



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE FISIOPATOLOGÍA NEUROMUSCULAR

**EFFECTOS DEL INHIBIDOR I DE CALPAÍNA (IC1), SOBRE
MORFOLOGÍA NEURONAL Y DINÁMICA MITOCONDRIAL EN
NEURONAS DE RATONES APP/PS1, UN MODELO DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

Unidad de investigación II para optar al
Título de Químico Farmacéutico.

Javiera Menares Valdebenito

Directora: Dra. Arlek Gonzalez-Jamett
Co-Directora: Dra. Javiera Illanes González

Julio, 2025.

DEDICATORIA

No puedo comenzar esta tesis sin dedicársela, con todo mi amor y gratitud, a mi familia: a mi mamá, mi papá y mi hermana. Gracias por ser mi sostén constante durante todos estos años. Gracias por cada palabra de aliento, cada gesto silencioso de apoyo, cada abrazo en los días difíciles y cada sonrisa en los logros. Ustedes han sido mi red y mi impulso. Me sostuvieron cuando sentía que no podía más y celebraron conmigo cada pequeña victoria. Gracias por tener siempre fe en mí, incluso en los momentos en que yo misma dudaba. Esta meta no es solo mía, es también de ustedes.

A mi pareja, gracias infinitas por llegar a mi vida en el momento perfecto. Viniste a enseñarme que el amor también puede ser cuidado, motivación y crecimiento. Tu presencia no solo transformó mi día a día, sino también mi forma de enfrentar los desafíos. Gracias por acompañarme, por levantarme cuando caí, por darme calma, por recordarme quién soy cuando lo olvidaba. Estoy convencida de que sin ti, este cierre no sería posible ni tan significativo como lo es hoy.

Quiero dedicar unas palabras también a mis pequeños compañeros incondicionales: Conan, que estás a mi lado desde que terminé el colegio. Cuántas noches de estudio compartimos, desde la preparación de la PSU hasta las madrugadas de la etapa universitaria. Siempre a mi lado, en silencio, con esa compañía que tanto reconforta. Y ahora, con tu hermanita Lizzie, que desde que llegó también me acompaña con su dulzura. Ustedes dos han sido más que mascotas; han sido compañía emocional, apoyo silencioso y parte esencial de mi hogar y mi corazón.

Y por último, quiero agradecerme a mí misma. Porque aunque muchos han visto mi esfuerzo, solo yo sé cuánto me ha costado este camino. Solo yo sé de las veces que lloré en silencio, que dudé de mis capacidades, que quise rendirme... pero no lo hice. Gracias, Javiera, por seguir, por resistir, por ser constante. Por dar todo de ti sin dejar de lado lo que te hace feliz. Has demostrado que sí se puede, que los sueños sí se logran con esfuerzo, y que mereces todo lo bueno que llega a tu vida. Estoy profundamente orgullosa de ti.

AGRADECIMIENTO

Quiero comenzar agradeciendo profundamente a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis, cada una aportando con su tiempo, apoyo, conocimientos y cariño en este proceso tan desafiante como significativo.

A mi co-directora, Dra. Javiera Illanes, gracias infinitas por tu confianza, enseñanzas y por abrirme las puertas a este nuevo mundo que fueron los cultivos neuronales. Tus conocimientos y tu paciencia fueron fundamentales para que este proyecto creciera, y para que yo también creciera como profesional y como persona. Gracias por acompañarme con tanta dedicación y cercanía.

A mi directora, Dra. Arlek González-Jamett, una gran científica y mujer admirable, gracias por guiarme desde el Seminario de Licenciatura hasta el cierre de esta Unidad de Investigación. Tu rigurosidad y pasión por la ciencia han sido un ejemplo constante para mí.

A mi Gabi, compañera de toda la vida universitaria y ahora también del laboratorio. Gracias por acompañarme siempre, en cada etapa, como pareja académica y como amiga. Te llevo siempre presente, amiguita.

Agradezco también a Cote y al equipo de la Facultad de Ciencias, por recibirme siempre con los brazos abiertos y con la mejor disposición para ayudarme en todo lo que necesitaba.

A Barbarita, del equipo de microscopía confocal, gracias por tu excelente trabajo en la toma de imágenes, y sobre todo, por tu cálida compañía y disposición.

A todo el equipo del Laboratorio A-Lab, gracias por la buena compañía, por estar siempre dispuestos a ayudarme, y por hacer más livianos los días de trabajo en sus dependencias.

Quiero agradecer con el corazón a todo el equipo de LAFINEM. Desde mi primer día en el laboratorio me hicieron sentir una más. Cada uno aportó con su granito de arena algunos, incluso, con una playa completa. Gracias por enseñarme, apoyarme y motivarme durante todo este camino.

Finalmente, quiero agradecer con mucho cariño a las amistades que formé a lo largo de esta carrera. Algunas ya son excelentes Químicas Farmacéuticas y otras estamos muy cerca de serlo. Gracias, Cúrcuminas, por tantas horas compartidas de estudio, desvelo, apoyo y risas. Todo ese esfuerzo conjunto valió la pena, y me siento orgullosa de haber recorrido este camino acompañada de ustedes.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las causas más frecuentes de demencia, caracterizada por deterioro progresivo de la memoria y funciones cognitivas. Sus mecanismos patológicos más conocidos incluyen la formación de placas amiloides y alteraciones en la proteína de asociación a microtúbulos TAU. Sin embargo, defectos en la dinámica mitocondrial, estrés oxidativo y desorganización del citoesqueleto neuronal son eventos tempranos que contribuyen a la disfunción sináptica, principal correlato del inicio del deterioro cognitivo en la EA. Las proteínas de la superfamilia de las dinaminas (DSP), son GTP-asas citosólicas que participan en procesos clave del citoesqueleto y dinámica mitocondrial, y se ha demostrado que son sustratos proteolíticos de las calpaínas. Estas son proteasas calcio-dependientes sobreactivadas en la EA. Esta Unidad de Investigación evaluó el efecto de inhibir la actividad de las calpaínas sobre la estructura sináptica y dinámica mitocondrial en neuronas de ratones APP/PS1, modelo murino de EA. Se realizaron cultivos neuronales de ratones APP/PS1 y silvestres (WT), tratados al día 14 *in vitro* (DIV 14) con el inhibidor de calpaína I (IC1) a distintas concentraciones (0,1 y 10 μ M) y tiempos (1 y 8 h). Se analizó el efecto sobre la densidad de espinas dendríticas y dinámica mitocondrial. Las neuronas APP/PS1 mostraron menor densidad de espinas que las neuronas WT, lo cual fue prevenido por IC1, sugiriendo un efecto protector sináptico. IC1 redujo la densidad mitocondrial y aumentó el área de las mitocondrias en neuronas APP/PS1, lo que sugiere menor fragmentación. Estos hallazgos proponen a las calpaínas como blancos terapéuticos potenciales en la EA

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common causes of dementia, characterized by progressive deterioration of memory and cognitive functions. Its most well-known pathological mechanisms include the formation of amyloid plaques and alterations in the microtubule-associated protein TAU. However, mitochondrial dynamics defects, oxidative stress, and cytoskeletal disorganization are early events that contribute to synaptic dysfunction, the main correlate of initial cognitive decline in AD. Proteins of the dynamin superfamily (DSP) are cytosolic GTPases involved in key processes of cytoskeletal organization and mitochondrial dynamics, and have been identified as proteolytic substrates of calpains—calcium-dependent proteases that are overactivated in AD. This research project evaluated the effect of inhibiting calpain activity on synaptic structure and mitochondrial dynamics in neurons from APP/PS1 mice, a murine model of AD. Primary hippocampal cultures from APP/PS1 and wild-type (WT) mice were treated at day 14 in vitro (DIV14) with calpain inhibitor I (IC1) at different concentrations (0.1 and 10 μ M) and exposure times (1 and 8 h). The effects on dendritic spine density and mitochondrial dynamics were analyzed. APP/PS1 neurons showed reduced spine density compared to WT neurons, which was prevented by IC1, suggesting a synaptoprotective effect. IC1 also decreased mitochondrial density and increased mitochondrial area in APP/PS1 neurons, indicating reduced fragmentation. These findings propose calpains as potential therapeutic targets in AD.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Calpaínas: Familia de proteasas dependientes de calcio que participan en la degradación de proteínas, entre ellas proteínas involucradas en procesos celulares como remodelación sináptica y señalización celular.

Citoesqueleto: Es una red tridimensional de estructuras proteicas que se extienden por el citoplasma de las células eucariotas.

Espinas dendríticas: Pequeñas protrusiones en las dendritas de las neuronas que actúan como contacto sináptico, principalmente en sinapsis excitatorias.

Filamentos de actina: Componentes del citoesqueleto que participan en la forma celular, movilidad y estructura de espinas dendríticas.

Microtúbulos: Estructuras del citoesqueleto que permiten el transporte intracelular y actúan como soporte estructural de las neuronas.

Péptido beta-amiloide: Fragmento proteico que se acumula formando placas en el cerebro, asociado a la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer.

Proteína TAU: Proteínas de asociación a microtúbulos que estabilizan el citoesqueleto neuronal; su hiperfosforilación causa agregados tóxicos en enfermedades neurodegenerativas.

ABREVIACIONES

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5metilo-4-isoxazolpropiónico.

APP: Proteína precursora amiloide (Amyloid Precursor Protein).

APP/PS1: Animal transgénico, modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

β A: Péptido beta-amiloide.

Ca⁺²: Calcio.

CDK5: Cyclin-dependent kinase 5.

DIV: *Días in vitro*.

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNMs: Dinaminas clásicas (Dynamins).

DRPs: Proteínas relacionadas con dinaminas (Dynamin-Related Proteins).

DSP: Proteínas de la superfamilia de dinaminas (Dynamin-Superfamily Proteins).

EA: Enfermedad de Alzheimer.

GSK3-beta: Glycogen synthase kinase-3 beta.

HBSS: Solución Salina Balanceada de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution).

IC1: Inhibidor de calpaína I.

MAP: Proteína de asociación a microtúbulos (Microtubule Associated Protein).

MEM: Medio esencial mínimo.

NB: Neurobasal.

PBS: Buffer fosfato salino (Phosphate buffered saline)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

PFA: Paraformaldehído.

PS1: Presenilina 1.

PSD: Densidad postsináptica (Post Synaptic Density).

ROIs: Área de interés (*Regions of interest*)

SNC: Sistema nervioso central.

WT: Silvestre (Wild-type).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Enfermedad de Alzheimer (EA)	1
1.2 Mecanismos patológicos en la EA.	1
1.3 Defectos estructurales y funcionales en las neuronas en el.....	2
contexto de la EA.	2
1.4 Dinaminas y su participación en la regulación del citoesqueleto y en la dinámica mitocondrial.	6
1.5 Calpaínas: su sobreactivación en el contexto de la EA y su efecto en la proteólisis de las dinaminas.	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo general.....	9
2.2 Objetivos específicos	9
3. METODOLOGÍA.....	10
3.1 Modelo murino APP/PS1	10
3.2 Genotipificación Animales de experimentación	10
3.3 Cultivo de neuronas hipocampales.	10
3.4 Tratamiento farmacológico.	10
3.5 Visualización y análisis de espinas dendríticas.....	11
3.6 Tinción y análisis de la red mitocondrial.....	12
3.7 Condiciones experimentales	12
3.8. Análisis estadístico	13
4. RESULTADOS	14
4.1 Efectos de Inhibidor de calpaína I sobre densidad de espinas dendríticas ..	14
4.2 Efectos de inhibidor de calpaína I sobre la dinámica mitocondrial.	17
5. DISCUSIÓN.....	20
6.CONCLUSIÓN.....	23
7.REFERENCIAS	24
8.ANEXOS.	28

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Alzheimer (EA)

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que conduce a la pérdida de células en el cerebro, lo que se manifiesta con un deterioro cognitivo que afecta a la memoria, así como a la realización de actividades cotidianas en los pacientes. La EA es una patología altamente prevalente en personas mayores de 60 años, aunque no excluye a personas de menor edad. Se caracteriza por ser una enfermedad progresiva en donde sus principales síntomas son la pérdida de memoria de reconocimiento, deterioro del lenguaje y pérdida de memoria espacial manifestada como problemas en la orientación, entre otros signos clínicos (Bera et al., 2022).

La EA es la causa más frecuente de demencia en la vejez. Actualmente, más de 55 millones de personas en el mundo sufren de alguna demencia, donde la EA representa un 60-70% de los casos (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2024). La EA es la séptima causa de muerte y de discapacidad a nivel global; en Chile más de 180.000 personas sufren de algún tipo de demencia (MINSAL, 2019). La realidad en nuestro país demuestra que el envejecimiento tiene un crecimiento exponencial en el tiempo, y se proyecta que para el año 2050 el país podría llegar a una población de 626.000 personas con EA u otra demencia (MINSAL, 2019).

1.2 Mecanismos patológicos en la EA.

La EA es una patología multifactorial que dificulta las funciones neuronales (Zhang et al., 2024). Dos de los principales marcadores histológicos de la EA son la acumulación de agregados proteicos de la proteína de asociación a microtúbulos o MAP (del inglés *Microtubule-Associated-Protein*) **TAU** y del **péptido beta-amiloide** (β A). Los agregados de TAU. Depósitos del **péptido beta-amiloide** (β A) forman “placas amiloides” características de estados avanzados de la EA. Estos contienen productos del procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP del inglés *Amyloid Precursor Protein*). En un contexto homeostático, el procesamiento de APP tiene dos vías. Una es la vía no amiloidogénica en donde actúan los complejos enzimáticos α -secretasa y γ -secretasa sin formación de beta-amiloide; mientras que en la vía amiloidogénica participan de manera secuencial las enzimas β -secretasa y γ -secretasa procesando la APP, y generando fragmentos de β A de 40 y 42 residuos aminoacídicos respectivamente, siendo los últimos altamente neurotóxicos (Overk & Masliah, 2014). En condiciones normales ambas vías se encuentran “activas”, y el β A formado se encuentra en equilibrio entre el espacio intra y extracelular, sin embargo, cuando aumenta β A, especialmente el de 42 residuos, produce agregación de oligómeros, protofibrillas y fibras de β A depositándose en el espacio extracelular formando las placas amiloides las cuales difunden hacia las sinapsis interfiriendo con su estructura y función (Overk & Masliah, 2014).

La **proteína TAU** se une a los microtúbulos estabilizándolos, y consecuentemente regulando el crecimiento axonal y el transporte de vesículas a través del axón. La unión de los microtúbulos axonales con TAU está regulada principalmente por fosforilaciones de esta última. En el contexto de la EA, TAU se encuentra hiperfosforilada por la sobreactivación de kinasas encargadas de su fosforilación como la GSK3-beta (del inglés *Glycogen synthase kinase-3 beta*) y CDK5 (del inglés *cyclin-dependent kinase 5*). La hiperfosforilación de TAU, la convierte en una proteína menos soluble que precipita de manera anormal formando “ovillos neurofibrilares”, que consecuentemente conducen a la pérdida de la estructura neuronal y contribuyen finalmente a la neurodegeneración (Von Bernhardi, 2005).

Estas dos lesiones histopatológicas (ovillos neurofibrilares y placas amiloides), además de otros factores como el estrés oxidativo y la neuroinflamación (Zhang et al., 2024), conllevan a un daño en las sinapsis neuronales, que se manifiesta en la pérdida de la morfología neuronal y en la pérdida de estructuras sinápticas importantes para la neurotransmisión (Dorostkar et al., 2015). Este deterioro afecta particularmente al hipocampo, una de las regiones más vulnerables en las etapas iniciales de la enfermedad, lo que se traduce en una atrofia progresiva de esta estructura cerebral clave para la memoria y el aprendizaje (Drew, 2018)

1.3 Defectos estructurales y funcionales en las neuronas en el contexto de la EA.

Las neuronas son células especializadas en la transmisión de señales eléctricas. Una neurona está compuesta por tres dominios celulares, los cuales son (Figura 1A): soma, axón y dendritas, estas últimas son proyecciones que emergen desde el soma y son las responsables de recibir la información proveniente de otras neuronas presinápticas. De las dendritas emergen protrusiones denominadas **espinas dendríticas**, las cuales constituyen sitios donde ocurre el contacto sináptico entre neuronas. Las espinas presentan un citoesqueleto rico en actina, conformado por actina filamentosa (F-actina) y por actina globular (G-actina), las cuales se encuentran como polímero y monómero respectivamente. El equilibrio dinámico entre ambas es esencial para la estructura y funcionalidad del citoesqueleto (Borovac et al., 2018). Sin embargo, estas no actúan sólo como soporte estructural, sino también facilitando el tráfico de proteínas sinápticas, ejerciendo un papel importante en la función sináptica y en la neurotransmisión (Stefen et al., 2016). Además del citoesqueleto de actina, las espinas presentan **microtúbulos** de alfa y beta-tubulina ensambladas, los cuales forman polímeros estabilizados por proteínas MAP (Austin et al., 2017). La morfología de la espina dendrítica está formada por una “cabeza” la cual se conecta a la dendrita a través de un “cuello”. En la cabeza hay una matriz electrón densa denominada densidad postsináptica (PSD del inglés *Post Synaptic Density*) que permite el anclaje de proteínas sinápticas relevantes como los receptores de neurotransmisores los cuales participan en la comunicación neuronal (Ono et al., 2016). (Figura 1B).

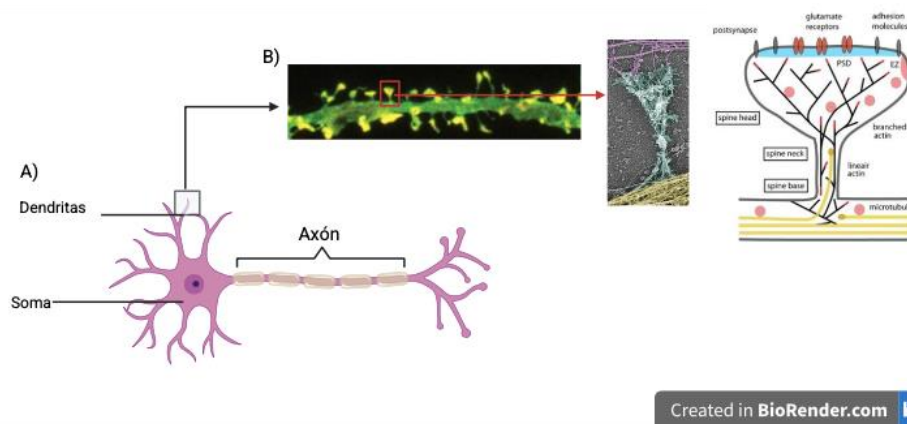


Figura 1: Morfología y elementos del citoesqueleto neuronal. **A)** Se observan los tres grandes dominios de una neurona: axón, soma y dendritas. **B)** Organización estructural y molecular de las espinas dendríticas. A la izquierda, imagen de microscopía que muestra una dendrita con múltiples espinas en neuronas hipocámpales. Al centro, una ampliación de una espina individual que revela la organización interna del citoesqueleto, mostrando la presencia de actina y microtúbulos. A la derecha, un diagrama esquemático ilustra los principales componentes estructurales y funcionales de la espina dendrítica, incluyendo la densidad postsináptica (PSD), moléculas de adhesión, receptores glutamatérgicos, filamentos de actina, y microtúbulos. Figura creada en la plataforma BioRender, adaptada desde (Pirta, 2010).

Las diferentes morfologías de las espinas dendríticas reflejan diferencias en la “madurez” y eficacia de la fuerza sináptica que transducen. Se pueden clasificar como de tipo “**hongo**”, **que son espinas maduras** en donde la cabeza es grande y el cuello es delgado; tipo “**espina delgada**” con cuello largo y cabeza delgada; tipo “**stubby**”, cortas con cabeza pequeña y con cuello muy pequeño; protrusiones tipo “filopodios” corresponden a espinas inmaduras las cuales no poseen una cabeza visible (Figura 2) (Hering & Sheng, 2001). En este sentido, se ha evidenciado que el tamaño de la cabeza de las espinas está relacionado con el área de la PSD que aloja, y con el número de receptores glutamatérgicos de tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) en la membrana post-sináptica (Matsuzaki et al., 2001), por lo tanto, **las espinas con cabeza más grande forman las conexiones más robustas y eficaces desde el punto de vista de la transmisión sináptica.**



Figura 2: Morfología de espinas dendríticas. Se esquematizan diferentes formas de espinas dendríticas, según tipo y tamaño de “cabeza” y “cuello”. Estas pueden variar en tipo hongo o mushroom, thin o delgada, stubby o protrusión, y tipo filopodios, la cual puede ser multiramificada o bifurcada. Figura original creada en la plataforma BioRender.

En la EA se ha descrito tanto la pérdida de espinas dendríticas, como defectos en la morfología neuronal (Mijalkov et al., 2021). Alteraciones en la organización y remodelamiento del citoesqueleto neuronal pueden conducir a una pérdida en la eficiencia de la transmisión sináptica. Un estudio realizado por Mijalokv y colaboradores en el año 2021, utilizando tejido cerebral *postmortem* de pacientes con EA, reportó una pérdida significativa de espinas dendríticas, además de ser más pequeñas y compactas lo que conlleva a una disminución en la comunicación sináptica (Mijalkov et al., 2021).

De manera consistente, en cultivos neuronales primarios de modelos murinos transgénicos APP/PS1, utilizados para simular la patología de Alzheimer, también se ha observado una reducción en la densidad de espinas dendríticas (Kommaddi et al., 2017) Estos cambios se asocian con la acumulación de péptido β -amiloide y a un deterioro progresivo en la plasticidad sináptica, reproduciendo las características tempranas del deterioro cognitivo observado en humanos (Jacobsen et al., 2006).

Por otra parte, la compleja morfología neuronal requiere de una amplia distribución de los organelos que aportan a la bioenergética y función neuronal. Un aspecto importante es la **cantidad y distribución de mitocondrias neuronales**, las cuales se encuentran homogéneamente distribuidas tanto en el soma neuronal, como en terminales axonales, dendritas y espinas dendríticas (Gu et al., 2024).

Las mitocondrias se encuentran sometidas a un proceso dinámico que considera **constantes ciclos de fusión y fisión, denominado “dinámica mitocondrial”** lo que permite que las mitocondrias se separen y reubiquen dependiendo de los requerimientos energéticos de la célula para una correcta función de las actividades fisiológicas (Gu et al., 2024) (Figura 3). En cerebros *postmortem* de pacientes con EA se han evidenciado mitocondrias con crestas fracturadas, así como una mayor fragmentación debido a una excesiva fisión mitocondrial (Baloyannis, 2006), lo que lleva a una disfunción mitocondrial causando defectos en la bioenergética neuronal, estrés oxidativo, pérdida sináptica y muerte neuronal (Baek et al., 2017).

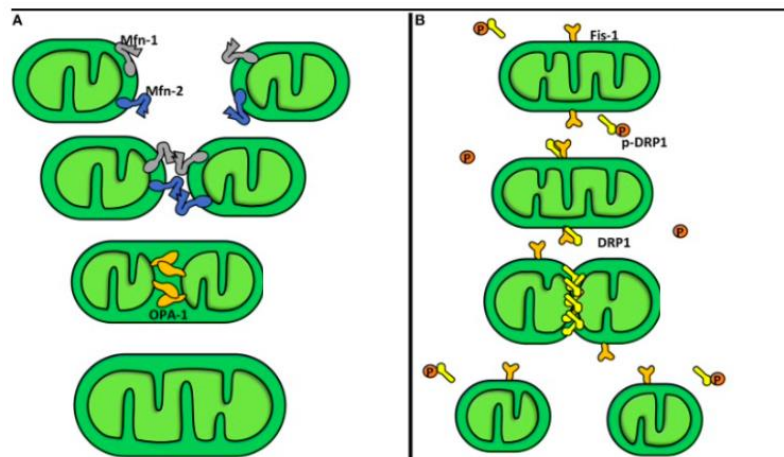


Figura 3: Dinámica mitocondrial. Las mitocondrias forman redes que están permanentemente sometidas a un proceso dinámico de fusión/fisión. **A)** Proceso de fusión: cuando dos mitocondrias se unen para formar una única estructura tubular, participan las proteínas mitofusina 1 (MFN1) y mitofusina 2 (MFN2), localizadas en la **membrana mitocondrial externa**, y la proteína OPA1, que actúa a nivel de la membrana mitocondrial interna. **B)** Proceso de fisión: cuando una mitocondria se divide en dos estructuras separadas, participan la proteína tipo dinamina 1 (DRP1) que se transloca al citosol hacia la membrana mitocondrial externa, ensamblándose en forma de anillo para inducir la escisión mitocondrial, también actúa la proteína Fis1, anclada a la membrana externa, facilita el reclutamiento de DRP1 favoreciendo la fisión. (Figura tomada desde Chiong, 2014).

Por otro lado, trabajos en modelos animales y en modelos in vitro de EA han demostrado que ocurre un aumento de la fisión y una reducción de la fusión mitocondrial, lo que conlleva a alteraciones morfológicas y funcionales de las mitocondrias (Misrani et al., 2021). Específicamente, en el modelo murino APP/PS1 se ha observado un aumento en el número de mitocondrias, las cuales presentan un tamaño reducido y una morfología alterada, indicativa de un desequilibrio en la dinámica mitocondrial (Xu et al., 2018). Este fenómeno sugiere una activación persistente de la fisión mitocondrial, lo cual no solo compromete la eficiencia bioenergética de la neurona, sino que también puede contribuir a la disfunción sináptica observada en las etapas tempranas de la enfermedad. Además, se ha reportado un aumento significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que contribuye a la disfunción mitocondrial (Yang et al., 2012).

Las **cascadas de señalización que modulan la estructura sináptica, el citoesqueleto y la dinámica mitocondrial son potenciales focos de atención en el contexto de la EA**, los cuales, hasta ahora han sido poco estudiados. En este contexto, la **superfamilia de las dinaminas** son un ejemplo de **proteínas capaces de modular la organización del citoesqueleto neuronal, la estructura sináptica y también la dinámica mitocondrial**. Considerando su participación en múltiples procesos celulares alterados en la EA, el estudio de la superfamilia de las dinaminas podría contribuir significativamente a la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la disfunción sináptica y mitocondrial, así como a la identificación de posibles dianas terapéuticas de intervención temprana.

1.4 Dinaminas y su participación en la regulación del citoesqueleto y en la dinámica mitocondrial.

Las proteínas de la superfamilia de las dinaminas (DSP del inglés *Dynamain-Superfamily- Proteins*) son enzimas con actividad GTPasa, presentes en diversas especies, desde bacterias hasta mamíferos. Cumplen con diferentes funciones en donde la principal es el remodelamiento de las membranas celulares, incluyendo fisión y fusión de membranas, exocitosis y endocitosis de vesículas (16). Las DSP también modulan la dinámica del citoesqueleto de F-actina, y de microtúbulos, favoreciendo tanto su polimerización, como su estabilización en distintos contextos (Arriagada-Díaz et al., 2020).

Las DSP se organizan en dinaminas clásicas (DNMs) y en proteínas relacionadas con dinaminas (DRP, del inglés *Dynamain-Related-Proteins*). En los mamíferos, las DNMs clásicas expresan tres isoformas: DNM1 que se encuentra principalmente en tejidos neuronales, DNM3 que se expresa en cerebro, pulmones y testículos y DNM2, la única isoforma que se expresa en todos los tejidos mamíferos y que se ha descrito que tiene un rol en la mantención de la estructura sináptica en neuronas hipocámpales mamíferas (Arriagada-Díaz et al., 2023).

Las dinaminas clásicas y las DRP participan en diversos procesos celulares a nivel neuronal, modulando de manera directa o indirecta la transmisión sináptica. A nivel presináptico DNM1 y DNM2 tienen funciones importantes modulando el reciclaje endocítico de las vesículas sinápticas de un modo dependiente de la actividad neuronal. Consecuentemente, DNM1 y DNM2 modulan la liberación de neurotransmisores desde la presinapsis (Arriagada-Díaz et al., 2023). En la postsinapsis DNM2 y DNM3 participan activamente en el reciclaje de receptores para neurotransmisores (Chowdhury et al., 2006), así como en la modulación del número de dendritas y de la disponibilidad de espinas dendríticas, modulando de esta forma la eficiencia de la transmisión sináptica (Arriagada-Díaz et al., 2020). Recientemente un trabajo publicado desde el Laboratorio de Fisiopatología Neuromuscular de la Universidad de Valparaíso (LAFINEM) estableció por primera vez la importancia de DNM2 para la generación de espinas dendríticas y para la arborización dendrítica en neuronas piramidales del sistema nervioso central, lo que sugiere además un rol clave de las dinaminas en la estructura sináptica (Arriagada-Díaz et al., 2023).

Por otro lado, DRP1, una importante representante de las proteínas relacionadas con dinaminas tiene un papel crítico en modular la dinámica mitocondrial al controlar los procesos de fisión mitocondrial de un modo dependiente de la actividad neuronal. La fisión mitocondrial determina el tamaño y el número de mitocondrias disponibles en las neuronas, un aspecto clave para mantener la bioenergética y el metabolismo neuronal (Bertholet et al., 2015). Por lo tanto, defectos en la expresión y/o en la función de las dinaminas pueden conducir a alteraciones estructurales y funcionales de la sinapsis, tal como ocurre en patologías neurodegenerativas como la EA. Interesantemente existe evidencia de que las dinaminas clásicas DNM1 y DNM2 disminuyen significativamente los niveles de sus transcritos en cerebros *post-mortem* de pacientes con demencia tipo Alzheimer (Aidaraliev

et al., 2008). Además, se ha descrito que, en el contexto de la EA, el péptido β A es capaz de **activar proteasas Ca^{2+} dependientes como la calpaína**, las cuales degradan DNM1, DNM2 y DRP, afectando sus niveles de expresión en el contexto de la EA (Kelly et al., 2005). Dada esta información, la actividad de las **calpaínas fue el foco en esta Unidad de investigación**.

1.5 Calpaínas: su sobreactivación en el contexto de la EA y su efecto en la proteólisis de las dinaminas.

Las calpaínas son una familia de proteasas de cisteína citoplasmáticas no lisosomales, dependientes de calcio (Ca^{2+}). Cuando el Ca^{2+} se une a las calpaínas ocurre en estas un cambio conformacional que promueve su actividad proteolítica. Las calpaínas se encuentran en casi todas las células eucariotas y en algunas bacterias (Ono & Sorimachi, 2011). Dentro de la familia de las calpaínas se encuentran: μ -calpaína y m-calpaína, también llamadas calpaína-1 y calpaína-2 respectivamente, o también como calpaínas convencionales. Ambas proteasas dependientes de Ca^{+2} son heterodímeros que contienen una subunidad idéntica de 28 kDa y una subunidad de 80 kDa que comparte una homología de secuencia del 55-65% entre ambas. La subunidad de 80kDa contiene cuatro dominios que incluyen: la hélice de anclaje en el N-terminal, el dominio catalítico CysPc formado por dos dominios de núcleo de proteasa, el dominio tipo C2 y el dominio penta-EF-hand (PEF[L]), que contienen los sitios de unión al Ca^{2+} que desempeñan un papel regulador y constituyen los dominios III y IV de las calpaínas, respectivamente. Por otro lado, la subunidad de 28 kDa contiene un dominio rico en glicinas y un dominio PEF(S) similar a la subunidad grande de 80 kDa, juntos forman los dominios V y VI de la molécula heterodímera de calpaína completa (Goll et al., 2003). Además de las calpaínas convencionales está la calpastatina, un inhibidor endógeno que inhibe a calpaína 1 y 2. En cuanto a su estructura molecular esta contiene seis dominios de los cuales dos no tienen propiedad inhibitoria, mientras que los cuatro dominios restantes, cada uno de ellos es capaz de unirse a una molécula de calpaína inhibiendo su actividad proteolítica (Goll et al., 2003).

En el contexto de la EA, se ha evidenciado desregulación en la homeostasis de Ca^{2+} . Los oligómeros de β A inducen un aumento rápido y sostenido del Ca^{2+} intracelular en las neuronas a través de diversos mecanismos. Más aún, en el contexto de la EA se produce una importante desregulación de la transmisión glutamatérgica, la cual conduce la excitotoxicidad debido a la hiperactivación de los receptores NMDA (N-metil-D- aspartato), lo que aumenta la permeabilidad de las neuronas al Ca^{2+} . Esto desencadena la activación **de diversas enzimas proteolíticas dependientes de Ca^{+2} , entre ellas calpaínas** (Mahaman et al., 2018).

Dentro de las proteínas que son degradadas por las calpaínas se encuentran las dinaminas, como fue evidenciado por Kelly y colaboradores en el año 2005, quienes reportaron por primera vez que DYN1 y DYN2 son degradadas por las calpaínas en el contexto de la EA (Kelly et al., 2005). Así mismo, en un estudio realizado el 2019 por Jiang y colaboradores se estableció que DRP1 también es sustrato de las calpaínas, afectando la dinámica mitocondrial y contribuyendo a la disfunción mitocondrial durante la patología de la EA (Jiang et al., 2019).

Por lo tanto, es factible suponer que al modular la actividad de las calpaínas podría prevenirse la degradación proteolítica de las dinaminas en la EA y así prevenir las alteraciones morfológicas y en la dinámica mitocondrial que ocurren tempranamente en la enfermedad. Por lo que se planteó la siguiente pregunta a abordar en esta Unidad de Investigación:

Pregunta: ¿La inhibición de las calpaínas previene la pérdida de estructura sináptica y los defectos en la dinámica mitocondrial en el contexto de EA?

Hipótesis: La inhibición de las calpaínas previene la pérdida de estructura sináptica y los defectos en la dinámica mitocondrial en el contexto de EA.

Para abordar esta pregunta de investigación y corroborar la hipótesis se utilizaron cultivos neuronales provenientes de ratones transgénicos **APP/PS1**, modelo murino de la EA. La inhibición de la actividad de las calpaínas se realizó mediante la droga comercial **inhibidor de calpaína I (IC1)**.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inhibición de las calpaínas en la estructura sináptica y la dinámica mitocondrial en neuronas provenientes de ratones APP/PS1, modelo murino de la EA.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluar el efecto de la inhibición de calpaínas, sobre la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales provenientes de ratones APP/PS1, modelo murino de la EA.
- 2) Evaluar el efecto de la inhibición de calpaínas, sobre la fragmentación mitocondrial en neuronas hipocampales provenientes de ratones APP/PS1, modelo murino de la EA.

3. METODOLOGÍA

3.1 Modelo murino APP/PS1

En esta unidad de investigación se utilizaron cultivos neuronales hipocampales como modelo experimental, los cuales se aislaron desde ratones APP/PS1 o su contraparte silvestre (WT, del inglés *wild type*) en estadios postnatal (P0-P2). El modelo APP/PS1 corresponde a ratones doble transgénicos los cuales presentan mutaciones en los transgenes humanos APP y presenilina 1 (PS1). Estas mutaciones los llevan a desarrollar mayor cantidad de A β y acumulación de placas amiloides, una de las características neuropatológicas principales en la EA (Jankowsky et al., 2003). Para llevar a cabo esta unidad de investigación se contó con la aprobación bioética del Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL-UV) quienes revisaron los protocolos propuestos, en el marco del proyecto FONDECYT Regular 1231511 de la Dra. Arlek González Jamett (ANEXO 1).

3.2 Genotipificación Animales de experimentación

Se utilizó un método de genotipificación basado en PCR (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*) para identificar cultivos hipocampales derivados de ratones APP/PS1. El ADN genómico fue extraído a partir de muestras de cola de crías de ratón post-eutanasia, las cuales fueron almacenadas a -20°C hasta su digestión. Para más detalles ver (ANEXO 2).

3.3 Cultivo de neuronas hipocampales.

Para realizar los cultivos neuronales se utilizó el protocolo previamente reportado por el Laboratorio de Fisiopatología Neuromuscular (Arriagada-Díaz et al., 2023). Los ratones neonatos fueron sacrificados mediante decapitación rápida con tijeras, siguiendo los protocolos aprobados por el CICUAL-UV. Posteriormente se extrajo el cerebro y se aislaron los hipocampos, para disgregar enzimáticamente usando tripsina (Corning, #25-053-CI) y ADNasa (Roche, #11284932001). Luego, las células fueron sembradas en medio esencial mínimo (MEM, Gibco, #6110-061) durante 1 hora; seguidamente las células se mantuvieron con medio Neurobasal (NB, Thermo Scientific, #21103049) suplementado hasta el 14 DIV, todo el proceso experimental fue realizado en condiciones estériles. Las neuronas fueron almacenadas hasta los 14 DIV en un incubador a 37°C, 100% humedad y una mezcla de 95/5% de O₂/CO₂ hasta realizar los tratamientos correspondientes. Más detalles en ANEXO 3 y 4.

3.4 Tratamiento farmacológico.

La inhibición de la actividad de las calpaínas se realizó mediante la droga **inhibidor de calpaína I (IC1)**, este es un aldehído tripéptido sintético que se une al sitio activo de las calpaínas, actuando como un potente inhibidor competitivo de las cisteínas proteasas, incluidas la calpaína I, calpaína II, catepsina B y L (Sigma, #A6185). El inhibidor fue incubado durante tiempos variables (1h y 8h) a dos concentraciones distintas para evaluar su efecto en la morfología neuronal y dinámica mitocondrial: 0.1 y 10 μ M. Detalles ANEXO

5. Estas concentraciones fueron escogidas según evidencia previa en la que se realizaron cultivos hipocampales primarios utilizando el IC1 (Rami et al., 1997).

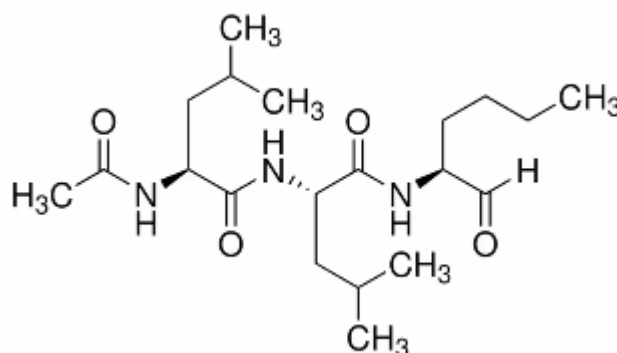


Figura 3: Estructura química del Inhibidor de Calpaína I.

Los controles correspondientes se realizaron utilizando el vehículo dimetilsulfóxido (DMSO) en concentraciones equivalentes a las utilizadas para disolver el IC1, es decir, 0,00038 % y 0,038 % para las condiciones de 0,1 μ M y 10 μ M, respectivamente.

3.5 Visualización y análisis de espinas dendríticas.

Tras el tratamiento con IC1 en las concentraciones y tiempos establecidos, las neuronas fueron fijadas mediante incubación con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% y sacarosa al 4% a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se procedió a la permeabilización celular utilizando Triton X-100 al 0,1% en PBS 1X. Para la visualización de la morfología dendrítica, se realizó la tinción con faloidina-rodamina B (Cytoskeleton, #PHDR1), a una concentración de 0,1 μ M en PBS 1X, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Adicionalmente, los núcleos fueron teñidos con DAPI a una dilución 1:1000. Finalmente, se procedió al montaje de las muestras utilizando medio de montaje (DAKO, #S3023). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal vertical Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments), empleando un objetivo de inmersión en aceite de 100x para obtener una visualización de alta resolución de la morfología dendrítica y las espinas. La excitación del fluoróforo rodamina B se efectuó mediante un láser He-Ne de 543 nm, con filtro de emisión 605/75, mientras que la detección del núcleo teñido con DAPI se llevó a cabo utilizando un láser de diodo violeta y un filtro de emisión de 450/35.

Las imágenes capturadas fueron analizadas con el software ImageJ para estudiar la densidad de espinas dendríticas como un indicativo de la pérdida de estructuras sinápticas. Por cada neurona fotografiada se seleccionaron al azar tres regiones de interés (ROIs) en las dendritas de una longitud de 30 μ m y en estas ROIs se contaron el número de protrusiones, utilizando un plugin de ImageJ para la identificación de las espinas contabilizadas.

La variable a medir luego de la aplicación de esta metodología fue el número de espinas

dendríticas normalizado por la longitud de las dendritas.

3.6 Tinción y análisis de la red mitocondrial

Las neuronas fueron incubadas con la sonda fluorescente Mitotracker-Orange (Invitrogen, #M7510) a una concentración de 0,1 μM en solución extracelular durante 30 minutos a 37°C (ANEXO 6, luego del tratamiento con IC1 a las dosis y tiempos propuestos). Posteriormente las neuronas teñidas con Mitotracker-Orange fueron fijadas con 4% PFA/sacarosa y se observaron mediante microscopía confocal (Microscopio de Servicio ubicado en la Facultad de Ciencias de la UV), utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 40X y un láser de 543 nm. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas y procesadas utilizando el software ImageJ (NIH, USA). Se evaluó el área de las mitocondrias y el número de las mitocondrias, comparando estos parámetros entre las neuronas sometidas a diferentes condiciones experimentales.

Las variables a medir luego de la aplicación de esta metodología fueron:

- Densidad mitocondrial (Número de mitocondrias/30 μm)
- Área de las mitocondrias (μm^2).

3.7 Condiciones experimentales

Tabla 1. Condiciones experimentales.

Objetivo	Genotipo Neuronal	Tratamiento
Objetivo específico 1	WT	Sin tratamiento
		Con vehículo DMSO durante 1h y 8h
		Con inhibidor de calpaína I (0.1 y 10 μM) durante 1h y 8h
	APP/PS1	Sin tratamiento
		Con vehículo DMSO durante 1h y 8h
		Con inhibidor de calpaína I (0.1 y 10 μM) durante 1h y 8h
Objetivo específico 2	WT	Sin tratamiento
		Con vehículo DMSO durante 1h
		Con inhibidor de calpaína I (0.1 y 10 μM) durante 1h
		Sin tratamiento
		Con vehículo DMSO durante 1h

	APP/PS1	Con inhibidor de calpaína I (0.1 y 10 μ M) durante 1h
--	---------	--

3.8. Análisis estadístico

La distribución de los datos recolectados fue analizada en el software Instat-GraphPad-10 utilizando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Cuando los datos siguieron una distribución normal, se analizó las diferencias estadísticas entre las condiciones experimentales con un análisis paramétrico ANOVA de dos vías para múltiples variables. Para los datos que no presentaron una distribución normal, se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias estadísticas entre las condiciones experimentales. Los resultados se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media (SEM), y se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efectos de Inhibidor de calpaína I sobre densidad de espinas dendríticas

Se evaluó la densidad de espinas dendríticas (número de espinas/30 μm) en neuronas hipocampales de ratones WT y APP/PS1 al *D/V* 14, tras 1 hora de tratamiento con el inhibidor de calpaína I (IC1) a dos concentraciones (0.1 μM y 10 μM), o con el vehículo DMSO 0,038 %. Para la visualización y análisis de las espinas dendríticas, las neuronas fueron fijadas y posteriormente teñidas con faloidina-rodamina B, a una concentración final de 0.1 μM en solución PBS 1X, esta es una sonda fluorescente la cual se une específicamente a la actina filamentosa, permitiendo observar con alta resolución la morfología dendrítica mediante microscopía confocal, con un aumento de 100X. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4A.

Las neuronas del grupo WT sin tratamiento (WT-CTL) presentaron una morfología dendrítica altamente compleja, con una densa presencia de espinas dendríticas, mientras que las neuronas APP/PS1 control (APP/PS1-CTL) mostraron una reducción de la complejidad del árbol dendrítico, lo que evidencia una alteración estructural sináptica en este modelo de EA. Esta diferencia fue cuantificada y confirmada en el gráfico de densidad de espinas dendríticas (Figura 4B), donde el grupo APP/PS1-CTL demostró una disminución significativa respecto al grupo WT-CTL ($p < 0,0001$).

El tratamiento con DMSO no indujo diferencias estadísticamente significativas respecto a sus respectivos controles, tanto en WT como en APP/PS1, descartando efectos del vehículo en la morfología sináptica. Sin embargo, al aplicar IC1 a neuronas APP/PS1, se observó un efecto protector; tanto con 0,1 μM como con 10 μM de IC1 se produjo un aumento significativo en la densidad de espinas respecto a APP/PS1-CTL ($p < 0,0001$ para 10 μM ; $p < 0,001$ para 0,1 μM). Notablemente, la concentración de 10 μM logró restaurar los niveles de espinas hasta valores comparables a los observados en WT-CTL, lo que sugiere un efecto “protector” del inhibidor sobre la estructura sináptica alterada.

Por otro lado, el tratamiento con IC1 en neuronas WT no produjo cambios significativos en comparación con WT-CTL, lo que indica que el efecto del inhibidor es específico para condiciones patológicas y no altera la arquitectura sináptica en condiciones fisiológicas.

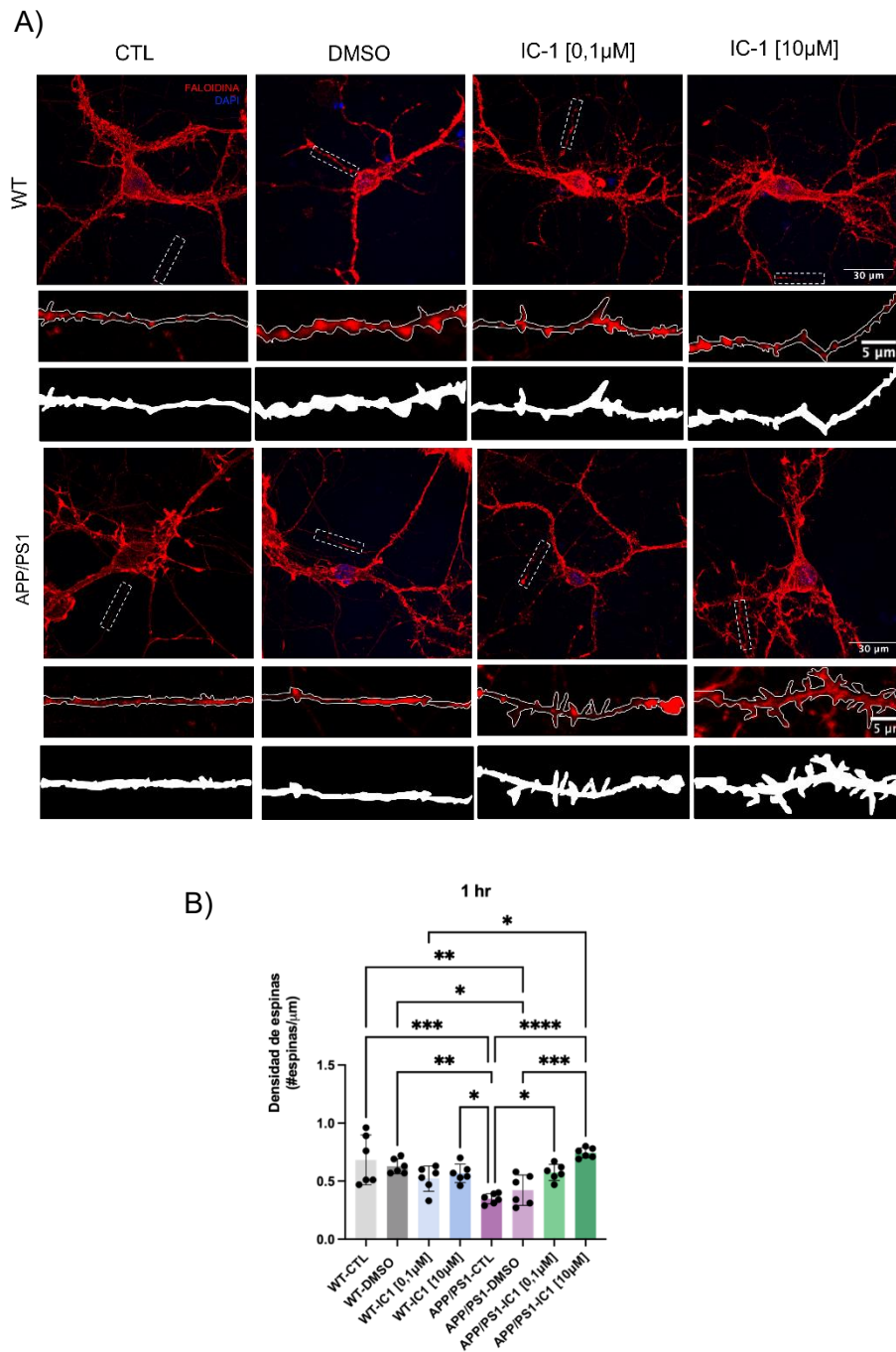


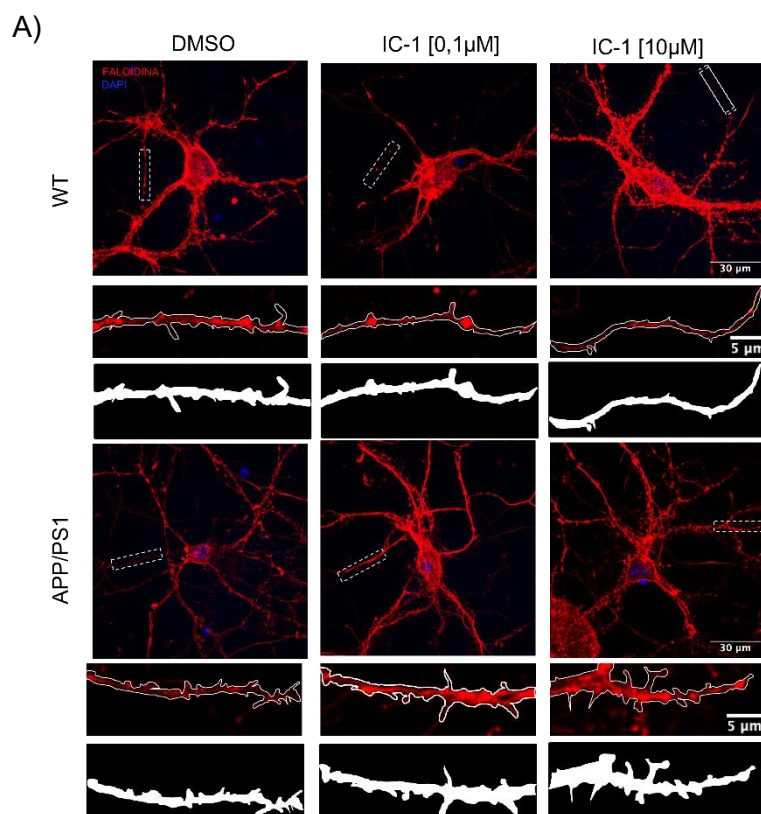
Figura 4: Efectos del inhibidor de calpaína I sobre la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales WT y APP/PS1 tras 1 hora de tratamiento. A) Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal (objetivo 100X) de neuronas hipocampales, tratadas al DIV 14 con IC1. Las neuronas fueron teñidas con falodina-rodaminaB (rojo) y DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas para todas las condiciones experimentales correspondientes a control sin tratamiento (CTL), vehículo DMSO, e inhibidor de calpaína I (IC1) a 0,1 y 10 μ M, tanto para el genotipo WT (fila superior) como para las neuronas APP/PS1 (fila inferior). Los ROIs (recuadros punteados) se amplían en la parte inferior para una mejor visualización de la morfología de las espinas dendríticas. La barra de escala corresponde a 30 μ m en las imágenes neuronales y a 5 μ m en las ampliaciones de los segmentos dendríticos. Las imágenes permiten observar la pérdida de espinas en APP/PS1 CTL, comparado con WT CTL, así como una recuperación de las mismas con IC1, especialmente a 10 μ M. **B)**

Cuantificación de la densidad de espinas dendríticas (n° espinas/30 μ m) en las condiciones indicadas, para ambos genotipos. Los datos corresponden a la media $\pm$ error estándar de la media (SEM), evaluados mediante ANOVA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Con el objetivo de evaluar si los efectos de IC1 se mantienen o modifican tras una exposición prolongada, se analizó la densidad de espinas en los mismos genotipos, con las mismas condiciones experimentales luego de 8 horas de tratamiento con el inhibidor de calpaínas. Las neuronas fueron analizadas mediante microscopía confocal (objetivo 100X) tras la tinción con faloidina-rodaminaB y DAPI (Figura 5A).

Las neuronas tratadas con el vehículo DMSO o IC1 no presentaron cambios morfológicos evidentes en comparación al grupo WT-CTL, conservando una estructura sináptica y una densidad de espinas comparable entre condiciones. Esto fue confirmado por el análisis estadístico, donde no se observaron diferencias significativas entre WT-CTL y los grupos tratados, lo que sugiere que el tratamiento prolongado con IC1 no afecta la morfología sináptica en condiciones fisiológicas.

En contraste, las neuronas APP/PS1 sin tratamiento (APP/PS1-CTL) presentaron una disminución significativa en la densidad de espinas comparado con WT-CTL ($p < 0,001$), confirmando la alteración de este modelo. El tratamiento con IC1 durante 8 horas en el modelo de EA produjo un aumento significativo ($p < 0,01$) de la densidad de espinas, tanto para 10 μ M como para 0.1 μ M respecto al control, sugiriendo un efecto protector de IC1 sobre la integridad sináptica, aunque menos marcado que a 1 hora.



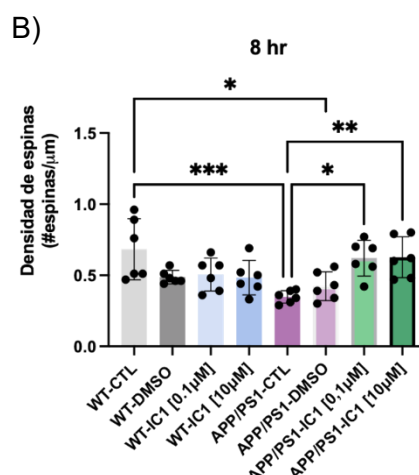


Figura 5: Efectos del inhibidor de calpaína I sobre la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales WT y APP/PS1 tras 8 horas de tratamiento. **A)** Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal (objetivo 100X) de neuronas hipocampales, tratadas al *DIV* 14 con IC1, teñidas con falodina-rodaminaB (rojo) y con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de todas las condiciones experimentales correspondientes a control sin tratamiento (CTL), vehículo DMSO, e inhibidor de calpaína I (IC1) a 0,1 y 10 μ M, tanto para el genotipo WT (fila superior), como para el genotipo APP/PS1 (fila inferior). Los ROIs (recuadros punteados) se amplían en la parte inferior para una mejor visualización de la morfología de las espinas dendríticas. La barra de escala corresponde a 30 μ m en las imágenes neuronales y a 5 μ m en las ampliaciones de los segmentos dendríticos. Las imágenes evidencian la pérdida de espinas en APP/PS1 CTL, comparado con WT CTL, así como una recuperación morfológica con IC1, a 0.1 y 10 μ M. **B)** Cuantificación de la densidad de espinas dendríticas (n° espinas/30 μ m) en las condiciones indicadas, para ambos genotipos. Los datos corresponden a la media $\pm$ error estándar de la media (SEM), evaluados mediante ANOVA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2 Efectos de inhibidor de calpaína I sobre la dinámica mitocondrial.

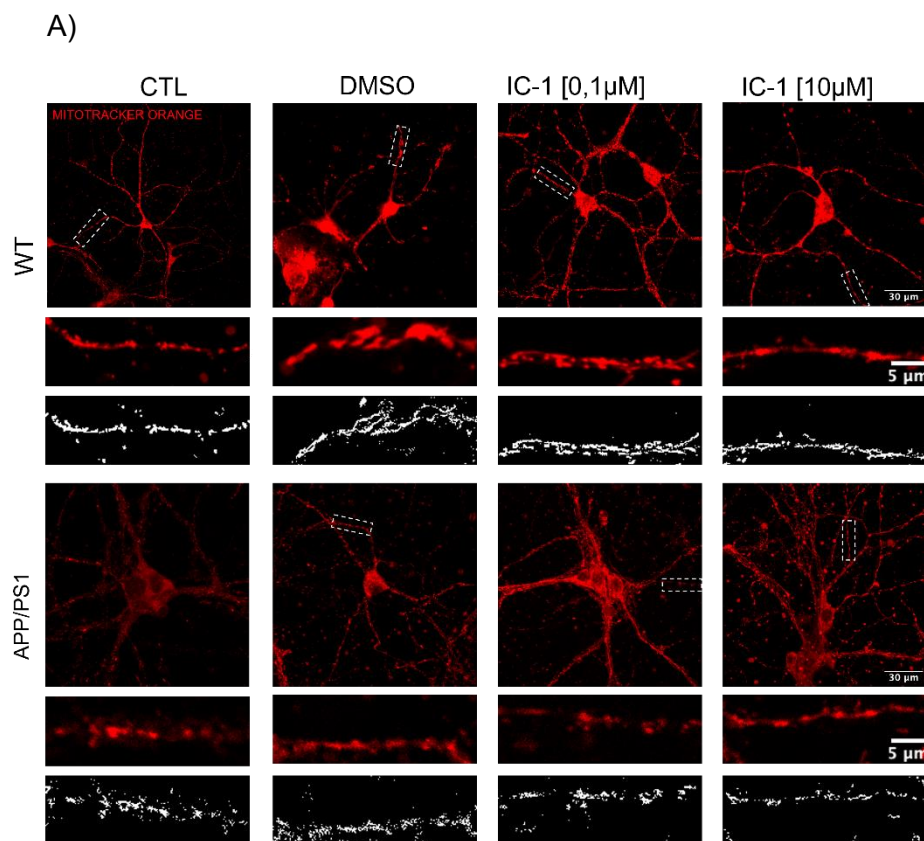
Se evaluó la densidad mitocondrial (el número de mitocondrias en un segmento de 30 μ m), así como el área de las mitocondrias visualizadas en neuronas hipocampales de ratones WT y APP/PS1 al *DIV* 14, tras 1 hora de tratamiento con IC1 a concentraciones de 0,1 μ M y 10 μ M, y con el vehículo DMSO. Para la visualización de las mitocondrias, las neuronas fueron incubadas durante 30 minutos con la sonda fluorescente Mitotracker-Orange a una concentración final de 0,1 μ M en solución extracelular (ANEXO 6). Esta sonda atraviesa pasivamente la membrana plasmática y se acumula en las mitocondrias funcionales, permitiendo su identificación en células vivas. Posteriormente, las neuronas fueron fijadas y montadas para su análisis mediante microscopía confocal, utilizando un objetivo de 40X con zoom de 2X (Figura 6A).

En cuanto a la densidad mitocondrial (número de mitocondrias por región de interés), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (Figura 6B). Sin embargo, se evidenció que el grupo APP/PS1-CTL presentó una mayor densidad de mitocondrias en comparación con el grupo WT-CTL, lo cual podría indicar un aumento de la fisión mitocondrial en el modelo patológico. Tras la administración de IC1 en neuronas APP/PS1, se observó una disminución progresiva de la densidad mitocondrial en una relación directamente proporcional a la concentración del inhibidor. Esto sugiere que la inhibición de calpaínas podría estar modulando la dinámica

mitocondrial, favoreciendo una menor fragmentación y promoviendo la fusión mitocondrial.

Por otro lado, el análisis del área mitocondrial sí reveló cambios estadísticamente significativos (Figura 6C). Específicamente en la condición WT-IC1 10 μ M, que presentó un aumento significativo del área mitocondrial en comparación con WT-CTL ($p < 0,01$) y WT-DMSO ($p < 0,01$). Este resultado indica que el tratamiento con IC1 a una alta concentración puede inducir un cambio morfológico en las mitocondrias bajo condiciones fisiológicas, posiblemente favoreciendo procesos de fusión.

En contraste, en el grupo APP/PS1 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones tratadas y el control. No obstante, se evidenció que el área mitocondrial en APP/PS1-CTL es visiblemente menor que en WT-CTL, lo cual es consistente con una morfología mitocondrial más fragmentada en el modelo patológico. Además, tras el tratamiento con IC1, se observó una leve tendencia al aumento del área mitocondrial, aunque sin alcanzar significancia estadística, lo que podría sugerir un posible efecto atenuado del inhibidor sobre la dinámica mitocondrial, al menos en este tiempo de tratamiento.



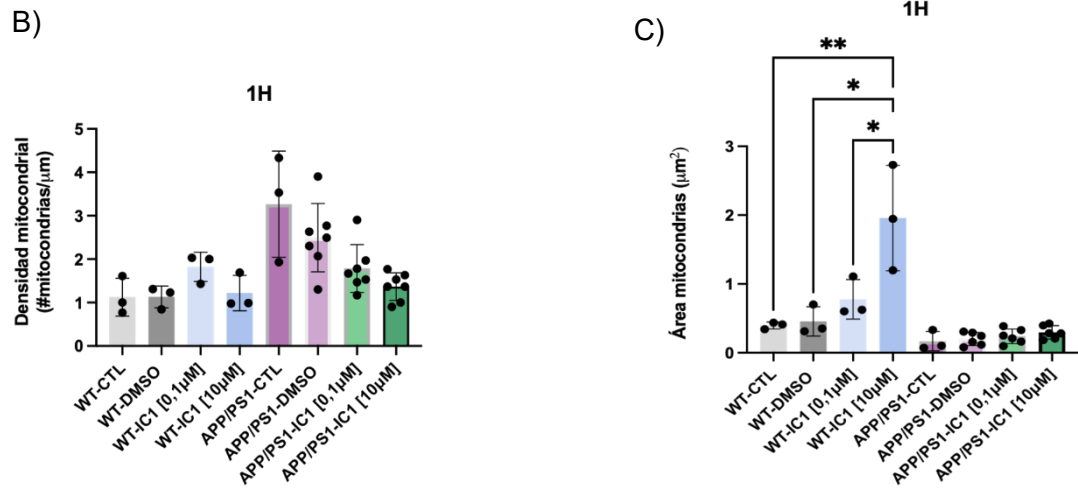


Figura 6: Evaluación de la dinámica mitocondrial en neuronas hipocampales WT y APP/PS1 tras el tratamiento con inhibidor de calpaína I. **A)** Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal (objetivo 40X + zoom 2X) de neuronas hipocampales teñidas con la sonda Mitotracker-Orange. Se muestran imágenes representativas a las condiciones de control (CTL), vehículo DMSO, e inhibidor de calpaína I (0,1 y 10 μM), tanto para el genotipo WT como APP/PS1. Las regiones de interés (ROIs) están destacadas con recuadros y ampliadas en la parte inferior para facilitar la observación de la red mitocondrial. Los análisis fueron realizados utilizando el software Image J. La barra de escala corresponde a 30 μm en las imágenes neuronales y a 5 μm en las ampliaciones de las regiones de interés (ROIs). **B)** Cuantificación de la densidad mitocondrial (número de mitocondrias por región de interés (30 μm)). Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre condiciones, se evidencia una tendencia a una mayor densidad mitocondrial en APP/PS1-CTL respecto a WT-CTL, así como una disminución progresiva de la densidad mitocondrial en APP/PS1 tratadas con IC1 en relación directa a la concentración. **C)** Cuantificación del área mitocondrial individual (μm²). Se observaron diferencias significativas únicamente dentro del grupo WT, donde la condición WT-IC1 10 μM mostró un aumento significativo en el área mitocondrial en comparación con WT-CTL y WT-DMSO. En el grupo APP/PS1 no se encontraron cambios estadísticamente significativos, aunque su control (APP/PS1-CTL) presentó un área menor que WT-CTL, con una leve tendencia al aumento tras tratamiento con IC1. Los datos corresponden a la media ± SEM. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías. $p < 0,05$; $p < 0,01$.

5. DISCUSIÓN

La (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo el cual se caracteriza por la acumulación de placas del péptido β -amiloide (β A) (Zhang et al., 2024) y ovillos neurofibrilares compuestos por TAU hiperfosforilada y pérdida sináptica (Zhang et al., 2024), lo que conlleva a un deterioro progresivo de las funciones cognitivas. En los últimos años, se ha reconocido que eventos como la disfunción mitocondrial y la desorganización del citoesqueleto neuronal ocurren en etapas tempranas de la enfermedad (Eckert et al., 2011). Sin embargo, hasta la fecha no existen tratamientos capaces de combatir esta condición, por lo que resulta fundamental estudiar y mitigar los mecanismos patológicos que contribuyen a su desarrollo.

Para nuestra investigación usamos el modelo transgénico APP/PS1 el cual presenta mutaciones humanas en los genes APP (KM670/671NL) y presenilina 1 (PS1 M146L) (Jankowsky et al., 2003). Esto promueve una acumulación acelerada de péptido β A, generando placas amiloides en etapas tempranas del desarrollo (Ahmad et al., 2018).

En cultivos hipocampales del modelo APP/PS1 al *DIV* 14, se ha observado un aumento en los niveles de A β 42, reflejando estas alteraciones de manera temprana *in vitro* (Ahmad et al., 2018). Estas alteraciones se reflejan con la disminución de densidad de espinas dendríticas (Subramanian et al., 2020), lo que indica pérdida de sinapsis funcionales. Por otro lado, se han observado alteraciones mitocondriales, tanto de transporte, distribución y dinámica mitocondrial en neuronas del modelo APP/PS1 (Trushina et al., 2012). Estas disfunciones también se han asociado con un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, en cultivos neuronales del modelo APP/PS1 contribuyendo al estrés oxidativo, características de esta patología (Yang, et al 2012):

En el contexto de EA las calpaínas se encuentran sobreactivadas debido a la disrupción la homeostasis del calcio intracelular, causada principalmente por la acción de oligómeros de A β sobre receptores NMDA y canales de calcio (Mahaman et al., 2018). Esta sobreactivación conduce a la degradación proteolítica desregulada de múltiples proteínas esenciales para la función neuronal. Se ha reportado que las calpaínas tienen más de 100 posibles sustratos proteolíticos, incluyendo proteínas, tales como PSD-95, entre otras (Mahaman et al., 2018). Esta actividad proteolítica contribuye al deterioro estructural y funcional neuronal observado en la EA. Entre estos sustratos, destacan las proteínas de la superfamilia de las dinaminas, como DNM1, DNM2 (Kelly et al., 2005) y DRP1 (Jiang et al., 2019), las cuales han sido identificadas como sustratos de calpaína.

Es por esto que en esta Unidad de Investigación se propuso estudiar los efectos del inhibidor de calpaína I (IC1), suponiendo que al modular la actividad de las calpaínas podría prevenirse la degradación proteolítica de las dinaminas en la EA y así evitar las alteraciones morfológicas y en la dinámica mitocondrial que ocurren tempranamente en la enfermedad.

Existen diversos inhibidores de calpaína disponibles comercialmente, los cuales varían en especificidad, mecanismo de acción y eficacia (Khan et al., 2022). Entre ellos se encuentran inhibidores peptídicos como el calpeptina, calpastatina recombinante, MDL28170 y el inhibidor de calpaína I utilizado en esta Unidad de Investigación. Este último es un aldehído tripéptido sintético (N-Acetil-Leu-Leu-norleucinal) que actúa como un inhibidor competitivo reversible, uniéndose al sitio activo de la calpaína a través de su grupo aldehído, que interactúa con el residuo catalítico de cisteína (Sigma-Aldrich, 2024). Este mecanismo impide la actividad proteolítica de calpaína, a concentraciones

elevadas puede también inhibir otras cisteína-proteasas como catepsinas B y L (Sigma-Aldrich, 2024). En estudios previos en cultivos neuronales hipocampales se demostró que este inhibidor es capaz de prevenir la muerte neuronal inducida por glutamato (Rami et al., 1997), confirmando su acción neuroprotectora dependiente de calpaína. Las concentraciones utilizadas en este estudio (0,1 μ M y 10 μ M) fueron seleccionadas en base a dicha evidencia (Rami et al., 1997), con el objetivo de cubrir un rango amplio que permitiera detectar posibles efectos diferenciales, tanto en estructura sináptica como en dinámica mitocondrial, sin generar toxicidad ni interferencias en otras rutas celulares.

Los resultados demostraron que hay una disminución significativa de la densidad de espinas dendríticas en neuronas APP/PS1 comparadas con WT, lo que coincide con los antecedentes previamente mencionados (Subramanian et al., 2020). Al tratar las neuronas con IC1, observamos una recuperación significativa de la densidad de espinas en APP/PS1, alcanzando niveles comparables a WT-CTL tanto a 1 hora de tratamiento como a las 8 horas, siendo más significativo el aumento a la hora de tratamiento.

Las diferencias observadas entre tratamientos podrían explicarse por los tiempos de acción que tiene el inhibidor sobre las proteínas que regulan la estructura sináptica, en este caso el foco de este estudio fueron las DSP, no obstante calpaína es capaz de procesar proteolíticamente diversas proteínas sinápticas como NMDAR y PSD95 (Mahaman et al., 2018), lo que podría también influenciar el estado de la estructura sináptica en las espinas dendríticas analizadas, a una ventana temporal distinta. Es posible que a corto plazo el efecto del inhibidor sea más directo y rápido, “protegiendo” a las DSPs de ser degradadas por calpaína. En cambio, cuando el tratamiento se extiende por más tiempo, podrían activarse otras respuestas celulares que modifiquen o contrarresten el efecto del inhibidor.

Los resultados referentes a la densidad de espinas dendríticas sugieren fuertemente que IC1 ejerce un efecto protector sobre la morfología sináptica que se encuentra alterada en el modelo de EA. De igual manera, no se observó efecto en neuronas WT, lo que sugiere que el tratamiento no afecta la morfología en condiciones fisiológicas.

Los datos respaldan la hipótesis de que los efectos de IC1 en la preservación de espinas dendríticas podrían estar ligados a la inhibición de la degradación de dinaminas. Esto, considerando que se ha descrito en condiciones en que la función de las dinaminas está alterada, se produce una disminución de la complejidad dendrítica, así como una reducción de la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales (Arriagada et al., 2023), por lo que el efecto protector sobre la densidad de espinas observado en esta Unidad de Investigación puede correlacionarse con la inhibición de la degradación proteolítica de las dinaminas con IC1. Sin embargo, para confirmar esta relación, sería necesario evaluar si el tratamiento con IC1 previene efectivamente la degradación proteolítica de dinaminas en cultivos neuronales mediante ensayos bioquímicos como Western blot.

Adicionalmente, y a pesar de que los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en la densidad de espinas dendríticas tras el tratamiento con IC1 en neuronas APP/PS1, es necesario complementar este análisis morfológico con evaluaciones más específicas que permitan caracterizar con mayor profundidad la complejidad de la arborización dendrítica. Por ejemplo, la aplicación del análisis de Sholl permitiría cuantificar el grado de ramificación y la extensión del árbol dendrítico, proporcionando información sobre la madurez estructural de las neuronas. Asimismo, un análisis de la forma de las espinas dendríticas permitiría clasificar las protrusiones según su forma (tipo hongo, filopodias, stubby, entre otras), lo que es relevante dado

que las espinas tipo hongo se asocian a sinapsis estables y funcionales, mientras que las filopodias suelen representar espinas inmaduras o inestables (Kasai et al., 2003). Este nivel de detalle permitiría determinar si el aumento de densidad observado refleja una recuperación funcional sináptica real o una respuesta morfológica parcial.

Respecto a la dinámica mitocondrial, si bien no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la densidad mitocondrial en las neuronas tratadas con IC1, se observó que las neuronas APP/PS1-CTL presentaron un mayor número de mitocondrias en comparación con las neuronas WT-CTL, lo cual coincide con lo reportado en estudios previos (Xu et al., 2018). Este hallazgo se asocia a un desequilibrio en los procesos de fisión y fusión mitocondrial, característico del contexto patológico de la EA (Bonda et al., 2010). Tras el tratamiento con IC1, se evidenció una disminución progresiva en el número de mitocondrias, lo que podría interpretarse como una reducción en los eventos de fisión mitocondrial. Este efecto puede estar relacionado con la inhibición de la actividad de DRP1, una proteína clave en el proceso de fisión. Estudios han demostrado que DRP1 es un sustrato directo de la calpaína, y que su clivaje por esta proteasa genera formas disfuncionales que promueven una fragmentación mitocondrial excesiva (Jiang et al., 2019). Por lo tanto, la inhibición de calpaína mediante IC1 podría prevenir la proteólisis de DRP1, reduciendo su actividad aberrante y favoreciendo una dinámica mitocondrial más equilibrada y funcional.

Por otro lado, en cuanto al área mitocondrial, se observó que el tratamiento con IC1 10 μ M aumentó significativamente el área de las mitocondrias en las neuronas WT. Esto podría deberse a que en condiciones fisiológicas, la dinámica mitocondrial está equilibrada, por lo tanto, al inhibir a calpaína esto se altera, favoreciendo una disminución de la fisión o un aumento en la fusión, lo que explicaría el aumento del área mitocondrial.

Mientras que en el modelo APP/PS1 no se observaron cambios estadísticamente significativos en el área mitocondrial tras el tratamiento con IC1; sin embargo, se evidenció una tendencia al aumento en el área de las mitocondrias APP/PS1 respecto al grupo control. Esta observación es coherente con la fisiopatología de la EA, en la que se ha descrito una sobreactivación de calpaínas que conduce a una proteólisis anormal de DRP1. Esta degradación genera fragmentos disfuncionales de DRP1 que alteran su función y promueven una fisión mitocondrial excesiva, lo que contribuye a una dinámica mitocondrial desbalanceada, caracterizada por un mayor número de mitocondrias de menor tamaño (Jiang et al., 2019). En este contexto, la inhibición de calpaína mediante IC1 podría prevenir la proteólisis aberrante de DRP1, permitiendo conservar su forma funcional y restaurar parcialmente el equilibrio en la dinámica mitocondrial. Como consecuencia, se observarían mitocondrias de mayor tamaño y menor fragmentación, lo que concuerda con nuestros resultados, pese a no alcanzar significancia estadística.

Dado que la dinámica mitocondrial es el resultado de un equilibrio entre los procesos de fisión y fusión, sería pertinente en estudios futuros evaluar si la actividad de calpaína también afecta a otras proteínas involucradas en estos mecanismos, como MFN1, MFN2 y OPA1 (Han et al., 2023). Además, considerando que las mitocondrias son organelos altamente complejos con funciones esenciales para la actividad neuronal, sería importante complementar los análisis morfológicos con evaluaciones funcionales de las mitocondrias, como por ejemplo la producción de especies reactivas de oxígeno, niveles de ATP, potencial de membrana mitocondrial, entre otros. Estos parámetros permitirían determinar si los efectos observados sobre la morfología mitocondrial se asocian también a una mejora en el desempeño energético y funcional de las mitocondrias.

En síntesis, los resultados obtenidos en esta Unidad de Investigación aportan evidencia que respalda el potencial terapéutico de la inhibición de calpaínas en el contexto de la enfermedad de Alzheimer. La recuperación de la densidad de espinas dendríticas y la tendencia a una dinámica mitocondrial más equilibrada tras el tratamiento con IC1 pueden ser explicados por la prevención de la degradación proteolítica de proteínas de la superfamilia de las dinaminas. Estas proteínas, esenciales tanto para el mantenimiento de la estructura sináptica (Arriagada-Díaz et al., 2020). Como para la regulación de la fisión mitocondrial (Jiang et al., 2019), se ven afectadas negativamente por la sobreactivación de calpaína en condiciones patológicas (Kelly et al., 2005). Al inhibir a las calpaínas con IC1 se preservaría la funcionalidad de dinaminas como DNM1, DNM2 y DRP1, lo que permitiría mantener la integridad sináptica y mitocondrial. Así, los efectos positivos observados en este estudio no sólo reafirman el vínculo entre calpaína y disfunción neuronal en EA, sino que también posicionan a las dinaminas como un punto de convergencia clave y potencial blanco para futuras intervenciones terapéuticas.

6.CONCLUSIÓN.

Los resultados obtenidos en esta unidad de investigación respaldan la hipótesis planteada: la inhibición de las calpaínas previene la pérdida de estructura sináptica en el contexto de EA. En cuanto a la dinámica mitocondrial, si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas, se evidenciaron tendencias que sugieren una posible modulación por parte del inhibidor IC1, tanto en la densidad como en el área de las mitocondrias.

En el contexto del objetivo específico 1 se observó una **disminución significativa en la densidad de espinas dendríticas en neuronas APP/PS1 en comparación con neuronas WT, fenómeno que fue prevenido por el tratamiento con IC1**, restaurando los niveles de espinas a valores comparables al control. Este efecto se interpreta como una consecuencia de la preservación de proteínas estructurales sensibles a la proteólisis por calpaína, como las dinaminas, esenciales para la estabilidad y maduración de las espinas dendríticas.

Respecto al objetivo específico 2, los análisis de dinámica mitocondrial revelaron una tendencia a la **reducción del número de mitocondrias y al aumento de su área tras el tratamiento con IC1**, particularmente en el modelo APP/PS1. Aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos, se alinean con la hipótesis de que la inhibición de calpaína evita la degradación aberrante de DRP1, proteína clave en la fisión mitocondrial, favoreciendo así una morfología mitocondrial más equilibrada.

En conjunto, esta investigación aporta evidencia morfológica que refuerza el rol patológico de la calpaína en la EA y destaca a las proteínas de la superfamilia de las dinaminas como elementos centrales afectados por su actividad. Asimismo, posiciona al inhibidor IC1 como una herramienta útil para explorar estrategias terapéuticas dirigidas a preservar la función sináptica y mitocondrial en etapas tempranas de la enfermedad.

7. REFERENCIAS

1. Ahmad, F., Das, D., Kommaddi, R. P., Diwakar, L., et al. (2018). Isoform-specific hyperactivation of calpain-2 occurs presymptotically at the synapse in Alzheimer's disease mice and correlates with memory deficits in human subjects. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31073-6>
2. Aidaraliev, N. J., Kamino, K., Kimura, R., et al. (2008). Dynamin 2 gene is a novel susceptibility gene for late-onset Alzheimer disease in non-APOE- ϵ 4 carriers. *Journal of Human Genetics*, 53(4), 296–302. <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0251-9>
3. Arriagada-Diaz, J., Prado-Vega, L., et al. (2020). Dynamin Superfamily at Pre- and Postsynapses: Master Regulators of Synaptic Transmission and Plasticity in Health and Disease. *The Neuroscientist*, 28(1), 41–58. <https://doi.org/10.1177/1073858420974313>
4. Arriagada-Diaz, J., Flores-Muñoz, C., et al. (2023). A centronuclear myopathy-causing mutation in dynamin-2 disrupts neuronal morphology and excitatory synaptic transmission in a murine model of the disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 49(4). <https://doi.org/10.1111/nan.12918>
5. Austin, T., Qiang, L., & Baas, P. (2017). Mechanisms of Neuronal Microtubule Loss in Alzheimer's Disease. En *Elsevier eBooks*(pp. 59-71). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803690-7.00004-1>
6. Baek, S. H., Park, S. J., et al. (2017). Inhibition of Drp1 Ameliorates Synaptic Depression, A β Deposition, and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *Journal of Neuroscience*, 37(20), 5099–5110. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2385-16.2017>
7. Baglietto-Vargas, D., Prieto, G. A., et al. (2018). Impaired AMPA signaling and cytoskeletal alterations induce early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 17(4). <https://doi.org/10.1111/accel.12791>
8. Baloyannis, S. J. (2006). Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 9(2), 119–126. <https://doi.org/10.3233/jad-2006-9204>
9. Bera, A., Lavanya, G., et al. (2022). Mechanistic and therapeutic role of Drp1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 56(9), 5516–5531. <https://doi.org/10.1111/ejn.15611>
10. Bertholet, A., Delerue, T., et al. (2015). Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiology of Disease*, 90, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.011>
11. Bonda, D. J., Wang, X., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2010). Mitochondrial Dynamics in Alzheimer's Disease. *Drugs & Aging*, 27(3), 181-192. <https://doi.org/10.2165/11532140-000000000-00000>
12. Borovac, J., Bosch, M., & Okamoto, K. (2018). Regulation of actin dynamics during structural plasticity of dendritic spines: Signaling messengers and actin-binding proteins. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 91, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.07.001>

13. Calpain Inhibitor I N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal, synthetic 110044-82-1. (s. f.). <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/product/roche/11086090001>
14. Chowdhury, S., Shepherd, J. D., et al. (2006). ARC/ARG3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 52(3), 445–459.
15. Dell, R. B., Holleran, S., & Ramakrishnan, R. (2002). Sample size determination. *ILAR Journal*, 43(4), 207–213. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.207>
16. Demencia - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/demencia>
17. Dorostkar, M. M., Zou, C., et al. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathologica*, 130, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1449-5>
18. Drew, L. (2018). An age-old story of dementia. *Nature*, 559(7715), S2–S3. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05718-5>
19. Eckert, A., Schmitt, K., & Götz, J. (2011). Mitochondrial dysfunction - the beginning of the end in Alzheimer's disease? *Alzheimer's Research & Therapy*, 3(2), 15. <https://doi.org/10.1186/alzrt74>
20. Goll, D. E., Thompson, V. F., et al. (2003). The Calpain system. *Physiological Reviews*, 83(3), 731–801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>
21. Gu, Y. Y., Zhao, X. R., et al. (2024). Mitochondrial dysfunction as a therapeutic strategy for neurodegenerative diseases: Current insights and future directions. *Ageing Research Reviews*, 102, 102577. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102577>
22. Han, Y., Liu, D., Cheng, Y., Ji, Q., Liu, M., Zhang, B., & Zhou, S. (2023). Maintenance of mitochondrial homeostasis for Alzheimer's disease: Strategies and challenges. *Redox Biology*, 63, 102734. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102734>
23. Hering, H., & Sheng, M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 880–888. <https://doi.org/10.1038/35104061>
24. Jacobsen, J. S., Wu, C., et al. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS*, 103(13), 5161–5166.
25. Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., et al. (2003). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo. *Human Molecular Genetics*, 13(2), 159–170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>
26. Jiang, S., Shao, C., et al. (2019). Dynamin-like protein 1 cleavage by calpain in Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 18(3). <https://doi.org/10.1111/ace1.12912>
27. Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends In Neurosciences*, 26(7), 360–368. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(03\)00162-0](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(03)00162-0)
28. Khan, H., Garg, N., Singh, T. G., Kaur, A., & Thapa, K. (2022). Calpain Inhibitors as Potential Therapeutic Modulators in Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Research*, 47(5), 1125–1149. <https://doi.org/10.1007/s11064->

021-03521-9

29. Kelly, B. L., Vassar, R., & Ferreira, A. (2005). β -Amyloid-induced Dynamin 1 Depletion in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31746–31753. <https://doi.org/10.1074/jbc.m503259200>
30. Kommaddi, R. P., Das, D., et al. (2017). A β mediates F-actin disassembly in dendritic spines leading to cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 38(5), 1085–1099. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2127-17.2017>
31. Mahaman, Y. A. R., Huang, F., et al. (2018). Involvement of calpain in the neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews*, 39(2), 608–630. <https://doi.org/10.1002/med.21534>
32. Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., et al. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1086–1092. <https://doi.org/10.1038/nn736>
33. Mijalkov, M., Volpe, G., et al. (2021). Dendritic spines are lost in clusters in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91726-x>
34. Ministerio de Salud – Gobierno de Chile. Plan de Acción Salud Mental 2019–2025. (s. f.)
35. Misrani, A., Tabassum, S., et al. (2021). Mitochondrial Deficits With Neural and Social Damage in Early-Stage Alzheimer's Disease Model Mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.748388>
36. Oddo, S., Caccamo, A., et al. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron*, 39(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00434-3)
37. Ono, Y., & Sorimachi, H. (2011). Calpains — An elaborate proteolytic system. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.005>
38. Ono, Y., Saido, T., & Sorimachi, H. (2016). Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15, 854–876. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.212>
39. Overk, C. R., & Masliah, E. (2014). Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.015>
40. Rami, A., Fergar, D., & Krieglstein, J. (1997). Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neuroscience Research*, 27(1), 93–97. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(96\)01123-6](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(96)01123-6)
41. Sharma, A., Sari, E., et al. (2023). Extracellular CIRP Induces Calpain Activation in Neurons via PLC-IP3-Dependent Calcium Pathway. *Molecular Neurobiology*, 60(6), 3311–3328. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03273-3>
42. Stefen, H., Chaichim, C., et al. (2016). Regulation of the Postsynaptic Compartment of Excitatory Synapses by the Actin Cytoskeleton in Health and Its Disruption in Disease. *Neural Plasticity*, 2016, 1–19.

<https://doi.org/10.1155/2016/2371970>

43. Subramanian, J., Savage, J. C., & Tremblay, M. (2020). Synaptic Loss in Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights Provided by Two-Photon in vivo Imaging of Transgenic Mouse Models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.592607>
44. Trushina, E., Nemutlu, E., et al. (2012). Defects in Mitochondrial Dynamics and Metabolomic Signatures of Evolving Energetic Stress in Mouse Models of Familial Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 7(2), e32737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032737>
45. Von Bernhardt, R. (2005). Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 43(2), 111–121.
46. Xu, Y., Mei, Y., et al. (2018). Ligustilide Ameliorates Memory Deficiency in APP/PS1 Transgenic Mice via Restoring Mitochondrial Dysfunction. *BioMed Research International*, 2018, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2018/4606752>
47. Yang, B., Sun, X., Lashuel, H., & Zhang, Y. (2012). Reactive oxidative species enhance amyloid toxicity in APP/PS1 mouse neurons. *Neuroscience Bulletin*, 28(3), 233-239. <https://doi.org/10.1007/s12264-012-1239-1>
48. Zhang, J., Zhang, Y., Wang, J., Xia, Y., Zhang, J., & Chen, L. (2024). Recent advances in Alzheimer's disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01911-3>

8. ANEXOS.

ANEXO 1. Acta de aprobación bioética BEA 192-23 del proyecto FONDECYT 1231511.



ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA CÓDIGO: BEA192-23

El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso (CICUAL-UV), con fecha 19 de abril de 2023 declara haber evaluado el siguiente protocolo experimental:

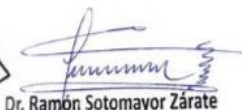
INVESTIGADOR RESPONSABLE	: Dra. Arlek González Jamett
TÍTULO DEL PROYECTO	: Contribución de la actividad de las dinaminas a la sinaptopatía dependiente del citoesqueleto neuronal en la enfermedad de Alzheimer
FINANCIAMIENTO	: FONDECYT REGULAR 2023
CÓDIGO DEL PROYECTO	: N° 1231511
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	: BEA192-23

Para su evaluación, el Comité revisó los antecedentes presentados en el formulario CICUAL-F-01-FORMULARIO DE SOLICITUD DE APROBACIÓN PARA INVESTIGACIÓN EN ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN y que se señalan en las páginas anexas a esta acta. En la valoración bioética, el Comité consideró procedentes los aspectos indicados en el formulario y estima que no hay objeciones para el uso de animales propuesto en este proyecto. Por lo anterior, el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio aprueba este protocolo experimental por la duración total del proyecto a contar de la fecha de aprobación.

El Investigador Responsable se debe asegurar que todas las personas involucradas en el protocolo e individualizadas en el formulario de solicitud se hayan capacitado en la realización de los procedimientos indicados en éste. Además, debe considerar los siguientes:

- Si requiere cambiar cualquier aspecto de este estudio, como objetivos, personal, patrocinadores, procedimientos, entre otros, deberá enviar una SOLICITUD DE ENMIENDA (CICUAL-F-05-FORMULARIO) al correo cicual@uv.cl. Los cambios solicitados no se deben iniciar hasta que el CICUAL-UV no haya aprobado la enmienda.
- Al inicio del último año del proyecto, el Investigador Responsable deberá enviar una SOLICITUD DE SEGUIMIENTO (CICUAL-F-03-FORMULARIO) al correo cicual@uv.cl. Sin perjuicio de lo anterior, CICUAL-UV podrá solicitar seguimiento a su proyecto en cualquier momento del mismo.
- El último trimestre del proyecto, el Investigador Responsable deberá enviar una SOLICITUD DE CIERRE (CICUAL-F-11-FORMULARIO) al correo cicual@uv.cl. Una vez emitida el acta de cierre, el Investigador Responsable no podrá utilizar más animales asociados al proyecto de investigación.
- Es deber del Investigador Responsable, mantener actualizados los registros de procedimientos realizados con animales. Estos serán revisados por el CICUAL-UV en las actividades de seguimiento del protocolo aprobado.
- El no cumplimiento de este protocolo puede significar que el proyecto no obtenga el cierre oficial por parte de CICUAL-UV, imposibilitando al Investigador Responsable a postular y adjudicar otro fondo de financiamiento para investigación.




Dr. Ramón Sotomayor Zárate
Instituto De Fisiología
Facultad De Ciencias
Universidad Valparaíso
Presidente CICUAL-UV



Montaña 885, Viña del Mar | Fono: +56 (32) 250 7000 | E-mail: cicual@uv.cl | 

ANEXO 2. Genotipificación de ADN de colas de ratón. Utilizando Kit Kappa Biosystems.

Se recolectaron fragmentos de cola de ratón de aproximadamente 1–2 mm de longitud, los cuales fueron almacenados a -20°C en un tubo eppendorf hasta el momento de la genotipificación. Todo el procedimiento se lleva a cabo en un mesón exclusivo, designado como zona libre de ARNasa (*RNAase-free*), el cual, junto con el material de trabajo, debe ser desinfectado previamente con etanol al 70 %.

Los partidores utilizados fueron los siguientes, dirigidos a las siguientes mutaciones:

APP: Fw: AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG (#OIMR3610); Rv: CGG GGG TCT AGT TCT GCA T (#OIMR3611); Banda esperada: 377 pb.

PS1: Fw: ATA GAG ACG GCA GGA GCA (#OIMR1644); Rv: GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT (#OIMR1645); Banda esperada: 608 pb.

Control positivo interno (WT): Fw: CTA GGC CAC AGA ATG AAA GAT CT (#OIMR7338); Rv: GTA GGT GGA ATT CTA GCA TCA TCC (#OIMR7339); Banda esperada: 324 pb.

1) Extracción de ADN.

1.1) Preparar la solución de extracción de ADN, esto se realiza por cada muestra.

Agua PCR	88 uL
EXPRESS EXTRACT ENZYME	2 uL
KAPA EXPRESS EXTRACT BUFFER 10X	10 uL

1.2) Vortex + spin.

1.3) Incubar a 75°C por 10 minutos.

1.4) Incubar a 90°C por 5 minutos.

1.5) Centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto.

1.6) Rescatar el sobrenadante (50uL aproximadamente) y llevar a otro tubo.

2) Realizar PCR.

2.1) Preparar MIX para PCR. Se debe considerar el número total de animales, además de un control negativo, el cual en lugar de templado debe tener 1µL de agua PCR. Usar tubos para PCR.

Agua PCR	9 uL
Master mix (Dream tag green)	12,5 uL
Primers	1,25 uL c.u.
Templado ADN	1 uL

2.2) Llevar muestras al termociclador.

Programa PCR	
Temperatura (°C)	Tiempo
94	3 minutos (desnaturalización inicial)
94	30 segundos
52	1 minuto (alineamiento)
72	1 minuto (extensión)
72	2 minutos (extensión final)

Los pasos 2 a 4 se repitieron durante 35 ciclos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3) Preparación gel de agarosa.

3.1) Añadir 1,25 gramos de agarosa en 75 mL de buffer TAE 1X, en agitador magnético con manta calefactora, hasta que la agarosa se disuelva. Quedando un gel de agarosa a una concentración de 1,67%.

3.2) Añadir 8 uL de GelStar Nucleic Acid Gel Stain al 0,001% para su revelado.

3.3) Llevar a cámara y esperar gelificación.

3.4) Agregar buffer TAE 1X.

3.5) Cargar muestras.

3.6) Conectar a fuente de poder a 70 V.

4) Revelado

Visualizar las bandas mediante transiluminación con luz UV.

ANEXO 3. Cultivo neuronal hipocampal de ratón.

Todo procedimiento debe realizarse bajo condiciones estériles, en una campana de flujo laminar, utilizando material estéril y manteniendo normas de bioseguridad.

1. Preparación de covers.

1.1) Lavar cuidadosamente los covers con etanol al 70 % y colocarlos en las placas multipocillo que se utilizarán posteriormente.

1.2) Añadir suficiente solución de poli-Lisina D (Gibco, #A3890401) para cubrir completamente la superficie del covers.

1.3) Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

1.4) Lavar tres veces con agua estéril o autoclavada.

1.5) Antes de sembrar las neuronas, añadir 800 μ L de MEM por pocillo y mantener en incubadora a 37 °C.

2. Extracción de cerebro y disección del hipocampo.

2.1) Esterilizar previamente todo el material quirúrgico con etanol al 70 %.

2.2) Realizar decapitación rápida del neonato (P0–P2) y extraer cuidadosamente el cerebro.

2.3) Transferir el cerebro inmediatamente a una placa de Petri con HBSS frío.

2.4) Separar ambos hemisferios y extraer los hipocampos.

2.5) Depositar los hipocampos en un tubo Eppendorf con 450 μ L de HBSS estéril y frío.

3. Preparación y siembra del cultivo

3.1) Lavar los hipocampos cuidadosamente con HBSS

- 3.2) Añadir 50 μ L de tripsina al tubo e incubar durante 15 minutos a 37 °C.
- 3.3) Posteriormente, agregar 20 μ L de DNAasa para facilitar la disgregación enzimática durante 2 minutos.
- 3.4) Retirar la solución y reemplazar con 450 μ L de MEM.
- 3.5) Realizar dos lavados adicionales con MEM.
- 3.6) Disgregar mecánicamente los hipocampos mediante pipeteo suave: primero con una pipeta P1000, luego con una P200, hasta obtener una suspensión homogénea.
- 3.7) Transferir el material disgregado a un tubo Falcon con 3.5 mL de MEM.
- 3.8) Sembrar las neuronas sobre los covers previamente preparados.
- 3.9) Incubar a durante 1 a 3 horas para favorecer la adhesión celular.
- 3.10) Luego, retirar el MEM y reemplazarlo por Neurobasal (NB) completo, manteniendo las células en incubación.
- 4) Control de proliferación:** 48 horas posterior a la siembra añadir AraC a concentración 1 μ M, dejar incubar 24 horas, para luego cambiar todo el medio por NB complementado fresco.

ANEXO 4. Soluciones usadas en cultivo neuronal primario.

Soluciones usadas en cultivo neuronal primario	
Solución Hank (500mL)	
- HBSS 1X (libre de calcio y magnesio) (stock 10X).....	482 mL
- D-glucosa 0.1% (20%).....	500 μ L
- HEPES 10mM (pH 7.3).....	5 mL
- Piruvato 1X (stock 100X, 11 mg/mL) (pH 7,4).....	5 mL
- Penicilina/Estreptomicina 1X (stock 100X).....	5 mL
Medio esencial mínimo (100)	
- 1 Sobre MEM (contiene glutamina) + bicarbonato.....	86,5 mL

- Agua milliQ 2 mL - Glucosa 0.5% p/v.....500 µL - Piruvato de Na.....1 mL - Suero fetal bovino 10 mL - Penicilina/Estreptomicina 5 mL Ajustar a pH 7,2. Filtrar bajo la campana.
Neurobasal complementado (50mL) - Neurobasal 48 mL - B27 1 mL - Glutamax 500 µL - Penicilina/Estreptomicina 500 µL
Solución extracelular (50mL) - Solución salina (stock10X).....5 mL - Glucosa (stock 33mM) 1 mL - Penicilina/Estreptomicina 500 µL - Cloruro de calcio (1M) 65 µL - Cloruro de calcio (1M) 62,5 µL Aforar a 50 mL con agua milliQ
Buffer fosfato salino (PBS 1X) - NaCl.....8 g - KCl.....0,2 g - Na₂HPO₄..... 1,44 g - KH₂PO₄..... 0,24 g Ajustar pH 7,4 Aforar 1 L

ANEXO 5. Tratamiento IC1.

1) Disolver liofilizado de IC1 en 500 µL de DMSO. Quedando un stock de concentración 26mM.

2) Llevar a un substock de concentración 100 µM de volumen final 2500µL

$$26 \text{ mM} * V1 = 100 \mu\text{M} * 2500 \mu\text{L}$$

$$V1 = 9,615$$

3) Tomar 9,615 μL del stock 26mM IC1 y diluirlo en 2490 μL de NB completo.

3.1) Repetir con DMSO: 9,516 μL + 2490 μL NB completo. Quedando DMSO 0,3846%

4) Llevar a concentraciones de tratamiento.

4.1) Llevar a 0.1 μM , considerando volumen final 500 μL

$$100\mu\text{M} * V1 = 0.1 \mu\text{M} * 500 \mu\text{L}$$

$$V1 = 0,5\mu\text{L}$$

4.2) Llevar a 10 μM considerando volumen final 500 μL

$$100 * V1 = 10 \mu\text{M} * 500\mu\text{L}$$

$$V1 = 50\mu\text{L}$$

5) Añadir 0.5 μL o 50 μL según corresponda.

5.1) Repetir con DMSO. Considerar volumen final de 500 μL de NB complementado. Tomando 50 μL DMSO 0,038%.

6) Dejar en incubadora durante los tiempos propuestos.

ANEXO 6. Tinción con Mitotracker-Orange.

Todo el procedimiento debe realizarse en oscuridad y utilizando tubos ámbar.

1) Diluir el vial en 117 μL de DMSO. Quedando a un stock de concentración 1mM

2) Llevar a concentración 0,1 μM . Considerando el volumen final de 500 μL .

$$1\text{mM} * V1 = 0,1 \mu\text{M} * (500\mu\text{L} * n^{\circ} \text{ pocillos})$$

$$1\text{mM} * V1 = 0,1 \mu\text{M} * (500\mu\text{L} * 20)$$

$$V1 = 1 \mu\text{L}$$

Por lo tanto, se debe tomar 1 μL y diluir en 9,999 μL de solución extracelular.

3) Posterior a los tiempos de tratamientos 1 u 8 horas. Se debe incubar mitotracker. Agregando 500 μL .

4)Agregar 0,5 μ L o 50 μ L de tratamiento, según corresponda.

5)Incubar 30 minutos.

6)Realizar lavados con solución extracelular.

7)Fijar con PFA.

ANEXO 7. Resumen cultivos.

Genotipo	Fecha cultivo	Total Animales	Nº Animales APP/PS1	Animales utilizados	Aplicación
APP/PS1	14/03/2025	7	3	A3- A4	A3: CTL Faloidina-DAPI y Mitotracker-Orage. A4: CTL Faloidina-DAPI.
APP/PS1	28/05/2025	14	8	A1- A5- A6	A1 y A5: Faloidina-DAPI en todas las condiciones 1 y 8 hrs. A6: Mitotracker-Orage todas las condiciones 1 hora.
APP/PS1	17/06/2025	7	4	A2 - A3	A2: Mitotracker-Orange todas las condiciones 1 hora. A3: Faloidina-DAPI todas las condiciones 8 hrs.
WT	16/05/2025	9	N/A	A1-A2-A3-A4-A5	A1-A2-A3-A4: Faloidina-DAPI todas las condiciones 1 y 8 hrs. A5: Mitotracker-Orange 1 hora.