en la evaluación de la respuesta de sobresalto (semana 7) (**Anexo I: artículo 1, figura 2; artículo 2, figura 2 y figura S1**). Estos cambios conductuales se acompañan de alteraciones en la actividad del eje del estrés que se detecta tanto a nivel central (expresión génica en núcleos cerebrales) como a nivel periférico (corticosterona acumulada en pelo de ratón). Los roedores

expuestos al modelo animal de TEPT presentan un aumento en la expresión génica del CRF en comparación con los controles (+150%) (**Anexo I: artículo 1, figura 3a**) que se acompaña de un aumento, aunque de menor intensidad, en la expresión génica del POMC (**Anexo I: artículo 1, figura 3b**) y de una reducción en la del rGC (**Anexo I: artículo 1, figura 3c**). Estos cambios a nivel central se reflejan en un aumento de la corticosterona acumulada en el pelo de los ratones expuestos al modelo de TEPT (+50%) (**Anexo I: artículo 1, figura 3d**). Además, los roedores expuestos al modelo animal de TEPT presentan una reducción en la expresión génica relativa del CNR1, y un aumento en la expresión génica del CNR2 y 5HTT (**Anexo I: artículo 1, figura 4**).

Estudios conductuales posteriores demuestran que las alteraciones a nivel de la respuesta emocional se mantienen hasta 9 semanas después de haber finalizado la fase de inducción del modelo animal, permitiendo al mismo tiempo la realización de un estudio farmacológico con el CBD y/o STR. En este sentido, durante las evaluaciones posteriores de la presencia de memorias aversivas en el paradigma del CM en las semanas 11 y 14, se observa una ligera reducción del tiempo de congelación (-1% a la semana 11 y -20% a la semana 14) poniendo de manifiesto los problemas de extinción de recuerdos aversivos que presentan los roedores expuestos al modelo animal (**Anexo I: artículo 1, figura 5a y 5d**). Aquí, tanto la administración aguda (semana 11) como la crónica (semana 14) del CBD presenta la misma eficacia que la STR a la hora de reducir el tiempo de congelación, consiguiendo una reducción mayor con la administración crónica (CBD: -30,67%; STR: -32,54%) que con la aguda (CBD: -23,62%; STR: -19,96%). Curiosamente, la

combinación de ambos fármacos consigue una reducción del tiempo de congelación mucho mayor que cada fármaco en monoterapia, tanto a nivel agudo (CBD+STR: -58.96%) como a nivel crónico (CBD+STR: -65,28%) (**Anexo I: artículo 1, figura 5c y 5f**).

De manera adicional, se llevan a cabo estudios conductuales para valorar los rasgos de ansiedad que presentan los roedores analizando, al mismo tiempo, la eficacia de la administración de los fármacos CBD y/o STR. Tanto a la semana 12 (**Anexo I: artículo 1, figura 6a**) como a la 13 (**Anexo I: artículo 1, figura 7a**), los ratones expuestos al modelo animal de TEPT presentan mayores rasgos de ansiedad que sus respectivos controles poniendo de manifiesto, una vez más, la larga duración de las alteraciones inducidas por el modelo. Aquí, el CBD y la STR en monoterapia consiguen reducir los rasgos de ansiedad de los roedores expuestos al modelo de TEPT aumentando su tiempo de permanencia en los compartimentos ansiogénicos tanto de la CCO (CBD: +36,87%; STR: +46,63%) como del LEC (CBD: +56,02%; STR: +37,63%). Curiosamente, de una manera similar a lo que ocurría en el paradigma del CM, se observa un efecto sinérgico/aditivo con la administración conjunta de CBD y STR en ambos paradigmas conductuales en cuanto al tiempo de permanencia de los roedores en los compartimentos ansiogénicos de ambas pruebas (+114,02% en CCO y +92,06% en LEC) (**Anexo I: artículo 1, figura 6c y figura 7c**).

Las alteraciones conductuales observadas a largo plazo se acompañan de cambios en la expresión génica de dianas relacionadas con el eje del estrés, el sistema cannabinoide endógeno y el serotoninérgico. En el caso del eje del estrés,

se observa un aumento significativo en la expresión génica del CRF (+30%) y algo menos en la de GCr, junto con una reducción en la expresión génica del POMC (**Anexo I: artículo 1, figura 8a, 8d y 8g**). Aquí, la administración crónica de CBD+STR consigue modular el aumento observado en la expresión génica del CRF (**Anexo I: artículo 1, figura 8c**), sin inducir ningún tipo de cambio significativo a nivel del POMC o GCr (**Anexo I: artículo 1, figura 8f, 8i**). De manera adicional, se observa un aumento en la expresión génica de los receptores cannabinoides CNR1 y CNR2 (+80%), y una reducción en el caso del 5HTT (-40%) (**Anexo I: artículo 1, figura 9a, 9d y figura 10a**). En el caso de la expresión génica de CNR1 y CNR2, la administración del CBD y/o STR consiguen inducir ligeros cambios, observándose un aumento sustancial en el caso de la expresión génica del 5HTT de más del 100% tanto con el CBD, como con la STR y la combinación CBD+STR (**Anexo I: artículo 1, figura 10c**).

Una vez evaluados los cambios conductuales y de expresión génica a largo plazo, el siguiente artículo incluido en la tesis doctoral trata de elucidar si dichas alteraciones pueden derivar en una mayor vulnerabilidad de los ratones hacia los efectos reforzantes y motivacionales del etanol, empleando los paradigmas experimentales del CV (**Anexo I: artículo 2, figura 3a**) y la AAO (**Anexo I: artículo 2, figura 4**). En el paradigma del CV se observa que los ratones expuestos al modelo animal de TEPT presentan una mayor preferencia por el etanol y un mayor consumo de esa droga (**Anexo I: artículo 2, figura 3b y 3c**). Posteriormente, en la AAO se demuestra que, aparte de presentar un mayor consumo de etanol, también tienen una mayor motivación por conseguir la droga (**Anexo I: artículo 2, figura 5**

y S2). Aquí, se valora la eficacia de la administración de la STR y/o NTX a la hora de modular el consumo y la motivación por el alcohol en el grupo de ratones expuestos al modelo de TEPT, observando una reducción significativa en el consumo y el número de accionamientos de la palanca activa sólo con la combinación farmacológica STR+NTX (**Anexo I: artículo 2, figura 6a y 6b**). Asimismo, se observa una reducción en la motivación por obtener etanol con ambos fármacos, siendo dicha reducción mucho más significativa con la combinación farmacológica STR+NTX (**Anexo I: artículo 2, figura 6c y 6d**). Estos cambios en el consumo y la motivación por el alcohol se acompañan de unas alteraciones significativas en dianas cerebrales relacionadas con los sistemas dopaminérgico, opioide y serotoninérgico. Más concretamente, los roedores expuestos al modelo animal de TEPT y posteriormente a la AAO presentan una reducción en la expresión génica relativa de la TH y Opmr1, y un aumento en la expresión génica del 5HTT (**Anexo I: artículo 2, figura 7a, 7b y 7c**). Curiosamente, estos cambios en la expresión génica de la TH y 5HTT se modulan tanto con la administración de cada fármaco en monoterapia como con la combinación farmacológica, sin embargo, en el caso de la expresión génica del Opmr1, es la combinación STR+NTX la que consigue normalizar sus niveles (**Anexo I: artículo 2, figura 7d, 7e y 7f**).

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral ponen de manifiesto que el nuevo modelo animal crónico de TEPT es capaz de inducir alteraciones conductuales y a nivel de expresión génica a largo plazo, permitiendo de esta manera el desarrollo de un modelo animal del trastorno dual TEPT-TUA y la

búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas tanto para el TEPT como para la patología dual.

A continuación, se expone un resumen de la discusión de los datos obtenidos y englobados en los **Artículos 1 y 2**, que se pueden consultar en el Anexo I.

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que el nuevo modelo animal de TEPT induce alteraciones conductuales y cambios en la expresión de ciertos genes que se mantienen a largo plazo. La larga duración de estos cambios permite desarrollar un modelo animal del trastorno dual TEPT-TUA y facilita el ensayo de abordajes farmacológicos (que requieren varias semanas de tratamiento) tanto para el TEPT como para el TEPT-TUA.

Los resultados obtenidos se resumen en los siguientes puntos: 1) Los ratones expuestos al modelo animal de TEPT presentan un marcado condicionamiento al miedo y rasgos de ansiedad que se acompañan de cambios significativos en la expresión génica de dianas cerebrales implicadas en la activación del eje del estrés, el sistema cannabinoide endógeno y el serotoninérgico, además de una mayor concentración de corticosterona acumulada en el pelo; 2) los efectos sobre la memoria aversiva y la ansiedad se mantienen a largo plazo en los ratones expuestos al modelo de TEPT, y se acompañan de cambios en la expresión génica de CNR1 y CNR2 en AMY, 5HTT en DR y de dianas relacionadas con el eje del estrés (CRF, POMC y GCr) que se modulan con la administración del CBD (20 mg/kg, i.p.), STR (10 mg/kg, p.o.) o su combinación; 3) los roedores expuestos al modelo animal de TEPT presentan una mayor vulnerabilidad por las acciones reforzantes y motivacionales del etanol en los paradigmas de CV y AAO, junto con alteraciones en la expresión génica de la TH en VTA, Opmr1 en NAcc y 5HTT en DR, 4) La administración conjunta de la STR (10 mg/kg, p.o.) y NTX (0,7 mg/kg,

p.o.) regula el consumo y la motivación por el etanol, así como las alteraciones observadas en la expresión génica de TH, Opmr1 y 5HTT.

Para conocer mejor las características fisiopatológicas del TEPT, es crucial el desarrollo de modelos animales que reproduzcan, al menos en parte, la intensidad y la duración de los síntomas de este trastorno, en particular, para identificar dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas más seguras y eficaces. En el estudio, se ha desarrollado un modelo animal crónico de TEPT para inducir alteraciones intensas y duraderas en el tiempo sobre la respuesta emocional y la expresión génica de distintas dianas cerebrales. El desarrollo del modelo animal de TEPT se ha realizado durante el período adolescente de los ratones, siendo este hecho crítico para inducir alteraciones notables y duraderas en la extinción del miedo y en los rasgos de ansiedad, evidentes incluso 9 semanas después de finalizar la fase de inducción del modelo. En el CM, la pequeña reducción del tiempo de congelación observada en las semanas 11 (1,38 %) y 14 (20,18 %) en comparación con la semana 6 pone de manifiesto los déficits de extinción al miedo en los ratones expuestos al modelo animal de TEPT. Por lo tanto, las deficiencias a largo plazo que desencadena este modelo facilitan la simulación, al menos en parte, de las alteraciones emocionales crónicas que presentan los pacientes con TEPT. Adicionalmente, también facilitan la realización de estudios farmacológicos crónicos (3 a 4 semanas de duración) y la combinación del modelo animal con paradigmas experimentales empleados habitualmente para valorar el consumo y la motivación por etanol en animales de experimentación (de 4 a 7 semanas de duración).

En un primer bloque de experimentos se evaluó la eficacia de la administración del CBD, sólo o combinado con la STR, para regular las alteraciones conductuales y de expresión génica a largo plazo presentes en los roedores expuestos al modelo animal de TEPT. Estudios recientes, clínicos y preclínicos, señalan que el CBD podría ser una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento del TEPT [209, 211, 273, 274]. Sin embargo, no se ha evaluado todavía el efecto de su administración crónica, sola o en combinación con la STR, sobre las alteraciones a largo plazo inducidas por un modelo animal de TEPT. En este estudio se ha observado que, tanto la administración aguda como crónica del CBD presenta la misma eficacia que la STR para reducir el tiempo de congelación en el CM y los rasgos de ansiedad en la CCO y el LEC. Es interesante destacar que la combinación farmacológica de CBD y STR induce unos efectos más pronunciados, reduciendo significativamente el tiempo de congelación y los rasgos de ansiedad, en comparación con cada fármaco por separado. Este resultado pone de manifiesto la utilidad terapéutica del CBD y, en particular, de su combinación con la STR para atenuar la memoria aversiva y los rasgos de ansiedad presentes en el TEPT. Estos cambios conductuales se podrían explicar, en parte, por las alteraciones que se observan en los cambios de expresión génica de dianas cerebrales relacionadas con el eje del estrés. Más concretamente, los ratones expuestos al modelo animal de TEPT presentan una elevada expresión génica de CRF, que se normaliza con la administración de CBD y STR. Además, estos cambios se acompañan de un incremento en la expresión génica del rGC y una reducción en la del POMC, simulando las alteraciones en la regulación del eje del estrés que se producen a largo plazo en los pacientes con TEPT [275].

Posteriormente, se midió la expresión génica de CNR1 y CNR2 en la AMY, y de 5HTT en DR. Se observó un aumento en la expresión génica relativa del CNR1, CNR2 y una reducción en la expresión génica del 5HTT. La administración de CBD, STR y su combinación indujo un aumento adicional en la expresión génica del CNR1. El efecto del CBD sobre el CB1 podría ser el resultado de su acción indirecta sobre el receptor mediante el aumento de la disponibilidad de la AEA [276] y su acción directa como modulador alostérico negativo del CB1 [277]. En cuanto a los cambios observados en la expresión génica del 5HTT, tanto el CBD como la STR y su combinación normalizan la reducción observada en los roedores expuestos al modelo animal de TEPT.

La ausencia de tratamientos efectivos para el abordaje de la comorbilidad TEPT-TUA motiva la urgente necesidad de búsqueda de nuevas estrategias. Para ello, se decide llevar a cabo un segundo bloque de experimentos donde se demuestra que los ratones expuestos al modelo de TEPT presentan una elevada vulnerabilidad por los efectos reforzantes y motivacionales del alcohol en paradigmas experimentales que tienen una duración de 5-7 semanas. El tratamiento de la asociación de STR+NTX reduce el consumo de etanol y el número de accionamientos de la palanca activa en las fases FR1 y FR3. En cuanto a la fase PR de la AAO, la administración de la STR o la NTX reduce levemente la motivación de los roedores por el etanol, alcanzando una reducción más pronunciada con la combinación farmacológica STR+NTX. Los resultados obtenidos en los estudios de qPCR con las muestras cerebrales señalan una reducción en la expresión génica relativa de la TH y *Oprm1*, y un aumento en la expresión génica del 5HTT. La administración de

la STR y NTX regula los cambios observados en la expresión génica de la TH, posiblemente, reduciendo la actividad dopaminérgica mesolímbica, que induce a su vez un aumento compensatorio de la expresión génica de la TH. De una forma similar, la STR, NTX y su combinación reducen el aumento observado en la expresión génica del 5HTT. Este efecto es esperable teniendo en cuenta el mecanismo de acción de la STR [278], sin embargo, sería necesario realizar más estudios para esclarecer el mecanismo más concreto de la interacción entre la NTX y el 5HTT.

Por otra parte, la administración de la NTX incrementa la expresión génica relativa del *Oprm1*, tal y como cabría esperar teniendo en cuenta su mecanismo de acción [279]. La combinación de STR+NTX produce un aumento más pronunciado en la expresión génica del *Oprm1* que la NTX. Sería plausible proponer que la regulación del sistema serotoninérgico por acción de la STR podría modificar la actividad opioide, produciendo un aumento sinérgico en la expresión génica del *Oprm1* con la administración de STR+NTX. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo estudios adicionales para explorar en profundidad esta posible interacción.

En resumen, los resultados de esta tesis doctoral señalan que el nuevo modelo animal de TEPT reproduce algunas de las características más importantes del estrés postraumático, como son las alteraciones conductuales prolongadas en el tiempo tanto en relación con la presencia de la memoria aversiva como en relación con los rasgos de ansiedad. Además, estos cambios se acompañan de alteraciones en la regulación del eje del estrés, así como modificaciones en la expresión génica de *CNR1* y *CNR2* en la AMY, y 5HTT en DR. Es importante destacar que el modelo

desarrollado permite la realización de estudios farmacológicos crónicos. Los estudios llevados a cabo han demostrado la eficacia del CBD, solo y particularmente en combinación con la STR, para regular los cambios emocionales y de expresión génica. Además, el diseño y la duración del paradigma experimental de TEPT nos permite desarrollar un modelo dual TEPT-TUA que facilite el ensayo farmacológico de nuevos fármacos en el modelo de TEPT con consumo elevado de alcohol. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la combinación STR+NTX normaliza el consumo y la motivación por etanol modificando las expresiones génicas de TH, Opmr1 y 5HTT.

1. Los roedores expuestos al nuevo modelo animal del TEPT desarrollan marcadas alteraciones emocionales y neurobiológicas que perduran en el tiempo, simulando algunos de los rasgos más característicos del trastorno clínico.
2. El efecto prolongado de las alteraciones inducidas tras la exposición al modelo animal permite realizar estudios farmacológicos con la duración apropiada para obtener un efecto terapéutico similar al que se obtiene en los estudios clínicos.
3. La administración del fármaco CBD presenta la misma eficacia que la STR para modular las alteraciones conductuales inducidas por la exposición al modelo animal de TEPT, y se demuestra un efecto sinérgico/aditivo cuando se combinan ambos fármacos.
4. Los cambios en las alteraciones conductuales inducidos por CBD y STR se relacionan con modificaciones en distintas dianas cerebrales implicadas en la regulación del estrés, del sistema cannabinoide endógeno y del serotoninérgico.
5. Los roedores expuestos al modelo animal de TEPT presentan una mayor vulnerabilidad al consumo y motivación por el alcohol, hasta 10 semanas después de haber finalizado la inducción del modelo.
6. La administración conjunta de NTX y STR reduce el consumo y la motivación por el alcohol en roedores expuestos al modelo animal de TEPT.
7. Los estudios de expresión génica en núcleos cerebrales microdisecionados demuestran la participación de los sistemas dopaminérgico, serotoninérgico y opioide en los mecanismos de acción de los fármacos STR y NTX.

REFERENCIAS

1. Karam, E.G., et al., *Cumulative traumas and risk thresholds: 12-month PTSD in the World Mental Health (WMH) surveys*. *Depress Anxiety*, 2014. **31**(2): p. 130-42.
2. Benjet, C., et al., *The epidemiology of traumatic event exposure worldwide: results from the World Mental Health Survey Consortium*. *Psychol Med*, 2016. **46**(2): p. 327-43.
3. Yehuda, R., et al., *Post-traumatic stress disorder*. *Nat Rev Dis Primers*, 2015. **1**: p. 15057.
4. Jawahar, M.C., et al., *Epigenetic alterations following early postnatal stress: a review on novel aetiological mechanisms of common psychiatric disorders*. *Clin Epigenetics*, 2015. **7**: p. 122.
5. Kessler, R.C., et al., *The associations of earlier trauma exposures and history of mental disorders with PTSD after subsequent traumas*. *Mol Psychiatry*, 2018. **23**(9): p. 1892-1899.
6. Shalev, A., I. Liberzon, and C. Marmar, *Post-Traumatic Stress Disorder*. *N Engl J Med*, 2017. **376**(25): p. 2459-2469.
7. Kessler, R.C., et al., *Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey*. *Arch Gen Psychiatry*, 1995. **52**(12): p. 1048-60.
8. Creamer, M., P. Burgess, and A.C. McFarlane, *Post-traumatic stress disorder: findings from the Australian National Survey of Mental Health and Well-being*. *Psychol Med*, 2001. **31**(7): p. 1237-47.
9. Breslau, N., et al., *Estimating post-traumatic stress disorder in the community: lifetime perspective and the impact of typical traumatic events*. *Psychol Med*, 2004. **34**(5): p. 889-98.
10. Steel, Z., et al., *Association of torture and other potentially traumatic events with mental health outcomes among populations exposed to mass conflict and*

- displacement: a systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2009. **302**(5): p. 537-49.
11. Hoppen, T.H. and N. Morina, *The prevalence of PTSD and major depression in the global population of adult war survivors: a meta-analytically informed estimate in absolute numbers*. Eur J Psychotraumatol, 2019. **10**(1): p. 1578637.
 12. Kessler, R.C., et al., *Trauma and PTSD in the WHO World Mental Health Surveys*. Eur J Psychotraumatol, 2017. **8**(sup5): p. 1353383.
 13. APA, *Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5th edn. DSM-V*. 2013, Washington, D.C.: American Psychiatric Association (APA).
 14. APA, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders III*. 1980, Washington, D.C.: American Psychiatric Association.
 15. Miao, X.R., et al., *Posttraumatic stress disorder: from diagnosis to prevention*. Mil Med Res, 2018. **5**(1): p. 32.
 16. Maercker, A., et al., *Diagnosis and classification of disorders specifically associated with stress: proposals for ICD-11*. World Psychiatry, 2013. **12**(3): p. 198-206.
 17. Brewin, C.R., et al., *A review of current evidence regarding the ICD-11 proposals for diagnosing PTSD and complex PTSD*. Clin Psychol Rev, 2017. **58**: p. 1-15.
 18. Blake, D.D., et al., *The development of a Clinician-Administered PTSD Scale*. J Trauma Stress, 1995. **8**(1): p. 75-90.
 19. Weathers, F.W., et al., *The Clinician-Administered PTSD Scale for DSM-5 (CAPS-5): Development and initial psychometric evaluation in military veterans*. Psychol Assess, 2018. **30**(3): p. 383-395.
 20. Pietrzak, R.H., et al., *Prevalence and Axis I comorbidity of full and partial posttraumatic stress disorder in the United States: results from Wave 2 of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions*. J Anxiety Disord, 2011. **25**(3): p. 456-65.

21. Bremner, J.D., et al., *Chronic PTSD in Vietnam combat veterans: course of illness and substance abuse*. Am J Psychiatry, 1996. **153**(3): p. 369-75.
22. Jacobsen, L.K., S.M. Southwick, and T.R. Kosten, *Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature*. Am J Psychiatry, 2001. **158**(8): p. 1184-90.
23. Shorter, D., J. Hsieh, and T.R. Kosten, *Pharmacologic management of comorbid post-traumatic stress disorder and addictions*. Am J Addict, 2015. **24**(8): p. 705-12.
24. Allen, J.P., E.F. Crawford, and H. Kudler, *Nature and Treatment of Comorbid Alcohol Problems and Post Traumatic Stress Disorder Among American Military Personnel and Veterans*. Alcohol Res, 2016. **38**(1): p. 133-40.
25. Grant, B.F., et al., *Epidemiology of DSM-5 Alcohol Use Disorder: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions III*. JAMA Psychiatry, 2015. **72**(8): p. 757-66.
26. Smith, N.D.L. and L.B. Cottler, *The Epidemiology of Post-Traumatic Stress Disorder and Alcohol Use Disorder*. Alcohol Res, 2018. **39**(2): p. 113-120.
27. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Biomarkers in Psychiatry: Concept, Definition, Types and Relevance to the Clinical Reality*. Front Psychiatry, 2020. **11**: p. 432.
28. Morey, R.A., et al., *Amygdala volume changes in posttraumatic stress disorder in a large case-controlled veterans group*. Arch Gen Psychiatry, 2012. **69**(11): p. 1169-78.
29. Wang, Z., et al., *Magnetic resonance imaging of hippocampal subfields in posttraumatic stress disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2010. **67**(3): p. 296-303.
30. Hughes, K.C. and L.M. Shin, *Functional neuroimaging studies of post-traumatic stress disorder*. Expert Rev Neurother, 2011. **11**(2): p. 275-85.

31. Morey, R.A., et al., *Amygdala, Hippocampus, and Ventral Medial Prefrontal Cortex Volumes Differ in Maltreated Youth with and without Chronic Posttraumatic Stress Disorder*. *Neuropsychopharmacology*, 2016. **41**(3): p. 791-801.
32. Qi, S., et al., *Cortical inhibition deficits in recent onset PTSD after a single prolonged trauma exposure*. *Neuroimage Clin*, 2013. **3**: p. 226-33.
33. Vermetten, E., et al., *Long-term treatment with paroxetine increases verbal declarative memory and hippocampal volume in posttraumatic stress disorder*. *Biol Psychiatry*, 2003. **54**(7): p. 693-702.
34. Rabinak, C.A., et al., *Altered amygdala resting-state functional connectivity in post-traumatic stress disorder*. *Front Psychiatry*, 2011. **2**: p. 62.
35. Misaki, M., et al., *Connectome-wide investigation of altered resting-state functional connectivity in war veterans with and without posttraumatic stress disorder*. *Neuroimage Clin*, 2018. **17**: p. 285-296.
36. White, S.F., et al., *PTSD symptom severity is associated with increased recruitment of top-down attentional control in a trauma-exposed sample*. *Neuroimage Clin*, 2015. **7**: p. 19-27.
37. van Rooij, S.J., et al., *Predicting Treatment Outcome in PTSD: A Longitudinal Functional MRI Study on Trauma-Unrelated Emotional Processing*. *Neuropsychopharmacology*, 2016. **41**(4): p. 1156-65.
38. Schmidt, U., S.F. Kaltwasser, and C.T. Wotjak, *Biomarkers in posttraumatic stress disorder: overview and implications for future research*. *Dis Markers*, 2013. **35**(1): p. 43-54.
39. Yehuda, R., et al., *Dose-response changes in plasma cortisol and lymphocyte glucocorticoid receptors following dexamethasone administration in combat veterans with and without posttraumatic stress disorder*. *Arch Gen Psychiatry*, 1995. **52**(7): p. 583-93.

40. Baker, D.G., et al., *Higher levels of basal serial CSF cortisol in combat veterans with posttraumatic stress disorder*. Am J Psychiatry, 2005. **162**(5): p. 992-4.
41. Yehuda, R., et al., *Gene expression patterns associated with posttraumatic stress disorder following exposure to the World Trade Center attacks*. Biol Psychiatry, 2009. **66**(7): p. 708-11.
42. Binder, E.B., et al., *Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults*. JAMA, 2008. **299**(11): p. 1291-305.
43. Blanchard, E.B., et al., *A psychophysiological study of post traumatic stress disorder in Vietnam veterans*. Psychiatr Q, 1982. **54**(4): p. 220-9.
44. Malloy, P.F., J.A. Fairbank, and T.M. Keane, *Validation of a multimethod assessment of posttraumatic stress disorders in Vietnam veterans*. J Consult Clin Psychol, 1983. **51**(4): p. 488-94.
45. Kibler, J.L., K. Joshi, and M. Ma, *Hypertension in relation to posttraumatic stress disorder and depression in the US National Comorbidity Survey*. Behav Med, 2009. **34**(4): p. 125-32.
46. Schuurmans, J., et al., *A randomized, controlled trial of the effectiveness of cognitive-behavioral therapy and sertraline versus a waitlist control group for anxiety disorders in older adults*. Am J Geriatr Psychiatry, 2006. **14**(3): p. 255-63.
47. Lenze, E.J., et al., *Efficacy and tolerability of citalopram in the treatment of late-life anxiety disorders: results from an 8-week randomized, placebo-controlled trial*. Am J Psychiatry, 2005. **162**(1): p. 146-50.
48. Berumen, L.C., et al., *Serotonin receptors in hippocampus*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 823493.
49. Yohn, C.N., M.M. Gergues, and B.A. Samuels, *The role of 5-HT receptors in depression*. Mol Brain, 2017. **10**(1): p. 28.

50. Kimbrel, N.A., et al., *Effect of the 5-HTTLPR polymorphism on posttraumatic stress disorder, depression, anxiety, and quality of life among Iraq and Afghanistan veterans*. *Anxiety Stress Coping*, 2015. **28**(4): p. 456-66.
51. Drury, S.S., et al., *The role of the dopamine transporter (DAT) in the development of PTSD in preschool children*. *J Trauma Stress*, 2009. **22**(6): p. 534-9.
52. Mota, N., et al., *The rs1049353 polymorphism in the CNR1 gene interacts with childhood abuse to predict posttraumatic threat symptoms*. *J Clin Psychiatry*, 2015. **76**(12): p. e1622-3.
53. Wilker, S., et al., *Endocannabinoid concentrations in hair are associated with PTSD symptom severity*. *Psychoneuroendocrinology*, 2016. **67**: p. 198-206.
54. Rabinak, C.A., et al., *Cannabinoid facilitation of fear extinction memory recall in humans*. *Neuropharmacology*, 2013. **64**: p. 396-402.
55. Rabinak, C.A., et al., *Cannabinoid modulation of prefrontal-limbic activation during fear extinction learning and recall in humans*. *Neurobiol Learn Mem*, 2014. **113**: p. 125-34.
56. Cipriani, A., et al., *Comparative efficacy and acceptability of pharmacological treatments for post-traumatic stress disorder in adults: a network meta-analysis*. *Psychol Med*, 2018. **48**(12): p. 1975-1984.
57. Stahl, S.M., *Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects*. *J Affect Disord*, 1998. **51**(3): p. 215-35.
58. Brady, K., et al., *Efficacy and safety of sertraline treatment of posttraumatic stress disorder: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2000. **283**(14): p. 1837-44.
59. Davidson, J., et al., *Efficacy of sertraline in preventing relapse of posttraumatic stress disorder: results of a 28-week double-blind, placebo-controlled study*. *Am J Psychiatry*, 2001. **158**(12): p. 1974-81.

60. Marshall, R.D., et al., *Efficacy and safety of paroxetine treatment for chronic PTSD: a fixed-dose, placebo-controlled study*. Am J Psychiatry, 2001. **158**(12): p. 1982-8.
61. Marshall, R.D., et al., *A controlled trial of paroxetine for chronic PTSD, dissociation, and interpersonal problems in mostly minority adults*. Depress Anxiety, 2007. **24**(2): p. 77-84.
62. Kim, Y., et al., *Clinical evaluation of paroxetine in post-traumatic stress disorder (PTSD): 52-week, non-comparative open-label study for clinical use experience*. Psychiatry Clin Neurosci, 2008. **62**(6): p. 646-52.
63. Kucukalic, A., A. Bravo-Mehmedbasic, and A. Dzibur-Kulenovic, *Paroxetine in the treatment of post traumatic stress disorder: our experiences*. Bosn J Basic Med Sci, 2008. **8**(1): p. 76-9.
64. Tucker, P., et al., *Paroxetine in the treatment of chronic posttraumatic stress disorder: results of a placebo-controlled, flexible-dosage trial*. J Clin Psychiatry, 2001. **62**(11): p. 860-8.
65. Vermetten, E., et al., *Alterations in stress reactivity after long-term treatment with paroxetine in women with posttraumatic stress disorder*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1071**: p. 184-202.
66. Popiel, A., et al., *Prolonged exposure, paroxetine and the combination in the treatment of PTSD following a motor vehicle accident. A randomized clinical trial - The "TRAKT" study*. J Behav Ther Exp Psychiatry, 2015. **48**: p. 17-26.
67. Schneier, F.R., et al., *Combined prolonged exposure therapy and paroxetine for PTSD related to the World Trade Center attack: a randomized controlled trial*. Am J Psychiatry, 2012. **169**(1): p. 80-8.
68. Simon, N.M., et al., *Paroxetine CR augmentation for posttraumatic stress disorder refractory to prolonged exposure therapy*. J Clin Psychiatry, 2008. **69**(3): p. 400-5.

69. Hamner, M.B., et al., *Ziprasidone Augmentation of SSRI Antidepressants in Posttraumatic Stress Disorder: A Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study of Augmentation Therapy*. J Clin Psychopharmacol, 2019. **39**(2): p. 153-157.
70. Smajkic, A., et al., *Sertraline, paroxetine, and venlafaxine in refugee posttraumatic stress disorder with depression symptoms*. J Trauma Stress, 2001. **14**(3): p. 445-52.
71. Bentefour, Y., et al., *Effects of paroxetine on PTSD-like symptoms in mice*. Psychopharmacology (Berl), 2015. **232**(13): p. 2303-12.
72. Bentefour, Y., et al., *Paroxetine treatment, following behavioral suppression of PTSD-like symptoms in mice, prevents relapse by activating the infralimbic cortex*. Eur Neuropsychopharmacol, 2016. **26**(2): p. 195-207.
73. Stidd, D.A., et al., *Amygdala deep brain stimulation is superior to paroxetine treatment in a rat model of posttraumatic stress disorder*. Brain Stimul, 2013. **6**(6): p. 837-44.
74. Takahashi, T., et al., *Effect of paroxetine on enhanced contextual fear induced by single prolonged stress in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2006. **189**(2): p. 165-73.
75. Perrine, S.A., et al., *Severe, multimodal stress exposure induces PTSD-like characteristics in a mouse model of single prolonged stress*. Behav Brain Res, 2016. **303**: p. 228-37.
76. Davidson, J.R., et al., *Multicenter, double-blind comparison of sertraline and placebo in the treatment of posttraumatic stress disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2001. **58**(5): p. 485-92.
77. Davidson, J.R., *Remission in post-traumatic stress disorder (PTSD): effects of sertraline as assessed by the Davidson Trauma Scale, Clinical Global Impressions and the Clinician-Administered PTSD scale*. Int Clin Psychopharmacol, 2004. **19**(2): p. 85-7.

78. Davidson, J.R., et al., *Characterizing the effects of sertraline in post-traumatic stress disorder*. Psychol Med, 2002. **32**(4): p. 661-70.
79. Rauch, S.A.M., et al., *Efficacy of Prolonged Exposure Therapy, Sertraline Hydrochloride, and Their Combination Among Combat Veterans With Posttraumatic Stress Disorder: A Randomized Clinical Trial*. JAMA Psychiatry, 2019. **76**(2): p. 117-126.
80. Zoellner, L.A., et al., *Doubly Randomized Preference Trial of Prolonged Exposure Versus Sertraline for Treatment of PTSD*. Am J Psychiatry, 2019. **176**(4): p. 287-296.
81. Rothbaum, B.O., et al., *Augmentation of sertraline with prolonged exposure in the treatment of posttraumatic stress disorder*. J Trauma Stress, 2006. **19**(5): p. 625-38.
82. Friedman, M.J., et al., *Randomized, double-blind comparison of sertraline and placebo for posttraumatic stress disorder in a Department of Veterans Affairs setting*. J Clin Psychiatry, 2007. **68**(5): p. 711-20.
83. Kline, N.A., et al., *Sertraline efficacy in depressed combat veterans with posttraumatic stress disorder*. Am J Psychiatry, 1994. **151**(4): p. 621.
84. Kamo, T., et al., *Dosage, effectiveness, and safety of sertraline treatment for posttraumatic stress disorder in a Japanese clinical setting: a retrospective study*. BMC Psychiatry, 2016. **16**(1): p. 434.
85. Wilson, C.B., et al., *Differential effects of sertraline in a predator exposure animal model of post-traumatic stress disorder*. Front Behav Neurosci, 2014. **8**: p. 256.
86. McFadden, S.L. and B.L. Hooker, *Comparing Perika St. John's Wort and Sertraline for Treatment of Posttraumatic Stress Disorder in Mice*. J Diet Suppl, 2020. **17**(3): p. 300-308.

87. Matar, M.A., et al., *The effect of early poststressor intervention with sertraline on behavioral responses in an animal model of post-traumatic stress disorder*. Neuropsychopharmacology, 2006. **31**(12): p. 2610-8.
88. Connor, K.M., et al., *Fluoxetine in post-traumatic stress disorder. Randomised, double-blind study*. Br J Psychiatry, 1999. **175**: p. 17-22.
89. Meltzer-Brody, S., et al., *Symptom-specific effects of fluoxetine in post-traumatic stress disorder*. Int Clin Psychopharmacol, 2000. **15**(4): p. 227-31.
90. Martenyi, F., et al., *Fluoxetine versus placebo in posttraumatic stress disorder*. J Clin Psychiatry, 2002. **63**(3): p. 199-206.
91. Martenyi, F., et al., *Fluoxetine v. placebo in prevention of relapse in post-traumatic stress disorder*. Br J Psychiatry, 2002. **181**: p. 315-20.
92. Martenyi, F. and V. Soldatenkova, *Fluoxetine in the acute treatment and relapse prevention of combat-related post-traumatic stress disorder: Analysis of the veteran group of a placebo-controlled, randomized clinical trial*. Eur Neuropsychopharmacol, 2006. **16**(5): p. 340-9.
93. van der Kolk, B.A., et al., *Fluoxetine in posttraumatic stress disorder*. J Clin Psychiatry, 1994. **55**(12): p. 517-22.
94. Martenyi, F., E.B. Brown, and C.D. Caldwell, *Failed efficacy of fluoxetine in the treatment of posttraumatic stress disorder: results of a fixed-dose, placebo-controlled study*. J Clin Psychopharmacol, 2007. **27**(2): p. 166-70.
95. Hertzberg, M.A., et al., *Lack of efficacy for fluoxetine in PTSD: a placebo controlled trial in combat veterans*. Ann Clin Psychiatry, 2000. **12**(2): p. 101-5.
96. Ariel, L., et al., *Fluoxetine treatment is effective in a rat model of childhood-induced post-traumatic stress disorder*. Transl Psychiatry, 2017. **7**(11): p. 1260.
97. Shafia, S., et al., *Effects of moderate treadmill exercise and fluoxetine on behavioural and cognitive deficits, hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction and*

- alternations in hippocampal BDNF and mRNA expression of apoptosis - related proteins in a rat model of post-traumatic stress disorder.* Neurobiol Learn Mem, 2017. **139**: p. 165-178.
98. Abdallah, C.G., et al., *The Neurobiology and Pharmacotherapy of Posttraumatic Stress Disorder.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2019. **59**: p. 171-189.
 99. Bahk, W.M., et al., *Effects of mirtazapine in patients with post-traumatic stress disorder in Korea: a pilot study.* Hum Psychopharmacol, 2002. **17**(7): p. 341-4.
 100. Davidson, J.R., et al., *Mirtazapine vs. placebo in posttraumatic stress disorder: a pilot trial.* Biol Psychiatry, 2003. **53**(2): p. 188-91.
 101. Kim, W., et al., *The effectiveness of mirtazapine in the treatment of post-traumatic stress disorder: a 24-week continuation therapy.* Psychiatry Clin Neurosci, 2005. **59**(6): p. 743-7.
 102. Connor, K.M., et al., *A pilot study of mirtazapine in post-traumatic stress disorder.* Int Clin Psychopharmacol, 1999. **14**(1): p. 29-31.
 103. Chung, M.Y., et al., *Efficacy and tolerability of mirtazapine and sertraline in Korean veterans with posttraumatic stress disorder: a randomized open label trial.* Hum Psychopharmacol, 2004. **19**(7): p. 489-94.
 104. Schneier, F.R., et al., *Combined Mirtazapine and Ssri Treatment of Ptsd: A Placebo-Controlled Trial.* Depress Anxiety, 2015. **32**(8): p. 570-9.
 105. Kosten, T.R., et al., *Pharmacotherapy for posttraumatic stress disorder using phenelzine or imipramine.* J Nerv Ment Dis, 1991. **179**(6): p. 366-70.
 106. Shestatzky, M., D. Greenberg, and B. Lerer, *A controlled trial of phenelzine in posttraumatic stress disorder.* Psychiatry Res, 1988. **24**(2): p. 149-55.
 107. Becker, M.E., et al., *A placebo-controlled trial of bupropion SR in the treatment of chronic posttraumatic stress disorder.* J Clin Psychopharmacol, 2007. **27**(2): p. 193-7.

108. Adetunji, B., et al., *Use of antipsychotics in the treatment of post-traumatic stress disorder*. Psychiatry (Edgmont), 2005. **2**(4): p. 43-7.
109. Kozaric-Kovacic, D., et al., *Risperidone in psychotic combat-related posttraumatic stress disorder: an open trial*. J Clin Psychiatry, 2005. **66**(7): p. 922-7.
110. Padala, P.R., et al., *Risperidone monotherapy for post-traumatic stress disorder related to sexual assault and domestic abuse in women*. Int Clin Psychopharmacol, 2006. **21**(5): p. 275-80.
111. Reich, D.B., et al., *A preliminary study of risperidone in the treatment of posttraumatic stress disorder related to childhood abuse in women*. J Clin Psychiatry, 2004. **65**(12): p. 1601-6.
112. Hamner, M.B., et al., *Adjunctive risperidone treatment in post-traumatic stress disorder: a preliminary controlled trial of effects on comorbid psychotic symptoms*. Int Clin Psychopharmacol, 2003. **18**(1): p. 1-8.
113. Bartzokis, G., et al., *Adjunctive risperidone in the treatment of chronic combat-related posttraumatic stress disorder*. Biol Psychiatry, 2005. **57**(5): p. 474-9.
114. Monnelly, E.P., et al., *Low-dose risperidone as adjunctive therapy for irritable aggression in posttraumatic stress disorder*. J Clin Psychopharmacol, 2003. **23**(2): p. 193-6.
115. Rothbaum, B.O., et al., *Placebo-controlled trial of risperidone augmentation for selective serotonin reuptake inhibitor-resistant civilian posttraumatic stress disorder*. J Clin Psychiatry, 2008. **69**(4): p. 520-5.
116. Krystal, J.H., et al., *Sleep disturbance in chronic military-related PTSD: clinical impact and response to adjunctive risperidone in the Veterans Affairs cooperative study #504*. J Clin Psychiatry, 2016. **77**(4): p. 483-91.

117. Krystal, J.H., et al., *Adjunctive risperidone treatment for antidepressant-resistant symptoms of chronic military service-related PTSD: a randomized trial*. JAMA, 2011. **306**(5): p. 493-502.
118. Krishnamurthy, S., D. Garabadu, and K.P. Joy, *Risperidone ameliorates post-traumatic stress disorder-like symptoms in modified stress re-stress model*. Neuropharmacology, 2013. **75**: p. 62-77.
119. Garabadu, D., A. Ahmad, and S. Krishnamurthy, *Risperidone Attenuates Modified Stress-Re-stress Paradigm-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in Rats Exhibiting Post-traumatic Stress Disorder-Like Symptoms*. J Mol Neurosci, 2015. **56**(2): p. 299-312.
120. Villarreal, G., et al., *Efficacy of Quetiapine Monotherapy in Posttraumatic Stress Disorder: A Randomized, Placebo-Controlled Trial*. Am J Psychiatry, 2016. **173**(12): p. 1205-1212.
121. Kozaric-Kovacic, D. and N. Pivac, *Quetiapine treatment in an open trial in combat-related post-traumatic stress disorder with psychotic features*. Int J Neuropsychopharmacol, 2007. **10**(2): p. 253-61.
122. Byers, M.G., et al., *Prazosin versus quetiapine for nighttime posttraumatic stress disorder symptoms in veterans: an assessment of long-term comparative effectiveness and safety*. J Clin Psychopharmacol, 2010. **30**(3): p. 225-9.
123. Ahearn, E.P., et al., *Quetiapine as an adjunctive treatment for post-traumatic stress disorder: an 8-week open-label study*. Int Clin Psychopharmacol, 2006. **21**(1): p. 29-33.
124. Wang, H.N., et al., *Quetiapine ameliorates anxiety-like behavior and cognitive impairments in stressed rats: implications for the treatment of posttraumatic stress disorder*. Physiol Res, 2010. **59**(2): p. 263-71.

125. Hamner, M.B., et al., *Quetiapine treatment in patients with posttraumatic stress disorder: an open trial of adjunctive therapy*. J Clin Psychopharmacol, 2003. **23**(1): p. 15-20.
126. Youssef, N.A., et al., *An open-label pilot study of aripiprazole for male and female veterans with chronic post-traumatic stress disorder who respond suboptimally to antidepressants*. Int Clin Psychopharmacol, 2012. **27**(4): p. 191-6.
127. Mello, M.F., et al., *Aripiprazole in the treatment of posttraumatic stress disorder: an open-label trial*. Braz J Psychiatry, 2008. **30**(4): p. 358-61.
128. Naylor, J.C., et al., *A pilot randomized placebo-controlled trial of adjunctive aripiprazole for chronic PTSD in US military Veterans resistant to antidepressant treatment*. Int Clin Psychopharmacol, 2015. **30**(3): p. 167-74.
129. Mohamed, S., et al., *Impact of Concurrent Posttraumatic Stress Disorder on Outcomes of Antipsychotic Augmentation for Major Depressive Disorder With a Prior Failed Treatment: VAST-D Randomized Clinical Trial*. J Clin Psychiatry, 2020. **81**(4).
130. Robert, S., et al., *An open-label assessment of aripiprazole in the treatment of PTSD*. Psychopharmacol Bull, 2009. **42**(1): p. 69-80.
131. Lin, C.C., et al., *Subchronic administration of aripiprazole improves fear extinction retrieval of Pavlovian conditioning paradigm in rats experiencing psychological trauma*. Behav Brain Res, 2019. **362**: p. 181-187.
132. Edmondson, D. and R. von Kanel, *Post-traumatic stress disorder and cardiovascular disease*. Lancet Psychiatry, 2017. **4**(4): p. 320-329.
133. Zona, C., M.T. Ciotti, and M. Avoli, *Topiramate attenuates voltage-gated sodium currents in rat cerebellar granule cells*. Neurosci Lett, 1997. **231**(3): p. 123-6.
134. Taverna, S., et al., *Inhibition of transient and persistent Na⁺ current fractions by the new anticonvulsant topiramate*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **288**(3): p. 960-8.

135. White, H.S., et al., *Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold.* Epilepsy Res, 1997. **28**(3): p. 167-79.
136. White, H.S., et al., *Topiramate modulates GABA-evoked currents in murine cortical neurons by a nonbenzodiazepine mechanism.* Epilepsia, 2000. **41 Suppl 1**: p. S17-20.
137. Gibbs, J.W., 3rd, et al., *Cellular actions of topiramate: blockade of kainate-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons.* Epilepsia, 2000. **41 Suppl 1**: p. S10-6.
138. Poulsen, C.F., et al., *Modulation by topiramate of AMPA and kainate mediated calcium influx in cultured cerebral cortical, hippocampal and cerebellar neurons.* Neurochem Res, 2004. **29**(1): p. 275-82.
139. Tucker, P., et al., *Efficacy and safety of topiramate monotherapy in civilian posttraumatic stress disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled study.* J Clin Psychiatry, 2007. **68**(2): p. 201-6.
140. Yeh, M.S., et al., *A double-blind randomized controlled trial to study the efficacy of topiramate in a civilian sample of PTSD.* CNS Neurosci Ther, 2011. **17**(5): p. 305-10.
141. Berlant, J. and D.P. van Kammen, *Open-label topiramate as primary or adjunctive therapy in chronic civilian posttraumatic stress disorder: a preliminary report.* J Clin Psychiatry, 2002. **63**(1): p. 15-20.
142. Berlant, J.L., *Prospective open-label study of add-on and monotherapy topiramate in civilians with chronic nonhallucinatory posttraumatic stress disorder.* BMC Psychiatry, 2004. **4**: p. 24.

143. Lindley, S.E., E.B. Carlson, and K. Hill, *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of augmentation topiramate for chronic combat-related posttraumatic stress disorder*. J Clin Psychopharmacol, 2007. **27**(6): p. 677-81.
144. Khan, S. and I. Liberzon, *Topiramate attenuates exaggerated acoustic startle in an animal model of PTSD*. Psychopharmacology (Berl), 2004. **172**(2): p. 225-9.
145. Hamner, M.B., et al., *A preliminary controlled trial of divalproex in posttraumatic stress disorder*. Ann Clin Psychiatry, 2009. **21**(2): p. 89-94.
146. Clark, R.D., et al., *Divalproex in posttraumatic stress disorder: an open-label clinical trial*. J Trauma Stress, 1999. **12**(2): p. 395-401.
147. Fesler, F.A., *Valproate in combat-related posttraumatic stress disorder*. J Clin Psychiatry, 1991. **52**(9): p. 361-4.
148. Steiner, H., et al., *Divalproex sodium for the treatment of PTSD and conduct disorder in youth: a pilot randomized controlled clinical trial*. Child Psychiatry Hum Dev, 2007. **38**(3): p. 183-93.
149. Davis, L.L., et al., *Divalproex in the treatment of posttraumatic stress disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in a veteran population*. J Clin Psychopharmacol, 2008. **28**(1): p. 84-8.
150. Li, S., et al., *The effects of chronic valproate and diazepam in a mouse model of posttraumatic stress disorder*. Pharmacol Biochem Behav, 2006. **85**(2): p. 324-31.
151. Wilson, C.B., et al., *Valproic acid effects in the hippocampus and prefrontal cortex in an animal model of post-traumatic stress disorder*. Behav Brain Res, 2014. **268**: p. 72-80.
152. Davidson, J.R., et al., *The efficacy and tolerability of tiagabine in adult patients with post-traumatic stress disorder*. J Clin Psychopharmacol, 2007. **27**(1): p. 85-8.

153. Connor, K.M., et al., *Tiagabine for posttraumatic stress disorder: effects of open-label and double-blind discontinuation treatment*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2006. **184**(1): p. 21-5.
154. Baniasadi, M., et al., *Effect of pregabalin augmentation in treatment of patients with combat-related chronic posttraumatic stress disorder: a randomized controlled trial*. *J Psychiatr Pract*, 2014. **20**(6): p. 419-27.
155. Douglas Bremner, J., et al., *Treatment of posttraumatic stress disorder with phenytoin: an open-label pilot study*. *J Clin Psychiatry*, 2004. **65**(11): p. 1559-64.
156. Kinrys, G., et al., *Levetiracetam for treatment-refractory posttraumatic stress disorder*. *J Clin Psychiatry*, 2006. **67**(2): p. 211-4.
157. Rezaei Ardani, A., et al., *Effect of Rivastigmine Augmentation in Treatment of Male Patients With Combat-Related Chronic Posttraumatic Stress Disorder: A Randomized Controlled Trial*. *J Clin Psychopharmacol*, 2017. **37**(1): p. 54-60.
158. Zisook, S., et al., *Nefazodone in patients with treatment-refractory posttraumatic stress disorder*. *J Clin Psychiatry*, 2000. **61**(3): p. 203-8.
159. Hertzberg, M.A., et al., *A preliminary study of lamotrigine for the treatment of posttraumatic stress disorder*. *Biol Psychiatry*, 1999. **45**(9): p. 1226-9.
160. Hamner, M.B., P.S. Brodrick, and L.A. Labbate, *Gabapentin in PTSD: a retrospective, clinical series of adjunctive therapy*. *Ann Clin Psychiatry*, 2001. **13**(3): p. 141-6.
161. Varma, A., et al., *Topiramate as Monotherapy or Adjunctive Treatment for Posttraumatic Stress Disorder: A Meta-Analysis*. *J Trauma Stress*, 2018. **31**(1): p. 125-133.
162. Berlin, H.A., *Antiepileptic drugs for the treatment of post-traumatic stress disorder*. *Curr Psychiatry Rep*, 2007. **9**(4): p. 291-300.

163. Hollander, E., et al., *Divalproex in the treatment of impulsive aggression: efficacy in cluster B personality disorders*. Neuropsychopharmacology, 2003. **28**(6): p. 1186-97.
164. Nappi, C.M., S.P. Drummond, and J.M. Hall, *Treating nightmares and insomnia in posttraumatic stress disorder: a review of current evidence*. Neuropharmacology, 2012. **62**(2): p. 576-85.
165. Khazaie, H., M. Nasouri, and M.R. Ghadami, *Prazosin for Trauma Nightmares and Sleep Disturbances in Combat Veterans with Post-Traumatic Stress Disorder*. Iran J Psychiatry Behav Sci, 2016. **10**(3): p. e2603.
166. Taylor, F.B., et al., *Prazosin effects on objective sleep measures and clinical symptoms in civilian trauma posttraumatic stress disorder: a placebo-controlled study*. Biol Psychiatry, 2008. **63**(6): p. 629-32.
167. Ahmadpanah, M., et al., *Comparing the effect of prazosin and hydroxyzine on sleep quality in patients suffering from posttraumatic stress disorder*. Neuropsychobiology, 2014. **69**(4): p. 235-42.
168. Peskind, E.R., et al., *Prazosin reduces trauma-related nightmares in older men with chronic posttraumatic stress disorder*. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2003. **16**(3): p. 165-71.
169. Taylor, F.B., et al., *Daytime prazosin reduces psychological distress to trauma specific cues in civilian trauma posttraumatic stress disorder*. Biol Psychiatry, 2006. **59**(7): p. 577-81.
170. Raskind, M.A., et al., *A parallel group placebo controlled study of prazosin for trauma nightmares and sleep disturbance in combat veterans with post-traumatic stress disorder*. Biol Psychiatry, 2007. **61**(8): p. 928-34.

171. Raskind, M.A., et al., *Reduction of nightmares and other PTSD symptoms in combat veterans by prazosin: a placebo-controlled study*. Am J Psychiatry, 2003. **160**(2): p. 371-3.
172. Raskind, M.A., et al., *Prazosin reduces nightmares in combat veterans with posttraumatic stress disorder*. J Clin Psychiatry, 2002. **63**(7): p. 565-8.
173. Boynton, L., et al., *Preliminary findings concerning the use of prazosin for the treatment of posttraumatic nightmares in a refugee population*. J Psychiatr Pract, 2009. **15**(6): p. 454-9.
174. Raskind, M.A., et al., *Trial of Prazosin for Post-Traumatic Stress Disorder in Military Veterans*. N Engl J Med, 2018. **378**(6): p. 507-517.
175. McCall, W.V., et al., *A Pilot, Randomized Clinical Trial of Bedtime Doses of Prazosin Versus Placebo in Suicidal Posttraumatic Stress Disorder Patients With Nightmares*. J Clin Psychopharmacol, 2018. **38**(6): p. 618-621.
176. Manion, S.T., E.H. Gamble, and H. Li, *Prazosin administered prior to inescapable stressor blocks subsequent exaggeration of acoustic startle response in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 2007. **86**(3): p. 559-65.
177. Brunet, A., et al., *Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder*. J Psychiatr Res, 2008. **42**(6): p. 503-6.
178. Brunet, A., et al., *Reduction of PTSD Symptoms With Pre-Reactivation Propranolol Therapy: A Randomized Controlled Trial*. Am J Psychiatry, 2018. **175**(5): p. 427-433.
179. Mahabir, M., et al., *Propranolol's impact on cognitive performance in post-traumatic stress disorder*. J Affect Disord, 2016. **192**: p. 98-103.
180. Vaiva, G., et al., *Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma*. Biol Psychiatry, 2003. **54**(9): p. 947-9.

181. Hoge, E.A., et al., *Effect of acute posttrauma propranolol on PTSD outcome and physiological responses during script-driven imagery*. CNS Neurosci Ther, 2012. **18**(1): p. 21-7.
182. Cohen, H., et al., *Early post-stressor intervention with propranolol is ineffective in preventing posttraumatic stress responses in an animal model for PTSD*. Eur Neuropsychopharmacol, 2011. **21**(3): p. 230-40.
183. Zhu, R.T., et al., *Propranolol can induce PTSD-like memory impairments in rats*. Brain Behav, 2018. **8**(2): p. e00905.
184. Guina, J., et al., *Benzodiazepines for PTSD: A Systematic Review and Meta-Analysis*. J Psychiatr Pract, 2015. **21**(4): p. 281-303.
185. Kosten, T.R., et al., *Benzodiazepine use in posttraumatic stress disorder among veterans with substance abuse*. J Nerv Ment Dis, 2000. **188**(7): p. 454-9.
186. Rothbaum, B.O., et al., *A randomized, double-blind evaluation of D-cycloserine or alprazolam combined with virtual reality exposure therapy for posttraumatic stress disorder in Iraq and Afghanistan War veterans*. Am J Psychiatry, 2014. **171**(6): p. 640-8.
187. Cates, M.E., et al., *Clonazepam for treatment of sleep disturbances associated with combat-related posttraumatic stress disorder*. Ann Pharmacother, 2004. **38**(9): p. 1395-9.
188. Gelpin, E., et al., *Treatment of recent trauma survivors with benzodiazepines: a prospective study*. J Clin Psychiatry, 1996. **57**(9): p. 390-4.
189. Miao, Y.L., et al., *Midazolam ameliorates the behavior deficits of a rat posttraumatic stress disorder model through dual 18 kDa translocator protein and central benzodiazepine receptor and neurosteroidogenesis*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101450.

190. Xu, J.N., et al., *The anxiolytic-like effects of estazolam on a PTSD animal model*. Psychiatry Res, 2018. **269**: p. 529-535.
191. Matar, M.A., et al., *Alprazolam treatment immediately after stress exposure interferes with the normal HPA-stress response and increases vulnerability to subsequent stress in an animal model of PTSD*. Eur Neuropsychopharmacol, 2009. **19**(4): p. 283-95.
192. Lipinska, G., D.S. Baldwin, and K.G. Thomas, *Pharmacology for sleep disturbance in PTSD*. Hum Psychopharmacol, 2016. **31**(2): p. 156-63.
193. Liechti, M., *Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and pharmacology of modulators of monoamine signaling*. Swiss Med Wkly, 2015. **145**: p. w14043.
194. Mithoefer, M.C., et al., *MDMA-assisted psychotherapy for treatment of PTSD: study design and rationale for phase 3 trials based on pooled analysis of six phase 2 randomized controlled trials*. Psychopharmacology (Berl), 2019. **236**(9): p. 2735-2745.
195. Mithoefer, M.C., et al., *3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-assisted psychotherapy for post-traumatic stress disorder in military veterans, firefighters, and police officers: a randomised, double-blind, dose-response, phase 2 clinical trial*. Lancet Psychiatry, 2018. **5**(6): p. 486-497.
196. Mithoefer, M.C., et al., *Durability of improvement in post-traumatic stress disorder symptoms and absence of harmful effects or drug dependency after 3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy: a prospective long-term follow-up study*. J Psychopharmacol, 2013. **27**(1): p. 28-39.
197. Bouso, J.C., et al., *MDMA-assisted psychotherapy using low doses in a small sample of women with chronic posttraumatic stress disorder*. J Psychoactive Drugs, 2008. **40**(3): p. 225-36.

198. Oehen, P., et al., *A randomized, controlled pilot study of MDMA (+/- 3,4-Methylenedioxymethamphetamine)-assisted psychotherapy for treatment of resistant, chronic Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD)*. J Psychopharmacol, 2013. **27**(1): p. 40-52.
199. Mithoefer, M.C., et al., *The safety and efficacy of {+/-}3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy in subjects with chronic, treatment-resistant posttraumatic stress disorder: the first randomized controlled pilot study*. J Psychopharmacol, 2011. **25**(4): p. 439-52.
200. Morina, N., et al., *Remission from post-traumatic stress disorder in adults: a systematic review and meta-analysis of long term outcome studies*. Clin Psychol Rev, 2014. **34**(3): p. 249-55.
201. Pertwee, R.G., *Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists*. Curr Med Chem, 2010. **17**(14): p. 1360-81.
202. Pertwee, R.G., *Endocannabinoids*. Handbook of Experimental Pharmacology, ed. R.G. Pertwee. 2015, Switzerland: Springer International Publishing.
203. Bracey, M.H., et al., *Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1793-6.
204. Cravatt, B.F., et al., *Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides*. Nature, 1996. **384**(6604): p. 83-7.
205. Gulyas, A.I., et al., *Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(2): p. 441-58.
206. Dinh, T.P., et al., *Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10819-24.
207. Viudez-Martinez, A., et al., *Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior*. Acta Pharmacol Sin, 2019. **40**(3): p. 358-364.

208. Elsaid, S. and B. Le Foll, *The complexity of pharmacology of cannabidiol (CBD) and its implications in the treatment of brain disorders*. Neuropsychopharmacology, 2019.
209. Elms, L., et al., *Cannabidiol in the Treatment of Post-Traumatic Stress Disorder: A Case Series*. J Altern Complement Med, 2019. **25**(4): p. 392-397.
210. Song, C., et al., *Bidirectional Effects of Cannabidiol on Contextual Fear Memory Extinction*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 493.
211. Shannon, S. and J. Opila-Lehman, *Effectiveness of Cannabidiol Oil for Pediatric Anxiety and Insomnia as Part of Posttraumatic Stress Disorder: A Case Report*. Perm J, 2016. **20**(4): p. 16-005.
212. Blessing, E.M., et al., *Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders*. Neurotherapeutics, 2015. **12**(4): p. 825-36.
213. Campos, A.C., F.R. Ferreira, and F.S. Guimaraes, *Cannabidiol blocks long-lasting behavioral consequences of predator threat stress: possible involvement of 5HT1A receptors*. J Psychiatr Res, 2012. **46**(11): p. 1501-10.
214. Shallcross, J., et al., *The Divergent Effects of CDPPB and Cannabidiol on Fear Extinction and Anxiety in a Predator Scent Stress Model of PTSD in Rats*. Front Behav Neurosci, 2019. **13**: p. 91.
215. Rosner, S., et al., *Acamprosate for alcohol dependence*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(9): p. CD004332.
216. Rosner, S., et al., *Opioid antagonists for alcohol dependence*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(12): p. CD001867.
217. Jarosz, J., et al., *Naltrexone (50 mg) plus psychotherapy in alcohol-dependent patients: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Am J Drug Alcohol Abuse, 2013. **39**(3): p. 144-60.
218. Skinner, M.D., et al., *Disulfiram efficacy in the treatment of alcohol dependence: a meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87366.

219. Pascual Pastor, F.G.S., J; Pereiro Gómez, C; Bobes García, J, *Alcoholismo*. 3 ed. 2013: Socidrogalcohol.
220. Spanagel, R., et al., *Acamprosate produces its anti-relapse effects via calcium*. *Neuropsychopharmacology*, 2014. **39**(4): p. 783-91.
221. Oslin, D.W., et al., *A functional polymorphism of the mu-opioid receptor gene is associated with naltrexone response in alcohol-dependent patients*. *Neuropsychopharmacology*, 2003. **28**(8): p. 1546-52.
222. Hartwell, E.E., et al., *Systematic review and meta-analysis of the moderating effect of rs1799971 in OPRM1, the mu-opioid receptor gene, on response to naltrexone treatment of alcohol use disorder*. *Addiction*, 2020. **115**(8): p. 1426-1437.
223. Petrakis, I.L., et al., *Naltrexone and disulfiram in patients with alcohol dependence and comorbid post-traumatic stress disorder*. *Biol Psychiatry*, 2006. **60**(7): p. 777-83.
224. Zandberg, L.J., et al., *Concurrent treatment of posttraumatic stress disorder and alcohol dependence: Predictors and moderators of outcome*. *J Consult Clin Psychol*, 2016. **84**(1): p. 43-56.
225. Foa, E.B., et al., *Concurrent naltrexone and prolonged exposure therapy for patients with comorbid alcohol dependence and PTSD: a randomized clinical trial*. *JAMA*, 2013. **310**(5): p. 488-95.
226. Petrakis, I.L., et al., *Noradrenergic vs serotonergic antidepressant with or without naltrexone for veterans with PTSD and comorbid alcohol dependence*. *Neuropsychopharmacology*, 2012. **37**(4): p. 996-1004.
227. Brady, K.T., S.C. Sonne, and J.M. Roberts, *Sertraline treatment of comorbid posttraumatic stress disorder and alcohol dependence*. *J Clin Psychiatry*, 1995. **56**(11): p. 502-5.

228. Hien, D.A., et al., *Combining seeking safety with sertraline for PTSD and alcohol use disorders: A randomized controlled trial*. J Consult Clin Psychol, 2015. **83**(2): p. 359-69.
229. Brady, K.T., et al., *Sertraline in the treatment of co-occurring alcohol dependence and posttraumatic stress disorder*. Alcohol Clin Exp Res, 2005. **29**(3): p. 395-401.
230. Naglich, A.C., et al., *Effect of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors on Healthcare Utilization in Patients with Post-Traumatic Stress Disorder and Alcohol Use Disorder*. Alcohol Alcohol, 2019. **54**(4): p. 428-434.
231. Torok, B., et al., *Modelling posttraumatic stress disorders in animals*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2019. **90**: p. 117-133.
232. Goswami, S., et al., *Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 89.
233. Chiba, S., et al., *Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012. **39**(1): p. 112-9.
234. Xu, P., et al., *Effects of the chronic restraint stress induced depression on reward-related learning in rats*. Behav Brain Res, 2017. **321**: p. 185-192.
235. Toth, I. and I.D. Neumann, *Animal models of social avoidance and social fear*. Cell Tissue Res, 2013. **354**(1): p. 107-18.
236. Rajbhandari, A.K., S.T. Gonzalez, and M.S. Fanselow, *Stress-Enhanced Fear Learning, a Robust Rodent Model of Post-Traumatic Stress Disorder*. J Vis Exp, 2018(140).
237. Sawamura, T., et al., *Effect of paroxetine on a model of posttraumatic stress disorder in rats*. Neurosci Lett, 2004. **357**(1): p. 37-40.

238. Zhang, L.M., et al., *Anxiolytic-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18 kDa) in animal models of post-traumatic stress disorder*. Int J Neuropsychopharmacol, 2014. **17**(10): p. 1659-69.
239. Seetharaman, S., et al., *Influence of daily social stimulation on behavioral and physiological outcomes in an animal model of PTSD*. Brain Behav, 2016. **6**(5): p. e00458.
240. Cohen, H., et al., *Hippocampal microinfusion of oxytocin attenuates the behavioural response to stress by means of dynamic interplay with the glucocorticoid-catecholamine responses*. J Neuroendocrinol, 2010. **22**(8): p. 889-904.
241. Chu, X., et al., *24-hour-restraint stress induces long-term depressive-like phenotypes in mice*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32935.
242. Philbert, J., et al., *Acute inescapable stress exposure induces long-term sleep disturbances and avoidance behavior: a mouse model of post-traumatic stress disorder (PTSD)*. Behav Brain Res, 2011. **221**(1): p. 149-54.
243. Berardi, A., et al., *An updated animal model capturing both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD)*. Front Behav Neurosci, 2014. **8**: p. 142.
244. Zoladz, P.R., et al., *Acute episodes of predator exposure in conjunction with chronic social instability as an animal model of post-traumatic stress disorder*. Stress, 2008. **11**(4): p. 259-81.
245. Wakizono, T., et al., *Stress vulnerabilities in an animal model of post-traumatic stress disorder*. Physiol Behav, 2007. **90**(4): p. 687-95.
246. Liberzon, I., et al., *Differential regulation of hippocampal glucocorticoid receptors mRNA and fast feedback: relevance to post-traumatic stress disorder*. J Neuroendocrinol, 1999. **11**(1): p. 11-7.

247. George, S.A., et al., *Alterations in cognitive flexibility in a rat model of post-traumatic stress disorder*. Behav Brain Res, 2015. **286**: p. 256-64.
248. Lin, C.C., C.S. Tung, and Y.P. Liu, *Escitalopram reversed the traumatic stress-induced depressed and anxiety-like symptoms but not the deficits of fear memory*. Psychopharmacology (Berl), 2016. **233**(7): p. 1135-46.
249. Le Dorze, C. and P. Gisquet-Verrier, *Sensitivity to trauma-associated cues is restricted to vulnerable traumatized rats and reinstated after extinction by yohimbine*. Behav Brain Res, 2016. **313**: p. 120-134.
250. Wu, Z., et al., *Behavioral changes over time in post-traumatic stress disorder: Insights from a rat model of single prolonged stress*. Behav Processes, 2016. **124**: p. 123-9.
251. Wang, W., et al., *A modified single-prolonged stress model for post-traumatic stress disorder*. Neurosci Lett, 2008. **441**(2): p. 237-41.
252. Wang, H., et al., *Conditioned fear stress combined with single-prolonged stress: a new PTSD mouse model*. Neurosci Res, 2012. **73**(2): p. 142-52.
253. Weera, M.M., et al., *The role of central amygdala corticotropin-releasing factor in predator odor stress-induced avoidance behavior and escalated alcohol drinking in rats*. Neuropharmacology, 2020. **166**: p. 107979.
254. Manjoch, H., et al., *Predator-scent stress, ethanol consumption and the opioid system in an animal model of PTSD*. Behav Brain Res, 2016. **306**: p. 91-105.
255. Edwards, S., et al., *Traumatic stress reactivity promotes excessive alcohol drinking and alters the balance of prefrontal cortex-amygdala activity*. Transl Psychiatry, 2013. **3**: p. e296.
256. Zoladz, P.R., et al., *Predator-based psychosocial stress model of PTSD differentially influences voluntary ethanol consumption depending on methodology*. Alcohol, 2018. **70**: p. 33-41.

257. Meyer, E.M., et al., *Stress increases voluntary alcohol intake, but does not alter established drinking habits in a rat model of posttraumatic stress disorder*. Alcohol Clin Exp Res, 2013. **37**(4): p. 566-74.
258. Ortega-Alvaro, A., et al., *Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol*. Addict Biol, 2015. **20**(1): p. 43-55.
259. Viudez-Martinez, A., et al., *Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice*. Addict Biol, 2018. **23**(1): p. 154-164.
260. Navarrete, F., G. Rubio, and J. Manzanares, *Effects of naltrexone plus topiramate on ethanol self-administration and tyrosine hydroxylase gene expression changes*. Addict Biol, 2014. **19**(5): p. 862-73.
261. LeDoux, J.E., *Emotion circuits in the brain*. Annu Rev Neurosci, 2000. **23**: p. 155-84.
262. Ortega-Alvaro, A., et al., *Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice*. Neuropsychopharmacology, 2011. **36**(7): p. 1489-504.
263. Bodnoff, S.R., et al., *The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety*. Psychopharmacology (Berl), 1988. **95**(3): p. 298-302.
264. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(7): p. 1773-84.
265. Paxinos, G., Franklin, K.B.J., *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2001, New York: Academic Press. Harcourt Science and Technology Company.
266. Palkovits, M., *Punch sampling biopsy technique*. Methods Enzymol, 1983. **103**: p. 368-76.
267. Navarrete, F., J.M. Perez-Ortiz, and J. Manzanares, *Pregabalin and topiramate mediated regulation of cognitive and motor impulsivity in DBA/2 mice*. Br J Pharmacol, 2012.

268. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
269. Erickson, R.L., C.A. Browne, and I. Lucki, *Hair corticosterone measurement in mouse models of type 1 and type 2 diabetes mellitus*. *Physiol Behav*, 2017. **178**: p. 166-171.
270. Crawley, J. and F.K. Goodwin, *Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1980. **13**(2): p. 167-70.
271. Lister, R.G., *The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987. **92**(2): p. 180-5.
272. Viudez-Martinez, A., et al., *Effects of cannabidiol plus naltrexone on motivation and ethanol consumption*. *Br J Pharmacol*, 2018.
273. Das, R.K., et al., *Cannabidiol enhances consolidation of explicit fear extinction in humans*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013. **226**(4): p. 781-92.
274. Bitencourt, R.M. and R.N. Takahashi, *Cannabidiol as a Therapeutic Alternative for Post-traumatic Stress Disorder: From Bench Research to Confirmation in Human Trials*. *Front Neurosci*, 2018. **12**: p. 502.
275. Miller, G.E., E. Chen, and E.S. Zhou, *If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans*. *Psychol Bull*, 2007. **133**(1): p. 25-45.
276. Bisogno, T., et al., *Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide*. *Br J Pharmacol*, 2001. **134**(4): p. 845-52.

277. Tham, M., et al., *Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors*. Br J Pharmacol, 2019. **176**(10): p. 1455-1469.
278. Benmansour, S., et al., *Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level*. J Neurosci, 1999. **19**(23): p. 10494-501.
279. Parkes, H. and J.D. Sinclair, *Reduction of alcohol drinking and upregulation of opioid receptors by oral naltrexone in AA rats*. Alcohol, 2000. **21**(3): p. 215-21.

ANEXO I. ARTÍCULOS

Artículo 1. En revisión (Frontiers in Pharmacology)

Cannabidiol and sertraline regulate behavioral and brain gene expression alterations in an animal model of PTSD

Ani Gasparyan^{1,2}, Francisco Navarrete^{1,2} and Jorge Manzanares^{1,2*}

¹Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda. de Ramón y Cajal s/n, San Juan de Alicante, 03550 Alicante, Spain

²Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS), Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain

*** Correspondence:**

Dr. Jorge Manzanares

jmanzanares@umh.es

Keywords: PTSD; mice model; cannabidiol; sertraline; mRNA.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of cannabidiol (CBD) and/or sertraline (STR) on behavioral and gene expression alterations induced by a new chronic animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD).

C57BL/6J male mice were repeatedly exposed to physical and psychogenic alternate stressful stimuli. Fear-related memory and anxiety-like behaviors were evaluated. The effects of the administration of CBD (20 mg/kg, i.p.) and/or STR (10 mg/kg, p.o.) were analyzed on behavioral and gene expression changes induced by the model of PTSD. Gene expression alterations of targets related with stress regulation, endocannabinoid and serotonergic systems were analyzed by real-time PCR. The results revealed an increased and long-lasting fear-related memory and anxiety-like behaviors in mice exposed to the animal model of PTSD. Treatment with CBD improved these behaviors in PTSD animals, effects that were significantly potentiated when combined with STR. Gene expression analyses revealed a long-term increase of corticotropin releasing factor (*Crf*) that was significantly normalized with the combination CBD plus STR. Cannabinoid receptors (*Cnr1* and *Cnr2*) were up regulated in PTSD mice whereas the serotonin transporter (*Slc6a4*) was reduced. Interestingly, CBD and STR alone or combined induced a significant and marked increase of *Slc6a4* gene expression.

These results point out the cooperative action of the combination CBD plus STR to enhance fear extinction and reduce anxiety-like behaviors, normalizing gene expression alterations in this animal model of PTSD and suggesting that the combination of CBD with STR deserves to be further explored for the treatment of patients with PTSD.

1. INTRODUCTION

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a disabling mental condition caused by the exposure to frightening or threatening life events (APA, 2013). Around a 70% of worldwide population experience one or more traumatic events in any moment of their lives, whereas 10 to 15% develop PTSD. Type, severity and number of traumatic events, associated with individual susceptibility or the stage of life in which the trauma occurs influences the likelihood of developing PTSD (Kessler et al., 2017).

It remains essential to identify new therapeutic targets that may improve PTSD treatment. From a translational point of view, it is crucial to identify animal models to recapitulate PTSD-related clinical traits by the exposure to different kind of stressors, mainly psychogenic (e.g., predator threat), physic (e.g., electric shock) and psychosocial (e.g., disturbances in housing conditions). However, it is unlikely that a single animal model will reproduce the complexity of the human disorder only mimicking core aspects of human PTSD such as fear dysregulation and increased anxiety-like behavior.

There is a broad range of multi-disciplinary experimental approaches to induce a PTSD-like syndrome (Zhang et al., 2019, Singewald and Holmes, 2019, Daskalakis et al., 2013). However, there is a need of chronic animal models of PTSD to induce intense and long-lasting (several weeks) emotional disturbances. These prolonged alterations will simulate more closely the time course of PTSD-related behavioral and neurochemical changes and, therefore, would permit to study the effects of chronic pharmacological treatments (3-5 weeks).

Currently approved medications for the treatment of PTSD are the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) paroxetine and sertraline (STR). These drugs present important limitations regarding the response rate that rarely exceeds 60%, and only 30% corresponds

to complete remission (Berger et al., 2009). In addition, the available treatments present relevant side effects that may limit tolerance or even decrease therapeutic adherence (Shin et al., 2014). Therefore, there is an increasing need to develop new pharmacological strategies to improve the complex management of PTSD symptomatology. Interestingly, recent research advances revealed the pivotal role of the endocannabinoid system in the regulation of fear memory and emotional behavior in PTSD (Berardi et al., 2016). In this sense, cannabidiol (CBD) has attracted growing attention due to its lack of abuse potential (Viudez-Martinez et al., 2019), its multimodal mechanism of action (Elsaid and Le Foll, 2019) and especially its effects on the regulation of fear-related memories (Song et al., 2016). Indeed, several animal studies showed that CBD facilitates extinction, decreases retrieval or acquisition, and blocks reconsolidation of contextual fear memory evaluated in a fear conditioning (FC) paradigm (Bitencourt and Takahashi, 2018). Furthermore, human studies also suggested the therapeutic potential of CBD for the treatment of PTSD symptoms related with fear extinction, anxiety and sleep disturbances (Das et al., 2013, Shannon and Opila-Lehman, 2016, Elms et al., 2019). However, no previous studies have evaluated the effects of chronic CBD administration, alone or in combination with STR, on the behavioral and neurochemical impairments produced by an animal model of PTSD.

Therefore, the main goals of this study were: 1) to characterize and validate a long-lasting animal model of PTSD by exposing C57BL/6J adolescent mice to alternating and unpredictable psychogenic (fox urine), physic (electric shock, movement restriction) and psychosocial stressors (wet bedding, tilted cage, food deprivation) during a 5-weeks period, including 2 intermediate resting weeks to add a pivotal re-exposure factor for modelling PTSD, and 2) to evaluate the effects of repeated administration of CBD, STR, and CBD plus STR combination on behavioral and neurochemical alterations induced by this animal model of PTSD. Fear-related memory and anxiety-like behaviors were evaluated by the FC

paradigm, and by the novelty suppressed feeding test (NSFT), light-dark box (LDB) and elevated plus maze (EPM) tests, respectively. In addition, real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) experiments were carried out to evaluate specific changes in the gene expression of targets involved in stress response (hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis) and pharmacological actions of CBD (cannabinoid receptors 1 (CB1r) and 2 (CB2r)) and STR (5-hydroxytryptamine transporter (5HTT)).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

A total of 94 male 4-weeks old mice were purchased from Charles River laboratories (Lille, France). Mice, weighed 20-25 g, housed in groups of 5 per cage (40 x 25 x 22 cm) under controlled environmental conditions (temperature, $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$; relative humidity, $60 \pm 10\%$, and 12 h light/dark cycle, lights on from 08:00 to 20:00h), in an enriched environment with nesting material and ad libitum access to food (Teklad global 18% protein diet, Ref. 2014S, Envigo, Barcelona, Spain), and water except during behavioral evaluation. Experimental procedures were carried out in the animal facilities of Miguel Hernandez University located in San Juan de Alicante (Alicante, Spain). Behavioral evaluation was initiated during the adolescent period of mice (4 weeks old), after one-week acclimatization period to the animal housing room. Experiments were performed during the light cycle (from 16:00 to 18:00h) placing home cages in the operant-task room one hour before to start. All experimental procedures complied with the Spanish Royal Decree 53/2013, the Spanish Law 32/2007 and the European Union Directive of the 22nd of September 2010 (2010/63/UE) regulating the care of experimental animals and were approved by the Ethics Committee of Miguel Hernandez University. Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010, McGrath and Lilley, 2015).

2.2. Drugs

CBD was obtained from STI Pharmaceuticals (Essex, UK) and was dissolved in ethanol:cremophor:saline (1:1:18) to obtain the required dose of 20 mg/kg for its intraperitoneal administration (i.p.). STR was purchased from Pfizer laboratories (Madrid, Spain) and was dissolved in water to obtain the required dose of 10 mg/kg for its oral administration (p.o.). CBD and STR were freshly prepared every day immediately before its administration at a final volume of 10 ml/kg. Once-daily administration of CBD, STR, CBD plus STR or the corresponding vehicles (from 15:00 to 17:00h) was carried out between weeks 11 and 14 of the model. A latency time of 90 (CBD) and/or 60 (STR) minutes was left before any behavioral evaluation according to previously published pharmacokinetics data (Deiana et al., 2012, Melis et al., 2012). Drug doses were selected according to prior literature (Wang et al., 2006, Blessing et al., 2015) and to preliminary results obtained with CBD in our laboratory (data not shown).

2.3. Animal model of PTSD

The animal model of PTSD was induced by exposing mice to the following stressful stimuli at different time point for 5 weeks: 1) Fox urine: a perforated plastic tube (50 ml) containing a gauze impregnated in fox urine (Code blue, Fox Urine Cover Scent, Ref. OA1105, 3 ml) or saline (control mice) was placed in the central zone of each cage for 15 min, 2) Unescapable electric shock: animals were placed inside a 50 x 25 x 25 cm acrylic box with a floor consisting of a grid of parallel stainless steel bars (1 mm in diameter and 1 cm apart). Thirty seconds after animals were introduced in the box, they received a 1 mA scrambling shock or not (control mice) during 10 seconds, with an additional resting time of 20 s, 3) movement restriction: animals were introduced in perforated plastic falcon tubes (50 ml) for 15 min, or were left undisturbed in the home cage (control mice), 4) tilted cage: during

dark cycle, home cages were tilted 30° for 12-14h or not (control mice), 5) wet bedding: during dark cycle, mice were exposed to a cage with wet sawdust bedding for 12-14h, or were left undisturbed (control mice); and vi) food restriction: during dark cycle, mice were food deprived for 12-14h, or were left undisturbed (control mice).

Stressful stimuli were applied alternating 3 weeks of exposure (weeks 1, 3 and 5) with 2 intermediate weeks of resting (weeks 2 and 4), to avoid habituation and to add elements of unpredictability and re-exposure to the stressor. Importantly, the intensity of stress exposure was increased by adding new stressful stimuli from week to week as displayed in the Figure 1. Overall, these experimental aspects are especially relevant to induce long-lasting behavioral and neurochemical alterations in an animal model of PTSD.

2.4. Experimental design

2.4.1. Procedure 1: Evaluation of basal behavioral and neurobiological alterations induced by the animal model of PTSD.

This experimental phase was intended to evaluate basal behavioral and neurobiological disturbances induced by the animal model of PTSD (Figure 1). For that purpose, a total of 16 mice were used in this experiment, 8 exposed to the animal model of PTSD and 8 non-exposed. Fear-related memory and anxiety-like behavior were evaluated at weeks 6 and 7 by the fear conditioning (FC), the acoustic startle response (ASR), and the novelty-suppressed feeding test (NSFT) paradigms. Immediately after the last behavioral evaluation by NSFT mice were killed by cervical dislocation and brain and hair samples were obtained. Brain samples were used for relative gene expression analyses of targets of interest. Hair samples were used for hair accumulated corticosterone quantification as a peripheral biomarker of long-term HPA axis activity. All the behavioral paradigms of this procedure were made under blind conditions.

2.4.2. Procedure 2: Evaluation of the effects of CBD and/or STR administration on long-lasting behavioral and gene expression alterations induced by the animal model of PTSD.

This experimental phase evaluates the effects of CBD and/or STR administration on long-lasting behavioral and gene expression alterations induced by the animal model of PTSD (Figure 1). A total of 78 mice were used, 39 exposed to the animal model of PTSD and 39 non-exposed. After the model induction period and the subsequent basal behavioral evaluations at weeks 6 (FC) and 7 (NSFT), mice were left undisturbed for 3 weeks. After this period, mice were randomly assigned to different treatment groups where CBD and/or STR effects on fear-related memory (weeks 11 and 14) and anxiety-like behavior (weeks 12 and 13) were analyzed. The first administration of CBD and/or STR was carried out 60 and/or 90 min before the FC at week 11, respectively, to evaluate the acute pharmacological effects. Subsequently, both drugs were administered once daily until week 14, evaluating its sub-chronic and chronic effects on different behavioral tests. CBD and/or STR actions on anxiety-like behavior were analyzed by the light-dark box (LDB; week 12) and the elevated plus maze (EPM; week 13) paradigms. At the end of the behavioral evaluation phase, mice were killed by cervical dislocation immediately after the last behavioral test (FC at week 14) and brain samples were removed. These samples were used to analyze relative gene expression of several targets of interest. All the behavioral paradigms of this procedure (FC, NSFT, LDB and EPM) were made under blind conditions (for more detail see Supplementary Information).

2.5. Behavioural analyses

2.5.1. Fear conditioning (FC)

Fear memory retention was evaluated using Pavlovian contextual fear conditioning protocol as described elsewhere (LeDoux, 2000). Briefly, in this behavioural paradigm mice were re-exposed to the same cage where they received electric shocks during the induction

of the model of PTSD (or not in the case of control animals), without applying any shock in this evaluation phase. For a total of 5 minutes, freezing behaviour was evaluated as the time of total absence of movements except those necessary to breathe.

2.5.2. Acoustic startle response (ASR)

A previously described protocol was used to evaluate acoustic startle response of mice exposed to the animal model of PTSD and controls. Briefly, mice were placed in soundproof chambers equipped with loudspeakers controlled by STARTLE software (Panlab, Barcelona, Spain) (Ortega-Alvaro et al., 2011). Mice movement inside a Plexiglas cylinder was measured by a piezoelectric accelerometer and converted into a digital signal. Mice were acclimatized three days prior to test sessions by placing them each day in the apparatus for 5 min without background noise. The day of the evaluation, mice were exposed to 10 trials of 120 dB (40 ms, 8000 Hz) acoustic startle stimulus applied every 44 s, recording the maximum of startle amplitude during a 100 ms sampling window.

2.5.3. Novelty suppressed feeding test (NSFT)

This behavioural test measures anxiety-induced hyponeophagia as the inhibition of food ingestion or approach to food in an anxiety-provoking environment (Bodnoff et al., 1988, Garcia-Gutierrez et al., 2010). After 24 hours of food deprivation, mice were placed in a transparent square cage (40 x 40 x 50 cm) with a single pellet of food left on a white paper platform in the centre of the cage. The latency time before the mouse started to eat was recorded up to a threshold period of 5 min. Once the mice started to eat, the total amount of food pellet consumption was measured during an additional 5-minutes time.

2.5.4. Light-dark box (LDB)

Anxiety-like behaviour was evaluated by the widely accepted LDB paradigm (Crawley and Goodwin, 1980, Garcia-Gutierrez et al., 2018). LDB was carried out in an apparatus with two methacrylate compartments (20 x 20 x 15 cm), one transparent and the other black and opaque, separated by an opaque tunnel (4 cm). Light compartment is illuminated with a lamp (60W) that is placed 25 cm above it. At the beginning of the 5-minutes session, mice were placed in the light box facing the tunnel. The total time spent in the light box and the number of transitions between boxes were recorded. A mouse whose four paws were inside the new box was considered as having changed boxes.

2.5.5. Elevated plus maze (EPM)

Another commonly used method for evaluating anxiety-like behaviour in mice is the EPM (Garcia-Gutierrez et al., 2018, Lister, 1987). The apparatus consists of four arms (two open and two enclosed), that form a plus shape at 50 cm above the floor. The junction of the four arms is a central square platform (5 x 5 cm). At the beginning of the test, mice were placed in the central square, facing one of the enclosed arms. During a period of 5 minutes, the total time spent in the open arms (calculated as a percentage) and the number of transitions between open and enclosed arms were recorded. Animal arm entry was considered as the entry of its four paws into the arm.

2.6. Gene expression studies by real time PCR

Relative gene expression of corticotropin releasing factor (Crf) in the paraventricular nucleus (PVN), proopiomelanocortin (Pomc) in the arcuate nucleus (ARC), glucocorticoid receptor (GCr) in the hippocampus (HIP), Cnr1 and Cnr2 in the amygdala (AMY), and Slc6a4 in the dorsal raphe nucleus (DR) were analyzed on brain samples obtained in

Procedure 1 (week 7) and Procedure 2 (week 14). Briefly, mice were killed at the end of the experimental procedures by cervical dislocation and brains were removed from the skull and frozen at -80°C. Brain sections were cut (500 µm) in a cryostat (-10°C) containing the regions of interest according to Paxinos and Franklin atlas (Paxinos, 2001), mounted in the slides and stored at -80°C. Sections were microdissected following the method described by Palkovits and previously performed by our group (Palkovits, 1983, Navarrete et al., 2012). Total RNA was extracted from brain micropunches with TRI Reagent extraction reagent (Applied Biosystem, Madrid, Spain) and reverse transcription was carried out (Applied Biosystem, Madrid, Spain). Quantitative analyses of the relative expression of *Crf* (Mm01293920_s1), *Pomc* (Mm00435874_m1), *GCr* (Mm00433832_m1), *Cnr1* (Mm00432621_s1), *Cnr2* (Mm00438286_m1) and *Slc6a4* (Mm0043939_m1) genes was performed on the StepOne Sequence Detector System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). All the reagents used in the study were obtained from Life Technologies, and the manufacturer's protocols were followed. The reference gene used was 18S rRNA (Mm03928990_g1). Data for each target gene were normalized to the endogenous reference gene, and the fold change in target gene expression was determined using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.7. Hair corticosterone analysis

After cervical dislocation at week 7 (Procedure 1), mice hair of the dorsal zone was shaved using an electric razor. Hair samples were stored in 1.5 ml polypropylene tubes at -20°C. Extraction and analysis of corticosterone concentration were performed according to a previously described protocol (Erickson et al., 2017). Briefly, hair samples were washed with methanol (5 ml) twice rotating for 3 minutes. After methanol decantation, samples were placed on aluminium foil and dried in a protected hood for 3 days. Dried

samples were weighed and transferred to 2 ml polypropylene tubes containing stainless steel grinding beads (2.8mm Stainless Steel Grinding Balls Pre-Filled Tubes, OPS Diagnostics, Lebanon, NJ) that were placed in a bead beater (Mixermill MM300, Miguel Hernandez University, Alicante, Spain) to produce a powder. Powdered hair samples were incubated with 1.5 ml of methanol for 24 h on slow rotation to extract steroids. Tubes were centrifuged and steroid-containing supernatants were dried in a protected hood for 2-3 days to evaporate methanol. Dry extracts were analysed by a commercial competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (EIA-COR, Invitrogen, Spain) following manufacturer instructions.

2.8. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test for comparing two groups, and two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls post-hoc test for comparing four groups affected by two variables (treatment with CBD or STR). Differences were considered significant if the probability of error was less than 5%. SigmaPlot 11 software (Systat software Inc., Chicago, IL, USA) was used for all statistical analyses.

3. RESULTS

3.1. Procedure 1: Evaluation of basal behavioral and neurobiological alterations induced by the animal model of PTSD.

Behavioral evaluation. Mice exposed to the new animal model of PTSD showed a significant increased freezing time in the FC (Figure 2A, Student's *t*-test, $t = -13.738$, $P < 0.001$, 14 d.f.), enhanced startle response in the ASR (Figure 2B, Student's *t*-test, $t = -3.002$, $P < 0.01$, 14 d.f.), and increased latency time (Figure 2B, Student's *t*-test, $t = -6.824$, $P < 0.001$, 14

d.f.) with decreased food consumption (Figure 2C, Student's *t*-test, $t = 2.202$, $P < 0.05$, 14 d.f.) in the NSFT, in comparison with control mice. According to these basal behavioral results, mice were randomly assigned to 4 experimental groups to be treated with CBD and/or STR or its corresponding vehicle in Procedure 2 (for more detail about mice assignment see Figure S1).

Gene expression analyses. Statistical analyses indicated increased *Crf* (Figure 3A, Student's *t*-test, $t = -9.349$, $P < 0.001$, 14 d.f.) and *Pomc* (Figure 3B, Student's *t*-test, $t = -5.565$, $P < 0.001$, 14 d.f.) relative gene expression levels in the PVN and ARC, respectively, and decreased gene expression of *GCr* (Figure 3C, Student's *t*-test, $t = 5.734$, $P < 0.001$, 14 d.f.) in the HIPP of PTSD-like mice compared with control mice. These changes were accompanied by an increased corticosterone concentration in mice hair compared with controls (Figure 3D, Student's *t*-test, $t = -3.943$, $P < 0.01$, 14 d.f.)

In addition, mice exposed to the animal model of PTSD showed reduced *Cnr1* (Figure 4A, Student's *t*-test, $t = 5.647$, $P < 0.001$, 14 d.f.) and increased *Cnr2* (Figure 4B, Student's *t*-test, $t = -3.604$, $P = 0.003$, 14 d.f.) gene expression in the AMY, as well as enhanced gene expression of *Slc6a4* (Figure 4C, Student's *t*-test, $t = -3.337$, $P = 0.005$, 14 d.f.) in the DR compared with non-exposed mice.

3.2. Procedure 2: Evaluation of the effects of CBD and/or STR on long-lasting behavioral and gene expression alterations induced by the animal model of PTSD.

3.2.1. Effects of CBD and/or STR on fear-related memory and anxiety-like behavior disturbances induced by the animal model of PTSD.

Fear conditioning. Statistical analyses revealed a higher mean freezing time in PTSD-like mice compared with control mice at week 11 (Figure 5A, Student's *t*-test, $t = -14.178$, $P < 0.001$, 18 d.f.) and week 14 (Figure 5D, Student's *t*-test, $t = -21.269$, $P < 0.001$, 18 d.f.).

Within control group, no significant differences were observed between CBD plus STR-treated animals compared to CBD and STR-treated mice at week 11 (Figure 5B, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,37)} = 4.794$, $P < 0.05$; STR: $F_{(1,37)} = 4.712$, $P < 0.05$; CBD x STR: $F_{(1,37)} = 1.140$, $P = 0.293$), and at week 14 (Figure 5E, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,37)} = 0.006$, $P = 0.940$; STR: $F_{(1,37)} = 0.201$, $P = 0.657$; CBD x STR: $F_{(1,37)} = 0.456$, $P = 0.504$). In PTSD-like mice, CBD and STR treatments significantly reduced the freezing time at week 11 (acute treatment), reaching a more pronounced reduction at week 14 (repeated treatment). Interestingly, pharmacological combination of CBD plus STR, compared with CBD or STR alone, achieved a superior effect in the reduction of the freezing time in mice exposed to the PTSD model (without reaching statistical significance) at week 11 (Figure 5C, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,38)} = 24.661$, $P < 0.001$; STR: $F_{(1,38)} = 19.226$, $P < 0.001$; CBD x STR: $F_{(1,38)} = 1.488$, $P = 0.231$) and at week 14 (Figure 5F, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,38)} = 76.676$, $P < 0.001$; STR: $F_{(1,38)} = 86.029$, $P < 0.001$; CBD x STR: $F_{(1,38)} = 0.0823$, $P = 0.776$).

Light-dark box. PTSD-like mice spent less time in the lighted box (Figure 6A, Student's *t*-test, $t = 4.190$, $P < 0.001$, 18 d.f.) than control mice. Additionally, the number of transitions was reduced in PTSD-like mice compared with control mice (Figure 6D, Student's *t*-test, $t = 2.535$, $P < 0.05$, 18 d.f.). Within control mice group, only CBD treatment significantly increased the time spent in the lighted box (Figure 6B, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,37)} = 16.739$, $P < 0.001$; STR: $F_{(1,37)} = 1.400$, $P = 0.245$; CBD x STR: $F_{(1,37)} = 0.508$, $P = 0.481$). Within PTSD-like mice, both CBD and STR treatment increased the time spent in the lighted box. Interestingly, CBD plus STR combination increased the time of permanence in the lighted box compared with CBD or STR alone, without reaching statistical significance (Figure 6C, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,38)} = 16.271$, $P < 0.001$; STR: $F_{(1,38)} = 22.939$, $P < 0.001$; CBD x STR: $F_{(1,38)} = 1.394$, $P = 0.246$). STR treatment increased the number of transitions in both control and PTSD-like mice (Figure 6E, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,37)} =$

0.593, $P = 0.446$; STR: $F_{(1,37)} = 9.272$, $P < 0.01$; CBD x STR: $F_{(1,37)} = 0.212$, $P = 0.648$; and Figure 6F, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,38)} = 0.774$, $P = 0.385$; STR: $F_{(1,38)} = 30.088$, $P < 0.001$; CBD x STR: $F_{(1,38)} = 0.00452$, $P = 0.947$).

Elevated plus maze. PTSD-like mice spent less time in the open arms than control mice (Figure 7A, Student's t -test, $t = 2.962$, $P < 0.01$, 18 d.f.), and no differences were observed in the number of transitions between opened and closed arms (Figure 7D, Student's t -test, $t = 0.750$, $P = 0.463$, 18 d.f.). Within control mice no differences were observed in the time spent in open arms (Figure 6B, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,37)} = 1.564$, $P = 0.220$; STR: $F_{(1,37)} = 0.584$, $P = 0.450$; CBD x STR: $F_{(1,37)} = 1.202$, $P = 0.281$). However, within PTSD-like mice, CBD or STR treatment significantly increased the time spent in the open arms, effect that was more pronounced with the CBD plus STR combination without reaching statistical significance (Figure 7C, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,38)} = 41.191$, $P < 0.001$; STR: $F_{(1,38)} = 18.328$, $P < 0.001$; CBD x STR: $F_{(1,38)} = 0.008$, $P = 0.927$). STR treatment increased the number of transitions in control mice (Figure 7E, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,37)} = 0.923$, $P = 0.343$; STR: $F_{(1,37)} = 10.553$, $P < 0.01$; CBD x STR: $F_{(1,37)} = 0.0317$, $P = 0.860$) and in PTSD-like mice (Figure 7F, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,38)} = 0.000317$, $P = 0.986$; STR: $F_{(1,38)} = 4.869$, $P < 0.05$; CBD x STR: $F_{(1,38)} = 0.0203$, $P = 0.888$).

3.2.2. Effects of CBD and/or STR on relative gene expression alterations induced by the animal model of PTSD.

HPA axis. *Crf* gene expression increased in the PVN of PTSD-like mice compared with control mice (Figure 8A, Student's t -test, $t = -3.459$, $P < 0.01$, 18 d.f.). Within the control group, STR treatment induced an upregulation in *Crf* gene expression (Figure 8B, Two-way ANOVA; CBD: $F_{(1,37)} = 0.861$, $P = 0.360$; STR: $F_{(1,37)} = 6.702$, $P < 0.05$; CBD x STR: $F_{(1,37)} =$

0.0597, $P = 0.808$). In the PTSD-like mice group, Two-way ANOVA revealed that STR reduced the gene expression of *Crf*, achieving a more pronounced reduction when combined with CBD (Figure 8C, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,38)} = 0.733$, $P = 0.398$; STR: $F_{(1,38)} = 8.885$, $P < 0.01$; CBD x STR: $F_{(1,38)} = 4.246$, $P < 0.05$). In addition, PTSD-exposed mice also showed decreased gene expression of *Pomc* in the ARC compared with control mice (Figure 8D, Student's *t*-test, $t = 3.416$, $P < 0.01$, 18 d.f.), but no differences were observed in both control (Figure 8E, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,38)} = 0.561$, $P = 0.459$; STR: $F_{(1,38)} = 0.158$, $P = 0.693$; CBD x STR: $F_{(1,38)} = 2.859$, $P = 0.100$) and PTSD-like mice (Figure 8F, Two-way ANOVA; CBD: $F_{(1,37)} = 0.0340$, $P = 0.855$; STR: $F_{(1,37)} = 0.233$, $P = 0.632$; CBD x STR: $F_{(1,37)} = 0.0370$, $P = 0.849$) after CBD and/or STR administration. Finally, *GCr* gene expression in the HIPP increased in PTSD-like mice compared with controls (Figure 8G, Student's *t*-test, $t = -2.359$, $P < 0.05$, 18 d.f.) and no differences were observed among the four groups of control treated mice (Figure 8H, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,37)} = 1.621$, $P = 0.212$; STR: $F_{(1,37)} = 0.00139$, $P = 0.970$; CBD x STR: $F_{(1,37)} = 0.0626$, $P = 0.804$). Within PTSD-like group, CBD decreased the *GCr* gene expression and STR increased it (Figure 8I, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,38)} = 6.94$, $P < 0.05$; STR: $F_{(1,38)} = 6.022$, $P < 0.05$; CBD x STR: $F_{(1,38)} = 0.414$, $P = 0.524$).

Cannabinoid receptors. *Cnr1* gene expression was significantly increased in PTSD-like mice compared with controls (Figure 9A, Student's *t*-test, $t = -2.223$, $P < 0.05$, 18 d.f.). Within control group, no differences were observed in the *Cnr1* gene expression with drug administration (Figure 9B, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,37)} = 1.421$, $P = 0.241$; STR: $F_{(1,37)} = 0.319$, $P = 0.576$; CBD x STR: $F_{(1,37)} = 0.105$, $P = 0.747$). Nevertheless, CBD and its combination with STR increased the *Cnr1* gene expression in PTSD-like mice (Figure 9C, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,39)} = 18.716$, $P < 0.001$; STR: $F_{(1,39)} = 0.583$, $P = 0.450$; CBD x STR: $F_{(1,39)} = 9.955$, $P < 0.01$). In addition, *Cnr2* gene expression was significantly increased

in PTSD-like mice (Figure 9D, Student's *t*-test, $t = -4.763$, $P < 0.001$, 18 d.f.). In the control group, CBD or STR increased *Cnr2* gene expression (Figure 9E, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,39)} = 20.301$, $P < 0.001$; STR: $F_{(1,39)} = 27.577$, $P < 0.001$; CBD x STR: $F_{(1,39)} = 1.052$, $P = 0.312$). In addition, in the PTSD-like group CBD treatment decreased while STR increased *Cnr2* gene expression (Figure 9F, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,39)} = 4.281$, $P < 0.05$; STR: $F_{(1,39)} = 17.287$, $P < 0.001$; CBD x STR: $F_{(1,39)} = 0.179$, $P = 0.675$).

Serotonin transporter. Slc6a4 gene expression was significantly decreased in PTSD-like mice (Figure 10A, Student's *t*-test, $t = 3.550$, $P < 0.01$, 18 d.f.). Within control group, only CBD enhanced *Slc6a4* gene expression (Figure 10B, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,39)} = 25.440$, $P < 0.001$; STR: $F_{(1,39)} = 0.0931$, $P = 0.762$; CBD x STR: $F_{(1,39)} = 0.113$, $P = 0.739$). Within PTSD-like mice, CBD or STR significantly increased *Slc6a4* gene expression in comparison with VEH-treated group, and a similar effect was reached with CBD plus STR combination but without achieving statistical significance (Figure 10C, Two-way ANOVA, CBD: $F_{(1,38)} = 9.050$, $P < 0.01$; STR: $F_{(1,38)} = 10.984$, $P < 0.01$; CBD x STR: $F_{(1,38)} = 2.726$, $P = 0.108$).

4. DISCUSSION

The results of the present study reveal that the administration of CBD alone or in combination with STR significantly regulated the long-lasting behavioral and neurochemical disturbances in this animal model of PTSD. This statement is supported by the following observations: 1) Mice exposed to the animal model of PTSD showed a pronounced increase of fear-conditioning, hyperarousal and anxiety-like behaviors together with gene expression alterations in the HPA-axis, *Cnr1*, *Cnr2* and *Slc6a4* genes, including higher hair accumulated

corticosterone concentrations, 2) Exposure of mice to the animal model of PTSD produced a long-lasting enhancement of fear-related memories and anxiety-like behaviors, as well as gene expression changes in HPA-axis, *Cnr1*, *Cnr2* and *Slc6a4* genes, 3) The administration of CBD (20 mg/kg, i.p.), STR (10 mg/kg, p.o.) and its combination significantly reduced fear conditioning, anxiety-like behaviors and long-term gene expression alterations of PTSD-like mice.

Mice exposed to this model showed remarkable and enduring disturbances in fear extinction and anxiety-like behavior, that were notorious even 9 weeks after the end of the induction. In the FC, the small reduction of the freezing time observed at weeks 11 (1.38 %) and 14 (20.18 %) compared to the week 6 (baseline) highlights the fear extinction deficits in mice exposed to the animal model of PTSD. Therefore, PTSD-related impairments triggered by this model facilitate the simulation of chronic emotional disturbances in PTSD patients and is ideal to evaluate the effects of chronic drug treatments (that usually require 3-5 weeks).

In the present study, 2-weeks after the end of the induction of the PTSD model, gene expression analyses revealed that *Crf* and *Pomc* were significantly increased in the PVN and ARC of PTSD animals, respectively. In addition, hair accumulated corticosterone was also elevated, confirming the maintained hyperactivity of the HPA axis during the PTSD model. Furthermore, *GCr* gene expression was downregulated in the HIPP. This effect may be related, at least in part, with the increase of corticosterone concentrations and the negative feed-back regulation. On week 14, we found a moderate increase of *Crf* gene expression in the PVN whereas *Pomc* gene expression was reduced in the ARC and *GCr* gene expression increased in the HIPP. It is tempting to hypothesize that a long-term reduction of HPA axis activity may underlie these alterations, in accordance with the clinical evidence pointing out that PTSD at advanced stages may be associated with hypocortisolism (Miller et al., 2007).

The endogenous cannabinoid and serotonergic systems are strongly involved in the regulation of the emotional response. Mice exposed to the animal model showed reduced gene expression of *Cnr1* in the AMY and enhanced gene expression of *Cnr2* in the AMY and *Slc6a4* in the DR, suggesting the involvement of these targets in the behavioral changes observed in PTSD-like mice under basal conditions (weeks 6 and 7). Interestingly, up-regulation of *Cnr2* gene expression was maintained at week 14, whereas for *Cnr1* and *Slc6a4* an opposite effect was observed in the long-term.

Recently, some preclinical and clinical reports suggested the usefulness of CBD as a new alternative for the treatment of PTSD (Bitencourt and Takahashi, 2018, Shannon and Opila-Lehman, 2016, Elms et al., 2019, Bonaccorso et al., 2019, Lisboa et al., 2019, Crippa et al., 2018, Jurkus et al., 2016, Schier et al., 2012). Despite the available, although scarce, reports in rodents regarding the effects of CBD on fear extinction or anxiety-like behavior in animal models of PTSD (Campos et al., 2012, Shallcross et al., 2019), no previous studies evaluated the effects of the repeated administration of CBD, alone or in combination with STR, on long-term behavioral and neurochemical alterations produced by a chronic animal model of PTSD. The results demonstrate that CBD significantly attenuated freezing time under acute and chronic administration and produced an anxiolytic action on the LDB and EPM paradigms, effects that were similar to those produced by STR. Interestingly, the combination of CBD plus STR induced more pronounced effects, reducing the freezing time approximately by half, and significantly increasing the latency time in the lighted box or open arms. Therefore, these results provide novel and relevant information regarding the therapeutic potential of CBD but especially of CBD plus STR combination for attenuating trauma-related memories and anxiety-like behaviors in PTSD.

Real time PCR analyses revealed that the long-lasting increase of *Crf* in the PVN of PTSD-like animals was significantly normalized by CBD plus STR combination whereas no changes were observed in control mice. Furthermore, upregulation of *GCr* in the HIPP of

PTSD-like mice was only normalized by CBD while no changes were observed in control animals. These results are related with previous reports by our group showing that low to moderate doses of CBD did not change *Crf*, *Pomc* and *GCr* gene expressions in non-stressed mice whereas an intermediate CBD dose (15 mg/kg) induced a normalization effect in mice exposed to acute restraint stress (Viudez-Martinez et al., 2018).

Furthermore, gene expression analyses of *Cnr1* and *Cnr2* in the AMY, and *Slc6a4* in the DR were also performed as these targets are closely involved with the mechanisms of action of CBD and STR, respectively, and in PTSD-induced emotional alterations. *Cnr1* relative gene expression was increased in the AMY of PTSD-like mice, and CBD, STR or its combination produced an up-regulation. It has been accepted that CBD act as an indirect agonist of CB1r by increasing anandamide (AEA) levels through the blockade of its degradation and its reuptake (Bisogno et al., 2001). In addition, in the last years some authors suggested that CBD could act also as a negative allosteric modulator of CB1r (Tham et al., 2019). On the other hand, CBD reduced the increased gene expression of *Cnr2* in the AMY of PTSD animals presenting the opposite effect in control mice, especially in combination with STR. According to the idea that CBD is an inverse agonist or an antagonist at the CB2r (Thomas et al., 2007), it is plausible that the up regulation found in control animals may be related with this mechanism. Thus, significant differences in CBD-mediated regulation of *Cnr2* between control and PTSD-like animals may depend on a differential modulation of the endocannabinoid system tone depending on the exposure or not to the animal model of PTSD.

Interestingly, CBD, STR or the combination of both drugs significantly upregulated *Slc6a4* gene expression. In control mice, only CBD or CBD plus STR treatments significantly increased *Slc6a4*. The 1A serotonin receptor (5HT1A) is one of the main targets of the actions mediated by CBD (Campos et al., 2012), mainly due to 5HT1A receptor activation (Russo et al., 2005) or allosteric modulation. Interestingly, it has been recently reported that

5HT1A receptors are involved in the induction of cortical serotonin release by CBD treatment (Linge et al., 2016). Therefore, it is possible to hypothesize that CBD reduces serotonin concentrations in the DR by upregulation of Slc6a4 gene expression (Norris et al., 2016).

In conclusion, these results provide unequivocal evidence for the efficacy of CBD alone, and particularly in combination with STR, to significantly promote fear extinction and reduce anxiety-like behavior in animals exposed to an intense and long-lasting animal model of PTSD. Moreover, gene expression analyses also provide important clues regarding the short- and long-term neurobiological basis of this model of PTSD, and the mechanisms that could be underlying the pharmacological effects of CBD and STR. Some of the limitations that should be highlighted are the lack of female mice to evaluate gender-dependent effects, or the performance of a dose-response curve to have a more complete pharmacological profile of CBD and/or STR in this long-lasting animal model of PTSD. Future studies are warranted to explore the therapeutic potential of CBD for the treatment of PTSD, especially considering the increased effect when combined with STR.

Authors contribution statement

All named authors made an active contribution to the conception, design, performance and statistical analysis of the results. AG carried out the behavioral and real time-PCR analyses. AG and FN carried out ELISA immunohistochemical analyses and wrote the first draft of the manuscript. FN and JM critically reviewed the content, validated the accuracy of the data and approved the final version for publication.

Funding

This work was supported by 'Instituto de Salud Carlos III' (RETICS, RD12/0028/0019 and RD16/0017/0014), 'Plan Nacional Sobre Drogas' (PNSD, 2016I016 and 2019I012) and 'Ministerio de Economía y Competitividad' (FIS, PI14/00438 and PI18/00576) to J.M.

Acknowledgments

The authors would like to thank the technical support provided by José Mulet in this study.

The present work was partially presented in the following conference papers:

- P.417 Effects of cannabidiol and sertraline on behavioral and neurochemical alterations induced by a new long-lasting animal model of PTSD. A. Gasparyan, F. Navarrete, J. Manzanares. *European Neuropsychopharmacology*, 2019, 29(6):S296. Special issue: abstracts of the 32nd ECNP Congress, 7-10 September 2019, Copenhagen, Denmark. Doi: 10.1016/j.euroneuro.2019.09.430.
- 780.01 / X44 – Cannabidiol and sertraline-mediated regulation of behavioral and neurochemical disturbances induced by a new long-lasting animal model of post-traumatic stress disorder. J. Manzanares, A. Gasparyan, F. Navarrete. Abstract of the Neuroscience 2019 congress, 19-23 October 2019, Chicago IL, USA.

Authors declare that they hold the copyright and the permission to reuse the material that was published in the aforementioned conference papers.

Statement of interest

All authors declare no conflict of interest.

References

1. APA 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5th edn. DSM-V, Washington, D.C., American Psychiatric Association (APA).
2. BERARDI, A., SCHELLING, G. & CAMPOLONGO, P. 2016. The endocannabinoid system and Post Traumatic Stress Disorder (PTSD): From preclinical findings to innovative therapeutic approaches in clinical settings. *Pharmacol Res*, 111, 668-678.
3. BERGER, W., MENDLOWICZ, M. V., MARQUES-PORTELLA, C., KINRYS, G., FONTENELLE, L. F., MARMAR, C. R. & FIGUEIRA, I. 2009. Pharmacologic alternatives to antidepressants in posttraumatic stress disorder: a systematic review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33, 169-80.
4. BISOGNO, T., HANUS, L., DE PETROCELLIS, L., TCHILIBON, S., PONDE, D. E., BRANDI, I., MORIELLO, A. S., DAVIS, J. B., MECHOULAM, R. & DI MARZO, V. 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*, 134, 845-52.
5. BITENCOURT, R. M. & TAKAHASHI, R. N. 2018. Cannabidiol as a Therapeutic Alternative for Post-traumatic Stress Disorder: From Bench Research to Confirmation in Human Trials. *Front Neurosci*, 12, 502.
6. BLESSING, E. M., STEENKAMP, M. M., MANZANARES, J. & MARMAR, C. R. 2015. Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics*, 12, 825-36.
7. BODNOFF, S. R., SURANYI-CADOTTE, B., AITKEN, D. H., QUIRION, R. & MEANEY, M. J. 1988. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 95, 298-302.

8. BONACCORSO, S., RICCIARDI, A., ZANGANI, C., CHIAPPINI, S. & SCHIFANO, F. 2019. Cannabidiol (CBD) use in psychiatric disorders: A systematic review. *Neurotoxicology*, 74, 282-298.
9. CAMPOS, A. C., FERREIRA, F. R. & GUIMARAES, F. S. 2012. Cannabidiol blocks long-lasting behavioral consequences of predator threat stress: possible involvement of 5HT1A receptors. *J Psychiatr Res*, 46, 1501-10.
10. CRAWLEY, J. & GOODWIN, F. K. 1980. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, 13, 167-70.
11. CRIPPA, J. A., GUIMARAES, F. S., CAMPOS, A. C. & ZUARDI, A. W. 2018. Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. *Front Immunol*, 9, 2009.
12. DAS, R. K., KAMBOJ, S. K., RAMADAS, M., YOGAN, K., GUPTA, V., REDMAN, E., CURRAN, H. V. & MORGAN, C. J. 2013. Cannabidiol enhances consolidation of explicit fear extinction in humans. *Psychopharmacology (Berl)*, 226, 781-92.
13. DASKALAKIS, N. P., YEHUDA, R. & DIAMOND, D. M. 2013. Animal models in translational studies of PTSD. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 1895-911.
14. DEIANA, S., WATANABE, A., YAMASAKI, Y., AMADA, N., ARTHUR, M., FLEMING, S., WOODCOCK, H., DORWARD, P., PIGLIACAMPO, B., CLOSE, S., PLATT, B. & RIEDEL, G. 2012. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Delta(9)-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology (Berl)*, 219, 859-73.
15. ELMS, L., SHANNON, S., HUGHES, S. & LEWIS, N. 2019. Cannabidiol in the Treatment of Post-Traumatic Stress Disorder: A Case Series. *J Altern Complement Med*, 25, 392-397.

16. ELSAID, S. & LE FOLL, B. 2019. The complexity of pharmacology of cannabidiol (CBD) and its implications in the treatment of brain disorders. *Neuropsychopharmacology*.
17. ERICKSON, R. L., BROWNE, C. A. & LUCKI, I. 2017. Hair corticosterone measurement in mouse models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Physiol Behav*, 178, 166-171.
18. GARCIA-GUTIERREZ, M. S., NAVARRETE, F., LABORDA, J. & MANZANARES, J. 2018. Deletion of Dlk1 increases the vulnerability to developing anxiety-like behaviors and ethanol consumption in mice. *Biochem Pharmacol*, 158, 37-44.
19. GARCIA-GUTIERREZ, M. S., PEREZ-ORTIZ, J. M., GUTIERREZ-ADAN, A. & MANZANARES, J. 2010. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br J Pharmacol*, 160, 1773-84.
20. JURKUS, R., DAY, H. L., GUIMARAES, F. S., LEE, J. L., BERTOGLIO, L. J. & STEVENSON, C. W. 2016. Cannabidiol Regulation of Learned Fear: Implications for Treating Anxiety-Related Disorders. *Front Pharmacol*, 7, 454.
21. KESSLER, R. C., AGUILAR-GAXIOLA, S., ALONSO, J., BENJET, C., BROMET, E. J., CARDOSO, G., DEGENHARDT, L., DE GIROLAMO, G., DINOLOVA, R. V., FERRY, F., FLORESCU, S., GUREJE, O., HARO, J. M., HUANG, Y., KARAM, E. G., KAWAKAMI, N., LEE, S., LEPINE, J. P., LEVINSON, D., NAVARRO-MATEU, F., PENNELL, B. E., PIAZZA, M., POSADA-VILLA, J., SCOTT, K. M., STEIN, D. J., TEN HAVE, M., TORRES, Y., VIANA, M. C., PETUKHOVA, M. V., SAMPSON, N. A., ZASLAVSKY, A. M. & KOENEN, K. C. 2017. Trauma and PTSD in the WHO World Mental Health Surveys. *Eur J Psychotraumatol*, 8, 1353383.
22. KILKENNY, C., BROWNE, W. J., CUTHILL, I. C., EMERSON, M. & ALTMAN, D. G. 2010. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*, 8, e1000412.

23. LEDOUX, J. E. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 23, 155-84.
24. LINGE, R., JIMENEZ-SANCHEZ, L., CAMPA, L., PILAR-CUELLAR, F., VIDAL, R., PAZOS, A., ADELL, A. & DIAZ, A. 2016. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology*, 103, 16-26.
25. LISBOA, S. F., VILA-VERDE, C., ROSA, J., ULIANA, D. L., STERN, C. A. J., BERTOGLIO, L. J., RESSTEL, L. B. & GUIMARAES, F. S. 2019. Tempering aversive/traumatic memories with cannabinoids: a review of evidence from animal and human studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 236, 201-226.
26. LISTER, R. G. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 92, 180-5.
27. LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25, 402-8.
28. MCGRATH, J. C. & LILLEY, E. 2015. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. *Br J Pharmacol*, 172, 3189-93.
29. MELIS, V., USACH, I. & PERIS, J. E. 2012. Determination of sertraline in rat plasma by HPLC and fluorescence detection and its application to in vivo pharmacokinetic studies. *J Sep Sci*, 35, 3302-7.
30. MILLER, G. E., CHEN, E. & ZHOU, E. S. 2007. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull*, 133, 25-45.
31. NAVARRETE, F., PEREZ-ORTIZ, J. M. & MANZANARES, J. 2012. Cannabinoid CB₂ receptor-mediated regulation of impulsive-like behaviour in DBA/2 mice. *Br J Pharmacol*, 165, 260-73.

32. NORRIS, C., LOUREIRO, M., KRAMAR, C., ZUNDER, J., RENARD, J., RUSHLOW, W. & LAVIOLETTE, S. R. 2016. Cannabidiol Modulates Fear Memory Formation Through Interactions with Serotonergic Transmission in the Mesolimbic System. *Neuropsychopharmacology*, 41, 2839-2850.
33. ORTEGA-ALVARO, A., ARACIL-FERNANDEZ, A., GARCIA-GUTIERREZ, M. S., NAVARRETE, F. & MANZANARES, J. 2011. Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology*, 36, 1489-504.
34. PALKOVITS, M. 1983. Punch sampling biopsy technique. *Methods Enzymol*, 103, 368-76.
35. PAXINOS, G., FRANKLIN, K.B.J. 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, New York, Academic Press. Harcourt Science and Technology Company.
36. RUSSO, E. B., BURNETT, A., HALL, B. & PARKER, K. K. 2005. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res*, 30, 1037-43.
37. SCHIER, A. R., RIBEIRO, N. P., SILVA, A. C., HALLAK, J. E., CRIPPA, J. A., NARDI, A. E. & ZUARDI, A. W. 2012. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an anxiolytic drug. *Rev Bras Psiquiatr*, 34 Suppl 1, S104-10.
38. SHALLCROSS, J., HAMOR, P., BECHARD, A. R., ROMANO, M., KNACKSTEDT, L. & SCHWENDT, M. 2019. The Divergent Effects of CDPPB and Cannabidiol on Fear Extinction and Anxiety in a Predator Scent Stress Model of PTSD in Rats. *Front Behav Neurosci*, 13, 91.
39. SHANNON, S. & OPILA-LEHMAN, J. 2016. Effectiveness of Cannabidiol Oil for Pediatric Anxiety and Insomnia as Part of Posttraumatic Stress Disorder: A Case Report. *Perm J*, 20, 16-005.

40. SHIN, H. J., GREENBAUM, M. A., JAIN, S. & ROSEN, C. S. 2014. Associations of psychotherapy dose and SSRI or SNRI refills with mental health outcomes among veterans with PTSD. *Psychiatr Serv*, 65, 1244-8.
41. SINGEWALD, N. & HOLMES, A. 2019. Rodent models of impaired fear extinction. *Psychopharmacology (Berl)*, 236, 21-32.
42. SONG, C., STEVENSON, C. W., GUIMARAES, F. S. & LEE, J. L. 2016. Bidirectional Effects of Cannabidiol on Contextual Fear Memory Extinction. *Front Pharmacol*, 7, 493.
43. THAM, M., YILMAZ, O., ALAVERDASHVILI, M., KELLY, M. E. M., DENOVA-WRIGHT, E. M. & LAPRAIRIE, R. B. 2019. Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, 176, 1455-1469.
44. THOMAS, A., BAILLIE, G. L., PHILLIPS, A. M., RAZDAN, R. K., ROSS, R. A. & PERTWEE, R. G. 2007. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*, 150, 613-23.
45. VIUDEZ-MARTINEZ, A., GARCIA-GUTIERREZ, M. S. & MANZANARES, J. 2018. Cannabidiol regulates the expression of hypothalamus-pituitary-adrenal axis-related genes in response to acute restraint stress. *J Psychopharmacol*, 32, 1379-1384.
46. VIUDEZ-MARTINEZ, A., GARCIA-GUTIERREZ, M. S., MEDRANO-RELINQUE, J., NAVARRON, C. M., NAVARRETE, F. & MANZANARES, J. 2019. Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior. *Acta Pharmacol Sin*, 40, 358-364.
47. WANG, J. S., DEVANE, C. L., GIBSON, B. B., DONOVAN, J. L., MARKOWITZ, J. S. & ZHU, H. J. 2006. Population pharmacokinetic analysis of drug-drug interactions among risperidone, bupropion, and sertraline in CF1 mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 183, 490-9.
48. ZHANG, L., XIAN-ZHANG, H., LI, H., LI, X., YU, T., DOHL, J. & URSANO, R. J. 2019. Updates in PTSD Animal Models Characterization.

Figures

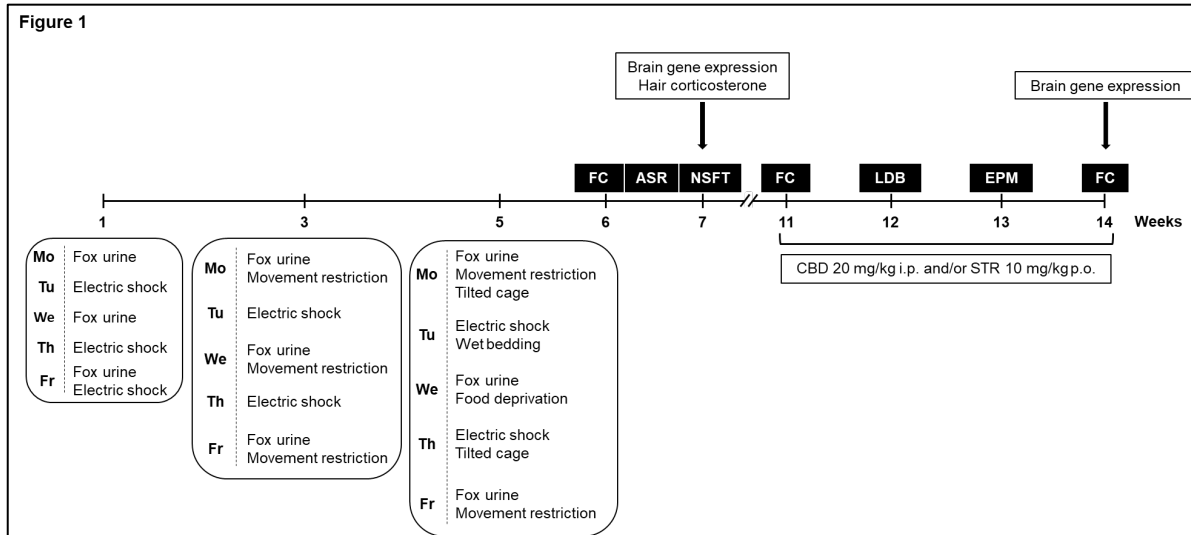


Figure 1. Timeline diagram of the experimental procedure used for the development of the animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD) (weeks 1 to 5) to evaluate PTSD-induced behavioral and neurobiological alterations under basal conditions (weeks 6 and 7), and to analyze the pharmacological actions of cannabidiol (CBD, 20 mg/kg, i.p.) and/or sertraline (STR, 10 mg/kg, p.o.) on long-lasting PTSD disturbances (weeks 11 to 14). FC: Fear Conditioning, NSFT: Novelty Suppressed Feeding Test, LDB: Light-Dark Box, EPM: Elevated Plus Maze.

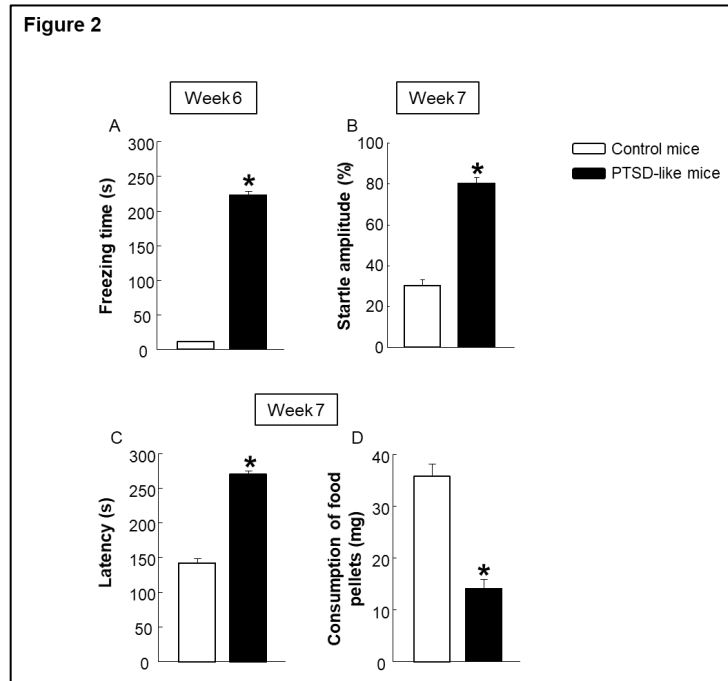


Figure 2. Evaluation of the basal behavioral disturbances induced by the animal model of PTSD at weeks 6 and 7. Analysis of the freezing time (s) by the fear conditioning (FC) paradigm (A), the startle amplitude (B) by the acoustic startle response (ASR), and of the latency time (C) and food pellets consumption (D) by the novelty suppressed feeding test (NSFT). Columns represent the mean and vertical lines \pm SEM. *, Values from PTSD-like mice that are significantly different from control mice (Student's *t*-test, $P < 0.001$). Mice exposed to the PTSD-like model: N=8; control mice: N=8.

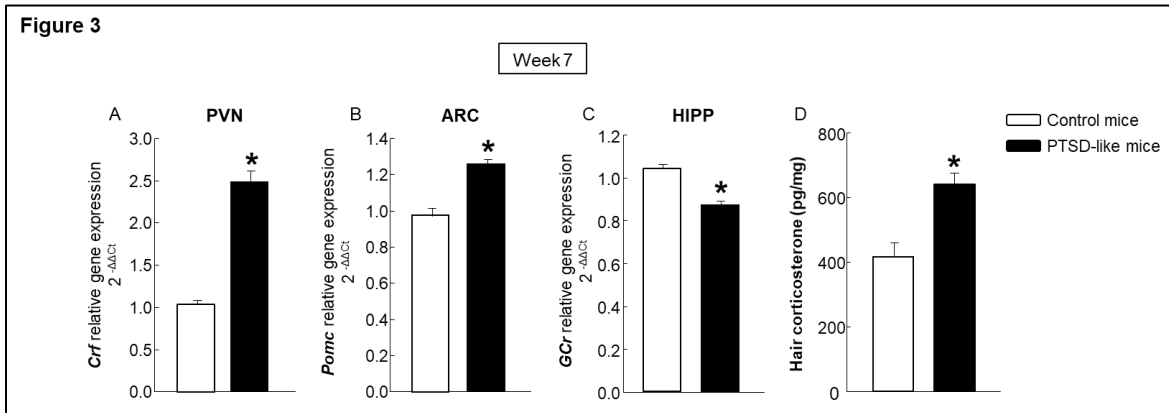


Figure 3. Relative gene expression analyses of corticotropin releasing factor (*Crf*) in the paraventricular nucleus (PVN) (A), proopiomelanocortin (*Pomc*) in the arcuate nucleus (ARC) (B), and glucocorticoid receptor (*GCr*) in the hippocampus (HIPP) (C) by real time PCR. Quantification of hair corticosterone (pg/mg) (D) by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). Columns represent the mean and vertical lines \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta C_T}$. *, Values from PTSD-like mice that are significantly different from control mice (Student's *t*-test, $P < 0.001$). Mice exposed to the PTSD-like model: N=8; control mice: N=8.

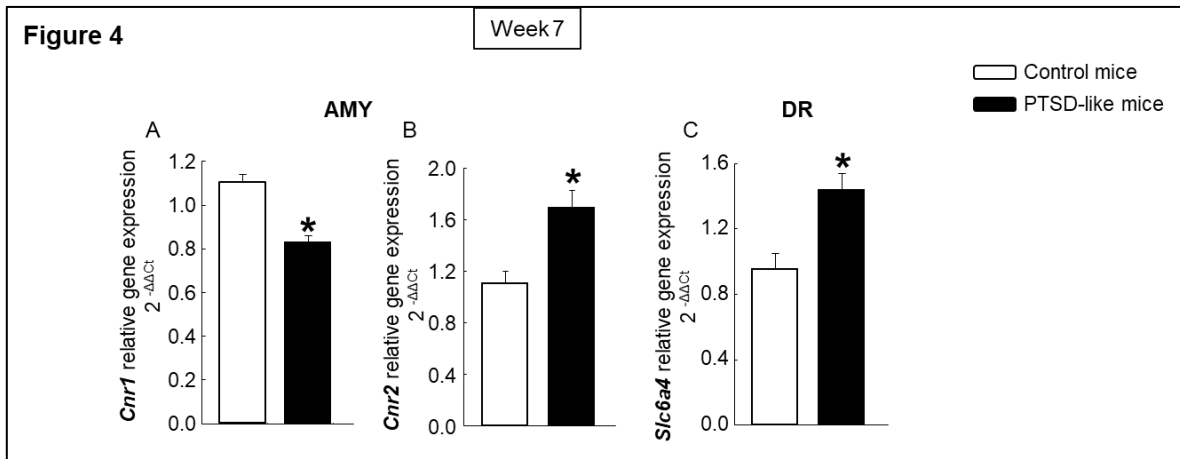


Figure 4. Relative gene expression analyses of cannabinoid receptors 1 (*Cnr1*) (A) and 2 (*Cnr2*) (B) in the amygdala (AMY), and serotonin transporter (*Slc6a4*) in the dorsal raphe nucleus (DR) (C) by real time PCR. Columns represent the mean and vertical lines \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *, Values from PTSD-like mice that are significantly different from control mice (Student's *t*-test, $P < 0.001$). Mice exposed to the PTSD-like model: N=8; control mice: N=8.

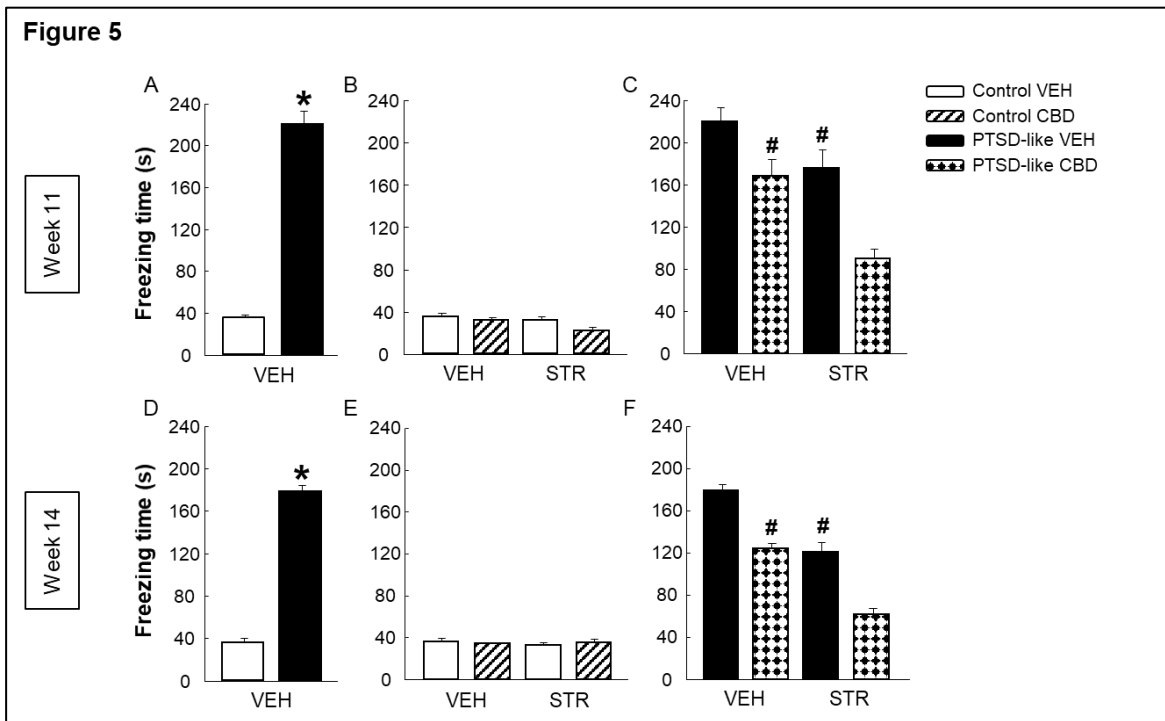


Figure 5. Evaluation of fear-related memory at weeks 11 and 14. Analysis of the freezing time (s) by the fear conditioning paradigm between control and PTSD-like VEH-treated mice at week 11 (A) and week 14 (D). Effects of acute (week 11) and chronic (week 14) administration of CBD (20 mg/kg, i.p.) and/or STR (10 mg/kg, p.o.), or its corresponding VEH, on the freezing time (s) of control mice (B, E) and PTSD-like mice (C, F). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM. *, Values from PTSD-like VEH-treated mice that are significantly different from control VEH-treated mice (Student's *t*-test, $P < 0.001$). #, Values from CBD- or STR-treated groups that are significantly different from VEH-treated mice (Two-way ANOVA, $P < 0.05$). &, Values from CBD plus STR-treated mice that significantly different from CBD- and STR-treated control (Two-way ANOVA, $P < 0.05$) and PTSD-like mice (Two-way ANOVA, $P < 0.001$). Mice exposed to the PTSD-like model: N(VEH)=10, N(CBD)=10, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10; control mice: N(VEH)=10, N(CBD)=9, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10.

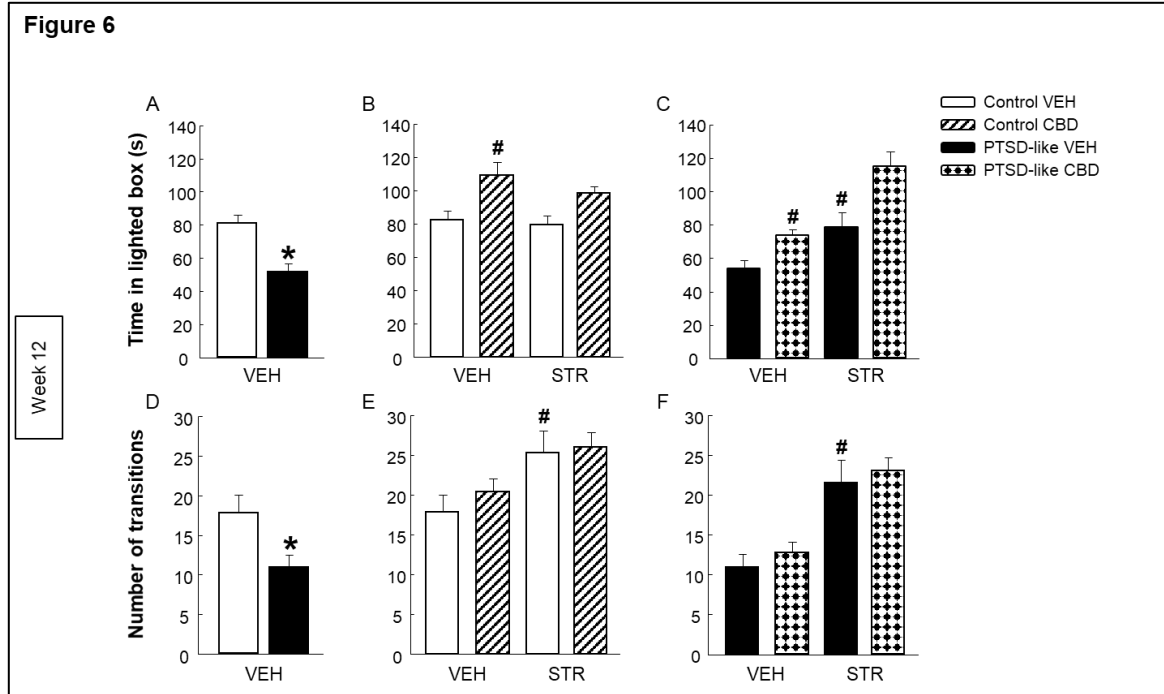


Figure 6. Evaluation of anxiety-like behaviour by the light-dark box (LDB) paradigm at week 12. Comparative analysis between control and PTSD-like VEH-treated mice of the time spent in the lighted box (s) (A) and the number of transitions (D). Effects of CBD (20 mg/kg, i.p.) and/or STR (10 mg/kg, p.o.) administration, or its corresponding VEH, on the time spent in the lighted box (s) (B, C) and the number of transitions (E, F) of control and PTSD-like mice. Columns represent the mean and vertical lines \pm SEM. *, Values from PTSD-like VEH-treated mice that are significantly different from control VEH-treated mice (Student's *t*-test, $P < 0.001$). #, Values from CBD- or STR-treated groups that are significantly different from VEH-treated mice (Two-way ANOVA, $P < 0.001$). &, Values from CBD plus STR-treated mice that are significantly different from CBD- and STR-treated mice (Two-way ANOVA, $P < 0.001$). Mice exposed to the PTSD-like model: N(VEH)=10, N(CBD)=10, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10; control mice: N(VEH)=10, N(CBD)=9, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10.

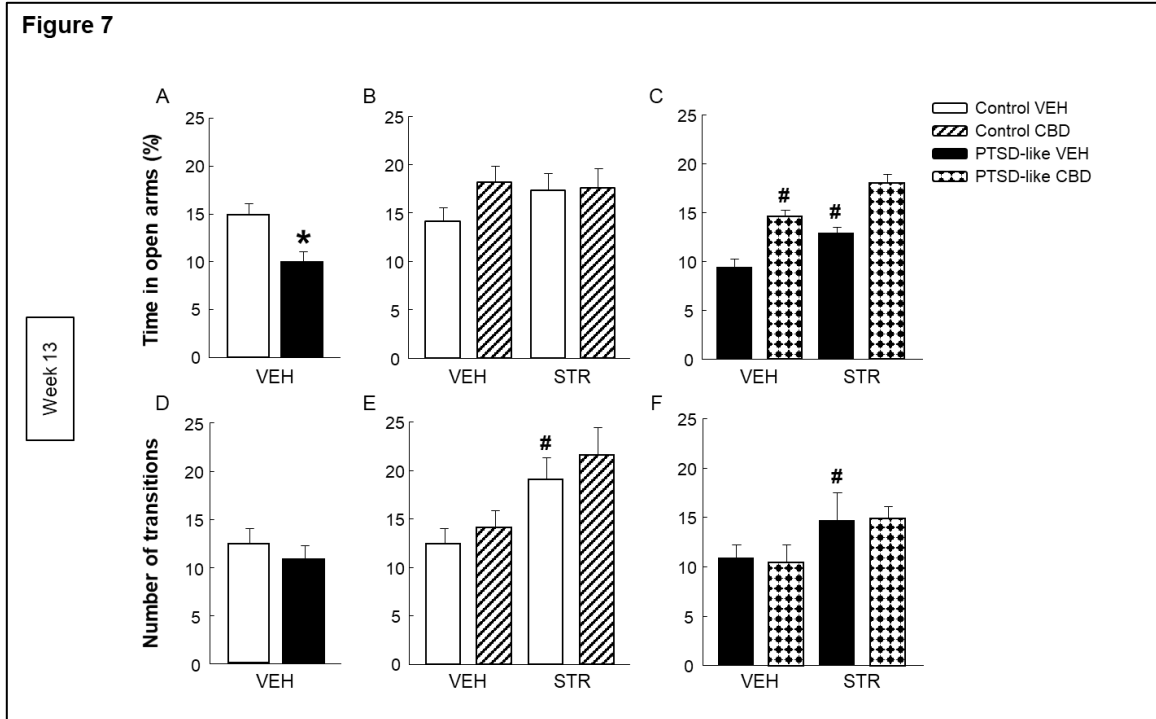


Figure 7. Evaluation of anxiety-like behaviour by the elevated plus maze (EPM) paradigm at week 13. Comparative analysis between control and PTSD-like VEH-treated mice of the time spent in the open arms (s) (A) and the number of transitions (D). Effects of CBD (20 mg/kg, i.p.) and/or STR (10 mg/kg, p.o.) administration, or its corresponding VEH, on the time spent in the open arms (s) (B, C) and the number of transitions (E, F) of control and PTSD-like mice. Columns represent the mean and vertical lines \pm SEM. *, Values from PTSD-like VEH-treated mice that are significantly different from control VEH-treated mice (Student's *t*-test, $P < 0.001$). #, Values from CBD- or STR-treated groups that are significantly different from VEH-treated mice (Two-way ANOVA, $P < 0.001$). &, Values from CBD plus STR-treated mice that are significantly different from CBD- and STR-treated mice (Two-way ANOVA, $P < 0.001$). Mice exposed to the PTSD-like model: N(VEH)=10, N(CBD)=10, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10; control mice: N(VEH)=10, N(CBD)=9, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10.

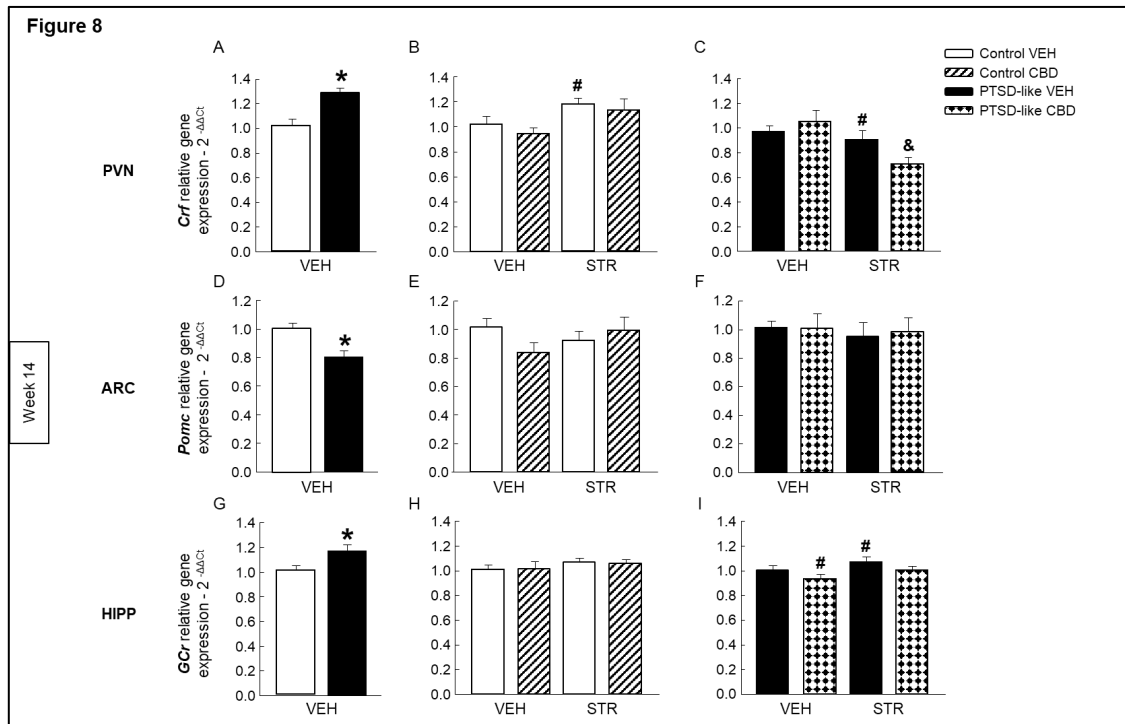


Figure 8. Relative gene expression analyses of Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis markers by real time PCR at week 14. Comparative analysis between control and PTSD-like VEH-treated mice of the relative gene expression of corticotropin releasing factor (*Crf*) in the paraventricular nucleus (PVN) (A), proopiomelanocortin (*Pomc*) in the arcuate nucleus (ARC) (D), and glucocorticoid receptor (*GCr*) in the hippocampus (G). Effects of CBD (20 mg/kg, i.p.) and/or STR (10 mg/kg, p.o.) administration, or its corresponding VEH, on the relative gene expression of *Crf* in the PVN (B, C), *Pomc* in the ARC (E, F), and *GCr* in the HIPP (H, I) of control and PTSD-like mice. Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta C_t}$. *, Values from PTSD-like mice that are significantly different from control mice (Student's *t*-test, $P < 0.05$). #, Values from CBD- or STR-treated mice that are significantly different from VEH-treated mice (Two-way ANOVA, $P < 0.05$). &, Values from CBD plus STR-treated mice that are significantly different from CBD- and STR-treated mice (Two-way ANOVA, $P < 0.05$). Mice exposed to the PTSD-like model: N(VEH)=10,

N(CBD)=9, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10; control mice: N(VEH)=10, N(CBD)=9, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10.

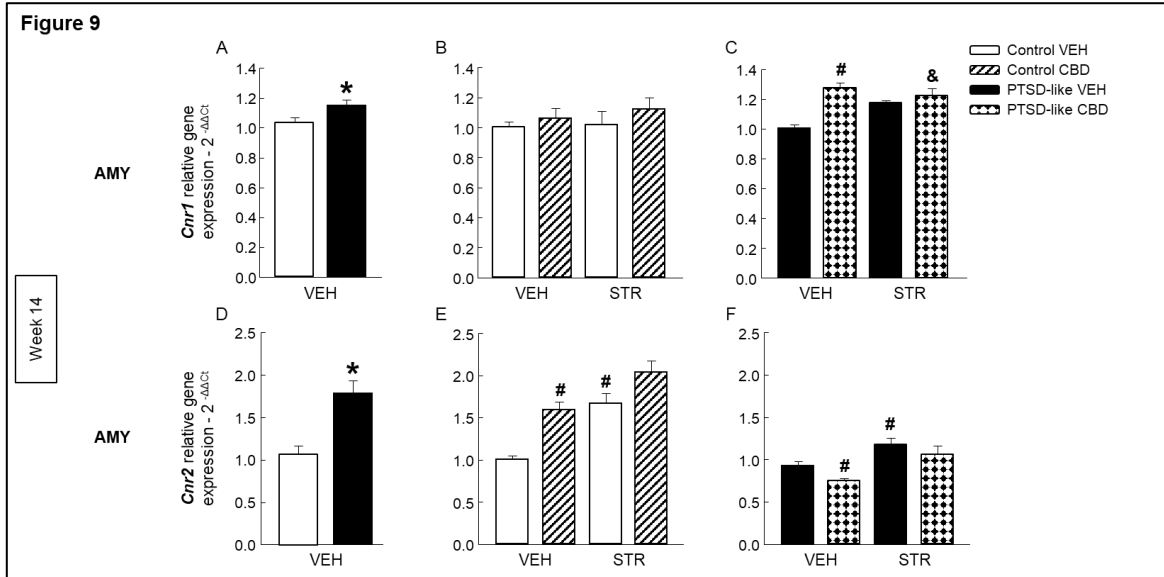


Figure 9. Relative gene expression analyses of cannabinoid receptor 1 (*Cnr1*) and 2 (*Cnr2*) in the amygdala (AMY) by real time PCR at week 14. Comparative analysis between control and PTSD-like vehicle (VEH)-treated mice of the relative gene expression of *Cnr1* (A) and *Cnr2* (D). Effects of CBD (20 mg/kg) and/or STR (10 mg/kg) administration, or its corresponding VEH, on the relative gene expression of *Cnr1* (B, C) and *Cnr2* (E, F) of control and PTSD-like mice. Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *, Values from PTSD-like mice that are significantly different from control mice (Student's *t*-test, *Cnr1*: $P < 0.05$, *Cnr2*: $P < 0.001$). #, Values from CBD- or STR-treated mice that are significantly different from VEH-treated mice (Two-way ANOVA, $P < 0.05$). &, Values from CBD plus STR-treated mice that are significantly different from CBD- and STR-treated mice (Two-way ANOVA, $P < 0.05$). Mice exposed to the PTSD-like model: N(VEH)=10, N(CBD)=9, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10; control mice: N(VEH)=10, N(CBD)=9, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10.

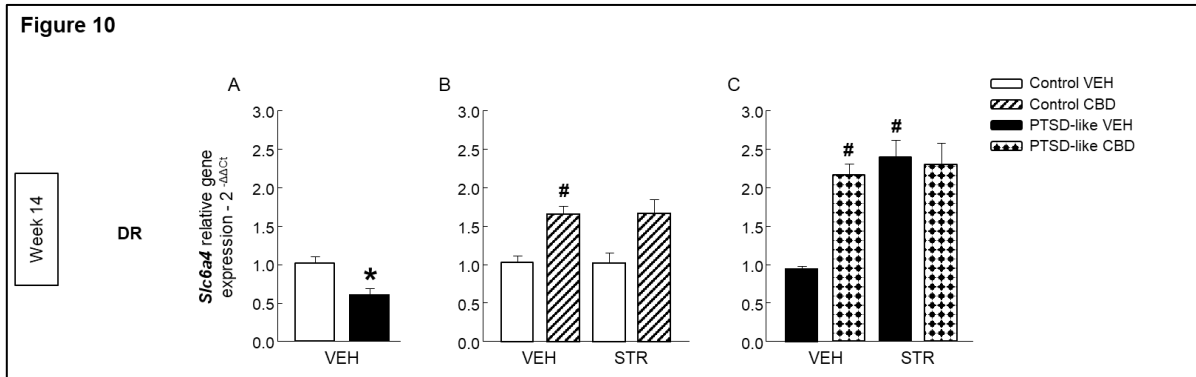


Figure 10. Relative gene expression analyses of serotonin transporter (*Slc6a4*) in the dorsal raphe nucleus (DR) by real time PCR at week 14. Comparative analysis between control and PTSD-like vehicle (VEH)-treated mice of the relative gene expression of *Slc6a4* (A) in the DR. Effects of CBD (20 mg/kg) and/or STR (10 mg/kg) administration, or its corresponding VEH, on the relative gene expression of *Slc6a4* in the DR of control (B) and PTSD-like (C) mice. Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta C_t}$. *, Values from PTSD-like mice that are significantly different from control mice (Student's *t*-test, *Slc6a4*: $P < 0.001$). #, Values from CBD- or STR-treated mice that are significantly different from VEH-treated mice (Two-way ANOVA, $P < 0.05$). Mice exposed to the PTSD-like model: N(VEH)=10, N(CBD)=9, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10; control mice: N(VEH)=10, N(CBD)=9, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10.

Supplementary information

Procedure 1: Evaluation of basal behavioural and neurobiological alterations induced by the animal model of PTSD.

Distribution of the treatment groups according to the basal behavioural evaluation before the beginning of the pharmacological treatment

Fear conditioning paradigm. No differences were observed in the freezing time evaluated in the FC between all 4 subgroups of PTSD-exposed mice (Figure S1B, One-way ANOVA, $F(3,38) = 0.17$, $P = 0.92$), and control mice (Figure S1A, One-way ANOVA, $F(3,38) = 0.05$, $P = 0.984$) that will be treated with CBD and/or sertraline, or the corresponding vehicles.

Novelty suppressed feeding test. No differences were observed in the latency time and food consumption evaluated in the NSFT between all 4 subgroups of PTSD-exposed mice (Latency time, Figure S1D, One-way ANOVA, $F(3,38) = 1.163$, $P = 0.337$; Food consumption, Figure S1C, One-way ANOVA, $F(3,38) = 0.08$, $P = 0.986$) and non-PTSD mice (Latency time, Figure S1F, One-way ANOVA, $F(3,38) = 0.838$, $P = 0.482$; Food consumption, Figure S1E, One-way ANOVA, $F(3,38) = 0.241$, $P = 0.867$) that will be treated with CBD and/or SERT, or the corresponding vehicles.

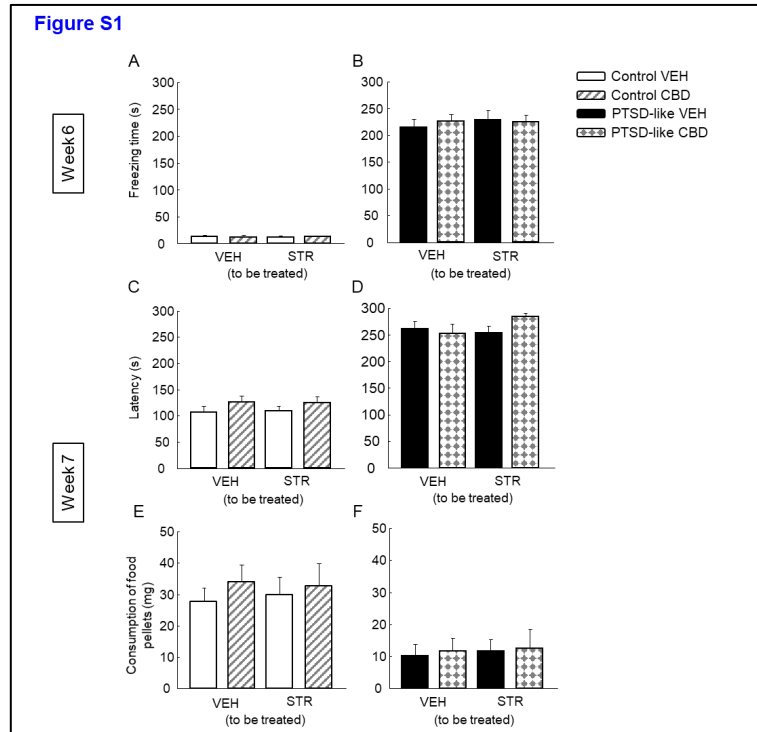


Figure S1. Behavioural basal evaluation of mice exposed to the animal model of PTSD-like ($n = 39$) and control mice ($n = 39$) by the fear conditioning (A and B) and the novelty suppressed feeding test (C, D, E and F) paradigms at weeks 6 and 7, respectively. In each behavioural paradigm, control (A, C and E) and PTSD-like (B, D and F) mice were randomly assigned into four experimental groups ($n = 9-10$ per group) according to the pharmacological treatment with CBD (20 mg/kg) and/or SERT (10 mg/kg), or the corresponding vehicle (VEH). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM. No differences were observed in all four groups of mice that will be treated with the selected pharmacotherapies. Mice exposed to the PTSD-like model: N(VEH)=10, N(CBD)=10, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10; control mice: N(VEH)=10, N(CBD)=10, N(STR)=9, N(CBD plus STR)=10.

Artículo 2. *Neuropharmacology*. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108552

The administration of sertraline plus naltrexone reduces ethanol consumption and motivation in a long-lasting animal model of post-traumatic stress disorder

Ani Gasparyan^{1,2}, Francisco Navarrete^{1,2} and Jorge Manzanares^{1,2}

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

Author to whom correspondence should be addressed:

Dr. Jorge Manzanares

Instituto de Neurociencias de Alicante

Universidad Miguel Hernández-CSIC

Avda. Ramón y Cajal s/n

03550 Sant Juan de Alicante, Alicante

SPAIN

Phone: 34-96-591-9252

E-mail: jmanzanares@umh.es

Abstract

This study was aimed to evaluate the effects of sertraline (STR) and/or naltrexone (NTX) on ethanol consumption and motivation in an animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD) and alcohol use disorder (AUD).

Male C57BL/6J mice were submitted to an intermittent and progressively increasing stressful stimuli simulating PTSD behavioural features. Behavioural alterations were explored by the fear conditioning (FC), novelty suppressed feeding test (NSFT) and acoustic startle response (ASR) paradigms. Afterwards, mice were evaluated in the voluntary ethanol consumption (VC) and the oral ethanol self-administration (OEA) paradigms. The effects of STR (10 mg/kg) and/or NTX (0.7 mg/kg) on ethanol consumption and motivation were analysed in the OEA. Furthermore, relative gene expression analyses of tyrosine hydroxylase (*Th*), mu-opioid receptor (*Oprm1*) and 5-hydroxytryptamine transporter (*Slc6a4*) were performed in the ventral tegmental area (VTA), nucleus accumbens (NAcc) and dorsal raphe nucleus (DR), respectively.

PTSD-like mice presented increased fear-related memory, anxiety-like behaviours, and startle response, as well as enhanced ethanol consumption and motivation in the VC and OEA paradigms. Interestingly, STR plus NTX combination significantly reduced ethanol intake and motivation in the OEA. Gene expression analyses revealed reduced *Th* and *Oprm1* whereas *Slc6a4* gene expression increased in PTSD-like mice. STR and/or NTX modulated *Th* and *Slc6a4* gene expression changes in PTSD-like mice. Furthermore, NTX increased *Oprm1* gene expression revealing a synergistic action when combined with STR.

These results provide evidence about the efficacy of the STR plus NTX to attenuate ethanol reinforcement and motivation in an animal model of PTSD and AUD dual pathology.

Keywords: AUD, mice, mRNA, naltrexone, PTSD, sertraline

1. Introduction

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a chronic and disabling mental illness caused by the exposure to traumatic life events and characterized by intrusion symptoms, avoidance of trauma-related stimuli, alterations in cognition, mood, arousal and reactivity (APA, 2013). The severity of PTSD symptoms and the development of psychiatric comorbidities depend upon multiple factors such as the type, intensity, and duration of the traumatic event, as well as the age of exposure. In this regard, clinical and epidemiological studies demonstrated the high co-occurrence of PTSD and substance use disorders (SUD). This dual pathology occurs 2 to 4 times more likely than in individuals without PTSD (Gilpin and Weiner, 2017). Alcohol use disorder (AUD) is the most common SUD in PTSD patients (Jacobsen et al., 2001). Individuals with the dual diagnosis of PTSD and AUD usually present worse clinical outcomes and poorer therapeutic responses compared to patients with each diagnosis separately. Indeed, PTSD and AUD comorbidity is accompanied by more severe PTSD symptoms, increased alcohol-related problems and risk of relapse, and more frequent psychiatric comorbidity than individuals with either disorder alone (Allen et al., 2016).

The clinical complexity of co-occurring PTSD and AUD together with the lack of specific pharmacological strategies significantly hampers the therapeutic management of these patients. To date, several approaches were proposed and evaluated. Some strategies analysed the improvement of PTSD symptomatology with the administration of the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) sertraline (STR) and paroxetine, the only drugs approved for PTSD treatment by regulatory agencies, with inconsistent results (Hien et al., 2015, Brady et al., 2005, Naglich et al., 2019). On the other hand, the drug commonly used for the treatment of AUD, naltrexone (NTX, mu-opioid antagonist), was also evaluated (Zandberg et al., 2016), showing a small reduction of the ratio of drinking days without positive effects on PTSD symptomatology (Foa et al., 2013). Thus, previously mentioned

strategies yielded low to moderate efficacy to reduce both alcohol use outcomes and PTSD symptomatology. Therefore, the identification of new targets or drug treatment strategies for comorbid AUD and PTSD is critical (Taylor et al., 2017). In this respect, the combination of pharmacological treatments may be an interesting option providing the possibility to use lower doses reducing the occurrence of side effects and achieving an additive or synergistic effect by combining different mechanisms of action (Verplaetse et al., 2018). Therefore, this approach deserves further investigation to improve the management of PTSD and AUD comorbidity (Verplaetse et al., 2018, Zandberg et al., 2016).

The development of animal models simulating, at least in part, PTSD and AUD clinical features, is becoming crucial to identify new targets and to develop more effective pharmacological approaches (Gilpin and Weiner, 2017). Since PTSD symptoms usually precede the onset of AUD in patients, an adequate animal model must reproduce this time course to induce PTSD-like behavioural traits and, subsequently, increase the vulnerability to ethanol reinforcing and motivational actions. Importantly, these alterations should be long-lasting to allow the combination with experimental procedures to evaluate alcohol reward, as well as with chronic pharmacological treatments in the time context of these paradigms (between 4 to 6 weeks). In recent years, alcohol consumption was evaluated in different animal models of PTSD. Nevertheless, the results obtained in these studies are contradictory probably due to the differences in experimental designs and the time point when stress is applied in relation to the evaluation of ethanol consumption (Edwards et al., 2013, Manjoch et al., 2016, Zoladz et al., 2018, Meyer et al., 2013).

The aim of the present study was to evaluate the effects of STR (10 mg/kg) and/or NTX (0.7 mg/kg) on ethanol consumption and motivation in a new animal model of PTSD and AUD comorbidity. For this purpose, a chronic animal model of PTSD was combined with two experimental paradigms normally used to evaluate ethanol rewarding effects, the voluntary

ethanol consumption (VC) and the oral ethanol self-administration (OEA). In addition, specific changes in the gene expression of tyrosine hydroxylase (Th) in the ventral tegmental area (VTA), mu-opioid receptor (Oprm1) in the nucleus accumbens (NAcc) and serotonin transporter (Slc6a4) in the dorsal raphe nucleus (DR) of mice exposed to the OEA paradigm were analysed by real time PCR.

2. Methods

2.1 Mice

A total of 136 C57BL/6J male mice (26 for the Experiment 1, 70 for the Experiment 2 and 40 for Additional Behavioural Studies) were purchased from Charles River laboratories (Lille, France). Mice were 4-weeks old and weighed 20-25 g at the beginning of the experiments. Mice were housed in groups of five per cage (40 x 25 x 22 cm) under controlled environmental conditions (temperature, $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$; relative humidity, $60 \pm 10\%$, and 12 h light/dark cycle, lights on from 08:00 to 20:00 h). After their arrival, mice were undisturbed for one week for its acclimatization to the animal housing room. Behavioural evaluation was performed during the light cycle (from 16:00 to 18:00 h), placing home cages in the operant-task room one hour before to start. All experimental procedures complied with the Spanish Royal Decree 53/2013, the Spanish Law 32/2007 and the European Union Directive of the 22nd of September 2010 (2010/63/UE) regulating the care of experimental animals and were approved by the ethics committee of Miguel Hernandez University.

2.2 Drugs

STR was purchased from Pfizer laboratories (Madrid, Spain), and was dissolved in tap water to obtain the required dose of 10 mg/kg for its oral administration (p.o.). NTX hydrochloride (Accord Healthcare S.L.U., Barcelona, Spain) was dissolved in saline 0.9% to obtain the required dose of 0.7 mg/kg (p.o.). Both drugs were daily prepared immediately before its administration at a final volume of 10 ml/kg (0.3 ml of solution/mouse). STR and/or NTX treatment began after the FR1 stabilization phase of the OEA paradigm, and both drugs or the corresponding vehicles were administered 1 h before the beginning of each daily session in FR1, FR3 and PR phases.

2.3 Development of the animal model of PTSD-AUD dual pathology and evaluation of STR and/or NTX effects on ethanol consumption and motivation

2.3.1 Animal model of PTSD

The animal model of PTSD was induced by exposing the mice to intermittent and progressively increasing stressful stimuli simulating PTSD behavioral features (PTSD-like mice) at different time point for 5 weeks: 1) Fox urine: a perforated plastic tube (50 ml) containing a gauze impregnated in fox urine (Code blue, Fox Urine Cover Scent, Ref. OA1105, 3 ml) or saline (control mice) was placed in the centre of each cage for 15 min; 2) Unescapable electric shock: animals were placed inside a 50 x 25 x 25 cm acrylic box with a floor consisting of a grid of parallel stainless steel

bars (1 mm in diameter and 1 cm apart). Thirty seconds after animals were introduced in the box, they received a 1 mA scrambling shock or not (control mice) during 10 seconds, with an additional resting time of 20 s; 3) movement restriction: animals were introduced in perforated plastic falcon tubes (50 ml) for 15 min, or were left undisturbed in the home cage (control mice); 4) tilted cage: during dark cycle, home cages were tilted 30° for 12-14 h or not (control mice); 5) wet bedding: during dark cycle, mice were exposed to a cage with wet sawdust bedding for 12-14 h, or were left undisturbed (control mice); and 6) food restriction: during dark cycle, mice were food deprived for 12-14 h, or were left undisturbed (control mice).

Stressful stimuli were applied at different time points for 5 weeks, alternating 3 weeks of exposure (weeks 1, 3 and 5) with 2 weeks of resting (weeks 2 and 4), to avoid habituation and to add elements of unpredictability and re-exposure to the stressors. Furthermore, the intensity of stress exposure was increased by adding new stressful stimuli from week to week as displayed in Figure 1. Overall, these experimental aspects are especially relevant to induce long-lasting behavioural and neurochemical alterations allowing the combination of this animal model with paradigms to evaluate alcohol rewarding properties.

2.3.2 Evaluation of basal behaviour after the exposure to the animal model of PTSD

Behavioural disturbances induced by the animal model of PTSD were evaluated by the fear conditioning (FC) (weeks 6) and novelty suppressed feeding test (NSFT)

(week 7) for the Experiments 1 and 2, and by the acoustic startle response (ASR) (week 8) and FC (week 11) for additional behavioural studies.

FC: Fear memory retention was evaluated using Pavlovian contextual fear conditioning protocol (LeDoux, 2000). Mice were re-exposed to the same cage where they received electric shocks (1.0 mA, 10 s) during the induction of the animal model of PTSD. Freezing behaviour was evaluated for 5 minutes considering the time of total absence of movements except those necessary to breathe.

NSFT: This behavioural test measures anxiety-induced hyponeophagia as the inhibition of food ingestion or approach to food in an anxiety-provoking environment (Bodnoff et al., 1988, Garcia-Gutierrez et al., 2010). After 24 hours of food deprivation, mice were placed in a transparent square cage (40x40x50 cm) under controlled lighting (150 lumens) with a single pellet of food in the centre of the cage, placed on a white paper platform. The latency time before the mouse started to eat was recorded up to a threshold period of 5 min. Once mice started to eat, the total amount of food pellet consumption was measured during an additional 5-minutes time.

ASR: mice were placed in soundproof chambers equipped with loudspeakers controlled by STARTLE software (Panlab, Barcelona, Spain) (Ortega-Alvaro et al., 2011). Mice movement inside a Plexiglas cylinder was measured by a piezoelectric accelerometer and converted into a digital signal. After an acclimatization period of three days, when mice were placed in the apparatus for 5 min, the evaluation was carried out. The day of the evaluation, mice were exposed to 10 trials of 120 dB (40

ms, 8000 Hz) acoustic startle stimulus applied every 44 s, recording the maximum of startle amplitude during a 100 ms sampling window.

2.3.3 Evaluation of the rewarding properties of ethanol in PTSD-like mice

Experiment 1: Voluntary ethanol consumption paradigm (VC)

After the induction of the animal model of PTSD and the characterization of PTSD-related behavioural alterations measured in the FC and NSFT, mice were evaluated in a two-bottle choice paradigm following a previously published modified protocol (Ortega-Alvaro et al., 2015). All mice were individually housed in cages equipped with two feeding bottles containing only water to be acclimated and avoid possible stress. One week after this acclimatization period, the two-bottle choice paradigm was performed as follows: one bottle always contained water, and the other contained a solution with gradually increasing ethanol concentrations (2, 4, 6 and 8% v/v per 3 days). After reaching the concentration of 8% for 3 days, the level of consumption and the percentage of preference were evaluated for an additional period of 2 weeks until stabilization criteria were reached in both parameters. Bottles were alternated to prevent any place preference bias and its content (tap water and ethanol) was freshly prepared and renewed daily between 18:00 and 19:00 pm. Mice were weighed every 4 days and food was available ad libitum. The volume of ethanol and water consumed was carefully measured every day and the amount of ethanol consumed was calculated individually for each mouse, expressing the values as g of ethanol/kg body weight per day (g/kg/day). The ratio of ethanol

preference was also determined [ethanol preference = ethanol intake/ (ethanol intake + water intake)].

Experiment 2: Oral ethanol self-administration (OEA) paradigm. Evaluation of STR and/or NTX effects on ethanol consumption and motivation in PTSD-like mice.

After the induction of the animal model of PTSD in another set of animals, and the characterization of PTSD-related behavioural alterations measured in the FC and NSFT, the OEA paradigm was carried out in 18 operant chambers (Panlab, Barcelona, Spain) (Navarrete et al., 2014) equipped with a chamber light, two levers, one receptacle to drop liquid solution, one syringe pump, one stimulus light and one buzzer. PACKWIN software (Panlab, Barcelona, Spain) controlled stimulus and fluid delivery and recorded operant responses (number of presses of chamber levers). When mice pressed one lever did not have any consequences (inactive lever), whereas pressing the other lever delivered 36 µl of fluid combined with a 0.5-second stimulus light and a 0.5 second 2850-Hz 85-dB buzzer beep (active lever), followed by a 6-second timeout period.

The experiment was divided into four phases: 1) training, 2) saccharine substitution, 3) basal 8% (v/v) ethanol consumption and motivation, and 4) evaluation of STR and/or NTX pharmacological treatment on ethanol consumption and motivation after a stabilization period, similarly as described elsewhere (Viudez-Martinez et al., 2018b). After the saccharine substitution period, animals underwent the following three stages to evaluate basal ethanol (8% v/v) consumption and

motivation: i) Fixed ratio 1 (FR1) reinforcement schedule: five daily 1 h sessions in which mice responding one time on the active lever released one reinforcement (36 μ l of ethanol 8% (v/v)); ii) Fixed ratio 3 (FR3) reinforcement schedule: five daily 1 h sessions in which mice responding three times on the active lever releases one reinforcement; and iii) Progressive ratio (PR) reinforcement schedule: one 2 h session in which mice responding requirement to gain reinforcements increased according to the following series: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-1000. During the PR session, the breaking point was obtained which corresponded to the maximum number of activations of the active lever that each animal was able to perform to achieve one reinforcement.

At the end of the progressive ratio (PR) phase of the basal ethanol consumption and motivation evaluation, mice were selected according to the following learning criteria: i) reaching $\geq 70\%$ of preference for the active lever; ii) ≥ 10 reinforced trials by session in FR1 and FR3, and ≥ 5 reinforced trials in PR; iii) $\leq 30\%$ deviation in the number of reinforced trials during the last three consecutive days (FR1 and FR3); iv) mean 8% ethanol consumption ≥ 500 μ l (1.5 g/kg) in FR1, ≥ 300 μ l (0.9 g/kg) in FR3 and ≥ 117.5 μ l (0.35 g/kg) in PR; and v) a breaking point ≥ 12 in PR. Mice that reached these criteria underwent a FR1 stabilization phase (5 days) and were randomly distributed into four treatment groups: VEH, STR (10 mg/kg), NTX (0.7 mg/kg) and STR (10 mg/kg) plus NTX (0.7 mg/kg). Pharmacological effects were evaluated during the FR1 (8 days), FR3 (5 days) and PR (1 day) stages as previously described (Figure 4). For all the different stages, the ethanol left in the receptacle was detracted from the total amount of ethanol delivered, getting the real amount of ethanol

consumed [Ethanol solution intake = 36 μ l volume delivered – volume left on the receptacle].

2.4 Gene expression studies by real time PCR

Relative gene expression changes of Th in the VTA, Oprm1 in the NAcc and Slc6a4 in the DR were analysed on brain samples obtained in Experiment 2. Briefly, mice were sacrificed just after the end of the OEA experimental procedure (PR phase) by cervical dislocation and brains were removed from the skull and were frozen at -80°C . Brain sections were cut (500 μm) in a cryostat (-10°C) containing the regions of interest according to Paxinos and Franklin atlas (Paxinos, 2001), mounted in the slides and stored at -80°C . Brain nuclei of interest were microdissected following the method described by Palkovits and previously performed by our group (Palkovits, 1983, Navarrete et al., 2012). Total RNA was extracted from brain micropunches with TRI Reagent extraction reagent (Applied Biosystems, Madrid, Spain) and reverse transcription was carried out to obtain the complementary DNA (cDNA) with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (4374966, Applied Biosystems, Madrid, Spain). To perform the real-time PCR, 6.25 μ l of water with DEPC (diethyl pyrocarbonate, RNAase inhibitor), 5 μ l of the cDNA, 11.25 μ l of the TaqmanTM Master Mix (4369514, Applied Biosystems, Madrid, Spain), and 1.25 μ l of the corresponding Taqman assay (4331182, Applied Biosystems, Madrid, Spain) were added in each well of the plate (4346907, Applied Biosystems, Madrid, Spain). Quantitative analysis of the relative expression of Th (Mm00447546_m1), Oprm1 (Mm01188089_m1) and Slc6a4

(Mm00439391_m1) genes was performed on the StepOne Sequence Detector System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). All reagents were used following the manufacturer's instructions. The reference gene used was 18s rRNA (Mm03928990_g1). Data for each target gene were normalized to the endogenous reference gene, and the fold change in target gene expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.5 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using: i) Student's t-test for comparing control and PTSD-like mice (FC and NSFT, PR stage of the OEA and real time PCR), ii) two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures (RM) followed by the Student–Newman–Keuls post hoc test for comparing control and PTSD-like mice (VC and OEA), or PTSD-like mice treated with STR, NTX, STR plus NTX or VEH (OEA) at different time points, and iii) two-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls post hoc test for comparing PTSD-like mice treated with STR, NTX, STR plus NTX or VEH (PR stage of the OEA and real time PCR). Differences were considered significant if the probability of error was less than 5%. SigmaPlot 11 software (Systat software Inc., Chicago, IL, USA) was used for all statistical analyses.

3. Results

3.1 Behavioural changes induced by the exposure to the animal model of PTSD

After the induction of the animal model of PTSD, behavioural changes were evaluated by the FC and NSFT paradigms in controls and PTSD-like mice employed for experiments 1 and 2, and by the ASR and FC in controls and PTSD-like mice employed for additional behavioural studies. Values obtained in both experiments evaluating the freezing behaviour (FC) and the latency time to start feeding and the amount of food pellets consumption (NSFT) were very homogeneous in each experimental group of controls and PTSD-like mice. Because of this, instead of representing the results of these paradigms from all the animals employed for Experiments 1 and 2, the data included in Figure 2 only correspond to mice that were selected to carry out the Experiment 2. The reason was that these animals were employed to evaluate the effects of STR and/or NTX administration on ethanol consumption and motivation in the OEA paradigm, as well as the gene expression changes by real time PCR. The behavioural evaluation of mice in the Experiment 1 is displayed in the Supplementary Information (Figure S1).

Fear-related memory evaluation. PTSD-like mice showed a significant increased freezing time (Figure 2A, Student's t-test, $t=-19.156$, $P<0.001$, 68 d.f.) in the FC paradigm at week 6 compared with control mice. Additional behavioural studies demonstrated that these alterations were still present at week 11 where mice exposed to the PTSD model showed much longer freezing times than controls (Figure 2D, Student's t-test, $t=-22.255$, $P<0.001$, 38 d.f.).

Anxiety-like behaviour evaluation. PTSD-like mice presented increased latency time (Figure 2B, Student's t-test, $t=-7.550$, $P<0.001$, 68 d.f.) as well as decreased food consumption (Figure 2C, Student's t-test, $t=2.331$, $P<0.05$, 68 d.f.) in the NSFT paradigm at week 7 compared with controls.

Hyperarousal. Additional behavioural studies showed that mice exposed to the animal model of PTSD had increased startle response amplitude compared with controls at week 8 (Figure 2E, Student's t-test, $t=-2.972$, $P=0.005$, 38 d.f.).

3.2 Evaluation of ethanol preference and intake in PTSD-like mice

Experiment 1: Voluntary ethanol consumption paradigm (VC)

In the VC paradigm, statistical analysis showed an increased ethanol consumption (g/kg/day) (Figure 3B, Two-way RM ANOVA, Stress: $F(1,363)=22.231$, $P<0.001$; Day: $F(13,363)=1.384$, $P=0.166$; Stress x Day: $F(13,363)=0.508$; $P=0.919$) and percentage of preference (Figure 3C, Two-way RM ANOVA, Stress: $F(1,363)=12.966$, $P<0.001$; Day: $F(13,363)=0.387$, $P=0.973$; Stress x Day: $F(13,363)=0.157$, $P=1.000$) in PTSD-like mice in comparison with control mice.

3.3 Effects of STR and/or NTX on ethanol consumption and motivation, and associated gene expression changes

Experiment 2: Oral ethanol self-administration (OEA) paradigm

Evaluation of ethanol consumption and motivation in VEH-treated PTSD-like mice and its corresponding controls

PTSD-like mice treated with VEH showed a higher number of effective responses in FR1 and FR3 (Figure 5A, two-way RM ANOVA) when compared with control VEH-

treated mice. Furthermore, PTSD-like mice also showed significantly increased ethanol intake in FR1 and FR3 (Figure 5B, two-way RM ANOVA) in comparison with controls. In addition, PTSD-like mice presented higher breaking point (Figure 5C, Student's t-test) and ethanol intake (Figure 5D, Student's t-test) values in PR phase than controls (see Table 1 for detailed statistical information).

Effects of STR and/or NTX on ethanol consumption and motivation in PTSD-like mice

After the FR1 stabilization phase, a 10% of PTSD-like mice (n=10) were discarded for not meeting previously described learning criteria. The remaining group of animals (90%) were randomly distributed to receive the selected pharmacological treatments (VEH, STR, NTX and STR plus NTX). No differences were found on ethanol consumption or motivation in the FR1, FR3, PR and FR1 stabilization phases before treatment administration (see Figure S3).

After the pharmacological manipulation, STR (10 mg/kg, p.o.) or NTX (0.7 mg/kg, p.o.) administration did not induce any change in the number of effective responses or in the ethanol intake in both FR1 and FR3 stages. Nevertheless, the pharmacological manipulation significantly reduced the number of effective responses in FR1 and FR3 (Figure 6A, two-way RM ANOVA). Moreover, STR plus NTX combination markedly reduced ethanol intake in FR1 and FR3 (Figure 6B, two-way RM ANOVA). Interestingly, the pharmacological manipulation reduced the breaking point (Figure 6C, two-way ANOVA) as well as the ethanol intake (Figure 6D, two-way ANOVA) of PTSD animals in the PR stage (see Table 2 for detailed statistical information).

Effects of STR and/or NTX on gene expression disturbances in PTSD-like mice exposed to the OEA paradigm

PTSD-like mice exposed to the OEA paradigm showed decreased Th (Figure 7A, Student's t-test) and Oprm1 (Figure 7B, Student's t-test) while increased Slc6a4 (Figure 7C, Student's t-test) gene expression levels. STR administration increased Th gene expression and a similar effect was observed with STR and NTX combination (Figure 7D, two-way ANOVA). Furthermore, NTX administration significantly up-regulated Oprm1 gene expression, achieving a more pronounced effect when combined with STR (Figure 7E, two-way ANOVA). Finally, the administration of STR, NTX or the combination of both significantly reduced the increase of Slc6a4 gene expression observed in PTSD-like mice (Figure 7F, two-way ANOVA) (see Table 3 for detailed statistical information).

4. Discussion

The results of this study reveal that the administration of STR (10 mg/kg, p.o.) with a sub-effective dose of NTX (0.7 mg/kg, p.o.) significantly reduced ethanol consumption and motivation and modified gene expression alterations found in a new animal model of PTSD and AUD comorbidity. This statement is supported by the following observations: i) PTSD-like mice presented increased vulnerability to ethanol reinforcing and motivational properties in the VC and OEA paradigms; ii) The combination of STR plus NTX significantly reduced ethanol consumption and motivation in the OEA paradigm in FR1, FR3 and PR stages; and iii) The

administration of STR plus NTX modified Oprm1, Th and Slc6a4 gene expression alterations found in PTSD-like mice exposed to the OEA experimental paradigm.

The development of animal models simulating the comorbidity of PTSD and AUD is essential to improve the understanding of the underlying neurobiological alterations and to identify new therapeutic strategies. For that purpose, it is critical to design an animal model of PTSD inducing intense and long-lasting disturbances. In the present study, mice were exposed for 5 weeks to several stressful stimuli commonly employed to induce PTSD-like disturbances. The present model was designed carefully taking in consideration several features to induce long-lasting and pronounced disturbances: i) Stressful stimuli were applied alternating periods of exposure with periods of resting to avoid mice habituation and to add elements of unpredictability and re-exposure to the stressors; ii) The intensity of the stress exposure was progressively increased by adding new stressful stimuli each week; iii) The animal model was developed during mice adolescence, an early life period encompassing a critical window of vulnerability to environmental exposures. Thus, these features allow us to differentiate this model from other models commonly called “chronic stress models”, inducing long-lasting and pronounced PTSD-like behavioural and neurochemical disturbances such as increased relative gene expression of corticotropin releasing factor in the paraventricular nucleus and glucocorticoid receptor in the hippocampus (data not shown). This fact is essential to allow the assessment of chronic pharmacological strategies and for its combination with experimental paradigms employed to evaluate the reinforcing and motivational properties of ethanol which last approximately 4 to 6 weeks. This animal model of PTSD induced significantly increased freezing time, anxiety-like behaviour,

and startle response. Importantly, fear-related memories persisted for up to 6 weeks after the end of the model induction period. This prolonged effect allowed the combination with the VC and OEA paradigms, as well as the evaluation of the effects of chronic pharmacological treatment with STR and/or NTX. Interestingly, PTSD-like mice presented higher consumption and preference for ethanol in the VC paradigm, and increased motivation to ethanol consumption in the OEA paradigm than non-exposed mice. Ethanol consumption was evaluated in few PTSD animal models. In some studies, stress exposure did not alter or even reduced the subsequent ethanol consumption (Zoladz et al., 2018, Meyer et al., 2013). However, in other studies, rodents presented increased ethanol consumption after stress exposure during a short period of time. Nevertheless, previous reports studied changes in the ethanol intake of rodents with a previous history of alcohol consumption before the exposure to stress (Manjoch et al., 2016, Edwards et al., 2013). This approach does not closely simulate the causal relationship between PTSD diagnosis in adolescence and subsequent development of AUD. Indeed, trauma experienced specifically in adolescence is less likely to be preceded by alcohol experience (Park et al., 2019, Cloutier et al., 2018).

Nowadays there are no effective treatments for the integrative management of PTSD and AUD comorbidity (Verplaetse et al., 2018) motivating the urgent need to study new therapeutic strategies. Previous clinical studies evaluated the usefulness of STR or NTX to improve the symptomatology of patients with co-occurring PTSD and AUD. Some reports pointed out that STR could reduce alcohol drinking together with an improvement of PTSD symptomatology (Naglich et al., 2019) whereas other showed no differences in alcohol intake between this drug and placebo (Hien et al.,

2015, Brady et al., 2005). On the other hand, the treatment with NTX reduced the ratio of drinking days but was without effects to improve PTSD symptomatology (Foa et al., 2013). Thus, an interesting approach is to combine both pharmacological strategies, at low doses, to address jointly and more safely PTSD and AUD symptoms (Verplaetse et al., 2018).

In this study, the OEA paradigm was used to evaluate the effects of STR alone or in combination with NTX. The treatment with STR in PTSD-like mice did not significantly modify the number of effective responses or ethanol intake in FR1 and FR3 stages of OEA, although a slight reduction of ethanol intake was found during FR3 stage in STR-treated mice. During the PR stage, STR significantly lowered the breaking point values, whereas only a non-significant reduction effect was observed in the ethanol intake. Previous studies suggested that STR alone at similar doses reduced alcohol consumption in rats (Gill et al., 1988) and rhesus monkeys (Higley et al., 1998). These apparent discrepancies may be due to several causes including different animal species (rat or monkey vs. mouse), experimental paradigms (VC vs. OEA), routes of administration for STR (subcutaneous vs. oral), as well as the exposure to the animal model of PTSD. On the other hand, a sub-effective dose of NTX did not change the number of effective responses or ethanol intake in FR1 and FR3 stages but significantly reduced the breaking point. These results were not in agreement with previous publications of our group showing that the treatment with NTX reduced the number of lever presses, the ethanol consumption (Navarrete et al., 2014, Viudez-Martinez et al., 2018a) and the breaking point (Navarrete et al., 2014). However, it is important to note that previous exposure to the animal model of PTSD may alter the sensitivity of the pharmacological action of NTX. Interestingly,

the combination of STR plus a sub-effective dose of NTX produced a synergistic reduction of ethanol consumption and motivation in all the stages of the OEA paradigm. Previous studies pointed out that the same sub-effective dose of NTX also resulted more effective combined with topiramate (Navarrete et al., 2014) or cannabidiol (Viudez-Martinez et al., 2018b) to attenuate the reinforcing and motivational actions of ethanol. Thus, co-administration of low doses of NTX and STR may result beneficial for the management of alcohol dependence in PTSD patients. Further studies are necessary to explore this new therapeutic approach in clinical assays.

To elucidate the neurochemical mechanisms involved in the increased vulnerability to ethanol rewarding effects in mice submitted to intermittent and progressively increasing stressful stimuli simulating PTSD, gene expression analyses of *Th*, *Oprm1* and *Slc6a4* were carried out in the VTA, NAcc and DR, respectively. The reinforcing and rewarding properties of ethanol are mediated, at least in part, by dopaminergic pathways originated in the VTA and mainly projecting to the NAcc (Nestler et al., 1993), both regions undergoing functional changes after ethanol chronic administration (Ortiz et al., 1995). Although alcohol consumption was associated with increased *Th* gene expression in the VTA (Ortiz et al., 1995, Oliva et al., 2008), PTSD-like mice that underwent the OEA paradigm showed a significant reduction in *Th* gene expression. This opposite result may rely on recent evidence suggesting that stress exposure attenuates ethanol-induced spontaneous firing rate of VTA dopaminergic neurons while increasing ethanol operant self-administration (Ostroumov et al., 2016). Therefore, it is reasonable to hypothesize that the exposure to the animal model of PTSD may functionally alter the mesolimbic

dopaminergic system, effect that may be underlying the increased ethanol consumption and motivation.

On the other hand, ethanol consumption also promotes the release of opioid peptides modulating dopamine transmission within the mesocorticolimbic system (Trigo et al., 2010) where the pivotal role of the mu-opioid receptor has been demonstrated (Cowen and Lawrence, 1999, Herz, 1997). In this study, real-time PCR gene expression analyses revealed lower *Oprm1* gene expression in the NAcc of PTSD-like mice. This result is consistent with previous clinical evidence showing that after trauma there is a reduction of available opioid receptors associated with emotional distress (Liberzon et al., 2007). Interestingly, the decrease of endorphin signalling induced by the PTSD model accounts for the higher vulnerability to ethanol consumption due to the associated increase in the release of opioid peptides (Volpicelli et al., 1999). A similar result was reported in socially defeated mice showing increased ethanol consumption and motivation in the OEA paradigm and down-regulated *Oprm1* gene expression (Rodriguez-Arias et al., 2016).

The involvement of the DR serotonergic projections in rewarding processes was proposed (Liu et al., 2014), and changes in the serotonergic neurotransmission was described after ethanol intake. In this study, the increased vulnerability to ethanol rewarding properties in PTSD-like mice is accompanied by increased relative gene expression of *Slc6a4*. There is a compelling evidence regarding the pivotal role of *Slc6a4* in PTSD neuropathology, with multiple studies describing polymorphic variations typically leading to reduced serotonin transporter availability and function (Lee et al., 2005a). However, little is known about the relationship between the serotonergic system and the comorbidity PTSD and AUD. Previous studies revealed

increased Slc6a4 relative gene expression in ethanol dependent mice (Shibasaki et al., 2010), or alcohol-induced Slc6a4 up-regulation in human dendritic cells (Babu et al., 2009). Thus, it is tempting to hypothesize that the increase of Slc6a4 gene expression may be related to the actions of alcohol self-administration in PTSD-like mice.

Relative gene expression analyses of Th, Oprm1 and Slc6a4 also provided useful information to elucidate the possible mechanisms underlying the effects obtained with STR and/or NTX on ethanol consumption and motivation in PTSD-like mice. The modulation of dopaminergic function after alcohol consumption by NTX was extensively explored (Benjamin et al., 1993). In this study, NTX significantly increased Th relative gene expression in the VTA, an effect that contrasts with previous results showing a reduction of Th gene expression induced by NTX (Navarrete et al., 2014, Lee et al., 2005b). In addition, treatment with STR significantly up-regulated Th gene expression in the VTA. Previous studies suggested that the administration of STR increases dopamine concentrations in the NAcc (Kitaichi et al., 2010), but also reduces the spontaneous activity of dopaminergic neurons in the VTA (Di Mascio et al., 1998). Furthermore, the combination of NTX plus STR produced a similar effect than any of each drug separately. Therefore, it is reasonable to hypothesize that the exposure to the animal model of PTSD together with NTX and/or STR treatment decreases mesolimbic dopaminergic function, effect that is compensated by an increase in Th gene expression.

The administration with NTX significantly up-regulated Oprm1 gene expression. This effect may be related with the blockade of mu-opioid receptors produced by

NTX, as previously described (Parkes and Sinclair, 2000). The treatment with STR did not modify *Oprm1* gene expression whereas the combination of STR plus NTX notably increased *Oprm1* gene expression compared with NTX alone. The crosstalk between the serotonergic and opioid systems to regulate the reward mesolimbic circuit previously supported the therapeutic potential of combining SSRI and mu-opioid receptor antagonists for the treatment of alcohol dependence (Le et al., 1996). Thus, it may result plausible that the STR-induced increase of serotonin may regulate opioidergic function in the NAcc, accounting for the synergistic-like actions of NTX plus STR on *Oprm1* gene expression and the attenuation of ethanol reinforcement. However, additional studies are needed to further explore the underlying mechanisms involved.

In this study, the administration of STR downregulated *Slc6a4* gene expression in the DR. This effect was previously described for STR (Benmansour et al., 1999) and associated with the antidepressant actions of SSRIs (Horschitz et al., 2001). Similarly, the treatment with NTX significantly reduces *Slc6a4* gene expression, an action that was also found when combining NTX with STR. However, a previous study of our group showed that NTX-induced reduction of ethanol intake was associated with increased levels of *Slc6a4* gene expression (Oliva and Manzanares, 2007). This result may be related with the fact that the exposure to intermittent and progressively increasing stressful stimuli simulating PTSD behavioral features could differentially regulate opioidergic and serotonergic systems, as previously suggested.

5. Conclusions

In conclusion, the results obtained in this study provide new evidence about the efficacy of the combination of STR with a sub-effective dose of NTX to modulate the reinforcing properties of ethanol in a new animal model of the dual pathology PTSD-AUD. Moreover, gene expression analyses provide important clues to better understand the neurobiological basis of PTSD and AUD dual pathology as well as the mechanisms involved in the STR plus NTX-mediated modulation of ethanol consumption and motivation. Some of the limitations of the present study that should be addressed in the future are the evaluation of female mice to explore gender-dependent effects, or the performance of dose-response experiments. Thus, more studies are warranted to improve the understanding of the neurobiological mechanisms underlying PTSD and AUD comorbidity and to deeply evaluate the therapeutic potential of the STR plus NTX combination in patients with PTSD and AUD.

Author contributions

All named authors made an active contribution to the conception, design, performance and statistical analysis of the results. AG carried out the behavioural and real time-PCR analyses. AG and FN wrote the first draft of the manuscript. FN and JM critically reviewed the content, validated the accuracy of the data and approved the final version for publication.

Acknowledgements

The authors would like to thank the technical support provided by José Mulet in this study.

This research was supported by 'Instituto de Salud Carlos III' (RETICS, RD12/0028/0019 and RD16/0017/0014), 'Plan Nacional Sobre Drogas' (PNSD 2016I016) and 'Ministerio de Economía y Competitividad' (FIS, PI14/00438) to J.M. All the authors declare no conflict of interest.

References

1. ALLEN, J. P., CRAWFORD, E. F. & KUDLER, H. 2016. Nature and Treatment of Comorbid Alcohol Problems and Post Traumatic Stress Disorder Among American Military Personnel and Veterans. *Alcohol Res*, 38, 133-40.
2. APA 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5th edn. DSM-V, Washington, D.C., American Psychiatric Association (APA).
3. BABU, D. K., DIAZ, A., SAMIKKANNU, T., RAO, K. V., SAIYED, Z. M., RODRIGUEZ, J. W. & NAIR, M. P. 2009. Upregulation of serotonin transporter by alcohol in human dendritic cells: possible implication in neuroimmune deregulation. *Alcohol Clin Exp Res*, 33, 1731-8.
4. BENJAMIN, D., GRANT, E. R. & POHORECKY, L. A. 1993. Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. *Brain Res*, 621, 137-40.
5. BENMANSOUR, S., CECCHI, M., MORILAK, D. A., GERHARDT, G. A., JAVORS, M. A., GOULD, G. G. & FRAZER, A. 1999. Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level. *J Neurosci*, 19, 10494-501.
6. BODNOFF, S. R., SURANYI-CADOTTE, B., AITKEN, D. H., QUIRION, R. & MEANEY, M. J. 1988. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 95, 298-302.
7. BRADY, K. T., SONNE, S., ANTON, R. F., RANDALL, C. L., BACK, S. E. & SIMPSON, K. 2005. Sertraline in the treatment of co-occurring alcohol

- dependence and posttraumatic stress disorder. *Alcohol Clin Exp Res*, 29, 395-401.
8. CLOUTIER, R. M., SCHULER, K. L., KEARNS, N., RUGGERO, C. J., LEWIS, S. F. & BLUMENTHAL, H. 2018. Posttraumatic stress severity is associated with coping motives for alcohol use among in-patient and community recruited adolescents. *Anxiety Stress Coping*, 31, 500-513.
 9. COWEN, M. S. & LAWRENCE, A. J. 1999. The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 23, 1171-212.
 10. DI MASCIO, M., DI GIOVANNI, G., DI MATTEO, V., PRISCO, S. & ESPOSITO, E. 1998. Selective serotonin reuptake inhibitors reduce the spontaneous activity of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Bull*, 46, 547-54.
 11. EDWARDS, S., BAYNES, B. B., CARMICHAEL, C. Y., ZAMORA-MARTINEZ, E. R., BARRUS, M., KOOB, G. F. & GILPIN, N. W. 2013. Traumatic stress reactivity promotes excessive alcohol drinking and alters the balance of prefrontal cortex-amygdala activity. *Transl Psychiatry*, 3, e296.
 12. FOA, E. B., YUSKO, D. A., MCLEAN, C. P., SUVAK, M. K., BUX, D. A., JR., OSLIN, D., O'BRIEN, C. P., IMMS, P., RIGGS, D. S. & VOLPICELLI, J. 2013. Concurrent naltrexone and prolonged exposure therapy for patients with comorbid alcohol dependence and PTSD: a randomized clinical trial. *JAMA*, 310, 488-95.
 13. GARCIA-GUTIERREZ, M. S., PEREZ-ORTIZ, J. M., GUTIERREZ-ADAN, A. & MANZANARES, J. 2010. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br J Pharmacol*, 160, 1773-84.

14. GILL, K., AMIT, Z. & KOE, B. K. 1988. Treatment with sertraline, a new serotonin uptake inhibitor, reduces voluntary ethanol consumption in rats. *Alcohol*, 5, 349-54.
15. GILPIN, N. W. & WEINER, J. L. 2017. Neurobiology of comorbid post-traumatic stress disorder and alcohol-use disorder. *Genes Brain Behav*, 16, 15-43.
16. HERZ, A. 1997. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)*, 129, 99-111.
17. HIEN, D. A., LEVIN, F. R., RUGLASS, L. M., LOPEZ-CASTRO, T., PAPINI, S., HU, M. C., COHEN, L. R. & HERRON, A. 2015. Combining seeking safety with sertraline for PTSD and alcohol use disorders: A randomized controlled trial. *J Consult Clin Psychol*, 83, 359-69.
18. HIGLEY, J., HASERT, M., SUOMI, S. & LINNOILA, M. 1998. The serotonin reuptake inhibitor sertraline reduces excessive alcohol consumption in nonhuman primates: effect of stress. *Neuropsychopharmacology*, 18, 431-43.
19. HORSCHITZ, S., HUMMERICH, R. & SCHLOSS, P. 2001. Down-regulation of the rat serotonin transporter upon exposure to a selective serotonin reuptake inhibitor. *Neuroreport*, 12, 2181-4.
20. JACOBSEN, L. K., SOUTHWICK, S. M. & KOSTEN, T. R. 2001. Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature. *Am J Psychiatry*, 158, 1184-90.
21. KITAICHI, Y., INOUE, T., NAKAGAWA, S., BOKU, S., KAKUTA, A., IZUMI, T. & KOYAMA, T. 2010. Sertraline increases extracellular levels not only of serotonin, but also of dopamine in the nucleus accumbens and striatum of rats. *Eur J Pharmacol*, 647, 90-6.

22. LE, A. D., TOMKINS, D. M. & SELLERS, E. M. 1996. Use of serotonin (5-HT) and opiate-based drugs in the pharmacotherapy of alcohol dependence: an overview of the preclinical data. *Alcohol Alcohol*, 31 Suppl 1, 27-32.
23. LEDOUX, J. E. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 23, 155-84.
24. LEE, H. J., LEE, M. S., KANG, R. H., KIM, H., KIM, S. D., KEE, B. S., KIM, Y. H., KIM, Y. K., KIM, J. B., YEON, B. K., OH, K. S., OH, B. H., YOON, J. S., LEE, C., JUNG, H. Y., CHEE, I. S. & PAIK, I. H. 2005a. Influence of the serotonin transporter promoter gene polymorphism on susceptibility to posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety*, 21, 135-9.
25. LEE, Y. K., PARK, S. W., KIM, Y. K., KIM, D. J., JEONG, J., MYRICK, H. & KIM, Y. H. 2005b. Effects of naltrexone on the ethanol-induced changes in the rat central dopaminergic system. *Alcohol Alcohol*, 40, 297-301.
26. LIBERZON, I., TAYLOR, S. F., PHAN, K. L., BRITTON, J. C., FIG, L. M., BUELLER, J. A., KOEPPE, R. A. & ZUBIETA, J. K. 2007. Altered central micro-opioid receptor binding after psychological trauma. *Biol Psychiatry*, 61, 1030-8.
27. LIU, Z., ZHOU, J., LI, Y., HU, F., LU, Y., MA, M., FENG, Q., ZHANG, J. E., WANG, D., ZENG, J., BAO, J., KIM, J. Y., CHEN, Z. F., EL MESTIKAWY, S. & LUO, M. 2014. Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron*, 81, 1360-74.
28. LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.

29. MANJOCH, H., VAINER, E., MATAR, M., IFERGANE, G., ZOHAR, J., KAPLAN, Z. & COHEN, H. 2016. Predator-scent stress, ethanol consumption and the opioid system in an animal model of PTSD. *Behav Brain Res*, 306, 91-105.
30. MEYER, E. M., LONG, V., FANSELOW, M. S. & SPIGELMAN, I. 2013. Stress increases voluntary alcohol intake, but does not alter established drinking habits in a rat model of posttraumatic stress disorder. *Alcohol Clin Exp Res*, 37, 566-74.
31. NAGLICH, A. C., BOZEMAN, S., BROWN, E. S. & ADINOFF, B. 2019. Effect of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors on Healthcare Utilization in Patients with Post-Traumatic Stress Disorder and Alcohol Use Disorder. *Alcohol Alcohol*, 54, 428-434.
32. NAVARRETE, F., PEREZ-ORTIZ, J. M. & MANZANARES, J. 2012. Pregabalin and topiramate mediated regulation of cognitive and motor impulsivity in DBA/2 mice. *Br J Pharmacol*.
33. NAVARRETE, F., RUBIO, G. & MANZANARES, J. 2014. Effects of naltrexone plus topiramate on ethanol self-administration and tyrosine hydroxylase gene expression changes. *Addict Biol*, 19, 862-73.
34. NESTLER, E. J., HOPE, B. T. & WIDNELL, K. L. 1993. Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron*, 11, 995-1006.
35. OLIVA, J. M. & MANZANARES, J. 2007. Gene transcription alterations associated with decrease of ethanol intake induced by naltrexone in the brain of wistar rats. *Neuropsychopharmacology*, 32, 1358-69.
36. OLIVA, J. M., ORTIZ, S., PEREZ-RIAL, S. & MANZANARES, J. 2008. Time dependent alterations on tyrosine hydroxylase, opioid and cannabinoid CB1

- receptor gene expressions after acute ethanol administration in the rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol*, 18, 373-82.
37. ORTEGA-ALVARO, A., ARACIL-FERNANDEZ, A., GARCIA-GUTIERREZ, M. S., NAVARRETE, F. & MANZANARES, J. 2011. Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology*, 36, 1489-504.
 38. ORTEGA-ALVARO, A., TERNIANOV, A., ARACIL-FERNANDEZ, A., NAVARRETE, F., GARCIA-GUTIERREZ, M. S. & MANZANARES, J. 2015. Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addict Biol*, 20, 43-55.
 39. ORTIZ, J., FITZGERALD, L. W., CHARLTON, M., LANE, S., TREVISAN, L., GUITART, X., SHOEMAKER, W., DUMAN, R. S. & NESTLER, E. J. 1995. Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system. *Synapse*, 21, 289-98.
 40. OSTROUMOV, A., THOMAS, A. M., KIMMEY, B. A., KARSCH, J. S., DOYON, W. M. & DANI, J. A. 2016. Stress Increases Ethanol Self-Administration via a Shift toward Excitatory GABA Signaling in the Ventral Tegmental Area. *Neuron*, 92, 493-504.
 41. PALKOVITS, M. 1983. Punch sampling biopsy technique. *Methods Enzymol*, 103, 368-76.
 42. PARK, T., THOMPSON, K., WEKERLE, C., AL-HAMDANI, M., SMITH, S., HUDSON, A., GOLDSTEIN, A. & STEWART, S. H. 2019. Posttraumatic Stress Symptoms and Coping Motives Mediate the Association Between Childhood Maltreatment and Alcohol Problems. *J Trauma Stress*, 32, 918-926.

43. PARKES, H. & SINCLAIR, J. D. 2000. Reduction of alcohol drinking and upregulation of opioid receptors by oral naltrexone in AA rats. *Alcohol*, 21, 215-21.
44. PAXINOS, G., FRANKLIN, K.B.J. 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, New York, Academic Press. Harcourt Science and Technology Company.
45. RODRIGUEZ-ARIAS, M., NAVARRETE, F., BLANCO-GANDIA, M. C., ARENAS, M. C., BARTOLL-ANDRES, A., AGUILAR, M. A., RUBIO, G., MINARRO, J. & MANZANARES, J. 2016. Social defeat in adolescent mice increases vulnerability to alcohol consumption. *Addict Biol*, 21, 87-97.
46. SHIBASAKI, M., INOUE, M., KUROKAWA, K., OGOU, S. & OHKUMA, S. 2010. Expression of serotonin transporter in mice with ethanol physical dependency. *J Pharmacol Sci*, 114, 234-7.
47. TAYLOR, M., PETRAKIS, I. & RALEVSKI, E. 2017. Treatment of alcohol use disorder and co-occurring PTSD. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 43, 391-401.
48. TRIGO, J. M., MARTIN-GARCIA, E., BERRENDERO, F., ROBLEDO, P. & MALDONADO, R. 2010. The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend*, 108, 183-94.
49. VERPLAETSE, T. L., MCKEE, S. A. & PETRAKIS, I. L. 2018. Pharmacotherapy for Co-Occurring Alcohol Use Disorder and Post-Traumatic Stress Disorder: Targeting the Opioidergic, Noradrenergic, Serotonergic, and GABAergic/Glutamatergic Systems. *Alcohol Res*, 39, 193-205.
50. VIUDEZ-MARTINEZ, A., GARCIA-GUTIERREZ, M. S., FRAGUAS-SANCHEZ, A. I., TORRES-SUAREZ, A. I. & MANZANARES, J. 2018a. Effects of cannabidiol

plus naltrexone on motivation and ethanol consumption. *Br J Pharmacol*, 175, 3369-3378.

51. VIUDEZ-MARTINEZ, A., GARCIA-GUTIERREZ, M. S., NAVARRON, C. M., MORALES-CALERO, M. I., NAVARRETE, F., TORRES-SUAREZ, A. I. & MANZANARES, J. 2018b. Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice. *Addict Biol*, 23, 154-164.
52. VOLPICELLI, J., BALARAMAN, G., HAHN, J., WALLACE, H. & BUX, D. 1999. The role of uncontrollable trauma in the development of PTSD and alcohol addiction. *Alcohol Res Health*, 23, 256-62.
53. ZANDBERG, L. J., ROSENFELD, D., MCLEAN, C. P., POWERS, M. B., ASNAANI, A. & FOA, E. B. 2016. Concurrent treatment of posttraumatic stress disorder and alcohol dependence: Predictors and moderators of outcome. *J Consult Clin Psychol*, 84, 43-56.
54. ZOLADZ, P. R., EISENMANN, E. D., ROSE, R. M., KOHLS, B. A., JOHNSON, B. L., ROBINSON, K. L., HEIKKILA, M. E., MUCHER, K. E. & HUNTLEY, M. R. 2018. Predator-based psychosocial stress model of PTSD differentially influences voluntary ethanol consumption depending on methodology. *Alcohol*, 70, 33-41.

Figures

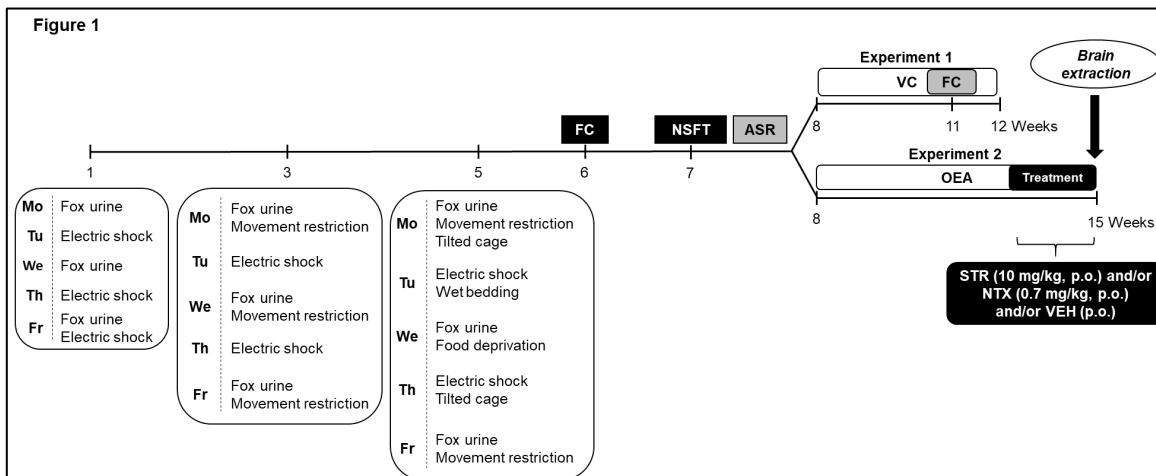


Figure 1. Timeline diagram of the experimental procedure used for the development of the animal model of PTSD-AUD dual pathology. Mice were submitted to an intermittent and progressively increasing stressful stimuli simulating PTSD behavioral features (PTSD-like mice) (weeks 1 to 5) evaluating basal behavioural alterations at weeks 6 and 7 by the FC and NSFT paradigms, respectively, as well as at weeks 8 and 11 by the ASR and FC paradigms (additional behavioural studies, grey boxes). Subsequently, mice were also exposed to the VC (Experiment 1, weeks 8-12) or to the OEA (Experiment 2, weeks 8-15). Finally, the effects derived from the administration of STR (10 mg/kg/day, p.o.) and/or NTX (0.7 mg/kg/day, p.o.) or the corresponding VEH (p.o.) of both drugs were evaluated. FC, fear conditioning; NSFT, novelty suppressed feeding test; ASR: acoustic startle response; VC, voluntary ethanol consumption; OEA, oral ethanol self-administration; STR, sertraline; NTX, naltrexone.

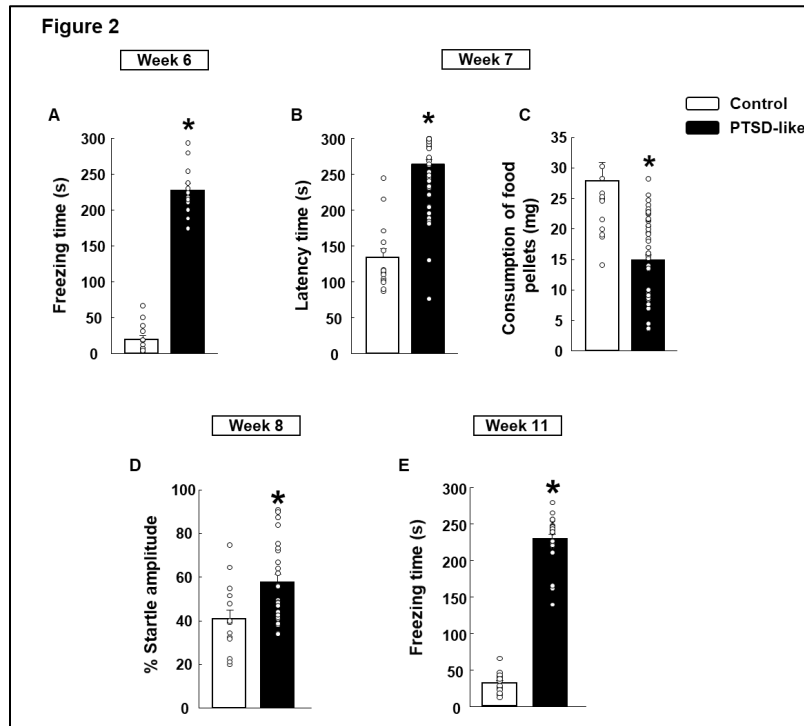


Figure 2. Behavioural evaluation of PTSD-like mice (n=12) and its controls (n=14) by the fear conditioning (FC) (A) and the novelty suppressed feeding test (NFST) (B and C) paradigms at weeks 6 and 7, respectively. Additional behavioural evaluation of PTSD-like mice (n=25) and controls (n=15) by the acoustic startle response (ASR) (D) and FC (E) paradigms. Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of freezing time (s) (A, at week 6; E, at week 11), latency time to feed (s) (B), food pellets consumption (mg) (C), and % of startle amplitude (D). * values from PTSD-like mice that are significantly different from control mice (Student's t-test, $P < 0.001$).

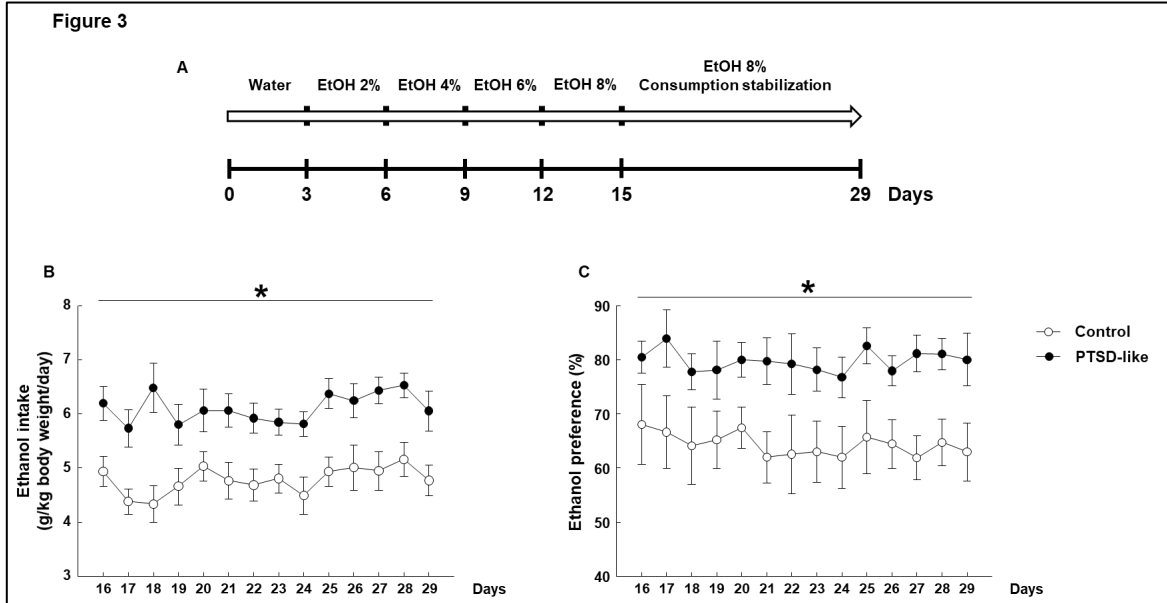


Figure 3. Evaluation of ethanol consumption and preference by the ethanol voluntary consumption paradigm of PTSD-like mice (n=15) and its controls (n=11). Schematic diagram of the experimental procedure (A). Ethanol concentration was increased gradually (2, 4, 6 and 8 % v/v) every 3 days until ethanol 8% v/v stabilization. Ethanol intake was measured every 24 h and was expressed as g/kg/day (B). Preference for ethanol consumption was calculated daily [ethanol preference = ethanol consumption / (ethanol consumption + water consumption)] (C). The dots represent the means and vertical lines \pm SEM of ethanol intake (g/kg/day) (A) and ethanol preference (%) (B). * values from PTSD-like mice that are significantly different from control mice (Two-way RM ANOVA, $P < 0.001$).

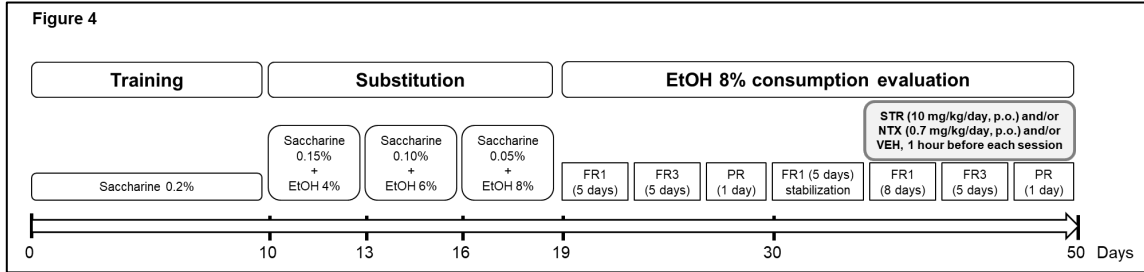


Figure 4. Schematic diagram of the evaluation of ethanol consumption and motivation in the oral ethanol self-administration (OEA) in PTSD-like mice and its controls. The diagram includes the different phases of the experimental procedure: fixed ratio 1 (FR1, 5 days), fixed ratio 3 (FR3, 5 days), progressive ratio (PR, 1 day), stabilization under FR1 (5 days) and the evaluation of STR (10 mg/kg, p.o.) and/or NTX (0.7 mg/kg, p.o.) effects in FR1 (8 days), FR3 (5 days) and PR (1 day).

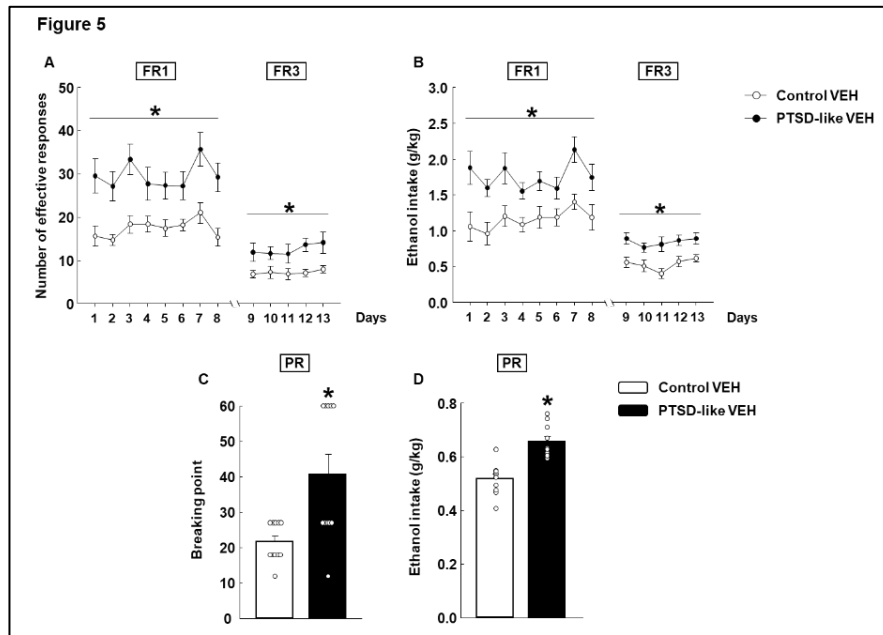


Figure 5. Evaluation of ethanol consumption and motivation in the oral ethanol self-administration (OEA) paradigm in PTSD-like mice and its controls (n=12-14). Number of effective responses of PTSD-like and control mice treated with VEH during FR1 and FR3 (A). Ethanol intake of PTSD-like and control mice treated with VEH during FR1 and FR3 (B). Breaking point (C) and ethanol consumption (D) during PR phase of PTSD-like and control mice. The dots (A, B) or columns (C, D) represent the means and vertical lines \pm SEM of the number of effective responses (A), the ethanol intake (B, D) and the breaking point (C). * values from PTSD-like mice that are significantly different from control mice (FR1, FR3: Two-way RM ANOVA, $P < 0.001$; PR: Student's t-test, $P < 0.001$).

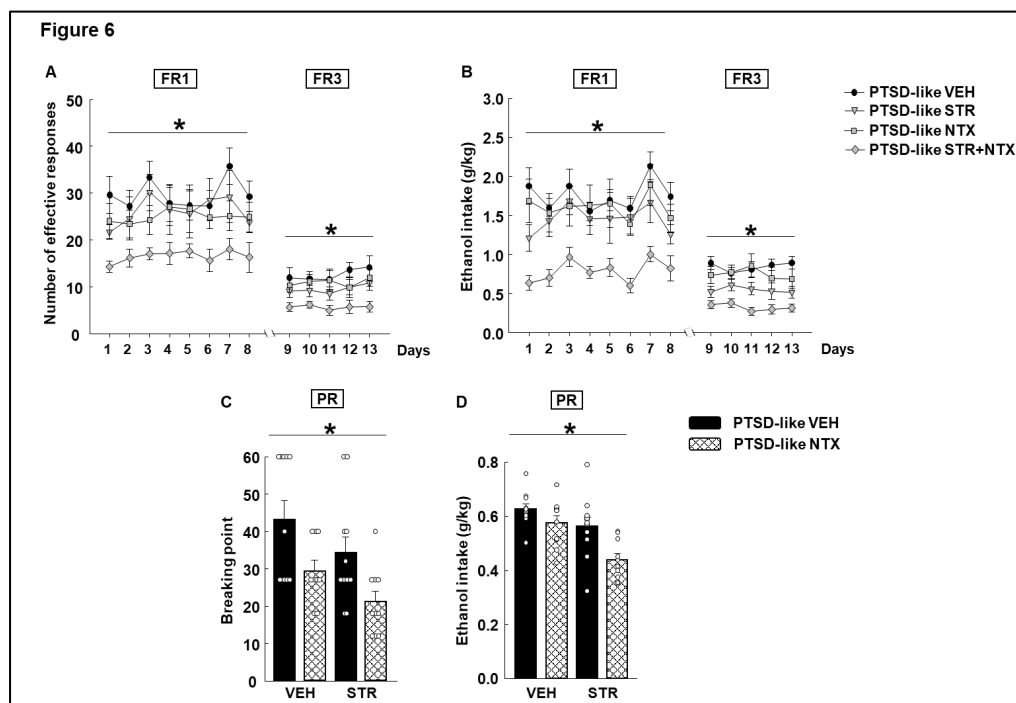


Figure 6. Evaluation of the effects of STR and/or NTX on ethanol consumption and motivation in PTSD-like mice ($n=12-14$ per group). Number of effective responses during FR1 + treatment (VEH, STR, NTX or STR + NTX) and FR3 + treatment (VEH, STR, NTX and STR + NTX) (A). Ethanol intake during FR1 + treatment (VEH, STR, NTX or STR + NTX) and FR3 + treatment (VEH, STR, NTX and STR + NTX) (B). Breaking point (C) and ethanol consumption (D) during PR + treatment (VEH, STR, NTX or STR + NTX). The dots (A, B) or columns (C, D) represent the means and vertical lines \pm SEM of the number of effective responses (A), the ethanol intake (B, D) and the breaking point (C). * values from PTSD-like mice treated with STR and/or NTX that are significantly different from VEH-treated PTSD-like mice (FR1, FR3: Two-way RM ANOVA, $P < 0.05$; PR: Two-way ANOVA, $P < 0.05$).

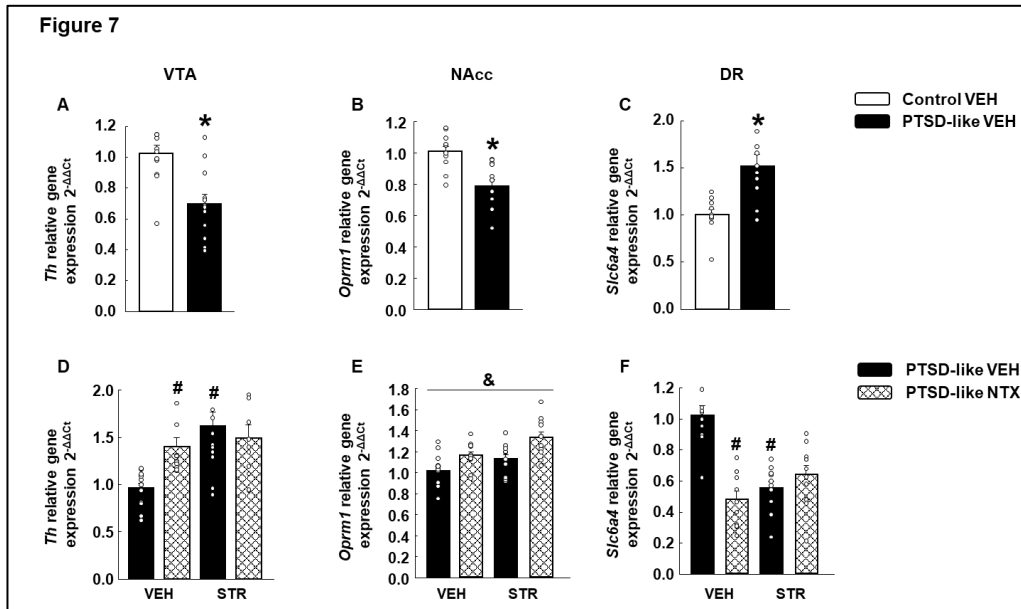


Figure 7. Relative gene expression analyses of tyrosine hydroxylase (*Th*) in the ventral tegmental area (VTA) (A and D), mu-opioid receptor (*Oprm1*) in the nucleus accumbens (NAcc) (B and E), and serotonin transporter (*Slc6a4*) in the dorsal raphe nucleus (DR) (C and F). Comparison between PTSD-like and control VEH-treated mice (A, B, C), and evaluation of VEH, STR, NTX and STR + NTX treatments in PTSD-like mice (D, E, F) (n=12-14 per group). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * values from PTSD-like VEH-treated mice that are significantly different from control VEH-treated mice (Student's t-test, $P < 0.001$). # values from PTSD-like STR- or NTX-treated mice that are significantly different from PTSD-like VEH-treated mice. & values from PTSD-like mice treated with STR and/or NTX that are significantly different from VEH-treated PTSD-like mice (Two-way ANOVA, $P < 0.001$).

Tables

Experiment	Experimental phase	Statistical test	Parameter	Factors	F	p-value
Evaluation of ethanol consumption and motivation in VEH-treated PTSD-like mice and its corresponding controls	FR1	Two-way RM ANOVA	Number of effective responses	Day	3.033	0.008
				Stress	30.703	<0.001
				Day x Stress	0.861	0.541
	FR3		Ethanol consumption	Day	2.202	0.044
				Stress	42.988	<0.001
				Day x Stress	0.505	0.828
	FR3		Number of effective responses	Day	0.971	0.429
				Stress	8.891	0.007
				Day x Stress	0.404	0.805
	PR		Ethanol consumption	Day	1.598	0.184
Stress		23.834		<0.001		
Day x Stress		0.520		0.721		
	Experimental phase	Statistical test	Parameter	d.f.	t	p-value
	PR	Student's <i>t</i> -test	Breaking point	20	-3.182	0.005
Ethanol consumption			20	-5.324	<0.001	

Table 1. Detail of the statistical results from the experimental procedure performed to evaluate ethanol consumption and motivation in VEH-treated PTSD-like and control mice in the OEA paradigm.

Supplementary information

3. Results

3.1 Behavioural changes induced by the exposure to the animal model of PTSD

Fear-related memory evaluation. PTSD-like mice showed a significant increased freezing time (Figure S1A, Student's t-test, $t=-18.750$, $P<0.001$, 33 d.f.) in the FC paradigm at week 6 compared with control mice.

Anxiety-like behaviour evaluation. PTSD-like mice presented increased latency time (Figure S1B, Student's t-test, $t=-14.647$, $P<0.001$, 33 d.f.) as well as decreased food consumption (Figure S1C, Student's t-test, $t=5.270$, $P<0.001$, 33 d.f.) in the NSFT paradigm at week 7 compared with controls.

3.3 Effects of STR and/or NTX on ethanol consumption and motivation, and associated gene expression changes

Experiment 2: Oral ethanol self-administration (OEA) paradigm

Evaluation of ethanol consumption and motivation in PTSD-like mice and its corresponding controls that will be treated

PTSD-like mice presented an increase in the number of effective responses in FR1 (Figure 5A, two-way RM ANOVA, Day $F(4,109)=1.104$, $P=0.368$; Stress $F(1,109)=7.858$, $P=0.019$; Day x Stress $F(4,109)=0.273$, $P=0.893$) and FR3 (Figure 5A, two-way RM ANOVA, Day $F(4,109)=2.581$, $P=0.052$; Stress $F(1,109)=7.038$, $P=0.024$; Day x Stress $F(4,109)=0.769$, $P=0.552$) in comparison with control mice. In addition, PTSD-like mice showed enhanced ethanol intake in FR1 (Figure 5D, two-way RM ANOVA, Day $F(4,109)=2.639$, $P=0.048$; Stress $F(1,109)=5.296$, $P=0.044$, Day x Stress $F(4,109)=1.467$, $P=0.230$) and FR3 (Figure 5D, two-way RM

ANOVA, Day $F(4,109)=1.958$, $P=0.120$; Stress $F(1,109)=8.065$, $P=0.018$; Day x Stress $F(4,109)=0.535$, $P=0.710$) than controls. Furthermore, in the PR experimental phase PTSD-like mice showed increased breaking point (Figure 5B, Student's t-test, $t=-2.181$, $P=0.033$, 60 d.f.) and ethanol consumption (Figure 5E, Student's t-test, $t=-2.908$, $P=0.005$).

Similarly, in the FR1 stabilization phase of the OEA paradigm, PTSD-like mice presented increased number of effective responses (Figure 5C, two-way RM ANOVA, Day $F(4,109)=11.918$, $P<0.001$; Stress $F(1,109)=11.683$, $P=0.007$; Day x Stress $F(4,109)=3.199$, $P=0.023$) and higher ethanol consumption (Figure 5F, two-way RM ANOVA, Day $F(4,109)=11.497$, $P<0.001$; Stress $F(1,109)=6.833$, $P=0.026$; Day x Stress $F(4,109)=2.170$, $P=0.090$) than control mice exposed to the OEA paradigm.

Evaluation of ethanol consumption and motivation in PTSD-like mice that will be treated with STR and/or NTX, or the corresponding VEH

Once PTSD mice were randomly distributed in treatment groups after the FR1 stabilization phase, ethanol consumption and motivation during previous FR1, FR3, PR and FR1 stabilization stages were analysed to discard significant differences and avoid bias. Within PTSD-like mice, no differences were observed between all four groups of mice that will be treated regarding the number of effective responses in FR1 (Figure S2A, FR1, two-way RM ANOVA, Day $F(4,239)=3.534$, $P=0.014$; Treatment $F(3,239)=0.428$, $P=0.734$; Day x Treatment $F(12,239)=1,145$, $P=0.330$) and FR3 (Figure S2A, two-way RM ANOVA; Day $F(4,239)=5.118$, $P=0.002$; Treatment $F(3,239)=0.405$, $P=0.751$; Day x Treatment $F(12,239)=0.775$, $P=0.675$).

Also, ethanol intake was similar in FR1 (Figure S2D, two-way RM ANOVA, Day $F(4,239)=2.451$, $P=0.060$; Treatment $F(3,239)=0.616$, $P=0.610$; Day x Treatment $F(12,239)=0.894$, $P=0.555$) and FR3 (Figure S2D, two-way RM ANOVA, Day $F(4,239)=2.524$, $P=0.054$; Treatment $F(3,239)=1.357$, $P=0.273$; Day x Treatment $F(12,239)=0.564$, $P=0.867$). Similarly, no differences were observed between all the four groups in the breaking point values achieved (Figure S2B, two-way ANOVA, STR $F(1,48)=0.005$, $P=0.947$, NTX $F(1,48)=0.022$, $P=0.883$, STR x NTX $F(1,48)=0.003$, $P=0.958$) and ethanol intake (Figure S2F, two-way ANOVA, STR $F(1,48)=0.016$, $P=0.899$, NTX $F(1,48)=1.183$, $P=0.282$, STR x NTX $F(1,48)=0.449$, $P=0.506$) in the PR experimental phase.

Regarding FR1 stabilization phase, no differences were found in the number of effective responses (Figure S2C, two-way RM ANOVA, Day $F(4,239)=7.795$, $P<0.001$; Treatment $F(3,239)=0.584$, $P=0.630$; Day x Treatment $F(12,239)=1.5647$, $P=0.110$) or ethanol consumption (Figure S2F, two-way RM ANOVA, Day $F(4,239)=9.120$, $P<0.001$; Treatment $F(3,239)=0.139$, $P=0.936$; Day x Treatment $F(12,239)=0.737$, $P=0.713$) between four groups of mice that will be treated.

Figures

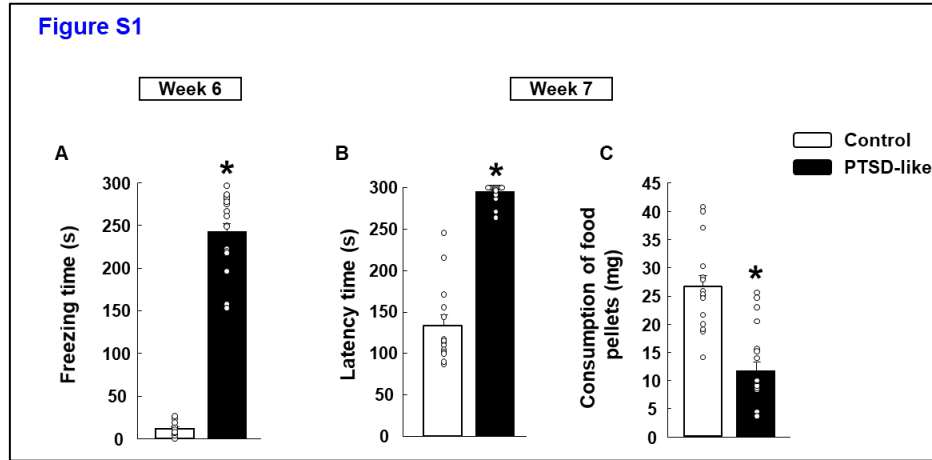


Figure S1. Behavioural evaluation of PTSD-like mice ($n=20$) and its controls ($n=15$) by the fear conditioning (FC) (A) and the novelty suppressed feeding test (NFST) (B and C) paradigms at weeks 6 and 7, respectively. Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of freezing time (s) (A), latency time to feed (s) (B) and food pellets consumption (mg) (C). * values from PTSD-like mice that are significantly different from control mice (Student's t-test, $P < 0.001$).

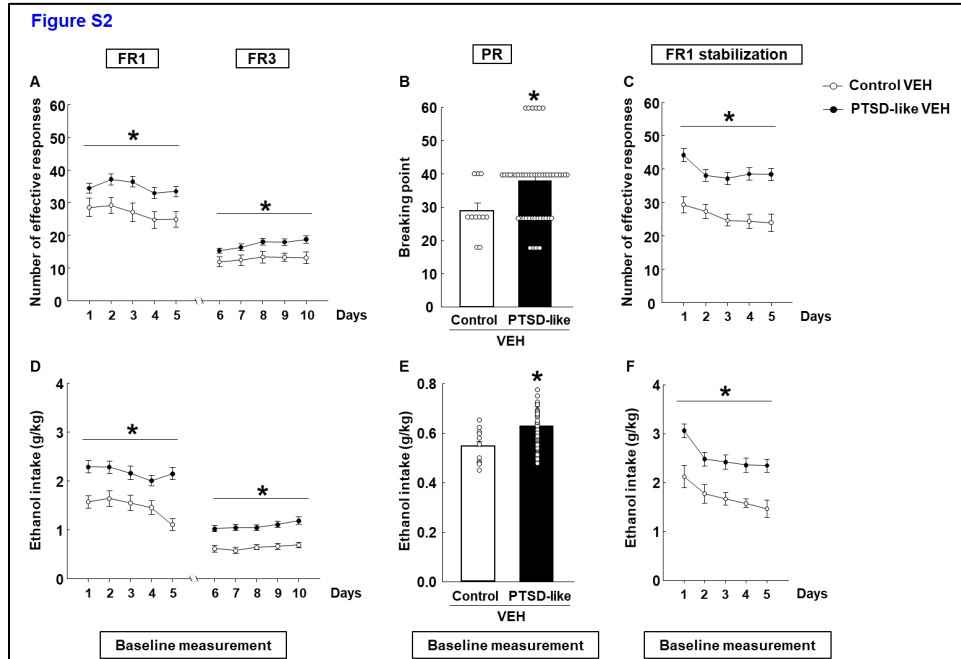


Figure S2. Evaluation of ethanol consumption and motivation by the oral ethanol self-administration (OEA) in PTSD-like mice and their controls that will be treated with VEH (n= 12-14). Number of effective responses (A) and ethanol intake (D) during FR1 + FR3 stages, breaking point (B) and ethanol consumption (E) during PR stage, and number of effective responses (C) and ethanol intake (F) during FR1 stabilization phase in PTSD-like and control mice that will be treated with VEH. The dots and columns represent the means and vertical lines \pm SEM. * Values from PTSD-like VEH-treated mice that are significantly different from control VEH-treated mice (FR1, FR3 and FR1 stabilization, two-way RM ANOVA, $P < 0.05$; PR, Student's t-test, $P < 0.05$).

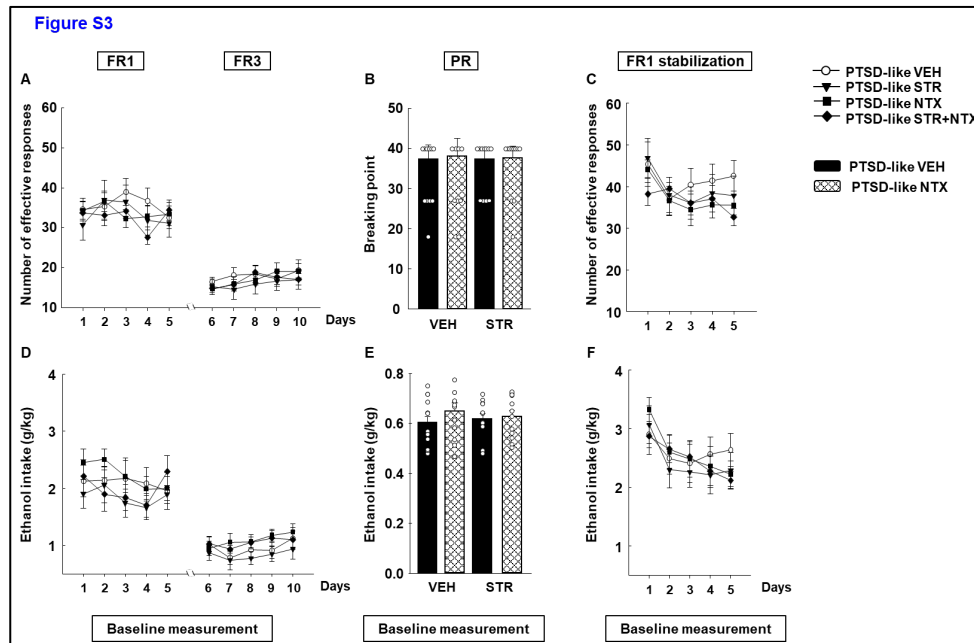


Figure S3. Evaluation of ethanol consumption and motivation by the oral ethanol self-administration (OEA) in PTSD-like mice. PTSD-like mice were divided in four groups according to the following treatments to be administered: VEH, STR, NTX or STR+NTX (n= 12-14). Number of effective responses (A) and ethanol consumption (D) during FR1 + FR3 stages, breaking point (B) and ethanol intake (E) during PR stage, and number of effective responses (C) and ethanol consumption (F) during FR1 stabilization phase of PTSD-like mice that will be treated. The dots and columns represent the means and vertical lines \pm SEM (FR1, FR3 and FR1 stabilization, two-way RM ANOVA, $P > 0.05$; PR, Student's t-test, $P > 0.05$).

