



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA DEL ESTRÉS

ESTUDIO SOBRE LA MODULACIÓN FARMACOLÓGICA
DE LA RESILIENCIA AL ESTRÉS EN UN MODELO MURINO

Unidad de Investigación II para optar al
Título de Química Farmacéutica

Rocío Dávila Oyarzún

Director: Alexies Dagnino Subiabre
Co-Directora: Arabia Olea Araya

NOVIEMBRE, 2024

Dedicado a mis padres, Astrid y Oscar

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el reflejo de un camino recorrido con el apoyo de personas que han sido fundamentales en mi vida. Quiero agradecer profundamente a cada uno de los que han formado parte de este proceso, ya sea en mi tiempo universitario o en mi vida personal, por su amor, paciencia y apoyo incondicional. A todos los que han sido mi motivación y mi guía, gracias por estar siempre a mi lado ante todas las circunstancias.

En primer lugar, agradecer a mis amados padres, Astrid y Oscar, a quienes dedico este trabajo y todos mis logros, pasados y futuros, los cuales siempre hemos compartido y celebrado como familia. Gracias por ser mis pilares y ser mi cable a tierra en todas las etapas que he experimentado en mi vida, por siempre estar para mí, para celebrar las alegrías o para escuchar mis problemas y secar mis lágrimas. Sin ustedes dos no hubiese podido ser capaz de obtener todo el crecimiento, madurez y conocimiento que he aprendido, al igual de entregarme las herramientas necesarias para poder enfrentar todos los desafíos pasados y los que estén por venir, todo lo que soy y he logrado es gracias a ustedes y su eterno cariño. No hay palabras suficientes para expresar lo agradecida que estoy con ustedes por todo lo que me han brindado. Muchas gracias, los amo con todo mi corazón y siempre los llevo en mi corazón y en mi mente.

A mi familia que siempre me ha dado ánimos, esperanza y cariño. A mis tíos, tías, primos, primas y abuelas que me han acompañado en cada etapa de mi vida y me han brindado su apoyo, familia Dávila, familia Oyarzún y familia Venegas-Jofré, muchas gracias por formar parte de mi vida y darme motivación. Agradecer especialmente a Nancy Pacheco, mi segunda mamá, muy querida para mí. Gracias por tu eterno cariño, por ser parte esencial de mi vida y tu constante apoyo.

También agradecer a mis amigos, mis queridos Otaples: Ale, Angy, Dami, Henry, Moma, Nini y Vale. Por ser siempre lo mejor que tuvo la universidad, por ser parte de mi vida y mi familia. Gracias por alegrar mis días, darme la fuerza y confianza cuando sentía que me faltaba, por ofrecerme su confianza y brindarme su cariño en cada momento. Cada uno de ustedes tiene algo único que aportar, su granito de arena, y me siento completamente agradecida por su constante compañía y apoyo que nos ha unido durante nuestro período universitario. Los quiero mucho y siempre los llevaré en mi corazón.

Agradezco profundamente al Laboratorio de Neurobiología del Estrés, un lugar donde agradezco formar parte y que nunca han hecho nada más que mostrarme su apoyo y cariño, siendo un lugar donde he aprendido cosas muy diversas y necesarias que me han formado durante este proceso. Gracias Arabia, Robinson, Justin, y a todos mis compañeros con quienes compartí en este espacio que me han ofrecido aprendizaje y cariño. Este laboratorio me ha permitido descubrir nuevas experiencias, conocimientos y que me ha formado tanto profesional como personalmente. Son personas que me han tratado con mucho cariño, que siempre confiaron en mí y yo en ellos, que siempre me vieron como una integrante que pudo aportar desde mi área. Gracias por su apoyo, su confianza y por cada momento compartido en este período, gracias por hacer de este lugar un espacio tan especial para mi vida.

Por último, agradecer a mis directores de Unidad de Investigación, Alexies y Arabia. No tengo más que palabras de agradecimiento que me han brindado durante este proceso, por la oportunidad de crecer bajo su guía y por la confianza que han depositado en mí. Su presencia ha sido muy significativa, y aunque no lo haya expresado, su influencia ha sido crucial en mis decisiones y en mi desarrollo y futuro profesional. Gracias por creer en mí, por brindarme oportunidad de aprender de ustedes y por dejarme ser parte de esta investigación y formar parte de este maravilloso laboratorio.

A todos los que han sido parte de mi vida, que me han entregado su amistad, su apoyo y su amor incondicional, les agradezco profundamente. Cada uno de ustedes que ha contribuido a hacer de este camino algo más valioso y significativo. Mi más sincero agradecimiento por todo lo que me han dado y por estar siempre a mi lado.

Mil gracias a todos y todas.

RESUMEN

El estrés es un concepto que explica como los seres vivos se adaptan a situaciones adversas que afectan la homeostasis. El estrés prolongado genera un estado proinflamatorio en el cerebro predisponiendo el desarrollo de enfermedades mentales relacionadas con el estrés como es la depresión. Un mecanismo importante para la regulación de la respuesta al estrés está formado por las hormonas del estrés y sus receptores, en especial los receptores de glucocorticoide (RG) y mineralocorticoide (RM). El balance de estos receptores en el cerebro regula la resiliencia al estrés que es la capacidad de adaptarse rápidamente a la adversidad. Cuando el balance de RG y RM se pierde, la respuesta al estrés se desregula provocando que el cerebro sea más vulnerable a desarrollar enfermedades mentales. En esta investigación se buscó responder la siguiente interrogante: ¿Es posible modular farmacológicamente la resiliencia al estrés a través de los receptores de glucocorticoide y mineralocorticoide? Para esto, se utilizaron ratas *Sprague-Dawley* macho que fueron expuestas a un protocolo de estrés llamado “estrés por derrota social” (EDS) y luego fueron clasificadas como resilientes al estrés en base a su comportamiento social. Estos animales fueron distribuidos en tres grupos experimentales y recibieron inyecciones subcutáneas con tres tratamientos diferentes: 1) Grupo Vehículo, las ratas fueron tratadas con aceite de sésamo; 2) Grupo Dazucorilant, las ratas fueron tratadas con un antagonista de los RG llamado dazucorilant; 3) Grupo Espironolactona, las ratas fueron tratadas con un antagonista de los RM llamado espironolactona. Se evaluaron los comportamientos similares a la depresión mediante la prueba de preferencia a la sacarosa (PS) y los marcadores fisiológicos del estrés mediante la medición del peso de las glándulas adrenales y la medición de la concentración de corticosterona mediante la técnica ELISA. Nuestros resultados dan

cuenta que las ratas expuestas al protocolo de EDS y tratadas con dazucorilant o espironolactona presentaron un mayor tiempo en la zona de interacción dentro de la fase social de la prueba de interacción social, un mayor porcentaje de preferencia a la sacarosa y una mejor respuesta al afrontamiento al estrés medido a través de las concentraciones séricas de corticosterona al ser comparado con el grupo tratado con corticosterona, la hormona del estrés. Esta investigación sugiere que es posible modular farmacológicamente la resiliencia al estrés y a través de este mecanismo prevenir el comportamiento similar a la depresión.

Palabras clave: Estrés, resiliencia, corticosterona, receptores de glucocorticoide, receptores de mineralocorticoide, enfermedades mentales.

ABSTRACT

Stress is a concept that explains how living beings adapt to adverse situations that affect homeostasis. Prolonged stress generates a pro-inflammatory state in the brain, predisposing it to the development of stress-related mental illnesses such as depression. An important mechanism for the regulation of the stress response is formed by stress hormones and their receptors, especially glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid (MR) receptors. The balance of these receptors in the brain regulates stress resilience, which is the ability to quickly adapt to adversity. When the balance of GR and MR is lost, the stress response is deregulated, making the brain more vulnerable to developing mental illnesses. This research sought to answer the following question: Is it possible to pharmacologically modulate stress resilience through glucocorticoid and mineralocorticoid receptors? For this, male Sprague-Dawley rats were used that were exposed to a stress protocol called "social defeat stress" (SDS) and were then classified as resilient to stress based on their social behavior. These animals were distributed into three experimental groups and received subcutaneous injections with three different treatments: 1) Vehicle Group, rats treated with sesame oil; 2) Dazucorilant group, the rats were treated with a GR antagonist called dazucorilant; 3) Spironolactone Group, the rats were treated with an MR antagonist called spironolactone. Depression-like behaviors were evaluated using the sucrose preference test (SPT) and physiological markers of stress by measuring the weight of the adrenal glands and measuring corticosterone concentration using the ELISA technique. Our results show that rats exposed to the SDS protocol and treated with dazucorilant and spironolactone had a longer time in the interaction zone within the social phase of the social interaction test, a higher percentage of preference for sucrose and a better response to coping with stress measured through serum concentrations of corticosterone

when compared with the group treated with corticosterone, the stress hormone. This research suggests that it is possible to pharmacologically modulate stress resilience and through this mechanism prevent depression-like behavior.

Key words: Stress, resilience, corticosterone, glucocorticoid receptors, mineralocorticoid receptors, mental illnesses.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Alostasis: Proceso activo de adaptación al estrés que conlleva un costo biológico que el organismo debe pagar para lograr la adaptación y la restauración de la homeostasis.

Campo abierto: Prueba conductual implementada para evaluar la actividad locomotora de las ratas y analizar conductas similares a la ansiedad.

Depresión: Enfermedad mental que se caracteriza por un trastorno del estado de ánimo como bajo ánimo o una tristeza persistente, asociado a alteraciones del comportamiento.

Estrés por derrota social: Modelo de estrés crónico que consta de una rata *Long Evans* residente y una rata *Sprague Dawley* intrusa, generando cambios en el comportamiento similares a la depresión como la ansiedad, anhedonia y conducta de evasión social.

Estrés: Es un concepto relacionado con procesos fisiológicos que permiten a los seres vivos adaptarse ante nuevas situaciones o adversidades.

Interacción social: Prueba conductual que evalúa las respuestas sociales que presenta una rata *Sprague Dawley* al enfrentarse a una rata *Sprague Dawley* conespecífico.

Preferencia a la sacarosa: Prueba conductual que permite evaluar el comportamiento depresivo en roedores evidenciado por la anhedonia.

Receptores de mineralocorticoide y glucocorticoide (RM y RG): Los receptores de mineralocorticoide se caracterizan por mantener la sensibilidad del sistema de estrés y generar las acciones rápidas en las situaciones estresantes y los receptores de glucocorticoide son esenciales para la recuperación y la adaptación al estrés, además de consolidar nuevas memorias. Los RM poseen una afinidad 10 veces mayor por los glucocorticoides en comparación a los RG y son expresados mayoritariamente en la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo.

Resiliencia al estrés: Es una característica de las personas que poseen una rápida adaptación ante las adversidades y lograr la adaptación al medio, siendo capaz de generar respuestas y soluciones que guíen al mejor estado de salud del organismo con una resolución positiva al problema.

Sobrecarga alostática: Se genera un costo biológico aún mayor, provocando que el organismo sea incapaz de adaptarse a la nueva situación y la homeostasis no sea posible restablecerse derivando en la neuroinflamación.

Vulnerabilidad al estrés: Característica de personas que tienen una disminución en la resiliencia, teniendo dificultad al momento de adaptarse a los estresores.

ABREVIACIONES

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
C°	Celsius
CA	Campo abierto
cm	Centímetro
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DPN	Día postnatal
EDS	Estrés por derrota social
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
HPA	Hipotálamo – Pituitaria – Adrenal
IS	Interacción social
LE	Long-Evans
PS	Preferencia de sacarosa
RG	Receptor de glucocorticoide
RM	Receptor de mineralocorticoide
SD	Sprague-Dawley
SNS	Sistema Nervioso Simpático
µL	Microlitro

ÍNDICE

RESUMEN	5
GLOSARIO DE TÉRMINOS	9
ABREVIACIONES	11
I. INTRODUCCIÓN	13
1. El estrés y su respuesta fisiológica	13
2. La resiliencia y vulnerabilidad al estrés y su asociación con las enfermedades mentales	17
3. Receptores de mineralocorticoide y glucocorticoide	19
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
Hipótesis	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos	26
III. MATERIALES Y MÉTODO	25
1. Animales	25
2. Diseño experimental	25
3. Estamento bioético	26
4. Estrés por derrota social (EDS)	27
5. Inyecciones	28
6. Pruebas conductuales	29
a) Campo abierto (CA)	29
b) Interacción social (IS)	29
c) Prueba de preferencia a la sacarosa (PS)	30
7. Medición del peso de las glándulas adrenales	31
8. Medición de corticosterona con ELISA	32
9. Análisis estadístico	32
IV. RESULTADOS	34
1. Pruebas conductuales	34
a) Campo abierto	34
b) Interacción social	35
c) Preferencia a la sacarosa	38
2. Marcadores fisiológicos	39
a) Peso glándulas adrenales	39
b) Medición de corticosterona	41
V. DISCUSIÓN	43
1. Campo abierto	43
2. Interacción social	43
3. Preferencia a la sacarosa	44
4. Peso glándulas adrenales	44
5. Medición de corticosterona	45
6. Discusión final	46
VI. CONCLUSIONES	47
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
VIII. ANEXOS	55

I. INTRODUCCIÓN

1. EL ESTRÉS Y SU RESPUESTA FISIOLÓGICA

El estrés es un concepto relacionado con diversos procesos fisiológicos que permiten a los seres vivos adaptarse ante nuevas situaciones o adversidades que se presentan diariamente en la vida (Selye, 1955). También es un factor que altera la homeostasis debido a la implicancia que tiene sobre las respuestas fisiológicas y conductuales, pudiendo afectar la adaptación del organismo al nuevo ambiente que se presenta (Duval, González y Rabia, 2010).

El organismo al verse afectado por cambios en el entorno o estresores, produce un estado de alerta donde el cuerpo se prepara para enfrentar las posibles opciones que tiene ante un peligro inminente, activando diversos mecanismos involucrados en la respuesta al estrés y se dispone a entregar la respuesta conductual denominada “*fight-or-flight*” o “lucha o huida” (Fava et al., 2019). Dentro del organismo, esta respuesta provoca cambios fisiológicos y la activación de múltiples sistemas que disponen al cuerpo para enfrentarse al peligro, tales como es el aumento de la circulación del flujo sanguíneo y el aumento del ritmo cardíaco mediado por el sistema cardiovascular, la dilatación de los bronquios para aumentar la cantidad de oxígeno circulante en sangre siendo controlado por el sistema respiratorio, la liberación de glucosa proveniente del hígado y su conversión de glucógeno a glucosa, entre otros cambios que se generan para mejorar la respuesta a la supervivencia del organismo (McCarty, 2016).

El concepto de estrés también explica la relación que existe en el ambiente —físico y psicológico— con el desarrollo de enfermedades mentales (McEwen y Akil, 2020). Este concepto de estrés provoca que el cuerpo humano interrumpa su estado de homeostasis con el ambiente y predispone al cerebro al desarrollo de enfermedades mentales como el trastorno depresivo (McEwen y Akil, 2020). El cuerpo humano no siempre se encuentra en un estado de equilibrio, no obstante, para su correcto funcionamiento tiende a buscar el estado de homeostasis.

Posteriormente se crea un concepto más completo en comparación a la homeostasis, el concepto de alostasis, el cual se define como un proceso activo de adaptación al estrés

que conlleva un costo biológico en el organismo que debe pagar para lograr la adaptación y la restauración de la homeostasis, tanto interna como con el medio ambiente, logrando el óptimo y correcto funcionamiento del organismo (McEwen y Akil, 2020).

Aunque los conceptos de homeostasis y alostasis pueden parecer similares, el elemento de la adaptación que otorga la alostasis es fundamental para entender de mejor manera el funcionamiento del organismo ante situaciones estresantes debido a la experiencia que se obtiene de cada caso y que se deriva de las situaciones que viven los individuos en el transcurso de la vida, consiguiendo la adaptación y generación de varios tipos de memorias y vivencias (Lemos, 2015).

La alostasis es una respuesta ante la necesidad de adaptación del organismo con la finalidad de lograr una mejor supervivencia (McEwen y Akil, 2020). Sin embargo, si esta adaptación no es posible de concretar, nos enfrentamos a una sobrecarga alostática donde el costo biológico es aún mayor, provocando que el organismo sea incapaz de adaptarse y la homeostasis no sea posible restablecerse, produciendo un estado inflamatorio que deriva en un daño en el cerebro mediante la neuroinflamación (Fava et al., 2019).

Dentro del concepto de sobrecarga alostática, se ha descrito la existencia de cuatro condiciones o tipos de cómo se puede presentar esta sobrecarga alostática (Figura 1). La primera condición que se muestra en la Figura 1 se refiere a situaciones de estrés frecuente y repetido de múltiples factores estresantes que se reiteran en el tiempo e impiden que el organismo pueda alcanzar la adaptación al nuevo medio (Pilnik, 2010). Luego se expone una situación donde el individuo tiene una falta de adaptación a los estresores de una misma categoría, lo que resulta en una exposición prolongada a las hormonas del estrés, teniendo como consecuencia una sobrecarga alostática. Por ejemplo, las personas que tienen problemas para hablar en público (McEwen, 1998).

También existe una respuesta prolongada que puede provocar una sobrecarga alostática debido a la incapacidad de desactivar el eje hipotalámico-pituitario-adrenal o eje HPA una vez finalizado el estrés, no logrando la recuperación del organismo. Por ejemplo, la hipersecreción de cortisol por la noche en personas con enfermedades mentales como la depresión (McEwen, 2000).

Y finalmente tenemos la cuarta condición, una respuesta inadecuada del organismo, lo que conduce a una hiperactividad de sistemas compensatorios como la secreción inadecuada de glucocorticoides (Pilnik, 2010). Por ejemplo, si la secreción de cortisol no aumenta como respuesta al estrés, se genera un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias, que se encuentran reguladas por la acción del cortisol (McEwen, 1998).

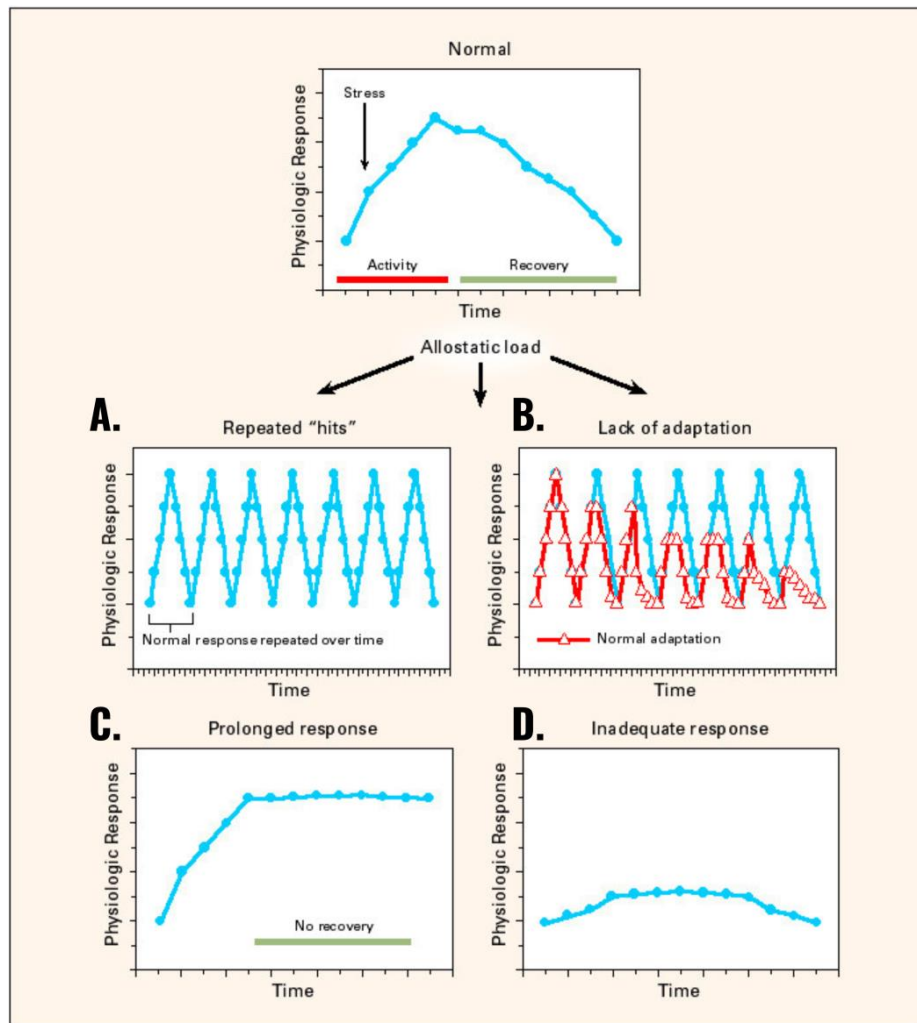


Figura 1. Gráficos representativos de los cuatro tipos de sobrecarga alostática. La figura muestra la respuesta alostática normal, donde un estresor inicia una respuesta en el organismo que perdura por un intervalo y luego se va deteniendo hasta apagarse. Los paneles muestran los cuatro tipos de sobrecarga alostática: el primer recuadro (A) muestra una respuesta múltiple ante el factor estresante; el segundo recuadro (B) muestra la falta de adaptación; el tercer recuadro (C) demuestra una respuesta prolongada debido a una tardía detención; y el recuadro (D) está la respuesta inadecuada del organismo que conduce a la hiperactividad de otros sistemas o mediadores para compensar (McEwen, 1998:174).

En relación a situaciones estresantes, encontramos la activación de dos sistemas importantes para dar respuesta a la disrupción de la homeostasis, una respuesta rápida que proviene del Sistema Nervioso Simpático (SNS) y una respuesta más lenta que se origina del eje hipotalámico-pituitario-adrenal o eje HPA (McEwen y Akil, 2020).

Dentro de la respuesta del SNS encontramos que los mediadores de la respuesta simpática del estrés son las catecolaminas que conducen a la liberación de la noradrenalina y la adrenalina, ambas secretadas desde la médula de las glándulas adrenales al torrente sanguíneo. La adrenalina aumenta la frecuencia cardíaca y la circulación sanguínea, preparando el cuerpo para afrontar el estrés (Dagnino-Subiabre, 2021).

Por otro lado, se activa el eje neuroendocrino HPA que se encuentra mediado por los glucocorticoides —tal como el cortisol en humanos o la corticosterona en roedores— siendo secretado desde la corteza adrenal hacia el torrente sanguíneo para efectuar su acción en el cerebro (Dagnino-Subiabre, 2021). Posteriormente, los glucocorticoides al unirse a sus receptores en el cerebro, los receptores de glucocorticoide (RG) y los receptores mineralocorticoide (RM), aumentan su actividad neuronal en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, que tiene la función de integrar la información recibida y estimular la producción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Esta hormona, a su vez induce la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) que circula al torrente sanguíneo, finalmente provocando la liberación de los glucocorticoides —cortisol o corticosterona— desde las glándulas suprarrenales, generando que los niveles de cortisol o corticosterona aumenten (McEwen y Akil, 2020). Los glucocorticoides producidos en glándulas suprarrenales y secretados al torrente sanguíneo atraviesan la barrera hematoencefálica en el cerebro, lo que produce que el sistema se controle mediante la retroalimentación negativa del eje HPA y se produzca la adaptación del organismo (Rodríguez, García y Franco, 2012).

Cuando no ocurre la adaptación al estrés el organismo continúa secretando glucocorticoides, generando una sobrecarga alostática y favoreciendo el desarrollo de enfermedades mentales (D'Alessio, 2009).

Este mecanismo de adaptación se estabiliza al detectar nuevamente los niveles basales de glucocorticoides (Rodríguez, García y Franco, 2012). Sin embargo, de Kloet plantea que los RG y RM se deben encontrar en un equilibrio en relación a su expresión neuroendocrina y actividad para mantener la homeostasis (de Kloet et al., 2018b).

En un individuo sano, el balance y señalización de RG y RM son adaptables y se pueden alterar ante la demanda que presenta el organismo, pudiéndose generar una respuesta inadecuada al momento que la energía que requiera el individuo exceda los recursos existentes en el cuerpo en relación a su capacidad de adaptación y afrontamiento hacia el estrés (de Kloet et al., 2018b). En el caso de las enfermedades mentales se genera un desequilibrio en su expresión, provocando el balance de los receptores RG/RM, los cuales se encuentran principalmente concentrados en el cerebro (McEwen, Nasca y Gray, 2016).

Al perderse este balance se genera un aumento en la expresión de ambos receptores en áreas del cerebro que controlan las emociones y la memoria, provocando la disfunción del hipocampo, favoreciendo la neuroinflamación y desencadenando que el cerebro se vuelva más vulnerable y se encuentre predispuesto a desarrollar alguna enfermedad mental relacionada con el estrés, como es la depresión y los trastornos ansiosos (de Kloet et al., 2018b). Como consecuencia del desbalance, la activación de RM produce una respuesta inadecuada, afectando a la respuesta, reacción y período de afrontamiento al inicio del evento estresante, pero también se puede ver afectada la señalización de RG, provocando que la respuesta al estrés se prolongue y la recuperación del individuo se dificulte, impidiendo la adaptación al estrés (de Kloet et al., 2018b).

2. LA RESILIENCIA Y VULNERABILIDAD AL ESTRÉS Y SU ASOCIACIÓN CON LAS ENFERMEDADES MENTALES

Ante la diversidad de respuestas y comportamientos frente a una misma situación estresante, es que se plantea la existencia de dos tipos de personas dependiendo de esta capacidad de reacción al estrés: las personas vulnerables al estrés, las cuales no son capaces de adaptarse a los estresores, y las resilientes al estrés que se caracterizan por tener una rápida adaptación ante las adversidades (McEwen, 2016).

La resiliencia al estrés es un proceso biológico-conductual que se va desarrollando a través del tiempo cuando los individuos se exponen al estrés y se adaptan a esa situación estresante (Dagnino-Subiabre, 2021). Una de sus principales características es la actividad del eje neuroendocrino HPA, el cual debe tener un funcionamiento óptimo para poder generar un afrontamiento activo ante el estrés y lograr la adaptación al medio (Dagnino-Subiabre, 2021).

Según plantea McEwen, un cerebro sano posee una alta capacidad de resiliencia ante las situaciones estresantes, siendo capaz de generar respuestas y soluciones que guíen al mejor estado de salud del organismo —o la recuperación de la homeostasis— produciendo plasticidad cerebral o una rápida adaptación ante situaciones adversas, destacando una resolución positiva al problema (McEwen, 2016). Ante esto, se puede señalar que la resiliencia se caracteriza porque las personas controlan correctamente su capacidad de afrontamiento ante los estresores dependiendo del grado de estrés que son expuestos. Así se evita una reactividad exacerbada o una activación de la respuesta al estrés disminuida, siendo en ambos casos donde la persona no puede adaptarse a la nueva situación estresante (de Kloet y Joëls, 2023).

Por otro lado, tenemos a las personas vulnerables al estrés que se caracterizan por una disminución de la resiliencia del individuo, provocando que la persona sea más propensa a desarrollar alguna enfermedad mental relacionada al estrés debido a esa vulnerabilidad (Bravo-Tobar et al., 2021).

Otra característica importante de las personas vulnerables al estrés es que necesitan un largo período de adaptabilidad para ajustarse a la nueva realidad del individuo, lo que también genera un daño debido a una alta concentración de glucocorticoides —cortisol o corticosterona— que se mantienen en circulación debido a la hiperactividad del eje HPA (Bravo-Tobar et al., 2021). Los niveles de actividad del eje HPA, ya sean más bajos o altos, generan una sobrecarga alostática y provocan que la persona sea vulnerable al estrés (Dagnino-Subiabre, 2021).

Este tipo de personas no logran la adaptación a su ambiente externo, el medio ambiente en que viven, y al ambiente interno que involucra al aspecto psicológico, como son las

experiencias traumáticas o situaciones adversas pasadas (McEwen y Akil, 2020). Además, al no adaptarse a la adversidad, se presenta un desbalance de RG y RM provocando que el estrés se vuelva negativo y tóxico para el cerebro e interfiriendo con el manejo de la respuesta al estrés (McEwen, 2016). Este estrés negativo causa una condición de desregulación neuroendocrina y alteración de la conducta en la adaptación del individuo, promoviendo la vulnerabilidad y favoreciendo el desarrollo de enfermedades mentales relacionadas al estrés (de Kloet et al., 2018a).

3. RECEPTORES DE MINERALOCORTICOIDE Y GLUCOCORTICOIDE

De Kloet y colaboradores descubrieron la existencia de dos receptores para los glucocorticoides que son relevantes y primordiales en la regulación de la respuesta al estrés: RG y RM; ambos receptores se expresan en mayor cantidad en la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo, regiones del cerebro encargadas de la modulación de la respuesta al estrés y las emociones (McEwen, Nasca y Gray, 2016).

Estos receptores trabajan coordinadamente e interactúan en relación al tiempo, tanto en el inicio de la respuesta al estrés, como en la consolidación de la memoria asociada a la experiencia del estrés (de Kloet et al., 2018b). Los RM poseen una mayor afinidad por los glucocorticoides en comparación a los RG, teniendo una afinidad 10 veces mayor, debido a esto es que, en condiciones homeostáticas, los RM se encuentran unidos a los glucocorticoides. Cuando el organismo se expone a situaciones estresantes aumenta la concentración de glucocorticoides presente en el cerebro y los glucocorticoides se comienzan a unir a los RG (Gómez-Sánchez, E. y Gómez-Sánchez, C., 2014).

El funcionamiento y retroalimentación negativa del eje HPA se encuentra mediado por la acción de los glucocorticoides de forma genómica y no genómica. El mecanismo genómico es un proceso lento que cuenta con una latencia y persistencia del efecto durante el tiempo, siendo controlado mediante la unión de los glucocorticoides a RG, a nivel del PVN y las glándulas adrenales, reprimiendo la liberación de CRH y POMC, la cual codifica la pro hormona proopiomelanocortina, precursora de ACTH (Timmermans, Souffriau y Libert, 2019).

La regulación genómica por parte de los glucocorticoides depende de la secuencia del sitio de unión al ADN, lo que también influye en la unión entre los glucocorticoides y los RG pudiendo conducir a diversos patrones de acción referentes a la expresión génica, incluidos los patrones proinflamatorios (Duque y Munhoz, 2016). Por la vía no genómica, los glucocorticoides regulan la acción del eje HPA, tiene acciones rápidas y no requiere de transcripción ni síntesis de proteínas (Timmermans, Souffriau y Libert, 2019).

Respecto a los RM y RG, podemos encontrar que los RM se pueden activar debido a la acción de sus propios ligandos, es decir, por la estimulación que generan los mineralocorticoides y glucocorticoides. Sin embargo, los RG solamente pueden ser activados mediante la acción que produzcan los glucocorticoides (Timmermans, Souffriau y Libert, 2019).

Del punto de vista estructural de los receptores RG y RM, su estructura primaria presenta tres dominios funcionales: el dominio extremo amino N-terminal (NTD), siendo de importancia debido a la actividad transcripcional de las hormonas esteroides; la región intermedia de unión al ADN (DBD) donde se une a los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) en la región promotora de los genes diana para ejercer sus efectos genómicos; y el extremo C-terminal o dominio de unión al ligando (LBD) que contiene el dominio de unión a glucocorticoides y determina la especificidad y afinidad de la unión (Serra, Roganovich y Rizzo, 2012).

Dentro de los dominios, el extremo NTD es la parte más variable y se puede diferenciar entre las estructuras de RM y RG, siendo vital en la interacción con las proteínas correguladoras; el dominio DBD es un dominio que se conserva altamente en ambos receptores RG y RM; la región de unión (HR) conecta los dominios DBD y LBD siendo importante para la flexibilidad y la función de los receptores; por último, el dominio LBD permite la unión de ligandos como es la unión del cortisol, además de contener una señal de localización nuclear (NLS) que es fundamental para la translocación al núcleo tras la unión del ligando (Meijer, Buurstede y Schaaf, 2018).

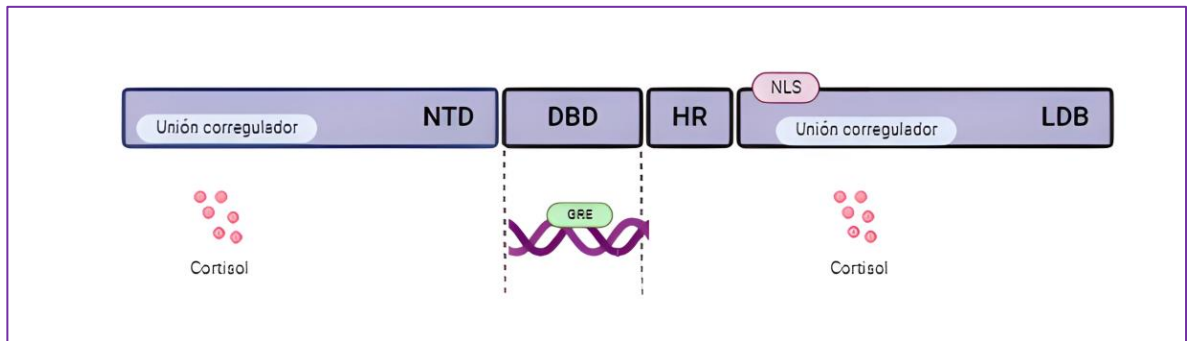


Figura 2. Estructura y dominios funcionales del receptor de mineralocorticoide (RM) y el receptor de glucocorticoide (RG). RM y RG poseen un dominio N-terminal (NTD), un dominio de unión al ADN (DBD), una región de unión (HR) y un dominio de unión a ligando (LBD). Los ligandos están unidos por el LBD donde, mediante la unión a los correguladores, se unen los ligandos (por ejemplo, el cortisol), que puede activar tanto a RM como a RG. LBD también contiene una señal de localización nuclear (NLS), importante para la translocación al núcleo después de la unión del ligando. El DBD permite la unión tanto del RM como del RG a los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) en el ADN. Imagen adaptada en la plataforma de BioRender de Meijer, Buurstedde y Schaaf, 2018.

Sobre el balance de los RG y RM, cuando se pierde este estado homeostático es que estos receptores se activan en la microglía y en los astrocitos en áreas del cerebro que controlan las respuestas al estrés, favoreciendo la neuroinflamación de esas estructuras cerebrales y provocando que el cerebro sea más vulnerable a desarrollar enfermedades mentales (de Kloet et al., 2018b).

Los RM son importantes debido a que mantienen la sensibilidad del sistema de estrés, siendo también los encargados de las acciones rápidas al momento de presentarse una situación estresante, mientras que los RG son esenciales para la recuperación y la adaptación al estrés, además que tienen la función de promover la consolidación de nuevas memorias en el hipocampo (de Kloet et al., 2018a).

Enfocándonos en los RG, éstos son controlados mediante el gen receptor nuclear de la subfamilia 3, grupo C, miembro 1 (NR3C1), pertenecientes a la familia de receptores nucleares (NRs), específicamente a la subfamilia de receptores de hormonas esteroideas, también formando parte de esta familia los RM, los receptores de estrógenos (ERs), andrógenos (ARs) y progesterona (PRs) (Cohen y Steger, 2017).

Desde el punto de vista farmacológico, podemos destacar el fármaco dazucorilant, también reconocido como CORT113176, caracterizado por su selectividad y su alta afinidad por los RG, mostrando una baja o nula afinidad ante otros receptores de esteroides (Meyer et al., 2018). Este compuesto no se encuentra disponible comercialmente, siendo fabricado por la farmacéutica “Corcept Therapeutics”. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos como potencial tratamiento farmacológico para trastornos depresivos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y cáncer.

Dazucorilant es un antagonista selectivo de RG, es decir, cumple la función de bloquear y detener la acción que ejercen los glucocorticoides frenando la hiperactividad producida por el eje HPA durante las situaciones estresantes al impedir la unión del cortisol o corticosterona, pudiendo ser de gran interés como terapia farmacológica (Pineau et al., 2016). Además, cuando se genera este bloqueo a corto plazo se ejercen efectos positivos como los neuroprotectores y antiinflamatorios, debido a que se previene la continuación de la cascada de señalización, que son los responsables de los efectos como la neuroinflamación y la muerte neuronal (Meyer et al., 2018).

Los RM son controlados mediante NR3C2, posee funciones en la modulación del transporte de fluidos e iones, siendo esencial para la homeostasis osmótica y la hemodinámica en el organismo, respuesta neuronal fundamental para el aprendizaje, la memoria y la respuesta temprana al estrés (Gómez-Sánchez, E. y Gómez-Sánchez, C., 2014). Además, los RM se expresan en varios tejidos del cuerpo, siendo encontrados principalmente en el riñón —en el conducto colector— y en el tracto gastrointestinal, al igual que en las glándulas salivales y sudoríparas (Grossmann et al., 2021).

El uso de espironolactona como terapia farmacológica dentro de la clínica ha aumentado considerablemente en el último tiempo, siendo empleados en terapias para la hipertensión, el manejo de edemas y la insuficiencia cardíaca crónica (ICC), especialmente en fracción de eyección reducida (FEVlr).

La espironolactona fue el primer antagonista de RM diseñado en el año 1960 y basado en la estructura básica de la progesterona, principalmente reconocida por actividad diurética (Medeiros et al., 2014). Esta droga, al ser un antagonista de RM, actúa a nivel de la

subfamilia de receptores nucleares 3 (NR3), que también incluye a los receptores RG, a los receptores de progesterona, estrógenos y andrógenos (Grossmann et al., 2021).

Una disminución de los RM o el desbalance en la expresión de RG/RM en el cerebro se relaciona con el desarrollo de la depresión y el deterioro cognitivo, además, la función de RM es crucial para la capacidad de aprender bajo estrés y de formar recuerdos (Gómez-Sánchez, E. y Gómez-Sánchez, C., 2014).

Considerando los aspectos presentados, el objetivo central de esta Unidad de Investigación es responder a la siguiente interrogante: **¿Es posible modular farmacológicamente la resiliencia al estrés a través de los receptores de glucocorticoide (RG) y mineralocorticoide (RM)?**

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Dazucorilant, un antagonista de los receptores de glucocorticoide, y espironolactona, un antagonista de los receptores de mineralocorticoide, mejoran la resiliencia al estrés.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rol que cumplen los receptores de las hormonas del estrés en la resiliencia al estrés.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar los efectos de dazucorilant y espironolactona en ratas resilientes al estrés en relación a:

- a) Comportamientos similares a la depresión.
- b) Marcadores fisiológicos del estrés.

III. MATERIALES Y MÉTODO

1. ANIMALES

Se emplearon ratas machos *Sprague-Dawley* (SD) de 350 gramos aproximadamente y 55 días de edad (55 DPN), al igual que ratas macho *Long-Evans* (LE) que poseían un peso mayor a las ratas SD, alrededor de 800 a 900 gramos, para cumplir la función de agresores dentro del paradigma de estrés por derrota social (EDS). Las ratas SD fueron agrupadas de dos a tres ratas por cada jaula, en condiciones estándar del laboratorio con una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y una humedad de $55 \pm 5\%$. Todas las ratas se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, junto con agua y comida *ad libitum*, excepto cuando se especifique lo contrario. Todas las manipulaciones y experimentos fueron realizados en la fase de luz. Los animales fueron adaptados una semana antes de comenzar el protocolo de EDS por una hora al día durante tres días como mínimo y al momento de aplicar el protocolo de EDS, se realizó en una habitación diferente a donde habitaban las ratas SD generalmente dentro del bioterio.

Las ratas SD no fueron sometidas a ningún tipo de estrés previo el experimento, solamente fueron expuestas a la manipulación por parte del experimentador y los sonidos de limpieza de las jaulas tres veces por semana. En el caso de las ratas LE, éstas fueron sometidas a un entrenamiento previo al experimento para categorizar su nivel de agresividad y ser seleccionadas como parte del estudio en la fase de aplicación del protocolo de EDS como ratas residentes.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la Figura 3 se muestra el diseño experimental que se siguió en la investigación y la cronología que se mantuvo durante cada grupo experimental. Después de una semana de aplicar el protocolo de EDS, se realizaron las pruebas conductuales de Campo Abierto (CA) e Interacción Social (IS), donde posteriormente se dividió el grupo experimental. Estos animales fueron inyectados vía subcutánea de acuerdo a los tratamientos asignados, ya sea dazucorilant, espirolactona o grupo control, obteniendo un $n= 22$. Por último, se implementaron nuevamente las pruebas conductuales de CA e IS, además de aplicar la prueba de Preferencia de Sacarosa (PS) para finalizar con la eutanasia de todos los grupos experimentales para extraer las glándulas adrenales y los cerebros.

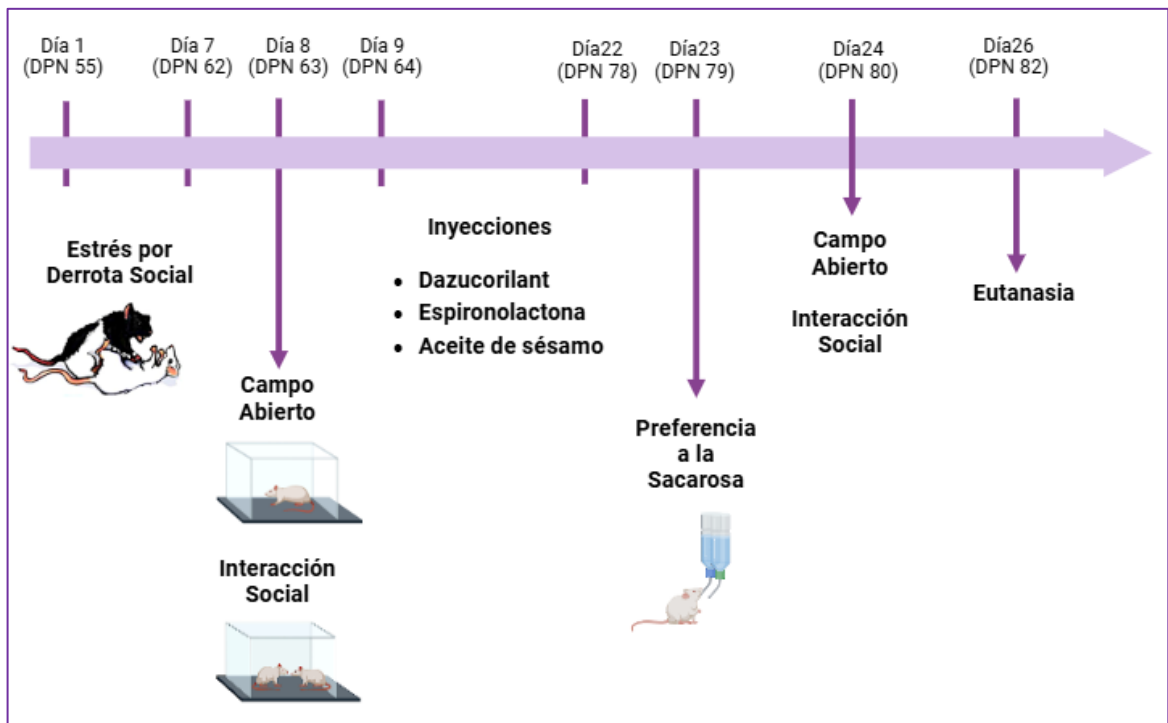


Figura 3. Línea de tiempo del diseño experimental. Línea temporal del diseño experimental. Las ratas *Sprague-Dawley* (SD) fueron sometidas al paradigma de estrés de derrota social (EDS). Luego de aplicar 7 días el protocolo de EDS, se realizaron las pruebas conductuales de Campo Abierto (CA) e Interacción Social (IS). Posteriormente se inyectó a las ratas con dazucorilant o espironolactona durante 14 días y se efectuaron las pruebas conductuales de CA e IS, además de Preferencia de Sacarosa (PS). Imagen creada en la plataforma BioRender.

3. ESTAMENTO BIOÉTICO

Los protocolos asociados al manejo y eutanasia fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso bajo el Acta de Aprobación N°E2CBC 20-2021 (Anexo 1). Esta investigación respetó la regla de las 3Rs de la bioética para el uso de animales de experimentación.

4. ESTRÉS POR DERROTA SOCIAL (EDS)

El estrés por derrota social (EDS) es un modelo de estrés crónico que se basa en una rata LE residente y una rata SD intrusa, produciendo cambios dentro del comportamiento de las ratas SD experimentales similares a la depresión, que incluyen la ansiedad, anhedonia o la incapacidad de experimentar placer en roedores, y la conducta de evasión social (Maher et al., 2021).

Para esta investigación se aplicó el protocolo establecido por Iturra-Mena et al., 2019, donde se realizó la prueba de EDS con una rata macho SD intrusa que se introduce a la jaula de la rata macho LE residente, desconocida para el intruso, durante un período de siete días consecutivos (Iturra-Mena et al., 2019). Cada día de aplicación del protocolo de EDS consiste en dos fases. La primera tiene una duración de 15 minutos, siendo el período de interacción entre ambas ratas —intrusa y residente— con la finalidad de obtener una subordinación o derrota social de la rata SD intrusa frente a la rata LE residente, teniendo como objetivo que la rata intrusa SD asuma una posición supina durante 3 segundos como mínimo. Luego de la derrota o transcurridos los 15 minutos, se procede a seguir con la segunda fase que consiste en otros 15 minutos, donde ambas ratas se mantienen en la misma jaula, pero la rata intrusa SD está dentro de una malla de alambre, de modo que no exista un contacto físico directo, pero sí permitiendo la interacción de manera visual, auditiva y olfativa, hasta que se complete la sesión del protocolo de EDS, con una duración total de 30 minutos (Iturra-Mena et al., 2019). Las ratas SD, posterior a ser aplicado el protocolo de EDS, fueron devueltas a su jaula.

Se registró la medición de variables como la latencia del primer ataque del LE, la cantidad de ataques realizados por LE, el tiempo transcurrido hasta que se produce la derrota social, detalles y comentarios respecto a las conductas realizadas por SD y LE durante los enfrentamientos.

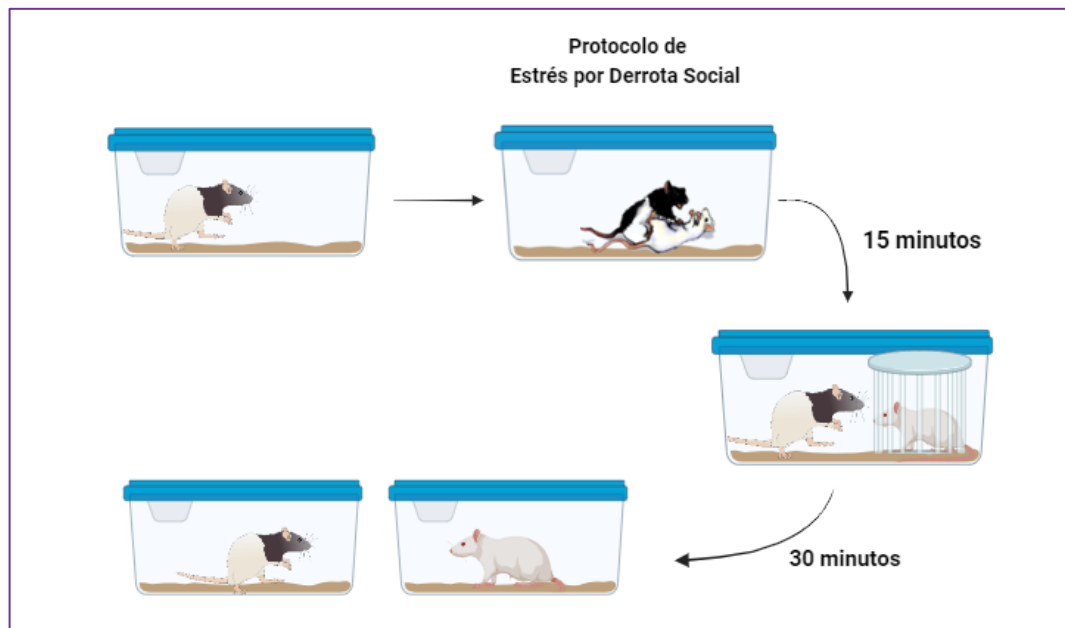


Figura 4. Esquema del protocolo de Estrés por Derrota Social. Protocolo de Estrés por Derrota Social (EDS). Se induce estrés a las ratas intrusas *Sprague-Dawley* (SD) (blancas) en la jaula de la rata residente *Long Evans* (LE) (blanca con capucha negra). Luego de la derrota social de la rata SD (posición supina durante 3 segundos) o 15 minutos transcurridos, se separan las ratas SD con una malla de alambre durante 15 minutos más. Finalmente ambas ratas son devueltas a sus jaulas. Imagen creada en la plataforma BioRender.

5. INYECCIONES

Las inyecciones se comenzaron a aplicar luego de emplear el protocolo de EDS y de realizar las pruebas conductuales de CA e IS.

Al momento de armar los grupos experimentales se analizaron los tiempos que tuvieron las ratas SD en la prueba de IS, especialmente el tiempo de interacción, para evaluar si eran resilientes o vulnerables. Finalmente se obtuvo que el grupo dazucorilant contó con 12 ratas SD, de las cuales 8 resultaron ser resilientes y 4 ratas fueron vulnerables al estrés. El grupo espirolactona contó con una cantidad de 4 ratas SD, 3 resilientes al estrés y 1 rata SD vulnerable, y en el grupo vehículo resultaron ser las 6 ratas SD resilientes.

Para el grupo con inyecciones de dazucorilant ($n= 8$) se aplicó una dosificación de 30 mg/kg/día de fármaco, solubilizado en el vehículo de aceite de sésamo (Meyer et al., 2018). Para el grupo de espirolactona ($n= 3$) se empleó una dosis de 50 mg/kg/día de fármaco, teniendo también como medio para solubilizar aceite de sésamo (Fox et al.,

2016). Para el grupo control (n= 6) se aplicó 300 µL de aceite de sésamo. Para todos los tipos de inyecciones se aplicaron 300 µL de forma subcutánea durante 14 días consecutivos.

6. PRUEBAS CONDUCTUALES

Antes de aplicar las pruebas conductuales y el protocolo de EDS, las ratas fueron habituadas a la sala definida para realizar los experimentos durante un tiempo de 30 minutos por tres días consecutivos previos a iniciar la fase experimental. Esta habitación es insonorizada y con una temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de empleadas las pruebas conductuales, por cada rata, se limpiaron las jaulas con una solución de etanol al 5%. Los videos se analizaron de forma automática mediante el programa EthoVision® XT versión 17 (Noldus, Wageningen, Países Bajos).

a) Campo abierto (CA)

La prueba de campo abierto se ocupó para evaluar las conductas de exploración, la actividad locomotora y comportamientos de tipo ansioso. Al detectarse cambios en la conducta de locomoción, se pueden reflejar indicios de procesos neurológicos alterados (Kraeuter et al., 2018). Las ratas que permanezcan un mayor tiempo en las zonas cercanas a las paredes o zonas periféricas tienden a demostrar tigmotaxis, una tendencia de evitar la zona central de la arena y permanecer en zonas cercanas a las paredes, siendo un signo de comportamiento similar a la ansiedad (Kuniishi et al., 2017).

Todas las ratas, al momento de realizar la prueba de campo abierto, no conocían la arena donde se realizó la prueba conductual. Para realizar la prueba, se coloca a cada rata SD en el centro de una jaula de plexiglás negra (70×70×40 cm) durante 5 minutos, siendo la arena iluminada a 300 ± 20 lux (Bravo-Tobar et al., 2021). Luego, mediante la grabación obtenida y el programa de EthoVision® XT, se divide la arena en 16 cuadrados iguales y se analiza el tiempo de permanencia y distancia recorrida en las zonas centrales y periféricas (Iturra-Mena et al., 2019).

b) Interacción social (IS)

La prueba de interacción social permite evaluar las respuestas e interacciones sociales que presenta la rata SD al enfrentarse a una rata SD conespecífico (Ricceri et al., 2016).

La prueba consiste en dos fases. En la fase denominada “no social”, consiste en exponer a las ratas a un campo abierto (70x70x40 cm) que contiene una caja perforada transparente (25x15x10 cm) vacía en una zona delimitada denominada como zona de interacción. Las ratas son libres de explorar durante 5 minutos y se mide el tiempo transcurrido en la zona de interacción y en la zona de no interacción usando el programa de EthoVision® XT (Walker et al., 2020).

En la fase denominada “social”, una rata conespecífica SD (macho *Sprague-Dawley* de edad y peso comparables) se coloca dentro de la caja transparente perforada, siendo considerada como el estímulo social de la prueba. El animal de experimentación puede explorar libremente la caja durante 15 minutos y al final de la prueba, se determina el tiempo total que las ratas se mantuvieron en cada zona usando el programa de EthoVision® XT (Walker et al., 2020).

Para nuestro estudio las ratas que en la “fase social” tuvieron un menor tiempo que dos desviaciones estándares que los animales no estresados fueron considerados como ratas vulnerables al estrés (Iturra-Mena et al., 2019). Los animales que permanecieron un tiempo por sobre dos desviaciones estándares en relación a los animales no estresados se consideraron como ratas resilientes, elegibles para el análisis de datos y de interés para comprobar la hipótesis propuesta (Iturra-Mena et al., 2019).

c) Prueba de preferencia a la sacarosa (PS)

Para evaluar el objetivo específico relacionado al comportamiento de tipo depresivo en las ratas SD experimentales es que se aplica la prueba de PS, teniendo como parámetro para la medición de los comportamientos depresivos, la anhedonia, la incapacidad de experimentar placer en roedores que se refleja por la reducción en el índice de preferencia de sacarosa (Liu et al., 2018). Existen muchos factores estresantes, como el estrés por derrota social, que pueden alterar la prueba de preferencia por la solución de sacarosa, siendo una prueba aceptada como parámetro para la medición del comportamiento de anhedonia en roedores (Liu et al., 2018).

Antes de realizar la prueba, se habitúa a las ratas SD con el líquido dulce —5% de sacarosa— tres días antes de aplicar la prueba, siendo expuestas a una hora por día, todas las ratas que conviven en la misma jaula. Esto se realiza para acostumbrar a los animales al líquido y minimizar la neofobia (Tynan et al., 2010).

Antes de comenzar la prueba se realiza una restricción hídrica de 12 horas. Cuando comienza la prueba, cada rata SD es separada de su compañera con el objetivo de obtener un resultado confiable y real sobre el consumo que realizó cada rata experimental. Se ubican dos botellas dentro de la jaula simultáneamente: una contiene agua y la otra tiene la solución de sacarosa al 5% p/v, éstas se mantienen durante las siguientes 12 horas. Cada botella es pesada antes y después de la prueba, además de ser pesadas vacías y llenadas con los líquidos respectivos (Liu et al., 2018). Finalmente se midió la cantidad total consumida de cada rata pesando cada botella, antes y después de aplicar el protocolo de PS, calculando la diferencia existente entre cada botella (Tynan et al., 2010). Además, se calcula el porcentaje de preferencia de solución de sacarosa en relación con el volumen de agua neutra mediante la siguiente ecuación: $[(\text{consumo de sacarosa (ml)} / (\text{consumo de agua} + \text{consumo de sacarosa})) \times 100]$ (Bravo-Tobar et al., 2021).

7. MEDICIÓN DEL PESO DE LAS GLÁNDULAS ADRENALES

Se realiza la medición de los pesos de las glándulas adrenales, particularmente para analizar la hipertrofia celular de las glándulas adrenales evidenciada en la corteza suprarrenal, específicamente en la zona fasciculada, como consecuencia de los efectos provocados por el protocolo de EDS (Iturra-Mena et al., 2019).

Se disectaron las glándulas adrenales y se les realizó una microdissección con el objetivo de separar cápsula, corteza y médula. Las masas de las cortezas se normalizaron con el último peso corporal de los animales antes de la eutanasia, según la siguiente fórmula: $\text{Peso húmedo de las glándulas suprarrenales (mg)} \times 100 / \text{peso corporal (g)}$ (Bravo-Tobar et al., 2021).

8. MEDICIÓN DE CORTICOSTERONA CON ELISA

La corticosterona en roedores es un marcador fisiológico del estrés el cual puede ser cuantificado a través de la técnica de ELISA. Para ello, a partir de las muestras de sangre periférica, la cual es extraída desde la vena de la cola de la rata SD como parte del protocolo de la prueba de Nado Forzado, donde se extrae una muestra basal antes de aplicar la prueba de NF, otra a los 20 minutos y finalmente a los 90 minutos de finalizado la prueba, obteniendo finalmente tres muestras por cada rata SD experimental. Las muestras se recogieron en tubos heparinizados para posteriormente ser centrifugadas a 3.000 rpm durante 20 minutos y obtener el plasma para ser guardado a -80°C hasta el momento de ser usado en la técnica de ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima) (Walker et al., 2020). Para realizar la técnica de ELISA se utilizó el kit de ELISA para la medición de corticosterona de la marca Crystal Chem y trabajado con triplicados para cada muestra.

Este ensayo se basa en el principio de unión competitiva, teniendo una cantidad desconocida de corticosterona presente en la muestra a analizar y una cantidad definida de corticosterona conjugada a la peroxidasa de rábano picante (HRP) que compiten por la unión de sitio de conjugación del antisuero de corticosterona que se encuentra presente en las paredes de los microplatos. Después de la incubación en un agitador durante 2 horas a temperatura ambiente, el microplato se lava cuatro veces, se agrega la solución del sustrato y se deja incubar por 30 minutos, en un cuarto oscuro, a temperatura ambiente y sin agitar. Finalmente se agrega una solución que detiene la reacción y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro de las muestras y el estándar, teniendo que la concentración de corticosterona sea inversamente proporcional a la densidad óptica. Los valores se representan en $\mu\text{g/dL}$.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se usará como supuesto estadístico la normalidad de los datos a través de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Cuando este supuesto se cumple, esto implica que la distribución de los datos es Gaussiana, se aplicará estadística paramétrica en el análisis de los datos, siendo evaluado las diferencias estadísticas mediante una prueba paramétrica ANOVA para las múltiples variables. Todos los datos se muestran como media \pm error estándar medio (SEM), y se consideró un valor de probabilidad (p-valor)

<0,05 como estadísticamente significativo (Walker et al., 2020). Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos).

IV. RESULTADOS

Los resultados se van a analizar y discutir en forma general y luego específicamente. Es decir, lo que se realizó experimentalmente en esta Unidad de Investigación que corresponden a los grupos Resiliente-Vehículo, Resiliente-Dazucorilant y Resiliente-Espironolactona. Sin embargo, estos grupos experimentales forman parte de una investigación más amplia que incluyen las categorías de No EDS-Vehículo y Resiliente-Corticosterona, pudiendo hacer un mejor análisis de los cambios generados por las terapias farmacológicas aplicadas.

1. PRUEBAS CONDUCTUALES

a) Campo abierto

No se observan diferencias significativas en relación a la actividad locomotora luego de dos semanas de haber aplicado el protocolo de EDS ($p= 0,3218$; $F_{(2,14)}= 1,231$) (Gráfico 1).

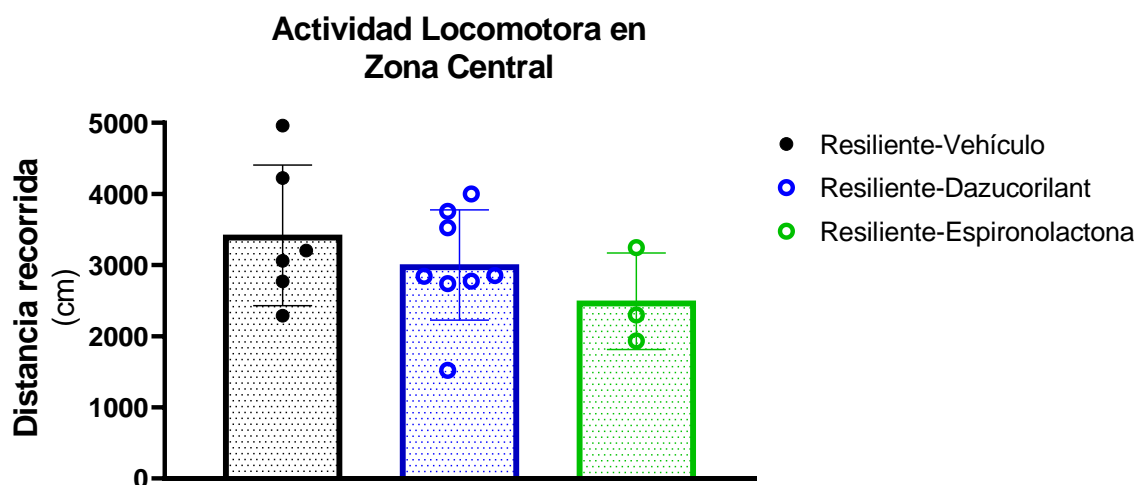


Gráfico 1. Actividad Locomotora en la Zona Central en el Campo Abierto. Se muestra la distancia total recorrida durante los 5 minutos de prueba de cada grupo experimental, luego de dos semanas de haber aplicado el protocolo de EDS. Distancia medida en centímetros (cm). Los datos están representados como media \pm SEM. Se utilizó un ANOVA de una vía.

En relación a la investigación en general, tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar los resultados de los cinco grupos experimentales participantes de la investigación ($p= 0, 1664$; $F_{(4, 35)}= 1, 726$) (Gráfico 2).

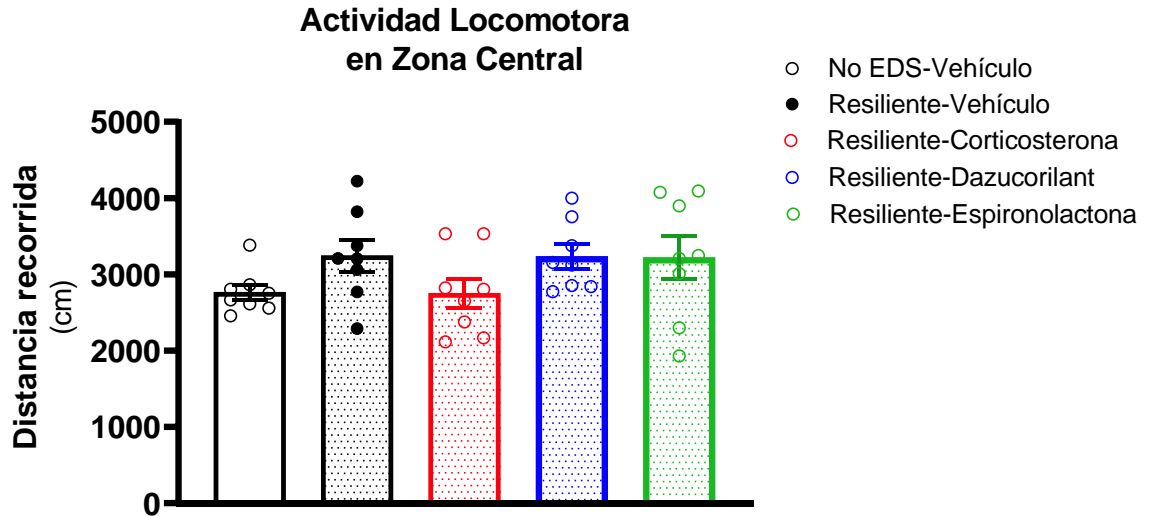


Gráfico 2. Actividad Locomotora en la Zona Central en el Campo Abierto. Se muestra la distancia total recorrida durante los 5 minutos de prueba de los cinco grupos experimentales incluidos en la investigación, luego de dos semanas de haber aplicado el protocolo de Estrés por Derrota Social (EDS). Distancia medida en centímetros (cm). Los datos están representados como media \pm SEM. Se utilizó un ANOVA de una vía.

b) Interacción social

Para la prueba de interacción social (IS), en la fase no social no se observan diferencias significativas ($p= 0, 5994$; $F_{(2,14)}= 0,5310$) (Gráfico 3A). En la fase social tampoco se registraron diferencias significativas entre los grupos experimentales de ratas ($p= 0, 2113$; $F_{(2,14)}= 1,740$) (Gráfico 3B).

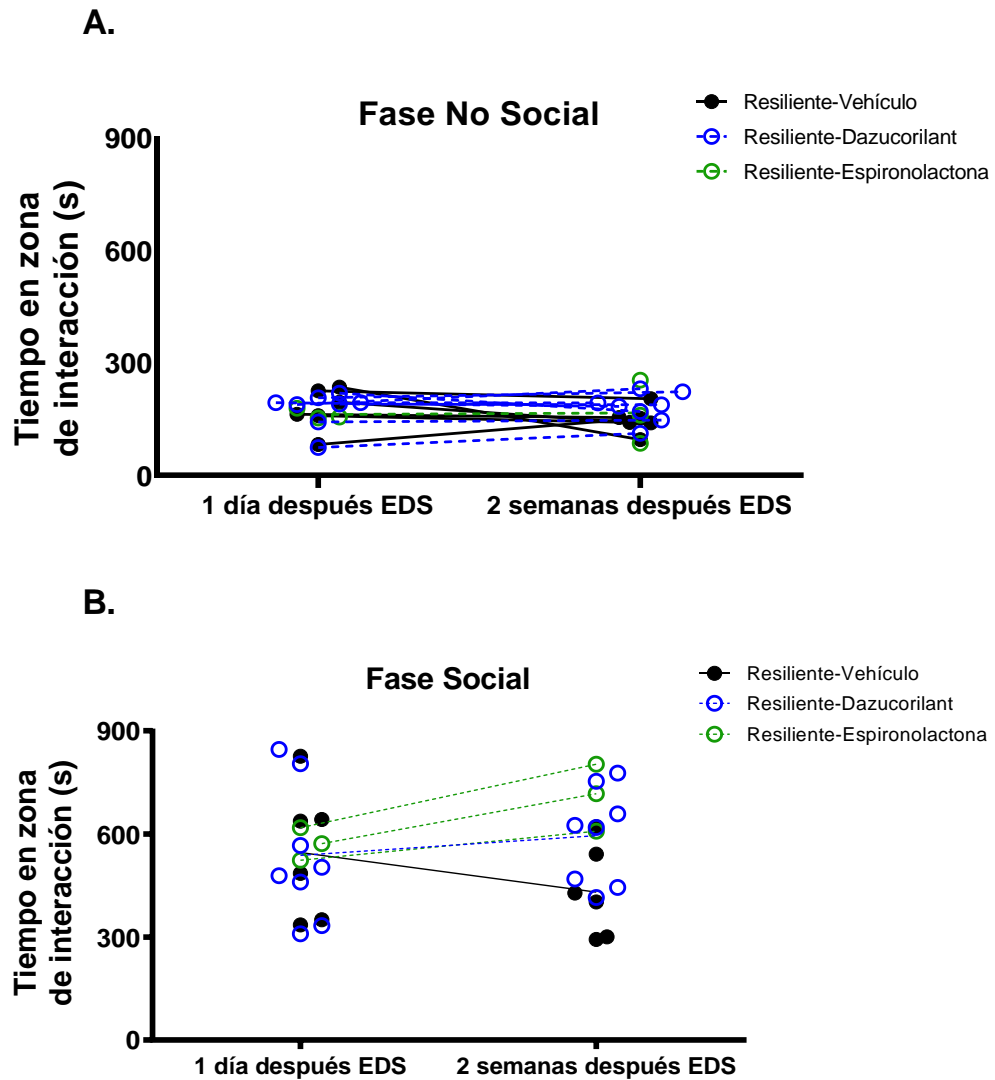


Gráfico 3. Tiempo en la zona de interacción en la prueba de Interacción Social. (A) Tiempo de interacción en la fase no social de la prueba de IS. (B) Tiempo de interacción en la fase social de la prueba de IS. Ambos gráficos muestran los tiempos 1 día después de aplicado el protocolo de Estrés por Derrota Social y 2 semanas después. Tiempo registrado en segundos (s). Los datos están representados como media \pm SEM. Se aplicó una ANOVA de dos vías.

Respecto a la investigación en general, no se observaron diferencias significativas respecto a la fase no social en ningún grupo ($p= 0,0616$; $F_{(2,258,15,81)}= 3,235$) (Gráfico 4A). Por otro lado, se evidenciaron resultados significativos en la fase social en relación al tiempo transcurrido en la zona de interacción mediante la prueba de interacción social ($p= <0,0001$; $F_{(4, 31)}= 19,91$), especialmente en los grupos Resiliente-Dazucorilant y Resiliente-

Espironolactona al ser comparados con los grupos Resiliente-Vehículo y Resiliente-Corticosterona ($p = <0,0001$; $F_{(4, 34)} = 13,96$) (Gráfico 4B).

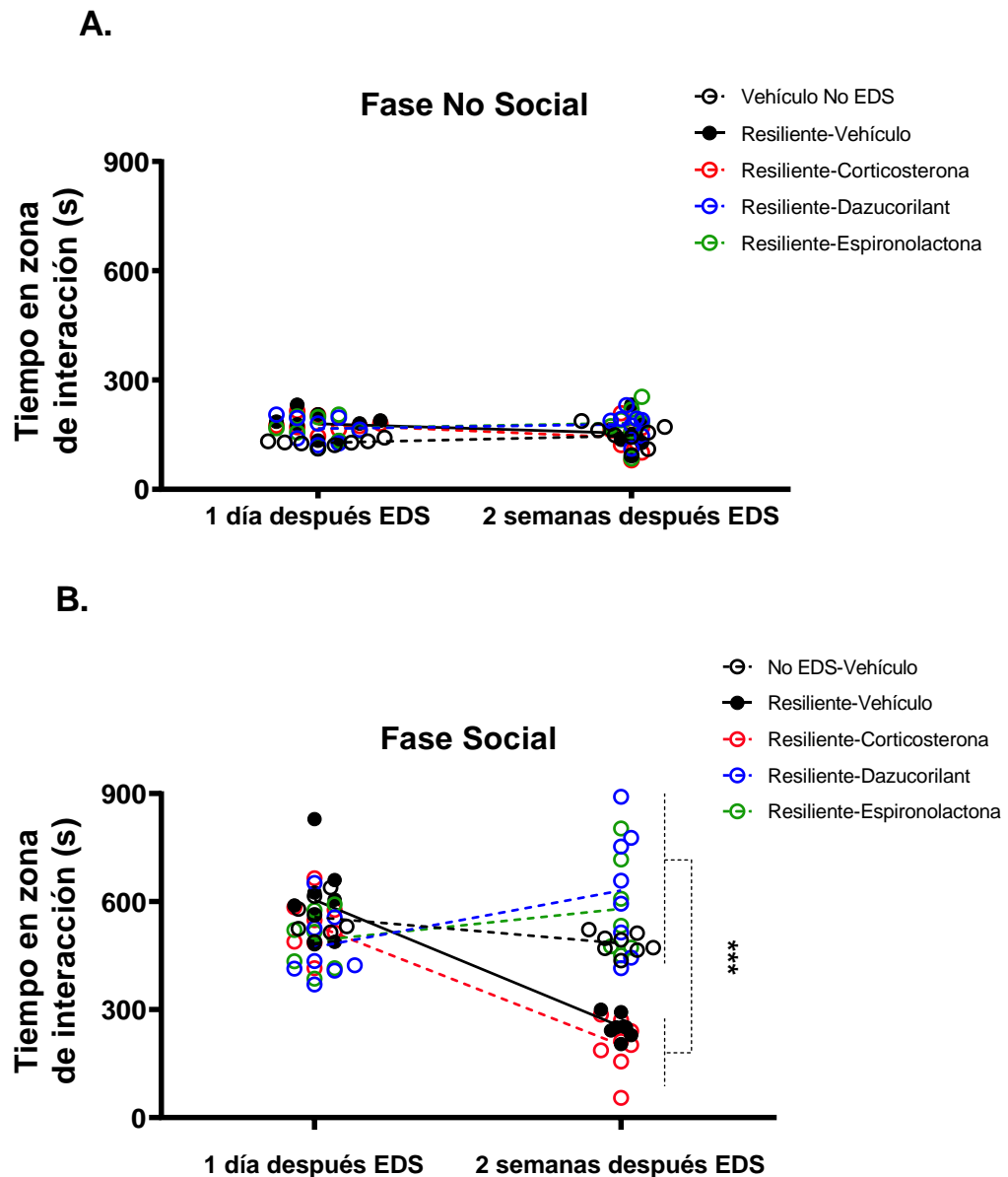


Gráfico 4. Tiempo en la zona de interacción en la prueba de Interacción Social. (A) Tiempo de interacción en la fase no social de la prueba de IS. (B) Tiempo de interacción en la fase social de la prueba de IS. Ambos gráficos muestran los tiempos 1 día después de aplicado el protocolo de Estrés por Derrota Social y 2 semanas después. Tiempo registrado en segundos (s). Los datos están representados como media \pm SEM. * = Indica diferencia significativa. Se aplicó una ANOVA de dos vías.

c) Preferencia a la sacarosa

En relación a los comportamientos de tipo depresivo, se pueden evidenciar mediante la prueba de preferencia a la sacarosa. Esta prueba no mostró diferencias significativas entre los grupos ($p= 0,9806$; $F_{(2,13)}=0,01962$) (Gráfico 5).

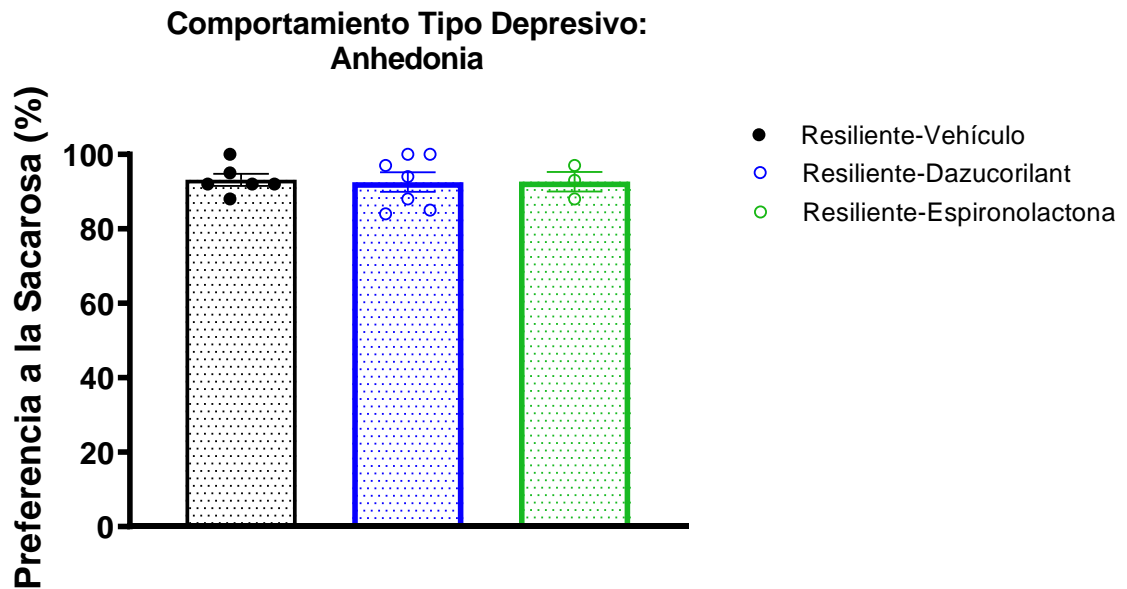


Gráfico 5. Porcentaje de preferencia a la sacarosa (%) obtenido en la prueba de Preferencia a la Sacarosa. Evaluación del comportamiento de tipo depresivo en las ratas SD evidenciado por la anhedonia. Los datos están representados como media \pm SEM. Se utilizó una ANOVA de una vía.

En la investigación global sí se reflejaron diferencias significativas entre los diferentes grupos ($p= <0,0001$; $F_{(4,35)} = 28,40$), específicamente al comparar los grupos con el grupo Resiliente-Corticosterona (Gráfico 6).

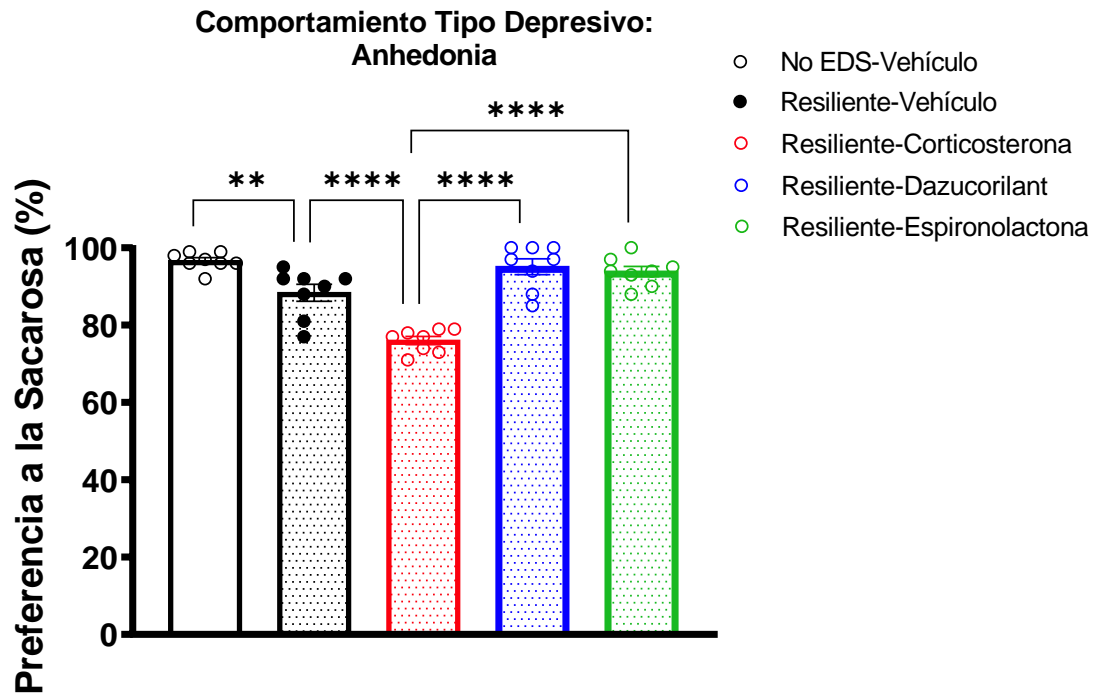


Gráfico 6. Porcentaje de preferencia a la sacarosa (%) obtenido en la prueba de Preferencia a la Sacarosa. Evaluación del comportamiento de tipo depresivo en las ratas SD evidenciado por la anhedonia. Los datos están representados como media \pm SEM. * = Indica diferencia significativa. Se aplicó una ANOVA de una vía.

2. MARCADORES FISIOLÓGICOS

a) Peso glándulas adrenales

Debido a que el estrés puede generar la hipertrofia de las glándulas adrenales, lo evaluamos como un marcador fisiológico del estrés (Bravo-Tobar et al., 2021). En nuestro grupo experimental específico solamente tuvimos una diferencia estadística entre el grupo Resiliente-Vehículo y Resiliente-Dazucorilant ($p= 0,0429$; $F_{(2, 13)} = 2,757$), mientras que en los otros grupos no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p= 0,1004$; $F_{(2, 13)} = 2,757$) (Gráfico 7).

Peso Glándulas Adrenales

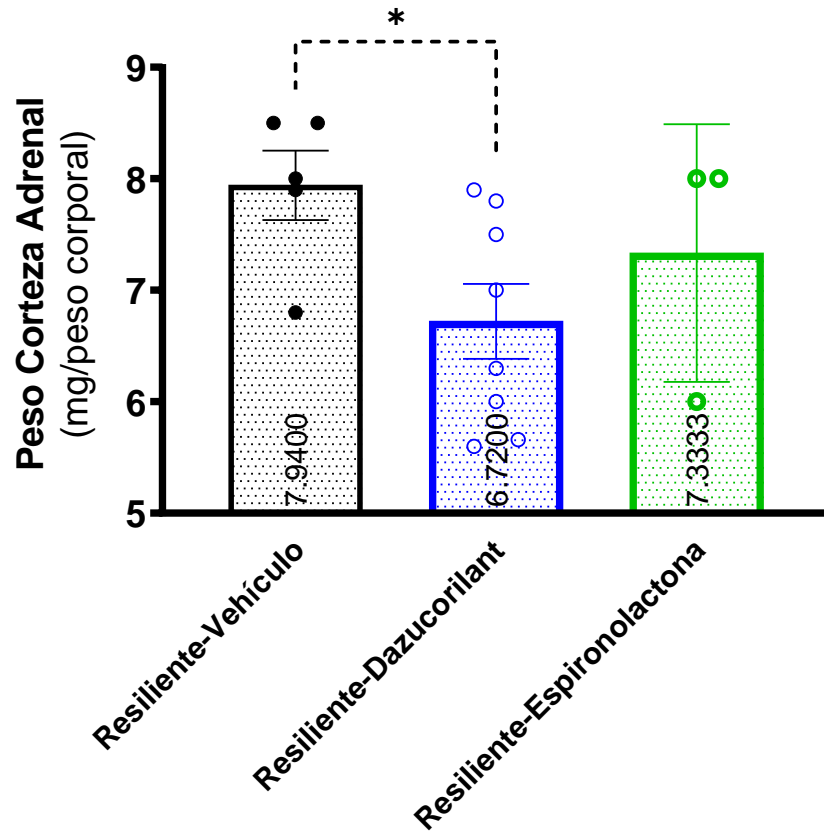


Gráfico 7. Marcador Fisiológico del Estrés: Glándulas Adrenales. El peso se calculó con el peso húmedo de las glándulas adrenales (mg) $\times 100$ /peso corporal (g). Los datos se representan como media \pm SEM. * = Indica diferencia significativa. Se aplicó una ANOVA de una vía.

En el otro grupo, existen diferencias significativas en el peso de las glándulas adrenales, que implica la hipertrofia suprarrenal, evidenciada en el grupo Resiliente-Corticosterona al poseer un mayor valor y presentar diferencia con el grupo Resiliente-Dazucorilant ($p=0,0004$; $F_{(4,35)} = 9,580$) (Gráfico 8).

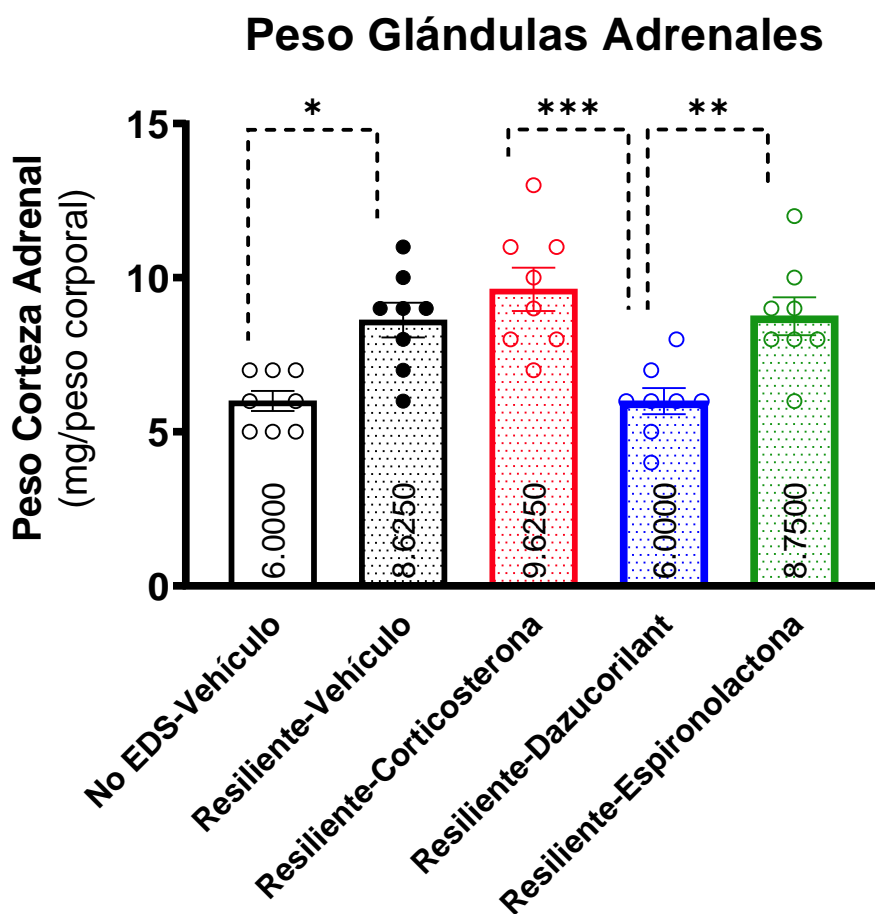


Gráfico 8. Marcador Fisiológico del Estrés: Glándulas Adrenales. El peso se calculó con el peso húmedo de las glándulas adrenales (mg) $\times 100$ /peso corporal (g). Los datos se representan como media \pm SEM. * = Indica diferencia significativa. Se aplicó una ANOVA de una vía.

b) Medición de corticosterona

Para la medición de corticosterona en sangre se obtuvieron diferencias significativas, específicamente el grupo Resiliente-Corticosterona que presentó un aumento de la actividad del eje HPA en comparación a los otros grupos experimentales de la investigación ($p = <0,0001$; $F_{(8, 40)} = 9,617$) (Gráfico 9).

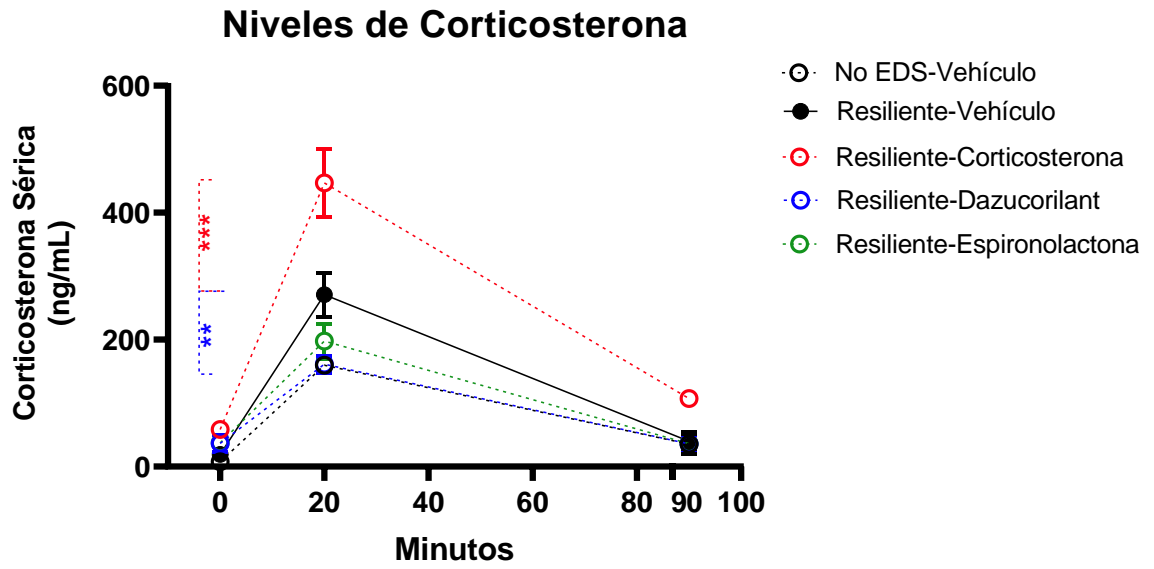


Gráfico 9. Concentración de Corticosterona Sérica. Medición realizada por la técnica de ELISA y representada como ng/mL. Los datos están representados como media \pm SEM. * = Indica diferencia significativa. Se aplicó una ANOVA de dos vías.

V. DISCUSIÓN

La resiliencia al estrés y el concepto de estrés han sido muy estudiados últimamente debido a su relación con diversas afecciones fisiológicas que genera en el organismo y que pueden conducir a padecer alguna enfermedad mental relacionada al estrés como el trastorno depresivo, habiendo un aumento en Chile de los síntomas severos como síntomas de ansiedad y/o síntomas depresivos moderados o severos de un 6,1% a un 7,9% a nivel nacional, generando que sea un gran foco de estudio y de importancia para la salud (Ministerio de Desarrollo Social, 2023). Un punto importante, mencionado anteriormente, es el número de grupos experimentales de la investigación, ya que esta Unidad de Investigación forma parte de un experimento más amplio, que cuenta con un mayor número de ratas SD y también se incluyen dos grupos de tratamiento adicionales, generando una discusión precisa.

1. CAMPO ABIERTO

Al analizar la actividad locomotora de los grupos experimentales no se encontraron diferencias significativas entre grupos, sugiriendo que el estrés inducido mediante el protocolo de EDS y el período de inyecciones de la terapia farmacológica no tuvo efecto sobre la actividad locomotoras en ningún grupo experimental (Gráfico 1). Este resultado está acorde con lo que previamente hemos publicado en nuestro laboratorio respecto a que EDS no afecta la actividad locomotora de las ratas (Bravo-Tobar et al., 2021). Los grupos Resiliente-Corticosterona y Resiliente-Vehículo no sufrieron alteraciones en la actividad locomotora lo que implica que el único factor determinante relacionado a las mediciones conductuales en este estudio están relacionadas con los tratamientos que se aplicaron (Gráfico 2) (Kuniishi et al., 2017).

2. INTERACCIÓN SOCIAL

Nuestros resultados muestran que no hubo diferencias significativas en la fase no social sobre el tiempo de interacción que presentaron las ratas, ya sea un día o dos semanas después de aplicado el protocolo de EDS, siendo un resultado esperado debido que es un área ya conocida por las ratas y no presenta ningún cambio en ningún momento del período experimental (Gráfico 3A y 4A). En cuanto al tiempo de interacción que presentaron las ratas en la fase social, tenemos que en la Gráfico 3B el tiempo de

interacción se mantuvo luego de pasar dos semanas de haber aplicado el protocolo de EDS. Esto es un hallazgo muy interesante debido que, según lo descrito por Bravo-Tobar et al. (2021), el tiempo de interacción de las ratas resilientes luego de dos semanas de ser sometidas a un estresor, tuvieron una disminución significativa del tiempo de interacción frente a un conoespecífico (Bravo-Tobar et al., 2021). Al comparar el tiempo de interacción en la fase social de la investigación global, se puede reforzar más la idea que los tratamientos farmacológicos aplicados con los antagonistas de RM y RG mantuvieron las conductas sociales en los roedores debido a las diferencias significativas que se presentan al comparar los grupos Resilientes-Dazucorilant y Resiliente-Espironolactona frente a los grupos Resiliente-Corticosterona y Resiliente-Vehículo (Gráfico 4B).

3. PREFERENCIA A LA SACAROSA

Para analizar los comportamientos de tipo depresivo se aplicó la prueba de preferencia a la sacarosa, siendo que una baja preferencia por la sacarosa suele interpretarse como la presencia de anhedonia en roedores. En nuestros resultados, la anhedonia fue presentada en el grupo Resiliente-Corticosterona, generando diferencias significativas en relación a todos los otros grupos de la investigación, presentando una menor preferencia de beber la solución dulce en la prueba (Gráfico 6).

4. PESO GLÁNDULAS ADRENALES

Uno de los marcadores biológicos que se analizó en la investigación es el peso de las glándulas adrenales, específicamente la corteza adrenal, debido a que se ha descrito que el estrés puede ser un factor que genere una hipertrofia a nivel de las glándulas adrenales gracias a una activación sostenida y de manera crónica del eje HPA por el aumento en las concentraciones de corticosterona, la hormona del estrés (Iturra-Mena et al., 2019). En nuestros resultados observamos que existe una diferencia significativa entre el grupo Resiliente-Vehículo y el Resiliente-Dazucorilant, presentando un mayor peso de la corteza adrenal lo que implica que se generó una hipertrofia adrenal debido al protocolo de EDS (Gráfico 7).

En los resultados de la investigación, observamos que el grupo Resiliente-Corticosterona presentó el mayor peso de la corteza adrenal en comparación a los otros grupos, pudiendo indicar una hipertrofia de las glándulas adrenales y generando una diferencia

significativa con el grupo Resiliente-Dazucorilant. Además, el grupo Resiliente-Espironolactona también presentó una mayor masa de las glándulas adrenales y generando una diferencia con el grupo Resiliente-Dazucorilant (Gráfico 8). Esto implica que el uso de espironolactona podría no tener efecto en el eje HPA y su regulación en la respuesta al estrés pudiendo deberse a su afinidad a más receptores como los de aldosterona, siendo un fármaco no específico para los RM.

5. MEDICIÓN DE CORTICOSTERONA

Otro marcador biológico como respuesta al estrés, es la cuantificación de corticosterona. Esta medición se realizó luego de estimular el eje HPA para evaluar la respuesta de los roedores frente al estrés y la recuperación del organismo luego de 90 minutos de haber sido expuesto a un estresor. Nuestros resultados demuestran que la concentración de corticosterona sérica del grupo Resiliente-Corticosterona fue la que presentó mayores valores, además de presentar una recuperación más tardía del sistema. Por otro lado, la respuesta del grupo Resiliente-Dazucorilant tiene una concentración semejante al grupo No EDS Vehículo, lo que implica que la terapia farmacológica del antagonista de RG ejerce acción en la regulación del eje HPA y la respuesta del organismo frente a un estresor (Gráfico 9).

6. DISCUSIÓN FINAL

Como consideraciones y limitaciones de esta Unidad de Investigación es mencionar que esta investigación mostró resultados favorables en relación a la mejora de la resiliencia al estrés en ratas machos, generando una limitante en la investigación debido a cómo las hembras podrían verse afectadas por el protocolo de EDS, los efectos producidos por las terapias farmacológicas y las posibles diferencias que se puedan presentar entre los resultados obtenidos en macho y en hembras. Este es un punto muy importante y condicionante en la investigación debido que las enfermedades mentales como el trastorno depresivo es hasta un 50% más prevalente en mujeres que en hombres (OMS, 2023).

Otro punto fundamental a tener en consideración es la afinidad que presenta espironolactona respecto a su acción en los RM, a pesar de presentar buenos resultados en las pruebas conductuales de interacción social y preferencia a la sacarosa, también se demuestra que tiene diferencias significativas en el peso de las glándulas adrenales al ser

comparado con el efecto de dazucorilant (Gráfico 8). Una de las razones puede deberse a la afinidad que presenta a los RM y a los receptores de aldosterona, generando un efecto diurético, y diferenciándose de dazucorilant por ser altamente específico a los RG.

VI. CONCLUSIONES

Las enfermedades mentales relacionadas con el estrés, específicamente el trastorno depresivo, es una enfermedad frecuente que ha evidenciado un aumento en su diagnóstico debido a su relación con la alimentación desbalanceada, la baja actividad física y el ambiente en el que vivimos diariamente. Se estima, según las cifras del Ministerio de Salud de Chile y la Encuesta de Salud 2016-2017, que un 6,2% de las personas presenta un trastorno depresivo y un 15,8% de personas se encuentran bajo la sospecha de depresión, siendo cifras que según la OMS se han visto en un creciente aumento, especialmente por la pandemia que enfrentamos mundialmente (MINSAL, 2018).

Esta es una investigación que ha demostrado un gran avance farmacológico en relación al uso de dazucorilant y espironolactona como nuevas terapias farmacológicas para las enfermedades mentales que se relacionen con el estrés, influyendo en su aparición, progresión y manifestación clínica, además de poder incorporar un nuevo blanco terapéutico a ser investigado relacionado con mejorar la resiliencia al estrés y el desbalance de los receptores RM-RG.

La resiliencia al estrés posee múltiples factores que la pueden afectar pero que también pueden mejorarla, siendo fundamental para nuestro modelo animal aplicar variadas pruebas conductuales para analizar de manera fiable, certera y que pueda representar correctamente las conductas de tipo ansioso, depresivo, afrontamiento al estrés, entre más variables que influyen y que alteran en los modelos animales. Si bien todos los modelos animales poseen limitaciones de estudio, debido a no poder reflejar la fisiología y conducta humana, son un modelo esencial en el estudio del estrés y sus respuestas en relación a la prueba de nuevos fármacos para la industria.

En conclusión, aún existen muchas interrogantes que investigar sobre la neurobiológica de la resiliencia al estrés y su conexión con los receptores de mineralocorticoide y glucocorticoide, no obstante, esta investigación aporta al ámbito farmacológico y clínico relacionado con la mejora a la resiliencia al estrés.

Esta investigación demuestra que la resiliencia al estrés sí puede ser mejorada farmacológicamente mediante el uso de antagonistas de los RM y RG como es el uso de espironolactona y dazucorilant, respectivamente.

Sin duda es necesaria la realización de más experimentos para complementar la investigación, como los efectos a largo plazo de los fármacos, la realización de pruebas de inmunohistoquímica para observar la actividad de los receptores RM y RG y la neuroinflamación en áreas del cerebro influyentes en la respuesta al estrés como la amígdala, la corteza prefrontal y el hipocampo para entender la neurobiología de la resiliencia al estrés.

I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bravo-Tobar, I.; Fernández, P.; Sáez, J. y Dagnino-Subiabre, A. (2021). "Long-term Effects of Stress Resilience: Hippocampal Neuroinflammation and Behavioral Approach in Male Rats." *Journal of Neuroscience Research* 99(10), pp. 2493–2510. DOI: <https://doi.org/10.1002/jnr.24902>

Cohen, D. y Steger, D. (2017). "Nuclear Receptor Function through Genomics: Lessons from the Glucocorticoid Receptor". *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(7), pp. 531–540. DOI: 10.1016/j.tem.2017.04.001

D'Alessio, L. (2009). "Introducción: Carga alostática y estrés". Luciana D'Alessio, José Bonet, Mariana Suárez-Bagnasco y Pedro Forcada (Editores). *Carga Alostática Parte 1*. Buenos Aires: Información Científica Gador, (pp. 11-20).

Dagnino-Subiabre, A. (2021). "Resilience to stress and social touch". *Current Opinion in Behavioral Sciences*, Vol. 43, pp. 75-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2021.08.011>

De Kloet, E.; de Kloet, S.; de Kloet, C. y de Kloet, A. (2018a). "Top-down and Bottom-up Control of Stress-Coping". *Journal of Neuroendocrinology*. DOI: 10.1111/jne.12675

De Kloet, R.; Meijer, O.; de Nicola, A.; de Rijk, R. y Joël, M. (2018b). "Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuroinflammation". *Frontiers in Neuroendocrinology*, Vol. 49, pp. 124-145. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.02.003>

De Kloet, R. y Joëls, M. (2023). "The cortisol switches between vulnerability and resilience". *Mol Psychiatry*. DOI: 10.1038/s41380-022-01934-8

Duque, E. y Munhoz, C. (2016). "The Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids in the Brain". *Frontiers in Endocrinology*, Vol. 7. DOI: 10.3389/fendo.2016.00078

- Duval, F.; González, F. y Rabia, H. (2010). "Neurobiología del estrés". *Revista chilena de neuropsiquiatría*, 48(4), pp. 307-318.
DOI:<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272010000500006>
- Fava, G.; McEwen, B.; Guidi, J.; Gostoli, S.; Offidani, E. y Sonino, N. (2019). "Clinical characterization of allostatic overload". *Psychoneuroendocrinology*, Vol.108, pp. 94-101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.05.028>
- Fox, L.; Davies, D.; Scholl, J.; Watt, M. y Forster, G. (2016). "Differential effects of glucocorticoid and mineralocorticoid antagonism on anxiety behavior in mild traumatic brain injury". *Behavioural Brain Research*, Vol. 312, pp. 362–365. DOI: [10.1016/j.bbr.2016.06.048](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.048)
- Gómez-Sánchez, E. y Gómez-Sánchez, C. (2014). "The Multifaceted Mineralocorticoid Receptor". *Comprehensive Physiology*, pp. 965–994. DOI: [10.1002/cphy.c130044](https://doi.org/10.1002/cphy.c130044)
- Grossmann, C.; Almeida-Prieto, B.; Nolze, A. y Álvarez, A. (2021). "Structural and molecular determinants of mineralocorticoid receptor signaling". *British Journal of Pharmacology*, 179(13), pp. 3103-3118. DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.15746>
- Iturra-Mena, A.; Aguilar-Rivera, M.; Arriagada-Solimano, M.; Pérez-Valenzuela, C.; Fuentealba, P. y Dagnino-Subiabre, A. (2019). "Impact of Stress on Gamma Oscillations in the Rat Nucleus Accumbens During Spontaneous Social Interaction". *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, Vol. 13. DOI: [10.3389/fnbeh.2019.00151](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00151)
- Kim, Y.; Na, K.; Myint, A. y Leonard, B. (2016). "The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression". *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Vol. 64, pp. 277–284. DOI: [10.1016/j.pnpbp.2015.06.008](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.008)
- Kuniishi, H.; Ichisaka, S.; Yamamoto, M.; Ikubo, N.; Matsuda, S.; Futora, E.; Harada, R.; Ishihara, K. y Hata, Y. (2017). "Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats". *Neuroscience Research*, Vol. 123, pp. 27–35. DOI: [10.1016/j.neures.2017.04.012](https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.04.012)

- Kraeuter, A.; Guest, P. y Sarnyai, Z. (2018). "The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior". *Pre-Clinical Models*, pp. 99–103. DOI: 10.1007/978-1-4939-8994-2_9
- Lemos, M. (2015). "La teoría de la alostasis como mecanismo explicativo entre los apegos inseguros y la vulnerabilidad a enfermedades crónicas". *Anales de Psicología*, 31(2), pp. 452-461. DOI: <https://dx.doi.org/10.6018/analesps.31.2.176361>
- Liu, M.; Yin, C.; Zhu, L; Zhu, X.; Xu, C.; Luo, C.; Chen, H.; Zhu, D. y Zhou, Q. (2018). "Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice". *Nature Protocols*, 13(7), pp. 1686–1698. DOI: 10.1038/s41596-018-0011-z
- Maher, S.; Ritger, A. y Rosenkranz, J. (2021). "A Phenotypic Screen for the Liver Stages of *Plasmodium vivax*". *Bio-protocol*, 11(23). DOI: 10.21769/BioProtoc.
- McCarty, R. (2016). "Chapter 4 - The Fight-or-Flight Response: A Cornerstone of Stress Research". *Handbook of Stress Series*, Vol. 1, pp. 33-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00004-2>
- McEwen, B. (1998). "Protective and Damaging Effects of Stress Mediators". *New England Journal of Medicine*, 338(3), pp. 171–179. DOI: 10.1056/nejm199801153380307
- McEwen, B. (2000). "Allostasis and Allostatic Load Implications for Neuropsychopharmacology". *Neuropsychopharmacology*, 22(2), pp. 108–124. DOI: 10.1016/s0893-133x(99)00129-3
- McEwen, B y Akil, H. (2020). "Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders". *The Journal of Neuroscience*, 40(1), pp. 12-21. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0733-19.2019
- McEwen, B.; Nasca, C. y Gray, J. (2016). "Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex". *Neuropsychopharmacology*, Vol. 41, pp. 3–23. DOI: <https://doi.org/10.1038/npp.2015.171>

- Medeiros, M.; Patiño, M.; Herrera, E.; García, J.; Vargas, A.; Rosas, V.; Saúl, Hernández, A.; Ortiz, L. y Velásquez, L. (2014). "Uso de antagonistas de aldosterona para detener la progresión de la enfermedad renal: de las bases fisiológicas a la aplicación clínica". *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 71(3), pp. 137-141.
- Meijer, O.; Buurstede, J. y Schaaf, M. (2018). "Corticosteroid Receptors in the Brain: Transcriptional Mechanisms for Specificity and Context-Dependent Effects". *Cellular and Molecular Neurobiology*. DOI: 10.1007/s10571-018-0625-2
- Meyer, M.; Lara, A.; Hunt, H.; Belanoff, J.; de Kloet, E.; González, M. y De Nicola, A. (2018). "The Selective Glucocorticoid Receptor Modulator Cort 113176 Reduces Neurodegeneration and Neuroinflammation in Wobbler Mice Spinal Cord". *Neuroscience*, Vol. 384, pp. 384–396. DOI:10.1016/j.neuroscience.2018.05.042
- Ministerio de Desarrollo Social (2023). "Encuesta Nacional de Bienestar 2023: Perfiles de Bienestar Social".
https://observatorio.ministeriodesarrollosocial.gob.cl/storage/docs/bienestar-social/2023/Informe_Perfiles_de_Bienestar_Social.pdf
- Ministerio de Salud (MINSAL) (2018). "Encuesta nacional de salud 2016-2017".
https://redsalud.ssmso.cl/wp-content/uploads/2018/02/2-Resultados-ENS_MINSAL_31_01_2018-ilovepdf-compressed.pdf
- Munshi, S.; Loh, M.; Ferrara, N.; DeJoseph, M.; Ritger, A.; Padival, M.; Record, M.; Urban, J. y Rosenkranz, A. (2019). "Repeated Stress Induces a Pro-inflammatory State, Increases Amygdala Neuronal and Microglial Activation, and Causes Anxiety in Adult Male Rats". *Brain, Behavior, and Immunity*. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.11.023
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2023). "Depresión".www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression#:~:text=A%20escala%20mundial%2C%20aproximadamente%20280,mujeres%20que%20entre%20los%20hombres.

- Pineau, F.; Canet, G.; Desrumaux, C.; Hunt, H.; Chevallier, N.; Ollivier, M.; Belanoff, J. y Givalois, L. (2016). "New selective glucocorticoid receptor modulators reverse amyloid- β peptide induced hippocampus toxicity". *Neurobiology of Aging*, Vol. 45, pp. 109-122. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.018.
- Pilnik, S. (2010). "El concepto de alostasis: un paso más allá del estrés y la homeostasis". *Revista Hospital Italiano de Buenos Aires*, 30(1).
www.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias_attachs/47/documentos/6974_7-12-articulo-pilnik.pdf
- Ricceri, L.; Michetti, C. y Scattoni, M. (2016). "Mouse Behavior and Models for Autism Spectrum Disorders". *Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability*, pp. 269–293. DOI: 10.1016/b978-0-12-800109-7.00017-0
- Rodríguez, J.; García, M. y Franco, P. (2012). "Neurobiología del Estrés Agudo y Crónico: Su Efecto en el Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y la Memoria". *Revista Ecuatoriana de Neurología*, 21(1), pp. 1-13.
- Selye, H. (1955). "Stress and Disease". *Science*, 122(3171), pp. 625-631. DOI: 10.1126/science.122.3171.625
- Serra, H.; Roganovich, J. y Rizzo, L. (2012). "Glucocorticoides: Paradigma de medicina traslacional. De lo molecular al uso clínico".
www.scielo.org.ar/img/revistas/medba/v72n2/html/v72n2a15.htm
- Timmermans, S.; Souffriau, J. y Libert, C. (2019). "A General Introduction to Glucocorticoid Biology". *Frontiers in Immunology*, Vol. 10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01545
- Tynan, R.; Naicker, S.; Hinwood, M.; Nalivaiko, E.; Buller, K.; Pow, D.; Day, T. y Walker, F. (2010). "Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions". *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(7), pp. 1058–1068. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.02.001

Walker, S.; Cavieres, A.; Peñaloza-Sancho, V.; El-Deredy, W.; McGlone, F. y Dagnino-Subiabre, A. (2020). "C-Low Threshold Mechanoafferent Targeted Dynamic Touch Modulates Stress Resilience in Rats Exposed to Chronic Mild Stress". *European Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1111/ejn.14951

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Acta de aprobación del comité de bioética N° E2CBC 20-2021



ENMIENDA ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA E2CBC 20-2021

El Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso (CBC-UV) en su sesión del 10 de enero de 2024, declara haber evaluado la solicitud de enmienda bioética del proyecto titulado "NEUROBIOLOGIA DE LA RESILIENCIA AL ESTRÉS Y ENFERMEDADES NEUROPSIQUIÁTRICAS", que corresponde a los protocolos experimentales aprobados en el acta **CBC 20-2021** y **ECBC 20-21**, solicitado por el investigador responsable Dr. Alexies Dagnino.

Los motivos de la solicitud de enmienda son:

1.- CAMBIOS EN EL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN Y/O MANIPULADORES DE ANIMALES

Incluir al enfermero Robinson Moreno (estudiante del primer año del Magíster de Neurociencia UV) y a Rocío Dávila (estudiante de cuarto año de Química y Farmacia UV), ambos como apoyo en las funciones que cumple el estudiante del Doctorado en Neurociencia-UV Andrew Justin Taylor indicadas en el Acta de Enmienda ECBC 20/2021 con vigencia hasta el 19 de enero del 2024. Andrew Justin Taylor capacitará en los experimentos a Robinson Moreno y Rocío Dávila. La justificación de este cambio es que Andrew no puede realizar solo estos experimentos y necesita apoyo. El Formulario de declaración de experiencia en manejo animal de Robinson Moreno y Rocío Dávila fueron enviados con la solicitud.

2.- OTRO TIPO DE CAMBIO.

Aumentar el tiempo de duración del proyecto por 72 días más. El Acta ECBC 20/2021 indica que el proyecto tiene una aprobación hasta 19 de enero del año 2024. Debido a la complejidad de los experimentos y para poder terminarlos con tranquilidad solicitamos ampliar el plazo de este proyecto hasta el 31 de marzo del 2024.

Considerando todo lo anterior, el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso aprueba las enmiendas para el proyecto CBC 20-2021 en los siguientes aspectos:

NUEVO PERSONAL PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO EXPERIMENTAL: Robinson Moreno y Rocío Dávila.

NUEVA VIGENCIA DEL ACTA DE APROBACIÓN BIOÉTICA: 31 de marzo 2024


Gabriela Muñoz Cerda
Presidenta



Comité de Bioética, Facultad de Ciencias
Universidad de Valparaíso